

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Jovana N. Kovačević

**FARMACEUTSKI RAZVOJ
GASTROREZISTENTNIH PELETA PRIMENOM
KONCEPTA DIZAJNA KVALITETA I TEHNIKA
VEŠTAČKE INTELIGENCIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Jovana N. Kovačević

**PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT
OF ENTERIC-COATED PELLETS BY
APPLICATION OF QUALITY BY DESIGN
CONCEPT AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE
TECHNIQUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentor:

Dr sc Svetlana Ibrić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski
fakultet

Članovi komisije:

Dr sc Jelena Đuriš, docent, Univerzitet u
Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc Tijana Miletić, naučni saradnik,
Hemofarm a.d. Vršac

Doc dr Aleksandar Kovačević, Fakultet
tehničkih nauka, Univerzitet u Novom
Sadu

Prof dr Peter Kleinebudde, redovni
profesor, Institut za farmaciju i
biofarmaciju, Hajnrih Hajne univerzitet u
Dizeldorfu

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija je urađena u Službi Razvoja Hemofarma A.D. u Vršcu i na Institutu za farmaciju i biofarmaciju Hajnrih Hajne Univerziteta u Dizeldorfu.

Posebno želim da se zahvalim prof. dr Svetlani Ibrić pod čijim rukovodstvom je izrađena ova disertacija na nesebičnoj pomoći, savetima i ohrabrenjima koje mi je pružila tokom svih faza eksperimentalnog rada i izrade doktorske disertacije.

Želim da izrazim veliku zahvalnost prof. dr Peter Kleinebudde na pruženoj mogućnosti da deo eksperimentalnog rada ove disertacije obavim na Institutu za farmaciju i biofarmaciju Univerziteta Hajnrih Hajne u Dizeldorfu kao i na izuzetnoj stručnoj pomoći koju mi je pružio.

Zahvaljujem se dr Aleksandru Kovačeviću na korisnim sugestijama i pruženoj podršci prilikom pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Jeleni Đuriš na pruženoj podršci i savetima prilikom pisanja doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem dr Tijani Miletić i svim kolegama iz Službe Razvoja Hemofarma na pruženoj podršci, saradnji i razumevanju.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici koja mi je pružila beskrajnu ljubav i podršku na ovom putu.

Farmaceutski razvoj gastrorezistentnih peleta primenom koncepta dizajna kvaliteta i tehnika veštačke inteligencije

Sažetak

Cilj ovog istraživanja je postizanje višeg stepena znanja o proizvodnji gastrorezistentnih peleta i unapređenje farmaceutskog razvoja gastrorezistentnih peleta primenom koncepta dizajna kvaliteta i različitih tehnika veštačke inteligencije. Istraživanje se sastoji iz tri dela. U prvom delu istraživanja je postavljen ciljani profil kvaliteta gastrorezistentnih peleta kao međuproizvoda koji se koristi za punjenje tvrdih želatinskih kapsula i identifikovani su njegovi kritični atributi kvaliteta. Tehnikom preliminarne analize opasnosti izvršena je analiza rizika za ispitivanje uticaja različitih tehnika proizvodnje peleta na kritične attribute kvaliteta gastrorezistentnih peleta sa duloksetin hidrohloridom kao model supstancom. Ispitane su sledeće tehnike oblaganja inaktivnih peleta duloksetin hidrohloridom: oblaganje peleta praškom (suvo oblaganje), oblaganje aktivnom supstancom iz rastvora i oblaganje iz supstancom. Tehnike oblaganja peleta gastrorezistentnim filmom koje su ispitane su: oblaganje praškom i oblaganje suspenzijom za oblaganje u kojoj je gastrorezistentni polimer rastvoren. Rezultati analize slika peleta sa optičkog mikroskopa i skenirajućeg elektronskog mikroskopa pokazale su da pelete proizvedene tehnikom suvog oblaganja poseduju lošije morfološke karakteristike u odnosu na pelete proizvedene tehnikama u kojima je tečnost korišćena kao vehikulum za aktivnu supstancu jer doziranje praška na pelete nije tako uniformno kao doziranje tečnosti. Obe ispitane tehnike oblaganja peleta gastrorezistentnim filmom omogućile se postizanje specificirane gastrorezistencije od ne više od 10% oslobođenog duloksetina u kiseloj fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja. Za postizanje slične gastrorezistencije bio je potreban 20% veći nanos filma kada se film nanosio suvim oblaganjem zbog veće permeabilnosti ovog filma. Sve tri ispitane formulacije su pokazale potpuno oslobađanje duloksetima u fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja koja se izvodi u fosfatnom puferu pH 6.8, ali su postojale razlike u obliku kriva brzine rastvaranja između formulacija. Najsporije oslobađanje imala je formulacija proizvedena tehnikom suvog oblaganja što je uslovljeno prisustvom lipofilnog plastifikatora – ricinusovog ulja u formulaciji i većom debljinom gastrorezistentnog filma. Dugoročna stabilnost gastrorezistentnih peleta praćena je određivanjem sadržaja srodnih supstanci duloksetina nakon 12, 24 i 36 meseci čuvanja u ambijentalnim uslovima. Nakon 36 meseci, u formulaciji proizvedenoj tehnikom oblaganja rastvorenog duloksetina zabeležen je sadržaj degradacionog proizvoda 1-naftol od 0.57% što je iznad gornje dozvoljene granice za specificirane identifikovane nečistoće od 0.2%. Porast proizvoda hidrolize duloksetina je uzrokovan prisustvom amorfne duloksetina u ovoj formulaciji čiji je nastanak u toku proizvodnog procesa dokazan DSC analizama u drugom delu istraživanja.

Cilj drugog dela istraživanja je ispitivanje uticaja formulacijskih i procesnih parametara oblaganja peleta aktivnom supstancom na efikasnost procesa i koristan prinos proizvodnog procesa i definisanje prostora za dizajn u kome je omogućeno istovremeno postizanje postavljenih kriterijuma za izlaze koji su praćeni. U skrining fazi je korišćenjem frakcionog faktorijalnog dizajna tipa 2^{8-4} ispitana uticaj karakteristika formulacije i parametara proizvodnog procesa na efikasnost i koristan prinos procesa oblaganja peleta duloksetin hidrohloridom. Rezultati skrining faze su objašnjeni DSC analizama koje su pokazale da u toku oblaganja peleta rastvorenim

duloksetin hidrohloridom nastaje amorfni duloksetin sa temperaturom bliskoj temperaturama proizvoda u toku procesa proizvodnje. U fazi optimizacije pomoću centralnog kompozitnog dizajna i metodologije površine odgovora ispitan je uticaj udela hidroksipropil metilceluloze 6 cp i koncentracije suvih supstancu na efikasnost procesa, koristan prinos, viskozitet suspenzije za oblaganje i trajanje proizvodnog procesa. Razvijeni su statistički značajni modeli (p -vrednost <0.05) drugog reda sa sledećim koeficijentima determinacije R^2 : za efikasnost procesa $R^2 = 0.9571$, za koristan prinos $R^2 = 0.9851$, za viskozitet suspenzije za oblaganje $R^2 = 0.9928$ i za vreme trajanja procesa $R^2 = 0.9584$. Pomoću funkcije poželjnosti softvera za eksperimentalni dizajn definisan je opseg koncentracija suspenzije za oblaganje i udela hidroksipropil metilceluloze koji omogućavaju postizanje maksimalne moguće efikasnosti procesa i prinosa.

Treći deo istraživanja je imao za cilj da ispita mogućnost primene različitih soft computing tehnika veštačke inteligencije za razvijanje modela koji mogu da se koriste za predviđanje gastrozistencije i profila brzine rastvaranja duloksetina iz gastrozistentnih peleta u zavisnosti od karakteristika formulacije peleta. Oslobođanje duloksetina iz gastrozistentnih peleta je okarakterisano gastrozistencijom i profilom oslobođanja duloksetina koji je sadržao podatke o procentu oslobođenog duloksetina nakon: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 i 90 minuta. Za razvoj modela korišćeni su istorijski podaci dobijeni u probama izvedenim po principu proba – greška. Ispitane su tehnike: multipla linearna regresija, stepwise regresija, grebenasta regresija, laso regresija, elastične mreže, regresiona stabla, ansambl regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting" i veštačke neuronske mreže. Elastična mreža je predvidela profile oslobođanja duloksetina sa najvišim faktorom sličnosti sa eksperimentalno dobijenim profilima oslobođanja (68.3 za formulaciju test 1 i 70.3 za formulaciju test 2. Međutim, one nemaju najniže vrednosti RMSE za sve tačke profila oslobođanja duloksetina te je zaključeno da se najbolja sličnost eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila oslobođanja postiže kombinovanjem tehnika koje su imale najniže vrednosti RMSE za pojedinačne tačke profila oslobođanja. Kombinovanjem ispitanih tehnika na ovaj način postiže se faktor sličnosti, $f_2 = 82.3$ za formulaciju test 1 i $f_2 = 74.6$ za formulaciju test 2. Razvijeni modeli mogu se koristiti prilikom planiranja budućih laboratorijskih proba ili se mogu koristiti u razvoju drugih proizvoda.

Ključne reči: gastrozistentne pelete, oblaganje, dizajn kvaliteta, soft computing, elastična mreža, modelovanje, profil oslobođanja, duloksetin hidrohlorid

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj: 615.014.2:[615.015.2/.3:001.891.54(043.3)

Pharmaceutical development of enteric-coated pellets by application of quality by design concept and artificial intelligence techniques

Abstract

The aim of this research was to enhance the knowledge of production of enteric-coated pellets and to improve the pharmaceutical development of enteric-coated pellets by using quality by design concept and different techniques of artificial intelligence. The research comprises three parts. In the first part of the research, quality target product profile of enteric-coated pellets, as an intermediate to be filled in hard gelatine capsules, was set and critical quality attributes were identified. Preliminary hazard analysis technique was applied for analyzing the risk of using different techniques of production of coated pellets with respect to critical quality attributes of enteric-coated pellets that contain duloxetine hydrochloride as a model substance. Following drug layering techniques were examined: powder layering, solution layering and suspension layering. Following enteric-coating techniques were examined: dry coating and spray coating of suspension containing dissolved enteric-coating polymer. Results of analyses of images made by optical microscope and scanning electron microscope showed that pellets produced by dry coating have worse morphological features in comparison with pellets whose production involved using liquid as a vehicle for transportation of drug to pellets because dosing of powder during the coating was not as uniform as the dosing of liquids. Both examined techniques of enteric-coating of pellets enabled achieving specified gastric-resistance of not more than 10% of duloxetine being released in the acid stage of the dissolution test. Owing to higher permeability of films obtained by dry coating, 20% higher weight gain of enteric-coating was required to achieve gastric-resistance that was similar to the gastric-resistance of spray coated pellets. All of the three examined formulation showed complete release of duloxetine in the buffer stage of the dissolution test, but there were differences in the shape of the release curves. Dry coated pellets showed the slowest release rate that was caused by the presence of lipophilic plasticizer – castor oil in the formulation and thickness of the enteric-coating. Long term stability of enteric-coated pellets was assessed on account of level of impurities in pellets after 12, 24 and 36 months. After 36 months, solution layered pellets contained 0.57% of 1-naphthol which was above the upper qualification limit for specified identified impurities of 0.2%. Increase in the level of this product of duloxetine hydrolysis was caused by the presence of amorphous duloxetine in this formulation which was confirmed by DSC analyses in the second part of the research.

The aim of the second part of the research was to evaluate effects of formulation characteristics and process parameters of drug layering process and to set the design space which allows for achieving all the criteria set for the predefined responses. Fractional factorial design 2^{8-4} was used in the screening phase to evaluate the effect of formulation and process factors on efficiency and useful yield of pellets layering by duloxetine hydrochloride. Some of the results of the screening phase were explained by DSC analyses that showed that during the solution layering process amorphous duloxetine is formed and that its T_g is close to the product temperature during the coating process. In the optimization phase, central composite design and the response surface methodology were employed to examine the effect of level of hypromellose 6 cp and level of dry substances in the coating suspension on coating efficiency, useful yield, viscosity of coating suspension and process time. Statistically significant second

order models (p -value <0.05) with following coefficients of determination R^2 : process efficiency $R^2 = 0.9571$, useful yield $R^2 = 0.9851$, viscosity of coating suspension $R^2 = 0.9928$ and process time $R^2 = 0.9584$, were obtained. Desirability function of experimental design software was used to define the range of levels of hypromellose 6 cp and levels of solids in the coating suspension that enable attaining maximum possible process efficiency and useful yield.

The aim of the third part of the reasearch was to examine the possibility of application of soft computing artificial intelligence techniques to develop models for predicting gastric-resistance and release profile of duloxetine with respect to characteristic of formulation of enteric-coated pellets. The release of duloxetine from enteric-coated pellets was characterized by gastric-resistance and percent of duloxetine released after 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 and 90 minutes of dissolution test. Historical data obtained in laboratory trials conducted according to trial and error concept were used. Techniques evaluated in this part of the research were: multiple linear regression, stepwise regression, ridge regression, lasso regression, elastic net, regression trees, ensemble of regression trees obtained by "boosting" technique and artificial neural networks. Models developed by the elastic net predicted release profiles of duloxetine that had the greatest similarity factor, f_2 , with experimentally obtained profiles ($f_2=68.3$ for the formulation test 1 and $f_2=70.3$ for the formulation test 2). However, RMSE values for single points of release profile were not the lowest for the elastic net models for all the points of the profile. It was, therefore, concluded that the greatest similarity between experimentally obtained and predicted release profiles would be achieved if techniques with the lowest RMSE values for single points of release profiles would be combined. By combining different techniques to predict single values of release profile similarity factor of experimentally obtained and predicted profiles increased to $f_2 = 82.3$ for formulation test 1 and $f_2 = 74.6$ for formulation test 2. Developed models can be used when planning future laboratory trials or they can be used in the development of other products.

Key words: enteric-coated pellets, coating techniques, quality by design, soft computing, elastic net, modelling, release profile, duloxetine hydrochloride

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number: 615.014.2:[615.015.2/.3:001.891.54(043.3)

S a d r Ź a j

1.0	OPŠTI DEO	1
1.1	Pelete – karakteristike, primena u farmaciji i tehnike proizvodnje	1
1.1.1	Oblaganje peleta rastvorenom ili suspendovanom aktivnom supstancom	3
1.1.2	Nanošenje aktivne supstance na pelete tehnikom oblaganja praškovima.....	5
1.1.3	Oblaganje peleta gastrozistentnim filmovima	6
1.1.4	Gastrozistentni filmovi dobijeni iz rastvora polimera	7
1.1.5	Gastrozistentni filmovi nastali iz polimernih disperzija.....	8
1.1.6	Gastrozistentni filmovi dobijeni tehnikom suvog oblaganja.....	9
1.1.7	Proizvodna oprema za oblaganje peleta	10
1.2	Pristupi za postizanje višeg stepena znanja o proizvodu i procesu u toku razvoja proizvoda ..	13
1.2.1	Koncept dizajna kvaliteta u razvoju farmaceutskih proizvoda.....	14
1.2.2	Analiza rizika	16
1.2.3	Eksplozivni dizajn.....	17
1.2.3.1	Faza skrininga uz korišćenje dizajna prvog reda.....	18
1.2.3.2	Optimizacija primenom metodologije površine odgovora	21
1.2.4	Modelovanje primenom tehnika veštačke inteligencije	24
1.2.5	Istraživanje i analize podataka	24
1.2.5.1	Metode koje se primenjuju u rešavanju regresionih problema	27
1.2.5.2	Veštačke neuronske mreže	34
1.2.5.3	Procena kvaliteta modela	37
2.0	CILJ ISTRAŽIVANJA	38
3.0	PRVI DEO ISTRAŽIVANJA	39
3.1	Uvod	39
3.1.1	Fizičko-hemijske karakteristike duloksetin-hidrohlorida	39
3.1.2	Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (CPK)	41
3.1.3	Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda	42
3.1.4	Definisanje potencijalno kritičnih atributa kvaliteta polaznih materijala i procesnih parametara.....	45
3.1.4.1	Analiza rizika za attribute kvaliteta duloksetin hidrohlorida.....	45
3.1.4.2	Analiza rizika za različite tehnike nanošenje aktivne supstance	46
3.1.4.3	Odabir ekscipijena za fazu nanošenja aktivne supstance na pelete.....	47
3.1.4.4	Nanošenje izolacionog sloja na pelete obložene aktivnom supstancom.....	49
3.1.4.5	Analiza rizika za tehnike nanošenja gastrozistentnog filma.....	49
3.1.4.6	Odabir ekscipijena za fazu nanošenja gastrozistentnog filma.....	50
3.2	Materijali i metode	51
3.2.1	Materijali	51
3.2.2	Metode	51
3.2.2.1	Proizvodnja obloženih peleta	51
3.2.2.2	Karakterizacija obloženih peleta	58
3.3	Rezultati i diskusija	63
3.3.1	Priprema peleta obloženih aktivnom supstancom	63
3.3.2	Priprema peleta obloženih izolacionom slojem.....	79
3.3.3	Priprema peleta obloženih gastrozistentnim filmom.....	83

3.3.4	Dugoročna stabilnost gastrorezistentnih peleta	88
4.0	DRUGI DEO ISTRAŽIVANJA.....	92
4.1	Uvod.....	92
4.1.1	Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda.....	92
4.1.2	Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda	93
4.1.3	Analiza rizika uticaja ekscipijenasa na efikasnost procesa i koristan prinos.....	95
4.1.4	Odabir ekscipijenasa	96
4.1.5	Analiza rizika za procesne parametre oblaganja peleta model supstancom	97
4.2	Materijali i metode	98
4.2.1	Materijali.....	98
4.2.2	Metode	98
4.2.2.1	Priprema peleta obloženih model supstancom	98
4.2.2.2	Kvantifikovanje efikasnosti procesa oblaganja i korisnog prinosa	99
4.2.2.3	Viskozitet tečnosti za oblaganje.....	99
4.2.2.4	Priprema slobodnih filmova	99
4.2.2.5	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	100
4.2.2.6	Proizvodnja amorfnog model supstance tehnikom sušenja raspršivanjem	100
4.2.2.7	Dizajn eksperimenata	101
4.3	Rezultati i diskusija	104
4.3.1	Skrining studija	104
4.3.2	Optimizaciona studija (Metodologija površine odgovora).....	112
5.0	TREĆI DEO ISTRAŽIVANJA	120
5.1	Uvod.....	120
5.1.1	Analiza rizika za formulacijske karakteristike gastrorezistentnih peleta.....	120
5.1.2	Modelovanje oslobađanja duloksetina iz gastrorezistentnih peleta.....	122
5.1.3	Ekscipijensi	122
5.2	Materijali i metode	123
5.2.1	Materijali.....	123
5.2.2	Metode	123
5.2.2.1	Proizvodnja gastrorezistentnih peleta.....	123
5.2.2.2	Gastrorezistencija i profil brzine rastvaranja.....	124
5.2.2.3	Set podataka	124
5.2.2.4	Metode modelovanja oslobađanja duloksetina iz gastrorezistentnih peleta	126
5.2.2.5	Evaluacija modela	127
5.2.3	Rezultati i diskusija	130
5.2.3.1	Modelovanje oslobađanja gastrorezistentnih peleta primenom multiple linearne regresije	130
5.2.3.2	Modelovanje oslobađanja gastrorezistentnih peleta primenom tehnike stepwise regresije.....	133
5.2.3.3	Modelovanje oslobađanja gastrorezistentnih peleta primenom tehnike laso regresije	135
5.2.3.4	Modelovanje oslobađanja tehnikom grebenaste regresije	136
5.2.3.5	Modelovanje oslobađanja tehnikom elastičnih mreža	139
5.2.3.6	Modelovanje oslobađanja tehnikom regresionih stabala	140
5.2.3.7	Modelovanje oslobađanja ansamblom regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting"	144
5.2.3.8	Modelovanje oslobađanja gastrorezistentnih peleta primenom veštačkih neuronskih mreža	145
6.0	ZAKLJUČAK	152
7.0	LITERATURA.....	158
8.0	BIOGRAFIJA AUTORA	164

1.0 Opšti deo

1.1 Pelete – karakteristike, primena u farmaciji i tehnike proizvodnje

U farmaciji, pelete se definišu kao protočne čestice sferičnog oblika, uske raspodele veličine čestica od 0.5 do 2 mm, u kojima je lekovita supstanca nanosena na površinu ili distribuirana kroz masu pelete (Heng i Wong, 2007; Porter i Ghebre-Sellassie, 1994). Nakon proizvodnje, pelete se mogu napuniti u tvrde želatinske ili HPMC kapsule, komprimovati u tablete, suspendovati u tečnostima ili spakovati u kesice (Bodmeier i Paeratakul, 1994).

Iako su pelete dugo u upotrebi u farmaciji, tek je sa razvojem prvih preparata sa kontrolisanim oslobađanjem krajem sedamdesetih godina prošlog veka shvaćeno koliko su velike prednosti peleta kao višestrukih farmaceutskih oblika (engl. *multiparticulate dosage forms*) u odnosu na pojedinačne farmaceutske oblike (engl. *monolithic dosage forms*) zbog fleksibilnosti koja postoji u razvoju formulacije ovakvih preparata i terapijske koristi za pacijenta. Fleksibilnost u dizajnu preparata zasnovanim na peletama sastoji se u tome što se različite doze preparata mogu proizvoditi od istih peleta, prostim menjanjem mase punjenja kapsule, tablete ili kesice. Dalje, pelete koje sadrže različite i/ili inkompatibilne lekovite supstance se mogu pomešati i na taj način se istovremeno isporučivati na iste ili različite lokacije u gastrointestinalnom traktu. Takođe se mogu pomešati i zajedno primeniti pelete koje sadrže istu lekovitu supstancu, ali sa različitim profilima brzine rastvaranja lekovite supstance i na taj način postići željeni profil oslobađanja lekovite supstance duž gastrointestinalnog trakta (Ghebre-Sellassie i Knoch, 2007).

Druga prednost farmaceutskih oblika zasnovanih na peletama, i svih višestrukih sistema uopšte, zasniva se na činjenici da bioraspoloživost lekovite supstance primenjene u ovakvim farmaceutskim oblicima ne zavisi u velikoj meri od pokretljivosti gastrointestinalnog trakta kao što je slučaj sa pojedinačnim farmaceutskim oblicima. Kada se rastvori tvrda želatinska kapsula napunjena peletama oslobode se stotine peleta koje su zbog svog malog prečnika sposobne da prođu kroz pilorični sfinkter čak i kada je on kontrahovan, a pelete se slobodno

raspoređuju duž gastrointestinalnog trakta čime se smanjuje efekat gastrointestinalnog motiliteta na bioraspoloživost (Bodmeier i Paeratakul, 1994).

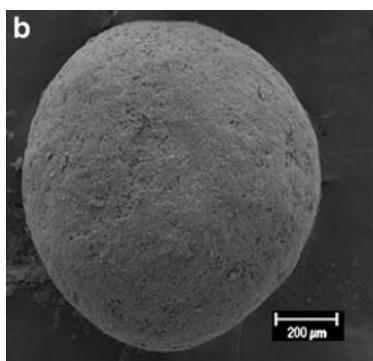
Verovatnoća pojavljivanja velikih oscilacija u oslobađanju doze (engl. *dose dumping*) je minimalna zato što je ukupna doza lekovite supstance raspoređena na mnogo peleta te i ako postoji nekoliko peleta koje su van specifikacije za brzinu oslobađanja lekovite supstance to nema uticaja na učinak farmaceutskog oblika u celini što ne bi bio slučaj sa pojedinačnim farmaceutskim oblicima. Komplijansa pacijenata je visoka pošto je sa ovakvim farmaceutskim oblicima moguće postići profile oslobađanja koji ne zahtevaju čestu primenu leka. Jedina prednost pojedinačnih lekovitih oblika u odnosu na višestručne je mogućnost postizanja većeg udela lekovite supstance u farmaceutskom obliku, mada ako se pelete proizvode tehnikom ekstruzije i sferonizacije ni to ne mora da bude problem (Lee i Yang, 2001; Shah, 2009).

Pelete se osim u proizvodnji preparata sa trenutnim oslobađanjem koriste u proizvodnji preparata sa odloženim, produženim, pulsanim i oslobađanjem specifičnim za odgovarajuću regiju gastrointestinalnog trakta. Aktivna supstanca se može naneti na pelete tehnikama oblaganja rastvorima, suspenzijama i praškovima ili se može inkorporirati u jezgro pelete nekom od tehnika direktne peletizacije kao što je ekstruzija i sferonizacija. Tehnika ekstruzije i sferonizacije takođe omogućava i proizvodnju matriks peleta sa produženim oslobađanjem u jednom koraku bez potrebe za dodatnim oblaganjem. U slučaju da se pelete koje sadrže aktivnu supstancu oblažu funkcionalnim filmom mogu se primeniti tehnike oblaganja rastvorenim ili suspendovanim funkcionalnim polimerom ili oblaganje praškovima. Optimalna tehnika nanošenja aktivne supstance, odnosno funkcionalnog filma bira se na osnovu fizičko-hemijskih osobina leka i gotovog proizvoda. Koja god tehnika oblaganja peleta da se koristi, cilj proizvodnog procesa je da broj peleta u proizvodnoj šarži bude isti na početku i na kraju procesa, ali da prečnik peleta bude povećan, a njihova površina glatka što ih čini pogodnim za dalje oblaganje (Ghebre-Sellasie i Knoch, 2007).

Razumevanje veza između promene formulacijskih i procesnih parametara oblaganja peleta i fizičko-hemijskih osobina gotovog proizvoda posebno je važno u proizvodnji čvrstih doziranih oblika koja ima za cilj obezbeđenje predviđanja i kontrole performansi preparata.

1.1.1 Oblaganje peleta rastvorenom ili suspendovanom aktivnom supstancom

Ove tehnike nanošenja aktivne supstance na pelete primenjuju se onda kada koncentracija lekovite supstance u peletama nije jako velika pošto proizvodnja visoko doznih preparata ovim tehnikama nije ekonomski isplativa. U sastav tečnosti za oblaganje osim aktivne supstance obično ulazi i vezivno sredstvo – polimer niske molekulske mase, koji ima ulogu da obezbedi adekvatnu adheziju lekovite supstance na inaktivne pelete i odgovarajuće mehaničke karakteristike tog sloja koje će da onemoguće gubitak aktivne supstance usled habanja peleta u toku procesa. U sastav tečnosti za oblaganje mogu ući i drugi ekscipijensi, ali se njihovo korišćenje izbegava ako je moguće jer se uvođenjem dodatnih ekscipijenasa u formulaciju snižava nivo aktivne supstance u tečnosti za oblaganje i time produžava trajanje procesa oblaganja. Ukoliko je aktivna supstanca rastvorena u tečnosti za oblaganje nije važno kolika je njena veličina čestica, međutim, ako je aktivna supstanca suspendovana poželjno je da bude mikronizirana pošto je za adekvatnu adheziju većih čestica potrebno više vezivnog sredstva, a jako krupne čestice aktivne supstance mogu da dovedu do stvaranje neravne površine peleta koja je krajnje nepoželjna u slučaju da se u narednim fazama proizvodnje na te pelete nanosi funkcionalni film (Ghebre-Sellassie i Knoch, 2007).



Slika 1. Pelete lansoprazola proizvedene oblaganjem suspenzijom (He i autori, 2010)

Figure 1. Lansoprazole pellets produced by suspension layering (He et al., 2010)

Ovi procesi proizvodnje peleta podrazumevaju korišćenje velikih količina rastvarača što može da dovede do fizičko-hemijskih promena aktivne supstance kao što su promena polimornog oblika ili nastanak amornog oblika (Lust i autori., 2013, Nikowitz i autori, 2013, Zhang i autori, 2003). Rastvaranje ili suspendovanje aktivne supstance u nekom rastvaraču povećava potencijal nastanka faznih prelaza usled rastvaranja ili po rastvaranjem posredovanom mehanizmu. Važno je napomenuti da

samo rastvorena frakcija lekovite supstance može da pretrpi promenu kristalnog oblika. U slučaju kada je aktivna supstanca rastvorena u rastvaraču, po uklanjanju rastvarača opet se izdvaja lekovita supstanca u čvrstom stanju. Međutim, taj izdvojeni čvrsti oblik ne mora da bude iste kristalne forme kao prvobitni oblik i može se sastojati od smeše različitih kristalnih oblika i amorfne forme. Mehanizam po kome se ova promena odigrala se označava kao mehanizam rastvaranja. Promena koja se dešava po ovom mehanizmu može biti od metastabilne u stabilnu fazu ili od stabilne faze u jednu ili više metastabilnih faza. Promene koje se odvijaju po rastvorom posredovanom mehanizmu samo mogu ići od metastabilnog do stabilnog oblika i posledica su razlike u rastvorljivosti između dve faze. Za razliku od mehanizma rastvaranja kod koga do promene čvrstog oblika dolazi u toku sušenja, ovaj mehanizam zahteva kontakt metastabilne faze i zasićenog rastvora. Tada se metastabilna faza rastvara u meri koja prevazilazi rastvorljivost stabilne faze usled čega dolazi do kristalisanja stabilne faze uz istovremeno rastvaranje metastabilne faze. (Zhang i autori, 2004). U poslednje vreme je prepoznat značaj karakterizacije i kontrole kristalnog oblika lekovite supstance u farmaceutskim preparatima jer različiti polimorfni oblici mogu imati različite fizičko-hemijske osobine, kao što su rastvorljivost, brzina rastvaranja, stabilnost, higroskopnost, ali i bioraspoloživost, efikasnost i toksičnost (Taday i autori, 2003, US Department of Human Services, FDA, 2004). Pored toga, promene polimorfnog oblika, odnosno nastanak amorfne supstance sa niskom temperaturom staklastog prelaza (T_g), mogu znatno da otežaju proces oblaganja peleta i smanje proizvodni prinos usled nastanka aglomerata, a zbog velike lepljivosti koja je karakteristična za supstance koje imaju nisku T_g (Roos i Silalai, 2011).

Već je spomenuto da je za obezbeđivanje odgovarajuće adhezije lekovite supstance za pelete u procesu oblaganja neophodno da tečnost za oblaganje sadrži i vezivno sredstvo u vidu odgovarajućeg polimera (Suhrenbrock i autori, 2011). S obzirom da su polimeri poznati inhibitori kristalizacije, prilikom raspršivanja rastvora koji sadrži polimer i lekovitu supstancu postoji rizik za prelazak lekovite supstance u amorfni oblik (Tajarobi i autori, 2011). Mogućnost pojave ovakvih promena zavisi od karakteristika aktivne supstance, formulacijskih karakteristika kao i parametara proizvodnog procesa (Zhao i autori, 2012; Zhang i autori, 2004). Iz navedenih razloga je važno da se u toku razvoja proizvoda kristalni oblik lekovite supstance odredi

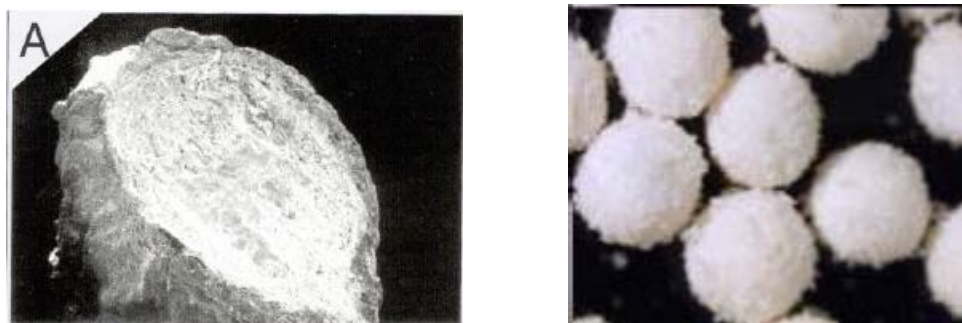
odgovarajućom metodom kao što je diferencijalna skenirajuća kalorimetrija, Raman spektroskopija ili difrakcija X zraka (Taylor i Zografi, 1998; Hao i autori, 2010).

1.1.2 Nanošenje aktivne supstance na pelete tehnikom oblaganja praškovima

Tehnika oblaganja inaktivnih peleta praškovima koji sadrže aktivnu supstancu podrazumeva raspršivanje rastvora vezivnog sredstva na pelete uz istovremeno ili naizmenično uvođenje praška koji sadrži aktivnu supstancu. U početnim fazama procesa čestice praška se vezuju za pelete zahvaljujući tečnim mostovima koji potiču od raspršenog rastvora vezivnog sredstva. Tečni mostovi bivaju zamenjeni čvrstim mostovima koji potiču od vezivnog sredstva ili bilo koje druge supstance koja je rastvorna u rastvaraču koji je korišćen za pripremu vezivnog sredstva. Za postizanje zadovoljavajuće efikasnosti procesa neophodno je da komponente praška budu mikronizirane. Međutim, mikronizacija u većini slučajeva negativno utiče na protočnost praška i onemogućava odgovarajuće doziranje praška u toku procesa. Iz tog razloga se u sastav praška koji se nanosi na pelete uključuje i sredstvo za klizanje, kao što su talk i koloidni silicijum-dioksid (Ghebre-Sellassie i Knoch, 2007; Nastruzzi i autori, 2000).

Na osnovu potencijala za fizičko-hemijske promene, za proizvodnju lekovitih preparata se obično bira najstabilniji kristalni oblik, kao i proces proizvodnje koji nosi najmanji rizik za nastanak polimorfnih prelaza, a kristalni oblik lekovite supstance se u fazi razvoja kontroliše odgovarajućom metodom (US Department of Human Services, FDA, 2007). U slučaju da u toku roka trajanja preparata ipak dolazi do promene kristalnog oblika lekovite supstance potrebno je dokazati biološku ekvivalentnost preparata na početku i na kraju roka trajanja (EMEA, 2011). U tom smislu, tehnika oblaganja inaktivnih peleta praškovima nosi manji rizik za promenu polimorfnog oblika lekovite supstance u odnosu na proces koji podrazumeva nanošenje suspendovane ili rastvorene lekovite supstance zato što podrazumeva korišćenje znatno manjih količina rastvarača (Zhang et al, 2004). U toku procesa proizvodnje nije potrebno ukloniti velike količine rastvarača tako da oblaganje peleta praškovima traje kraće u odnosu na procese koje koriste tečnost kao vehikulum za nanošenje aktivne supstance. S druge strane, površina peleta proizvedenih ovom tehnikom nije tako glatka kao što je to slučaj sa peletama koje su proizvedene

oblaganjem tečnošću za oblaganje što može da oteža kasnije oblaganje ovakvih peleta funkcionalnim filmom jer je potrebna veća debljina filma da bi se postigla njegova funkcionalnost (Nastruzzi i autori, 2000; Zhang i autori, 2004).



Slika 2. levo: pelete ibuprofena proizvedene tehnikom suvog oblaganja (Nastruzzi i autori, 2000); desno: pelete lansoprazola proizvedene tehnikom suvog oblaganja (Young i autori, 2006)

Figure 2. left: ibuprofen pellets produced by powder layering (Nastruzzi et al., 2000); right: lansoprazole pellets produced by powder layering (Young et al., 2006)

1.1.3 Oblaganje peleta gastrozistentnim filmovima

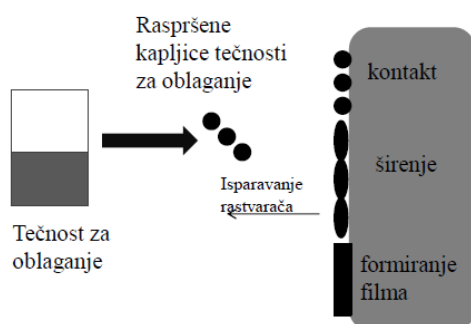
Preparati sa modifikovanim oslobađanjem oslobađaju lekovitu supstancu drugačijom brzinom i/ili na drugačijoj lokaciji gastrointestinalnog trakta nego preparati sa trenutnim oslobađanjem i dele se na tri glavne grupe: preparate sa produženim oslobađanjem, preparate sa odloženim oslobađanjem i preparate sa višefaznim oslobađanjem. Gastrozistentni preparati pripadaju grupi preparata sa odloženim oslobađanjem i zahvaljujući gastrozistentnom filmu ostaju intaktni u kiselj sredini želuca. Gastrozistentni film se brzo rastvarara u uslovima koji vladaju u duodenumu i tako omogućava oslobađanje aktivne supstance. Razlozi za oblaganje preparata gastrozistentnim filmom su brojni: prevencija degradacije leka od strane želučanih enzima ili kisele pH u želucu, sprečavanje iritacije gastične mukoze od strane lekovite supstance, isporučivanje leka na mesto lokalnog delovanja u tankom crevu, odlaganje delovanja leka, isporučivanje leka u najvećoj mogućoj koncentraciji na mesto na kome se najbolje apsorbuje. Gastrozistencija preparata postiže se oblaganjem preparata polimerom koji sadrži slobodnu karboksilnu grupu koja može da jonizuje. Ravnoteža između nejonizovanog, nerastvornog polimera i jonizovanog, rastvornog polimera zavisi od pH medijuma i pK_a polimera. Odnos koncentracija između nejonizovanog i jonizovanog polimera na određenoj pH vrednosti medijuma može se izračunati pomoću Henderson-Hasselbach-ove jednačine:

$$pH - pK_a = \log \frac{[\text{jonizovani oblik}]}{[\text{nejonizovani oblik}]} \quad (1)$$

Razne formulacijske karakteristike gastrozistentnog filma mogu, međutim, da zakomplikuju ovu pojednostavljenu sliku pH zavisnog rastvaranja gastrozistentnog polimera. Tako će, na primer, prisustvo plastifikatora ili pigmenata znatno uticati na mehaničke karakteristike, odnosno permeabilnost filma (Hogan, 1995).

1.1.4 Gastrozistentni filmovi dobijeni iz rastvora polimera

Mehanizam formiranja filma iz rastvora gastrozistentnog polimera je prilično jednostavan proces pošto su lanci rastvorenog polimera međusobno jako izmešani i prakazan je na Slici 3. U toku procesa oblaganja, raspršene kapljice tečnosti za oblaganje dolaze u kontakt sa supstratom (peletama), šire se po njegovoj površini, a usled isparavanja rastvarača polimerni lanci se prepliću i prelaze iz sol u gel stanje i konačno formiraju homogen film sa velikim stepenom isprepletanosti polimernih lanaca (Felton, 2013).



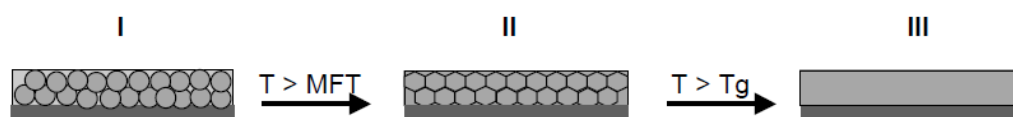
Slika 3. Šematski prikaz formiranja filma (Felton, 2013)

Figure 3. Overview of film formation process (Felton, 2013)

Gastrozistentni polimeri nisu rastvorljivi u vodi te je za njihovo rastvaranje potrebno koristiti organske rastvarače ili ih prevesti u rastvoran oblik dodavanjem baznih supstanci u vodeni medijum. Agensi koji se najčešće koriste za neutralizaciju prilikom pripreme vodenih rastvora gastrozistentnih polimera su: amonijak, natrijum-hidroksid, trietanolamin i amonijum hidrogen karbonat (Miller i McGinity, 2008).

1.1.5 Gastrozistentni filmovi nastali iz polimernih disperzija

U nekoliko poslednjih decenija tehnologija oblaganja filmovima za modifikovano oslobađanje lekovite supstance se usmerila od organskih rastvora funkcionalnih polimera ka vodenim disperzijama funkcionalnih polimera u cilju smanjenja upotrebe skupih, toksičnih i zapaljivih organskih rastvarača. Mehanizam formiranja filma iz vodenih disperzija je drugačiji nego u slučaju kada se film formira iz rastvora polimera jer podrazumeva sjedinjavanje pojedinačnih polimernih sfera i međusobno umetanje polimernih lanaca da bi se dobio kontinuirani film. Formiranje filma iz ovakvih disperzija podrazumeva više faza (Slika 4): fino raspršene kapi disperzije za oblaganje udaraju o supstrat i u fazi I, isparavanje vode dovodi do nastanka površinskog napona i kapilarnih sila usled kojih se čestice polimera gusto pakuju, a potom u fazi II, deformišu da bi ispunile prazan prostor koji je nastao usled isparavanja vode. Temperatura na kojoj dolazi do formiranja glatkog transparentnog filma je označena kao minimalna temperatura formiranja filma i procese oblaganja polimernim disperzijama je potrebno voditi na temperaturama višim od nje. Većina polimera zahteva fazu III - dodatni korak sušenja nakon oblaganja koji se označava kao sazrevanje (engl. *curing*). Ono se izvodi na temperaturama višim od temperature staklastog prelaza polimera (T_g) na kojoj polimer prelazi iz staklastog u viskoelastično stanje u kome je pokretljivost polimernih lanaca mnogo veća. Usled veće pokretljivosti polimernih lanaca, u fazi sazrevanja dolazi do potpune koalscencije filma zbog međusobnog preplitanja lanaca susednih čestica polimera te nestanka granica između pojedinačnih čestica polimera (Felton i autori, 2008).



Slika 4. Formiranje filma iz vodenih disperzija polimera (Kablitz, 2007)

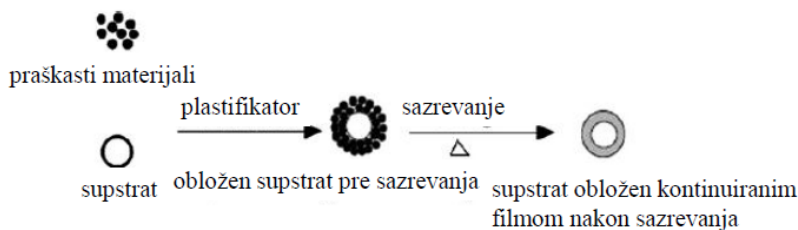
Figure 4. Film formation from aqueous polymer dispersions (Kablitz, 2007)

Korišćenje vodenih disperzija za oblaganja podrazumeva uklanjanje velikih količina vode u toku procesa što zahteva mnogo energije i produžava, odnosno poskupljuje proces. Zapušavanje mlaznice za raspršivanje tečnosti za oblaganje je čest problem u radu sa vodenim disperzijama polimera što znatno otežava proces tako da se za polimer hidroksipropilmetil celulozu acetat sukcinat preporučuje korišćenje

posebnih mlaznica dizajniranih da preveniraju prevremenu aglomeraciju polimera (Kablitz, 2007).

1.1.6 Gastrozistentni filmovi dobijeni tehnikom suvog oblaganja

Tehnika nanošenja gastrozistentnog filma suvim oblaganjem podrazumeva oblaganje supstrata praškastim polimerom uz naizmenično ili istovremeno raspršivanje jednog ili više tečnih plastifikatora. U prvoj fazi procesa se obezbeđuje adhezija čestica polimera za supstrat dok se funkcionalnost filma obezbeđuje u drugoj fazi procesa – sazrevanju (Slika 5). Adhezija u prvoj fazi se postiže zahvajući prisustvu plastifikatora. Plastifikator ima ulogu promotera adhezije čestica polimera za supstrat i za druge čestice polimera jer ih kvasi i stvara tečne mostove među njima. On snižava T_g polimera, omekšava njegovu površinu, čineći je lepljivom te i na taj način utiče na adheziju. Kapilarne sile potpomažu adheziju dokle god plastifikator u potpunosti ne prodre u polimer. Da bi se produžilo trajanje dejstva kapilarnih sila plastifikatoru se dodaju supstance koje usporavaju prodiranje plastifikatora u polimer. Kada prestane dejstvo kapilarnih sila Van der Waals-ove i elektrostatičke sile postaju važne. Na kraju ove faze film nije funkcionalan, odnosno ne zadovoljava farmakopejske zahteve za gastrozistenciju (Kablitz i autori, 2008). Funkcionalnost filma se postiže u fazi sazrevanja filma kada se na povišenim temperaturama bliskim temperaturi staklastog prelaza filma postiže potpuna koalescencija filma usled međusobnog uklapanja lanaca različitih polimernih čestica i nestanka granica između čestica. Važno je napomenuti da na datoj temperaturi dolazi do potpune koalescencije čestica polimera samo do određene veličine čestica polimera (Pearnchob i Bodmeier, 2003). Nekoliko autora je potvrdilo da je za postizanje gastrozistencije ovom tehnikom potreban veći nanos gastrozistentnog polimera nego ako se polimer nanosi u formi rastvora ili disperzije tako da se prednost tehnike suvog oblaganja u odnosu na njih sastoji u kraćem vremenu trajanja procesa i izbegavanju korišćenja vode koja može da naruši stabilnost aktivne supstance ili organskih rastvarača koji mogu biti toksični za operatere i zagaditi životnu sredinu (Obara i autori, 1999; Pearnchob i Bodmeier, 2003).



Slika 5. Formiranje filma nanesenog tehnikom suvog oblaganja (Kablitiz, 2007)
 Figure 5. Formation of film applied by dry coating technique (Kablitiz, 2007)

1.1.7 Proizvodna oprema za oblaganje peleta

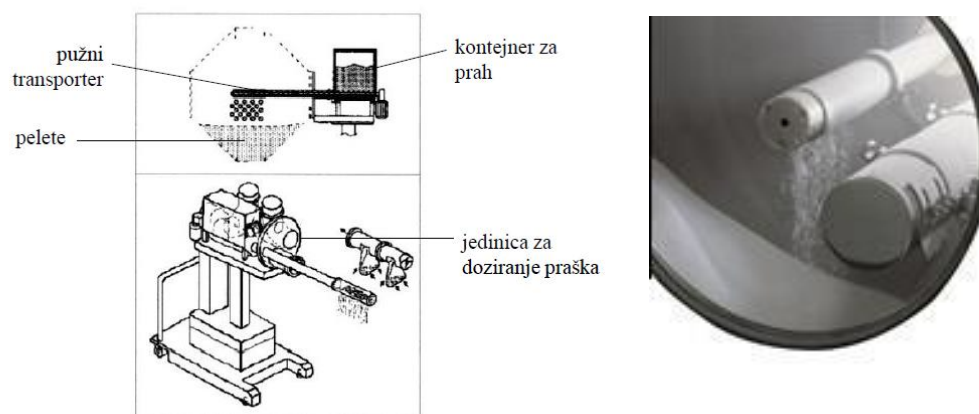
Oblaganje peleta može da se izvodi u konvencionalnim uređajima za oblaganje (Slika 6) kao i u uređajima sa fluidizirajućim kretanjem vazduha. Efikasnost procesa i kvalitet proizvedenih peleta će delom zavisiti i od opreme koja se koristi za proizvodnju (Ghebre-Sellassie i Knoch, 2007). Konvencionalni uređaji za oblaganje koji su opisani u literaturi da su korišćeni za oblaganje peleta su uređaji sa imerzionim mačevima. Za oblaganje peleta koriste se posebni imerzioni mačevi (drugačiji od onih koji se koriste za oblaganje tableta) kroz koje se vazduh za sušenje uvodi u masu peleta u uređaju. Ovakva konfiguracija uređaja se može koristiti za oblaganje peleta rastvorima i suspenzijama.



Slika 6. Oblaganje peleta rastvorima i suspenzijama u konvencionalnom uređaju za oblaganje sa imerzionim mačevima (IMA, 2016)
 Figure 6. Spray coating of pellets in a conventional coating machine with immersion swords (IMA, 2016)

Za oblaganje peleta praškom postoji poseban dodatak u vidu sistema za doziranje praška koji je prikazan na Slici 7. Nanošenje praška na pelete u ovom tipu proizvodne opreme se izvodi u ciklusima. Jedan ciklus sastoji se od pet faza: raspršivanje sredstva koje će da obezbedi adheziju praška na pelete, pauza koja obezbeđuje homogenizaciju nakvašenih peleta, doziranje praška, pauza za homogenizaciju peleta i sušenje koje je jedina faza ciklusa kada su imerzioni mačevi uronjeni u pelete. Ciklusi se ponavljaju dokle god se na pelete ne nanese predviđena količina praška. Proces je u potpunosti

automatizovan i kontroliše se preko digitalnog kontrolnog panela (Nastruzzi i autori 2000).



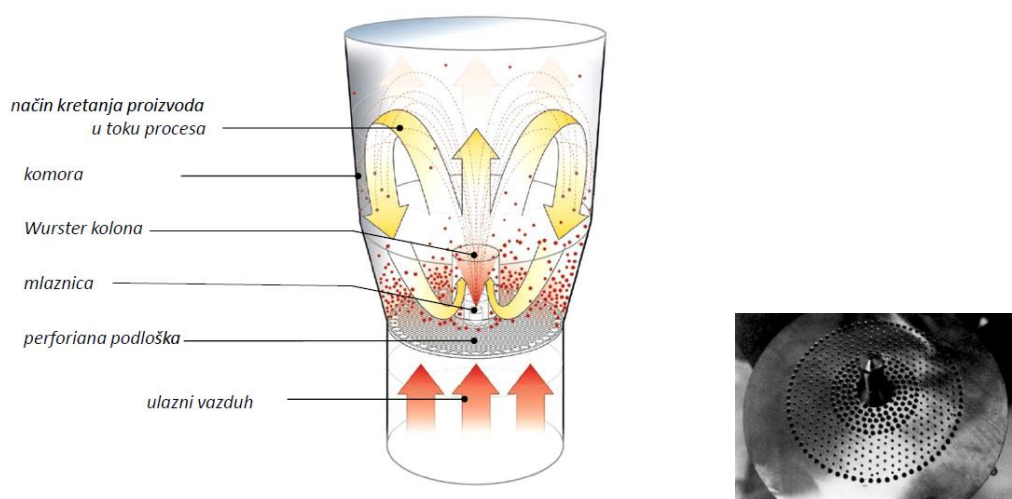
Slika 7. levo: Šematski prikaz sistema za oblaganje peleta prahom (Nastruzzi i autori, 2000); desno: oblaganje peleta praškom (IMA, 2016)

Figure 7. left: Overview of dry coating system in a conventional pan with immersion swords; right: dry coating of pellets (IMA, 2016)

Nedostatak konvencionalnih uređaja za oblaganje je manji kapacitet sušenja usled čega procesi oblaganja u ovom tipu uređaja traju duže nego kada se za proizvodnju koriste uređaji sa fluidizirajućim kretanjem vazduha. Dodatno, zbog načina kretanja peleta u konvencionalnim uređajima lakše dolazi do nepoželjne aglomeracije nego u uređajima sa fluidizirajućim kretanjem vazduha usled čega se procesi izvode na manjim protocima tečnosti za oblaganje te traju duže nego što je slučaj sa uređajima sa fluidizirajućim kretanjem vazduha.

Postoji više tipova uređaja sa fluidizirajućim kretanjem vazduha koji se koriste za oblaganje peleta. Jedan od najpoznatijih je Wurster uređaj koji je prikazan na Slici 8. On se razlikuje od ostalih uređaja sa fluidizirajućim kretanjem vazduha po prisustvu jedne ili više cilindričnih particija tzv. Wurster kolona u komori u kojoj se nalazi proizvod kao i po specifičnom dizajnu podloške kroz koju vazduh ulazi u komoru. Između kolone i podloške postoji prazan prostor. Mlaznica za raspršivanje tečnosti za oblaganje se nalazi na dnu uređaja tako da se proizvod u komori i raspršena tečnost za oblaganje kreću u istom smeru. Perforacije na podlošci na kojoj se nalaze pelete su dizajnirane tako da najveći deo ulaznog vazduha velikom brzinom ulazi u kontejner u regionu oko mlaznice za raspršivanje tečnosti za oblaganje, odnosno prolazi kroz Wurster kolonu noseći sa sobom i pelete koje se oblažu. Pelete bivaju obložene raspršenom tečnošću za oblaganje, a njihovo kretanje naviše biva potpomognuto i

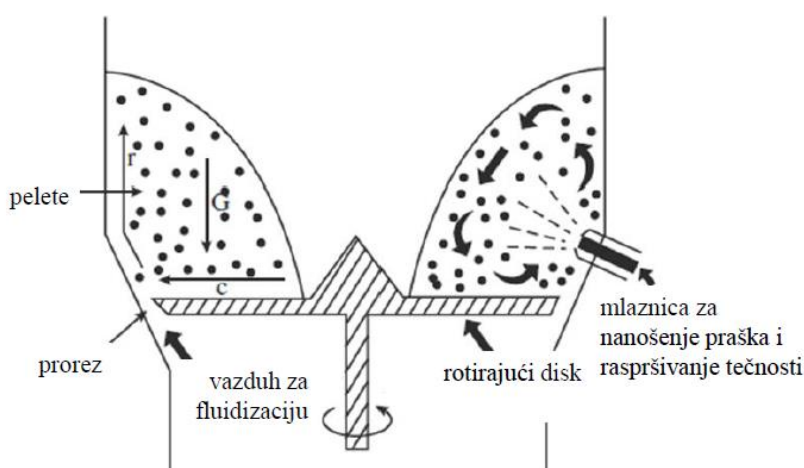
vazduhom za atomizaciju. Po izlasku iz kolone pelete ulaze u prošireni deo komore u kome brzina ulaznog vazduha pada na vrednost nižu od minimalne fluidizirajuće brzine tako da se pelete još neko vreme kreću naviše dok ne počnu da padaju ka delu komore izvan kolone. Perforacije na podlošci su u ovom delu manjeg prečnika i manje gustine nego u delu unutar kolone tako da je brzina vazduha u ovom delu uređaja manja od minimalne fluidizirajuće brzine. Ovaj vazduh koji se kreće u pravcu suprotnom od kretanja peleta omogućava da se pelete po izlasku iz kolone nežno spuste na podlošku. Tada, usled velikih brzina vazduha u regionu oko mlaznice i neposredno ispod kolone, bivaju usisane kroz otvor između podloške i kolone unutar kolone. Ovakav način kretanja proizvoda u uređaju se označava kao cirkulišuće fluidizirajuće kretanje. Ova tehnika oblaganja omogućava uniformno nanošenje filma na pelete i ima veliku primenu u oblaganju peleta rastvorima i suspenzijama (Christensen i Bertelsen, 1997). U literaturi postoje podaci da je laboratorijska oprema ovog tipa korišćena za oblaganje praškovima, ali generalno ovaj tip opreme se ne koristi za oblaganje peleta praškovima (Pearnchob i Bodmeier, 2003; Ghebre-Sellassie i Knoch, 2007).



Slika 8. levo: Šematski prikaz uređaja sa fluidizirajućim kretanjem vazduha sa Wurster kolonom; desno: perforirana podloška sa mlaznicom za raspršivanje (Glatt, 2006)
 Figure 8. left: Overview of fluid-bed device equipped with Wurster insert; right: perforated bottom plate with spraying nozzle (Glatt, 2006)

Za oblaganje peleta praškovima se mogu koristiti uređaji koji spadaju u grupu centrifugalnih granulatora sa fluidizirajućim kretanjem vazduha. U uređaju koji se zove rotor procesor i koji je prikazan na Slici 9, tečnost koja omogućava adheziju praha na pelete prska tangencijalno na i paralelno sa kretanjem peleta. Mlaznica je posebno dizajnirana tako da omogućava istovremeno nanošenje tečnosti i praha na

pelete i ulazi u kontejner kroz zid suda pri dnu uređaja, tako da je u toku procesa uronjena u pelete usled čega su gubici u procesu minimalni. Podloška na kojoj se nalaze pelete nije perforirana i naziva se još i rotirajući disk. Ona nije pričvršćena za zid kontejnera i u toku procesa rotira stvarajući tako centrifugalnu silu koja gura pelete ka zidu uređaja. Vazduh za fluidizaciju ulazi u komoru uređaja kroz prorez između ivice diska i zida komore i diže pelete do proširenog dela komore u kome one gube brzinu i pod dejstvom sile gravitacije padaju na centralni deo diska. Pri adekvatno podešenim procesnim parametrima, pelete imaju spiralan način kretanja koji obezbeđuje jako dobro mešanje peleta i uniforman nanos obloge (Ghebre-Sellasie i Knoch, 2007).



Slika 9. Šematski prikaz rotor procesora (Ghebre-Sellasie i Knoch, 2007)

Figure 9. Schematic overview of rotor processor (Ghebre-Sellasie and Knoch, 2007)

U literaturi je opisano i suvo oblaganje peleta u modifikovanim uređajima tipa sferonizera. Modifikacija se sastoji u tome što je standardnom uređaju pridodat sistem za raspršivanje tečnosti i sistem za doziranje praška. Po završetku procesa oblaganja pelete se vade iz uređaja i suše u komornoj sušnici ili sušnici sa fluidizirajućim kretanjem vazduha (Cao i autori, 2012).

1.2 Pristupi za postizanje višeg stepena znanja o proizvodu i procesu u toku razvoja proizvoda

U toku razvoja farmaceutskog proizvoda potrebno je steći što više znanja o proizvodu i proizvodnom procesu. To znanje se koristi u sledećim fazama životnog ciklusa proizvoda, a može da se primeni i u razvoju drugih proizvoda. Jedan pristup ka postizanju boljeg poznavanja proizvoda i procesa je primena koncepta dizajna

kvaliteta, odnosno eksperimentalnog dizajna i analize rizika kao njegovih glavnih alatki. Drugi pristup bi bila primena tehnika veštačke inteligencije koje se od eksperimentalnog dizajna razlikuju, pre svega, po načinu na koji su podaci u fazi razvoja prikupljeni (Ronowicz i autori, 2015).

1.2.1 Koncept dizajna kvaliteta u razvoju farmaceutskih proizvoda

Koncept dizajna kvaliteta, (engl. *Quality by design - QbD*), definisan u smernicama ICH Q8 („Farmaceutski razvoj“), Q9 („Upravljanje rizicima kvaliteta“) i Q10 („Farmaceutski sistem kvaliteta“) se može opisati kao sistematičan, naučno zasnovan, holistički i proaktivan pristup farmaceutskom razvoju i podrazumeva da kvalitet ne treba da se utvrdi ispitivanjem proizvoda, već treba da se ugradi u proizvod. Uveden je u farmaceutskoj industriji u cilju usmeravanja metodologije razvoja novih proizvoda ka boljem razumevanju i demonstraciji većeg stepena znanja o svim fazama životnog ciklusa farmaceutskog proizvoda. Znanja o stepenu kritičnosti ulaznih promenljivih: karakteristikama materijala, parametrima proizvodnog procesa i njihovim interakcijama, stečena u toku farmaceutskog razvoja daju naučnu bazu za definisanje prostora dizajna (engl. *design space*), specifikacija i kontrole proizvodnog procesa. Alati koji omogućavaju primenu koncepta dizajna kvaliteta su: analiza rizika, eksperimentalni dizajn i procesna analitička tehnologija (engl. *Process analytical technology – PAT*) (ICH, 2009; ICH, 2005; ICH, 2008; EMEA, 2014).

Farmaceutski razvoj bi, u skladu sa ovim konceptom, minimalno trebalo da podrazumeva sledeće korake:

1. definisanje ciljnog profila kvaliteta proizvoda (engl. *Quality target product profile – QTTP*)
2. identifikovanje potencijalnih kritičnih atributa kvaliteta proizvoda (engl. *Critical quality attributes – CQA*) tako da one karakteristike proizvoda koje imaju uticaj na kvalitet proizvoda mogu da budu proučene i kontrolisane
3. identifikovanje kritičnih atributa lekovite supstance i ekscipijenasa i odabir vrste i količine ekscipijenasa neophodnih za postizanje željenog kvaliteta proizvoda
4. definisanje kontrolne strategije

Ciljani profil kvaliteta (CPK) proizvoda definiše one karakteristike preparata koje se odnose na kvalitet, efikasnost i bezbednost, na primer: put primene, farmaceutski oblik, jačinu, bioraspoloživost, čistoću, stabilnost i drugi. Kritični atributi kvaliteta

(KAK) proizvoda su fizičke, hemijske, biološke ili mikrobiološke karakteristike koje treba da budu u okviru definisanih granica da bi se obezbedio željeni kvalitet proizvoda. Kritični atributi kvaliteta koji su tipični za čvrste farmaceutske oblike za peroralnu upotrebu su oni koji utiču na jačinu, čistoću, brzinu oslobađanja lekovite supstance i stabilnost preparata. Potencijalni KAK izvode se iz CPK proizvoda i prethodno stečenih znanja i vode razvoj proizvoda i procesa. Lista potencijalnih KAK se može promeniti sa sticanjem novih znanja o proizvodu i procesu. Relevantni KAK proizvoda se mogu identifikovati pomoću procesa upravljanja rizikom kvaliteta i izvođenjem eksperimenata koji se mogu ponavljati koliko god je to potrebno.

Unapređen pristup razvoju proizvoda u skladu sa konceptom dizajniranja kvaliteta dodatno treba da sadrži sledeće elemente:

1. sistematičnu procenu, razumevanje i optimizaciju formulacije i proizvodnog procesa uključujući:
 - identifikaciju kritičnih atributa materijala (engl. *Critical material attributes* - CMA) i kritičnih parametara procesa (eng. *Critical process attributes* – CPA) pomoću prethodno stečenih znanja, analize rizika i eksperimentisanja, određivanje funkcionalnih odnosa koji povezuju kritične attribute materijala i procesne parametre sa kritičnim atributima kvaliteta proizvoda;
2. uspostavljanje odgovarajuće kontrolne strategije zasnovane na visokom stepenu znanja o proizvodu i razumevanju proizvodnog procesa. Kontrolna strategija može da uključi predlog prostora za dizajn i/ili testiranje i oslobađanje proizvoda u realnom vremenu.

Kritični atributi materijala i kritični parametri procesa su oni čije variranje utiče na KAK proizvoda te se zato moraju pratiti i kontrolisati. Identifikacija kritičnih atributa materijala i procesa i njihovih optimalnih opsega na osnovu ustanovljenih funkcionalnih veza sa KAK proizvoda omogućava definisanje prostora za dizajn. **Prostor za dizajn** je višedimenzionalna kombinacija i interakcija ulaznih promenljivih (npr. atributa materijala) i procesnih parametara za koje je dokazano da obezbeđuju kvalitet. Rad u okviru prostora za dizajn se ne smatra promenom.

1.2.2 Analiza rizika

Upravljanje rizikom kvaliteta je sistematski proces procene, kontrole, komunikacije i preispitivanja rizika za kvalitet proizvoda u toku životnog ciklusa proizvoda, gde se rizik definiše kao kombinacija verovatnoće pojavljivanja otkaza i ozbiljnosti otkaza. Analiza rizika je značajan deo procesa upravljanja rizikom kvaliteta i podrazumeva identifikaciju opasnosti i analizu i evaluaciju rizika povezanih sa izlaganjem toj opasnosti. To je QbD alatka koja daje odgovor na pitanje o tome koje je karakteristike formulacije i parametre proizvodnog procesa potrebno detaljnije ispitati. Analiza rizika se sprovodi više puta u toku razvoja proizvoda i modifikuje se na osnovu eksperimentalnih rezultata. Postoje brojne metode analize rizika od kojih se izdvajaju PHA analiza (engl. *Preliminary hazard assesment*, preliminarna analiza opasnosti) koja se obično koristi za inicijalnu analizu rizika kada ne postoji mnogo podataka o proizvodu i procesu i FMEA analiza (engl. *Failure mode effects analysis – FMEA*, analiza modaliteta ispada i efekata) koja se može koristiti u kasnijim fazama razvoja na primer za analizu rizika proizvodnog procesa ili za analizu rizika nakon implementacije kontrolne strategije (ICH Q9, 2005; Sakura tablet case study, 2008). Preliminarna analiza opasnosti podrazumeva identifikaciju verovatnoće dešavanja rizičnog događaja, kvalitativnu procenu ozbiljnosti moguće štete, relativnog rangiranja opasnosti kombinovanjem ozbiljnosti i verovatnoće dešavanja rizičnog događaja i identifikaciju mogućih korektivnih mera. Definicije ozbiljnosti i verovatnoće dešavanja rizičnog događaja su prikazane u Tabelama 1 i 2.

Tabela 1. Definicije ozbiljnosti rizičnih događaja

Table 1. Definitions of severity of hazard

Težina	Ocena	Definicija
Mala	1	Nema uticaja na kvalitet proizvoda
Veća	2	Proizvod odstupa od specifikacije
Kritična	3	Zaustavljanje proizvodnje
Katastrofalna	4	Povlačenje proizvoda sa tržišta

Tabela 2. Definicije verovatnoće dešavanja rizičnih događaja
 Table 2. Definitions of probability of occurrence of hazardous events

Verovatnoća	Ocena	Definicija
Vrlo malo	1	Učestalost pojavljivanja jednom u 100 godina ili
Retko	2	Učestalost pojavljivanja oko jednom u 10 godina
Povremeno	3	Učestalost pojavljivanja oko jednom godišnje
Verovatno	4	Učestalost pojavljivanja oko jednom mesečno
Često	5	Učestalost pojavljivanja ne manja od jednom mesečno ako se godišnje proizvede 100 serija

Rizik se procenjuje na osnovu ozbiljnosti posledica i verovatnoće dešavanja rizičnog događaja i označava kao visoko-rizičan (H), srednje-rizičan (M) i nisko-rizičan (L) na način prikazan u Tabeli 3.

Tabela 3. Matrica rizika za PHA analizu
 Table 3. Matrix of risk for PHA analysis

Verovatnoća	1	2	3	4	5
Težina					
Katastrofalna:4	M	H	H	H	H
Kritična:3	L	M	M	H	H
Veća:2	L	L	M	M	H
Mala:1	L	L	L	M	M

L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H – visok nivo rizika
 L- low risk level; M – medium risk level; H – high risk level

1.2.3 Eksperimentalni dizajn

Eksperimentalni dizajn je skup matematičkih i statističkih tehnika koji omogućava sistematsku i istovremenu evaluaciju uticaja više kontrolisanih ulaznih promenljivih (procesnih ili formulacijskih) na određene izlazne parametre. Podrazumeva izvođenje eksperimenata po eksperimentalnom planu po kome se ulazne promenljive variraju na organizovan način tako da se izračuna uticaj pojedinačnih ulaznih promenljivih na odgovore koji se prate. Upotreba statističkih metoda u planiranju eksperimenata povećava efikasnost i dovodi do boljih i pouzdanijih zaključaka te je svrha korišćenja metoda eksperimentalnog dizajna dobijanje što više informacija o ispitivanom sistemu uz minimum eksperimentalnog i finansijskog angažmana (Ukrainczyk, 2010). Osnovne prednosti primene eksperimentalnog dizajna u odnosu na klasičan pristup kada se varira samo jedan faktor po eksperimentu su sledeće:

- omogućava uočavanje zakonitosti ispitivanog fenomena u okviru celog eksperimentalnog prostora te zaključivanje na osnovu rezultata ima veću upotrebnu vrednost;
- daje veće mogućnosti za testiranje efekata faktora, zato što se rezultati svih eksperimenata koriste za računanje faktorskih efekata;
- omogućava određivanje intenziteta faktorskih interakcija;
- pri istom broju eksperimenata daje kompletnije i preciznije informacije;
- konačni cilj istraživanja se postiže na sistematičan, dobro isplaniran i organizovan način sa manjim brojem eksperimenata, odnosno uz manje finansijske troškove;
- izlazni podaci su jasni i jednostavni za analizu;
- primena randomizacije eksperimenata sprečava uticaj nekontrolisanih faktora na rezultat;
- postoji osobina sukcesivnosti jer se svaka faza istraživanja planira na osnovu rezultata prethodne faze;
- menja se način razmišljanja istraživača u smislu da se više koristi njegova intuicija, empirijsko i naučno predznanje pošto je neophodno aktivno razmišljanje o kasnijim fazama istraživanja.

Na osnovu rezultata eksperimenata razvijaju se matematički modeli koji pokazuju na koji su način ulazi i izlazi povezani. Model je približno rešenje jer obično nije potpuno tačan opis predmeta istraživanja što je sa jedne strane dobro jer model zato nije previše komplikovan, ali sa druge strane zato smanjuje i pouzdanost rešenja. Da bi eksperimentalni dizajn bio što efikasniji, jednostavniji i usklađeniji sa zahtevima problema potrebno je da cilj istraživanja bude dobro definisan i potrebno je dobro poznavanje teorije eksperimenata i teoretskih osnova objekta istraživanja (Lazić, 2004). Eksperimente je najbolje izvoditi u fazama tako da se na osnovu rezultata jedne fa

ze odlučuje kako pristupiti sledećoj (Ukrainczyk, 2010).

1.2.3.1 Faza skrininga uz korišćenje dizajna prvog reda

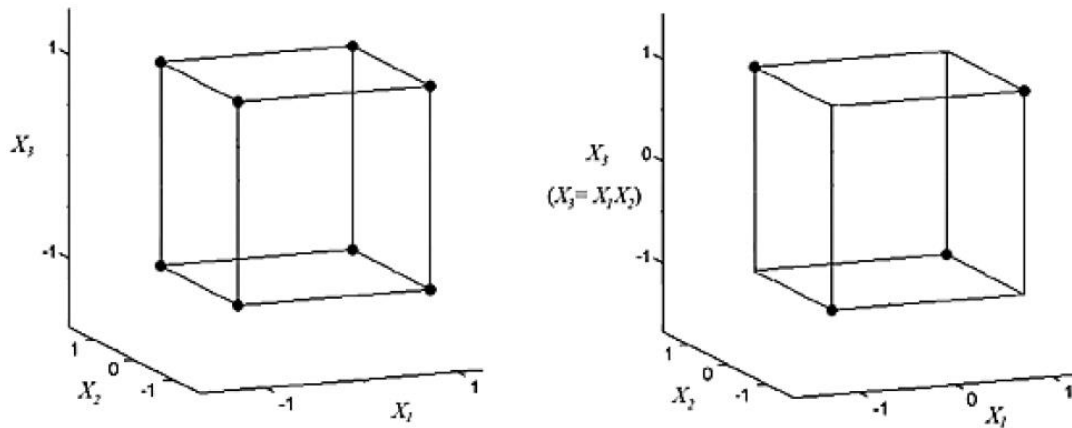
Fisher (1935) je preložio metodu faktorijalnog organizovanja eksperimenata. Najpotpuniji uvid o ispitivanom sistemu omogućava potpuni faktorijalni plan eksperimenata koji podrazumeva izvođenje eksperimenata sa svim mogućim

kombinacijama ulaznih promenljivih. Ovakvi planovi eksperimenta omogućavaju istovremeni ispitivanje uticaja neograničeno velikog broja ulaznih promenljivih na ispitivane odgovore kao i njihove interakcije.

Najjednostavniji i u praksi najčešće primenjivan je faktorijalni plan sa variranjem nivoa ulaznih promenljivih na dva nivoa. Broj eksperimenata u takvom planu iznosi 2^k , gde je k broj ulaznih promenljivih (faktora) koji se ispituju. Matrica faktorijalnog plana po kome se tri faktora variraju na dva nivoa se geometrijski može predstaviti kao kocka čiji rubovi predstavljaju setove uslova koje je potrebno primeniti u eksperimentima (Slika 10a).

Eksperimenti unutar jednog plana se prikazuju standardnim redom radi preglednosti, ali je redosled izvođenja eksperimenata potrebno odabrati na slučajan način (randomizovati) da bi se obezbedila nasumična distribucija greške prisutne usled nekontrolisanih faktora.

U početnoj fazi istraživanja, koja se označava kao skrining faza, se obično koriste frakcioni faktorijalni planovi pomoću kojih se iz većeg broja ulaznih promenljivih odaberu one sa najvećim uticajem na izlazne promenljive. Cilj ove faze nije razvoj modela koji detaljno opisuju ispitivani sistem, već dobijanje preliminarnih informacija na osnovu kojih se planiraju naredne faze istraživanja. Ovakve preliminarne informacije se mogu dobiti upotrebom jednog dela punog faktorijalnog dizajna pri čemu se pojedini eksperimenti iz punog faktorijalnog plana izostavljaju, a stiže se uvid samo u glavne faktorske efekte i eventualno interakcije prvog reda. Broj eksperimenata u ovom slučaju je 2^{k-1} gde je k broj faktora, a l broj koji ukazuje na nepotpunost faktorijalnog plana (Ukrainczyk, 2010). Za $l = 0$, faktorijalni plan je potpun. Obično se bira $1/2$, $1/4$, $1/8$ itd. punog faktorijalnog plana kao što je ilustrovano na Slici 10.



Slika 10. Grafički prikaz plana sa 3 faktora i dva nivoa: a) pun faktorijalni dizajn tipa 2^3 b) frakcioni faktorijalni dizajn tipa 2^{3-1} (Ukrainczyk, 2010)
 Figure 10. Graphical overview of plan with 3 factors varied at 2 levels: a) full factorial 2^3 design; b) fractional factorial 2^{3-1} (Ukrainczyk, 2010)

Rezolucija eksperimentalnog dizajna se označava rimskim brojevima i govori u kojoj meri je procena efekta interakcija onemogućena da bi mogao da se proceni efekat glavnih faktora pošto su u ovakvom tipu dizajna izračunate vrednosti efekata uvek izmešane. Pri rezoluciji III glavni faktorski efekti su izmešani sa interakcijama prvog reda. Rezolucija IV govori da su glavni efekti pomešani samo sa interakcijama višeg reda, ali da su interakcije prvog reda međusobno izmešane. Rezolucija V znači da izračunati efekat glavnih faktora nije izmešan sa interakcijama drugog (i nižeg) reda, interakcije prvog reda nisu međusobno izmešane, ali su izmešane sa interakcijama trećeg reda (Ukrainczyk, 2010).

Kada se faktori variraju na dva nivoa, nivoi se obično predstavljaju kodiranim vrednostima tako da -1 zamenjuje realnu vrednost za faktor na nižem nivou, a +1 zamenjuje realnu vrednost za faktor na višem nivou. Koeficijenti jednačina se računaju korišćenjem kodiranih vrednosti te se na taj način različite promenljive mogu porediti direktno bez obzira na njihovu veličinu. Koeficijenti modela se obično računaju korišćenjem multiple linearne regresije zasnovane na metodi najmanjih kvadrata (Ibrić, 2006). Na ovaj način se razvijaju modeli prvog reda koji podrazumevaju da ulazne promenljive imaju linearan uticaj na izlaze koji se prate. Model prvog reda ima sledeći opšti izgled:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2)$$

gde je Y izlazna promenljiva (odgovor), β_0 je konstanta, β_i je koeficijent povezan za i-tom ulaznom promenljivom, x_i je i-ta ulazna promenljiva, a ε je slučajna greška. Koeficijent β_i predstavlja promenu u odgovoru Y usled jedinične promene x_i pri čemu

su ostale ulazne promenljive konstantne. Pozitivan predznak koeficijenta za određeni faktor znači da se sa povećanjem tog faktora povećava vrednost izlazne promenljive i obrnuto. U mnogim slučajevima postoje interakcije između dve ulazne promenljive kada efekat jedne ulazne promenljive na odgovor zavisi od nivoa druge ulazne promenljive. Tada model prvog reda uključuje i članove koji opisuju interakcije:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

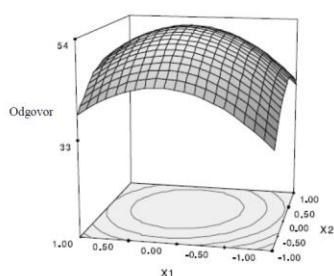
gde u odnosu na formulu (2) postoji dodatni član, koeficijent β_{ij} koji predstavlja interakciju između ulaznih promenljivih x_i i x_j . Pogodnost frakcionog faktorijalnog dizajna sastoji se u njegovoj fleksibilnosti jer se može projektovati u pun faktorijalni dizajn za neki podskup ulaznih promenljivih te se naj način može dobiti detaljna slika i o efektima interakcija (Myers, 2003).

1.2.3.2 Optimizacija primenom metodologije površine odgovora

Metodologija površine odgovora (engl. *Response Surface Methodology* - RSM) najčešće podrazumeva primenu modela drugog reda. Ovakvi modeli se koriste u slučajevima kada efekti ulaznih parametara na izlazne promenljive nisu linearni, kada je opseg od interesa širok i kada je potrebno sprovesti detaljnu kvantitativnu studiju uticaja manjeg broja faktora od značaja (obično ne više od 3). Modeli drugog reda pretpostavljaju da ulazne promenljive imaju kvadratni efekat (zakrivljenost) na odgovore koji se prate tako da je opšti izgled modela drugog reda sledeći:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4)$$

gde u odnosu na formulu (3) postoji dodatni član, β_{ii} koeficijent koji opisuje kvadratni efekat i -te ulazne promenljive. Primer površine odgovora je prikazan na Slici 11.



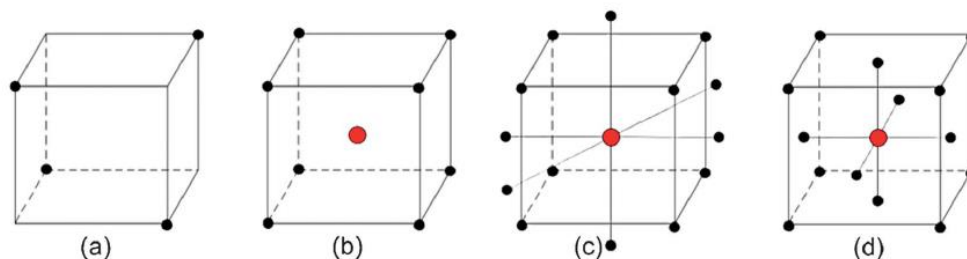
Slika 11. Primer površine odgovora (Myers, 2003)

Figure 11. An example of response surface (Myers, 2003)

Modeli drugog reda su vrlo fleksibilni jer mogu da aproksimiraju različite funkcionalne oblike. Iskustva iz prakse potvrđuju da su modeli drugog reda vrlo pogodni za rešavanje realnih problema (Mihajlović i autori, 2011; Parhi i Suresh, 2016).

Eksperimentalni dizajn koji se najčešće koristi u metodologiji površine odgovora je centralni kompozitni dizajn (engl. *Central Composite Design*, CCD). Centralni kompozitni dizajn sadrži pun faktorijalni ili frakcioni faktorijalni dizajn rezolucije V, centralne tačke i aksijalne (osovinske tačke). Aksijalne tačke predstavljaju nove ekstremne nivoe (niske i visoke) ulaznih promenljivih. U zavisnosti od oblasti operabilnosti aksijalne tačke se mogu nalaziti na stranama kuboidalne regije što omogućava ispitivanje 3 nivoa ulaza, odnosno mogu se nalaziti van ove oblasti što omogućava ispitivanje 5 nivoa ulaznih promenljivih. Lokacija aksijalnih tačaka utiče na mogućnost rotacije dizajna. Dizajn može da se rotira ako je varijansa predviđanja konstantna za sve tačke koje se nalaze na istom rastojanju od centra eksperimentalnog regiona. Poželjno je da dizajn može da se rotira pošto istraživač obično ne zna u kojoj oblasti eksperimentalnog regiona će se vršiti predviđanje te zahvaljujući ovoj osobini dizajna može da vrši kvalitetna predviđanja u okviru celog prostora za dizajn. Centralni kompozitni dizajn koji poseduje ovu karakteristiku se označava kao sferni jer tačke njegovog dizajna opisuju sferu oko faktorijalne kocke. Broj eksperimenata izvedenih na centralnoj tački takođe ima uticaj u dostizanju stabilnosti varijanse predviđenja u celokupnom regionu dizajna. Ako je oblast operabilnosti kuboidnog oblika, onda se aksijalne tačke nalaze na stranama kocke tako da ovakav dizajn ne može da se rotira (Myers, 2003).

Centralni kompozitni dizajn takođe omogućava sekvencijalno izvođenje eksperimenata tako da može da se krene od frakcionog faktorijalnog dizajna i da se od k ulaza izabere r onih koji imaju značajan uticaj na izlazne varijable. Zatim se izvedu dodatni eksperimenti prema 2^f faktorijalnom planu da bi se utvrdilo prisustvo i veličina dvofaktorskih interakcija. Dodatno se uključe i centralne tačke da bi se odredila eksperimentalna greška i prisustvo zakrivljenosti. Ako se utvrdi da je zakrivljenost značajna uvede se $2r$ aksijalnih tačaka i na taj način formira CCD za r faktora (Lebed et. al, 2014; Myers, 2003). Sekvencijalno izvođenje eksperimenata za tri ispitivana ulazna faktora je šematski prikazano na slici 12.



Slika 12. Eksperimentalni dizajni: a) frakcioni faktorijalni dizajn tipa 2^{3-1} ; b) pun faktorijalni dizajn 2^3 ; c) centralni kompozitni dizajn sferni; d) centralni kompozitni kubni (Lebed i autori, 2014)

Figure 12. Experimental designs: a) fractional factorial 2^{3-1} design; b) full factorial 2^3 design; c) central composite design spherical; d) central composite face-centered (Lebed et al, 2014)

Za procenu pogodnosti modela koristi se tzv. *Lack of fit test* koji utvrđuje da li se razlike između realno dobijenih vrednosti i onih predviđenim modelom mogu objasniti eksperimentalnom greškom. Da bi ovaj test mogao da se primeni potrebno je da postoji ponovljeni eksperiment u centralnoj tački. Izračunata F vrednost za ovaj test mora biti manja od teorijske da bi model mogao da bude prihvaćen jer se tada neusklađenost između realno dobijenih rezultata i rezultata predviđenih modelom može objasniti eksperimentalnom greškom.

Za svaki izlaz koji se ispituje se razvija poseban model. U industriji se prilikom optimizacije procesa sa više odgovora (izlaza) često koristi funkcija poželjnosti. Ona se zasniva na činjenici da je kvalitet proizvoda ili procesa sa više karakteristika kvaliteta neprihvatljiv, ako je jedna od karakteristika kvaliteta izvan definisanih granica. Ovaj metod pronalazi uslove pri kojima se dobijaju najpoželjnije moguće vrednosti svih ispitivanih odgovora. Za svaki odgovor se definiše idealna vrednost odgovora koja se označava sa 1 i neprihvatljiva vrednost odgovora koja se označava sa 0. U zavisnosti od toga da li je za određeni odgovor cilj da ima najveću ili najmanju vrednost, odnosno neku konkretnu vrednost mogu da se primenjuju različite funkcije poželjnosti. Pojedinačne poželjnosti se zatim kombinuju korišćenjem geometrijske srednje vrednosti i izračunava se ukupna poželjnost koja je mera stepena postizanja ciljeva za sve izlaze (E-handbook of statistical methods, 2016).

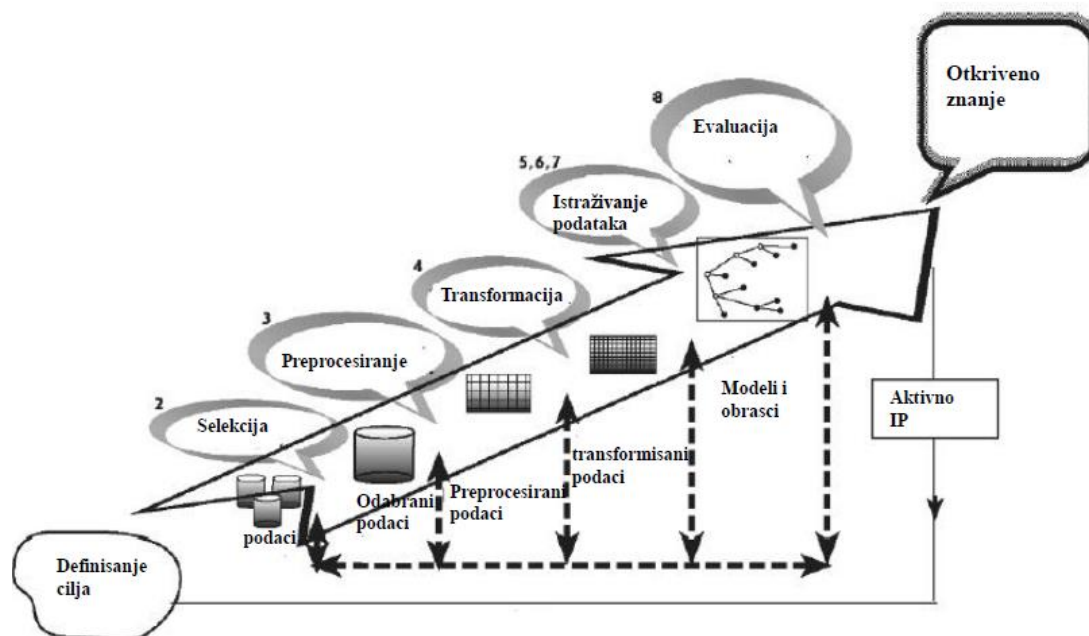
1.2.4 Modelovanje primenom tehnika veštačke inteligencije

Relativno je lako analizirati podatke dobijene u dobro osmišljenom eksperimentalnom dizajnu i kada je moguće opisati ispitivani sistem modelima prvog ili drugog reda. Međutim, kada su potrebni modeli višeg reda da opišu nelinearnost sistema ili kada podaci ne potiču iz statističkog dizajna eksperimenata, za modelovanje je praktičnije koristiti neku od tehnika veštačke inteligencije. Veštačka inteligencija (VI) je podoblast računarstva koja za cilj ima razvijanje softvera koji računarima omogućavaju da se ponašaju na način koji se može okarakterisati inteligentnim gde se pod inteligencijom podrazumeva sposobnost prepoznavanja korisnih informacija (znanja) u trenucima donošenja odluke. Soft computing je oblast veštačke inteligencije kojoj pripadaju tehnike koje namerno uključuju nepreciznost u proračune na jednom ili više nivoa da bi rešile problem. Ove tehnike tolerišu nepreciznost, neodređenost, delimičnu istinu i aproksimaciju i dovode do prihvatljivog rešenja traženjem aproksimiranog rešenja za problem koji može biti precizno ili neprecizno formulisan. One koriste sposobnost računara da brzo i efikasno pretražuju ogromne količine podataka koji mogu biti neprecizni i u kojima su obrasci i veze od interesa nisu u potpunosti jasne. Ideje za neke od tehnika koje pripadaju ovoj oblasti su potekle od bioloških modela i uzora, na primer: veštačke neuronske mreže, regresiona i klasifikaciona stabla, genetski algoritmi i fazi sistemi (engl. *fuzzy* – nejasan). Soft computing metodologije imaju široku primenu u fazi istraživanja podataka u okviru procesa otkrivanja znanja u bazama podataka (Magdalena, 2010; Mitra i autori, 2002;).

1.2.5 Istraživanje i analize podataka

Istraživanja i analize podataka (engl. *Data Mining*) (Ronowich i autori 2015). Istraživanje i analiza podataka (Istraživanje podataka - IP) je grana informatke koja se bavi netrivialnim izdvajanjem implicitnih, prethodno nepoznatih i potencijalno korisnih informacija iz baza podataka. Kombinuje tehnike mašinskog učenja, veštačke inteligencije, prepoznavanja obrazaca i statistike i naziva se još i istraživačka analiza podataka i podacima vođeno otkrivanje. IP je integralni i esencijalni deo otkrivanja znanja u bazama podataka (engl. *Knowledge Discovery in Databases* - *KDD*) koje označava celokupan proces pretvaranja podataka u korisne informacije (Maimon i Rokach, 2009). Proces otkrivanja znanja je iterativan i interaktivan i sastoji se od 9

koraka: definisanja cilja KDD, selekcije i kreiranje seta podataka na kojima će se primeniti KDD, preprocesiranja i čišćenja podataka, transformacije podataka, odabira vrste istraživanja podataka koja će se primeniti (deskriptivno ili prediktivno), odabira algoritma istraživanja podataka, njegove primena, evaluacije i primene otkrivenog znanja (Slika 13).



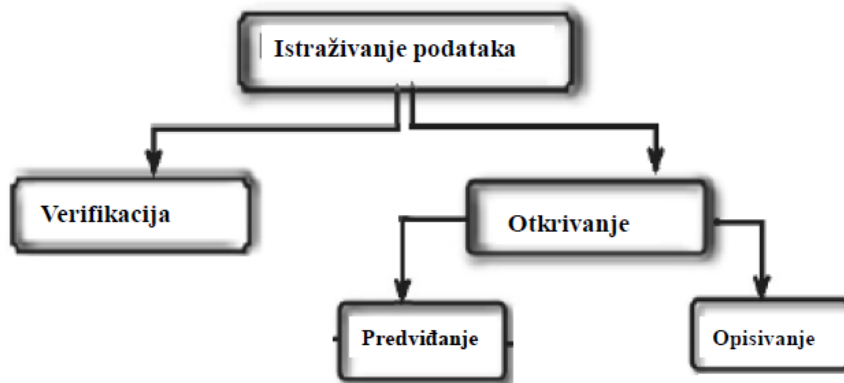
Slika 13. Šematski prikaz koraka u procesu otkrivanja znanja u bazama podataka (Maimon i Rokach, 2009)

Figure 13. Schematic overview of steps of knowledge discovery in data bases (Maimon and Rokach, 2009)

Tehnike istraživanja podataka se koriste u optimizaciji formulacije lekova (Chansanroy i autori, 2011; Ibrić i autori, 2002), optimizaciji proizvodnog procesa (Mihajlović i autori, 2011, Mansa i autori, 2008), za analizu istorijskih podataka u cilju boljeg razumevanja procesa, (Ranowicz i autori, 2015; Mendyk i autori, 2010), za uspostavljanje in-vitro in-vivo korelacije (Parojčić i autori 2007) i za ispitivanje stabilnosti lekovitih preparata (Ibrić i autori 2007).

Dva glavna tipa IP su ono koje je orijentisano ka verifikaciji, kada sistem potvrđuje korisnikovu hipotezu, i ono koje je orijentisano ka otkrivanju, kada sistem autonomno pronalazi nova pravila i obrasce (Slika 14). Metode koji su orijentisani ka verifikaciji su neki od uobičajenih statističkih metoda kao što su analiza varijanse (ANOVA), testiranje hipoteze (npr. t-test srednjih vrednosti) ili testiranje ponašanja po distribuciji. Ove metode se ređe povezuju sa IP nego one koje su orijentisane ka otkrivanju jer se većina problema kojima sa bavi IP zasniva na otkrivanju, a ne na

testiranju hipoteze. Grana IP koja je orijentisana ka otkrivanju obuhvata opisne (deskriptivne) metode i metode za predviđanja (prediktivne metode). Opisne metode pronalaze obrasce između podataka i omogućavaju bolje razumevanje načina na koji su ispitivani podaci povezani. Metode predviđanja automatski grade modele pomoću koga predviđaju vrednosti podataka na osnovu poznatih rezultata (Maimon i Rokach, 2010).



Slika 14. Taksonomija istraživanja podataka
Figure 14. Data mining taxonomy

Istraživanje podataka podrazumeva rešavanje sledećih zadataka (Fayyad i autori 1996, Sondwale, 2015):

- Detekcija devijacija (engl. *Anomaly detection*) – deskriptivni zadatak koji podrazumeva pronalaženje neobičnih podataka koje je potrebno detaljnije ispitati
- Pronalaženje asocijativnih pravila (engl. – *Association rule learning*) – deskriptivni zadatak koji podrazumeva pronalaženje veza između varijabli
- Klasterovanje (engl. *Clustering*) – deskriptivni zadatak koji podrazumeva pronalaženje sličnih grupa i struktura u podacima.
- Klasifikacija (engl. *Classification*) – zadatak predviđanja koji podrazumeva pronalaženje kategorije (subpopulacija) kojoj pripada novi slučaj, a na osnovu seta podataka za trening koji sadrži slučajeve poznatih kategorija.
- Regresija – zadatak predviđanja koji podrazumeva pronalaženje funkcije koja modeluje podatke sa najmanjom greškom, odnosno pronalazi veze između izlazne promenljive i jedne ili više ulaznih promenljivih (prediktora). Razlika između regresije i klasifikacije je u prirodi izlaza koji

se prate. Regresija se koristi u rešavanju problema koji za izlaz imaju kontinuirane vrednosti, dok se klasifikacija koristi kada su izlazi neke kategoričke vrednosti.

- Sumarizacija (engl. *Summarization*) – deskriptivni zadatak koji podrazumeva izvođenje opisa za skup (ili podskup) podataka.

1.2.5.1 Metode koje se primenjuju u rešavanju regresionih problema

Tip najpogodnije metode za rešavanje nekog regresionog problema zavisi od podataka sa kojima se radi, odnosno od broja prediktora (ulaza), broja odgovora koji se prate izlaza i efekta koji prediktori imaju na izlaze koji se prate. Efekat prediktora na izlaze se *a priori* ne zna te je potrebno na podacima primeniti različite tehnike i praktično utvrditi koja je tehnika optimalna za date podatke. Tehniku modelovanja i njene parametre treba odabrati tako da odgovaraju podacima. U suprotnom bi model mogao biti podnaučen (imao bi loše performanse na skupu podataka za obučavanje tj. sistem bi bio neprecizno opisan modelom pa ne bi dobro predviđao ni sa potpuno novim podacima) ili prenaučeni (imao bi “previše” dobre performanse sa podacima predstavljenim za razvoj modela tj. sistem bi bio previše precizno opisan modelom pa ne bi tačno predviđao sa potpuno novim podacima), odnosno model ne bi imao adekvatnu sposobnost predviđanja.

1.2.5.1.1 Multipla linearna regresija

Multipla linearna regresija modeluje veze između dve ili više ulaznih promenljivih i izlazne promenljive uklapanjem linearne jednačine u posmatrane podatke. Izgled osnovnog višestrukog linearnog regresionog modela je sledeći:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_n x_{in} + \varepsilon \quad (5)$$

za $i = 1, 2 \dots n$, gde je:

y - izlazna promenljiva

β_0 - slobodni član, pokazuje vrednost izlaza kada su sve vrednosti $x=0$

β_1, β_n - regresioni koeficijenti, pokazuju za koliko se u proseku menja zavisna varijabla ako se nezavisna varijabla promeni za jedan, a ostale nezavisne varijable se ne menjaju

ε - slučajna greška

Regresioni koeficijenti i slobodni član su nepoznati i računaju se metodom najmanjih kvadrata tako da se suma kvadriranih razlika (SKR) između eksperimentalno dobijenih i vrednosti y predviđenih regresijom minimizira (James i autori, 2013):

$$SKR = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (6)$$

$$SKR = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{\beta}_0 - \hat{\beta}_1 x_{i1} - \hat{\beta}_2 x_{i2} - \dots - \hat{\beta}_p x_{ip})^2 \quad (7)$$

gde je:

y_i – eksperimentalno dobijena vrednost

\hat{y}_i - predviđena vrednost

$\hat{\beta}_0$ - izračunati slobodan član

$\hat{\beta}$ – izračunati koeficijenti regresije

Kod modela sa mnogo parametara postoji veća verovatnoća da će biti prenaučeni. Prenaučeni linearni modeli imaju:

1. veliki broj parametara (varijabli) i/ili
2. prevelike vrednosti pojedinačnih koeficijenata regresije

Prenaučenost modela može da se spreči eliminisanjem varijabli iz modela i ograničavanjem rasta vrednosti koeficijenata čime se ostvaruje kompromis između tačnosti i jednostavnosti modela. Cilj je razvijanje modela koji koji pored toga sto imaju dobre performanse na nepoznatim podacima su i laki za interpretaciju (engl. *sparse models*).

1.2.5.1.2 Stepwise regresija (engl. *stepwise* – postepeno)

Ova vrsta regresije omogućava da se iz modela automatski eliminišu varijable koje malo ili uopšte ne doprinose tačnosti modela jer usled velike multikolinearnosti mnoge varijable nose slične informacije. Metod započinje sa modelom koji ima samo jednu promenljivu i redom dodaje jednu po jednu novu. Da li će neka promenljiva biti dodata u model zavisi od toga da li je eksplanatorna sposobnost modela veća ili manja sa tom promenljivom. Softver može da razvija modele i obrnutim redosledom, odnosno da započne modelom koji ima sve promenljive pa da oduzima jednu po jednu. Upotreba vrednost promenljive se konkretno određuje pomocu t-testa (tj. p-vednosti). Kao rezultat ovog pristupa može se razviti model sa manjim brojem nezavisnih varijabli (Matlab documentation, 2016).

1.2.5.1.3 Grebenasta regresija (engl. *ridge regression*)

Grebenasta regresija pokušava da reši problem složenih, prenaučениh modela koji su okarakterisani prevelikim vrednostima koeficijenata regresije tako što prigušuje vrednost koeficijenata proporcionalno njihovom iznosu, ali ne isključuje prediktore iz modela. Ova tehnika je pogodna za okruženje u kome je odgovor funkcija većeg broja prediktora sličnih vrednosti regresionih koeficijenata kao i kada postoji multikolinearnost zato što su podaci prikupljeni bez eksperimentalnog dizajna. Koeficijenti regresije se računaju tako da se na najmanju meru svede korigovana suma kvadriranih razlika:

$$SKR + \lambda \sum_{j=1}^p \beta_j^2 \quad (8)$$

gde je:

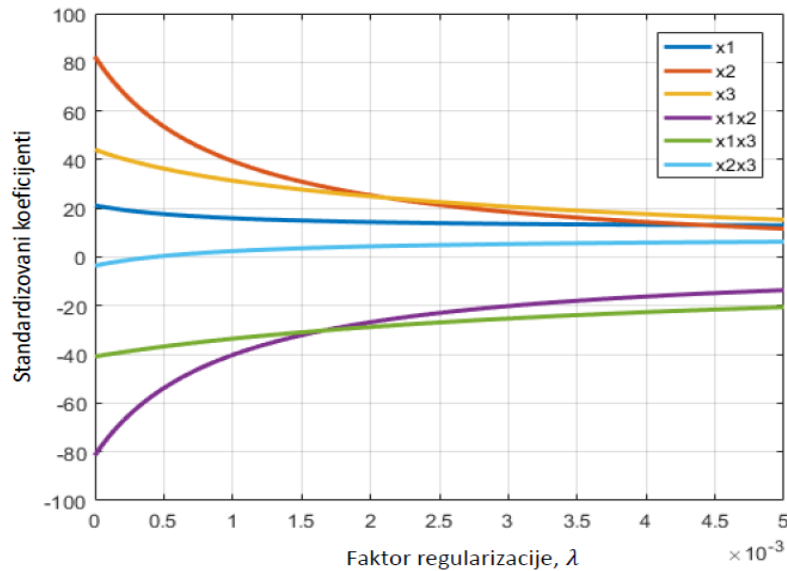
λ – faktor regularizacije koji je veći ili jednak sa 0 i određuje se posebno

Kao i kod metode najmanjeg kvadrata računaju se koeficijenti koji će svesti SKR na minimum, ali postoji i drugi član $\lambda \sum_{j=1}^p \beta_j^2$ koji se označava kao regularizacijski izraz. Regularizacijski izraz ima malu vrednost kada su vrednosti β_1, \dots, β_p bliske nuli tako da pokazuje efekat smanjenja izračunatih vrednosti β_j . Kada je $\lambda = 0$ grebenasta regresija daje izračunate vrednosti koeficijenata metodom najmanjeg kvadrata. Za različite vrednosti λ dobijaju se različite izračunate vrednosti koeficijenata (Slika 15). Faktor regularizacije se ne primenjuje na slobodan član. U praktičnom radu se zadaje opseg faktora regularizacije λ i za svaku vrednost opsega računa greška unakrsne validacije. Bira se ona vrednost λ za koju je vrednost greške unakrsne validacije najmanja. Greška unakrsne validacije izražava se kao kvadrirana razlika između tačne vrednosti i vrednosti predviđene modelom (engl. *Mean squared error* – MSE) (James i autori, 2013).

$$E = \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (9)$$

y_i – eksperimentalno dobijena vrednost

\hat{y}_i - predviđena vrednost



Slika 15. Promena vrednosti koeficijenata grebenaste regresije usled promene vrednosti faktora regularizacije, λ (James i autori, 2013)

Figure 15. Change of values of ridge regression coefficients due to the change of regularization factor, λ (James et al., 2013)

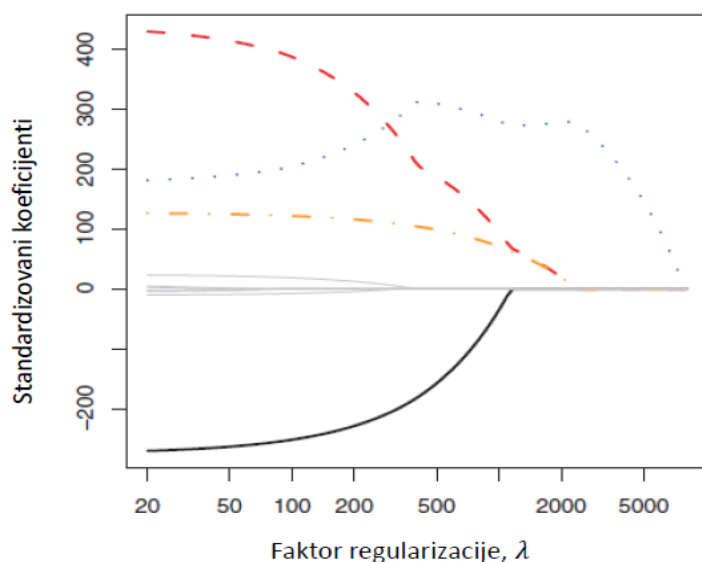
1.2.5.1.4 Laso regresija (engl. *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator* – Operator najmanjeg apsolutnog sužavanja i selekcije)

Koeficijenti u laso regresiji se računaju tako da se na najmanju meru svede sledeći izraz:

$$SKR + \lambda \sum_{j=1}^p |\beta_j| \quad (10)$$

u kome je β_j^2 u regularizacionom izrazu iz grebenaste regresije zamenjeno sa $|\beta_j|$ tako da laso regresija ne samo da smanjuje vrednost koeficijenata, već nekima od njih daje vrednost 0 kada je faktor regularizacije λ dovoljno veliki (Slika 16). Na taj način se vrši selekcija varijabli i razvijaju se modeli koji su lakši za interpretaciju. Laso regresija je pogodna za modelovanje podataka kod kojih manji broj prediktora ima znatno velike regresione koeficijente, a ostatak prediktora koeficijente koji su vrlo mali ili jednaki 0. Kada postoji više prediktora nego posmatranih eksperimenata, laso regresija može da smanji broj prediktora najviše do broja posmatranih eksperimenata. Ako postoje prediktori sa velikom međusobnom korelacijom, laso bira bilo koji iz grupe jer ne može da ih odabere više. Ovo može da bude problem kod genetskih ispitivanja gde obično postoji hiljade prediktora (gena) i manje od 100 uzoraka. Korelacija između gena koji imaju istu biološku funkciju može biti vrlo velika i te gene posmatramo kao grupu. Idealan metod za selekciju gena bi trebalo da može da

eliminiše trivijalne gene i automatski uključi grupe gena u model kada je jedan gen iz grupe odabran (grupna selekcija). Laso regresija nije idealan metod za rešavanje ovog problema jer može da smanji broj prediktora samo do broja uzoraka i ne može da uradi grupnu selekciju (James i autori, 2013; Zou i Hastie, 2005).



Slika 16. Promena vrednosti koeficijenata laso regresije usled promene vrednosti faktora regularizacije, λ (James i autori, 2013)

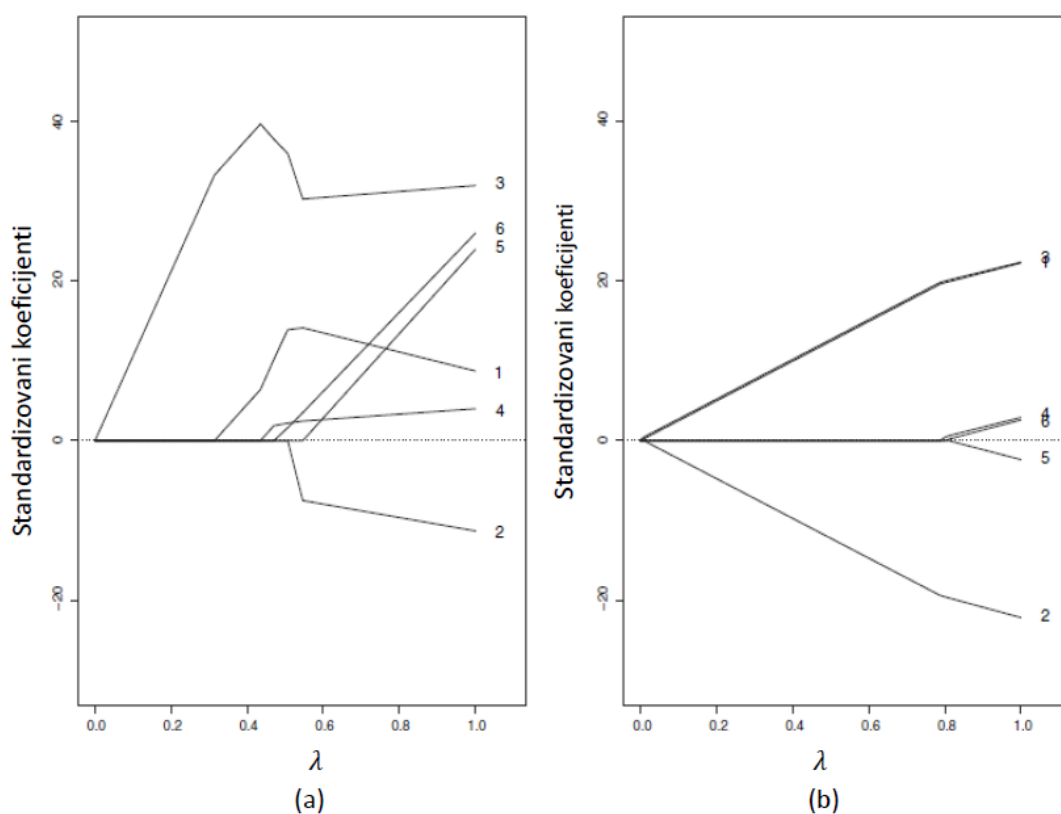
Figure 16. Change of values of lasso regression coefficients due to change of regularization factor, λ (James et. al, 2013)

1.2.5.1.5 Elastične mreže

Elastična mreža prevazilazi ograničenja laso regresije uvođenjem kvadratnog dela, $\sum_{j=1}^p \beta_j^2$, u izraz regularizacije za laso regresiju tako da metod elastičnih mreža praktično kombinuje laso i grebenastu regresiju. Regularizacioni izraz ima sledeći oblik:

$$\lambda \sum_{j=1}^p (\alpha \beta_j^2 + (1 - \alpha) |\beta_j|) \quad (11)$$

gde su λ i α faktori regularizacije koji se posebno podešavaju. Kada je $\alpha = 1$ elastična mreža je ista kao i laso regresija, a približava se grebenastoj regresiji kada se α približava 0. Elastična mreža vrši selekciju varijabli, smanjenje vrednosti koeficijenata, a može da selektuje i grupe varijabli koje su u korelaciji (Slika 17). Pogodna je za modelovanje podataka koji su takvi da broj odgovora koji se prati nadmašuje broj prediktora (ulaznih varijabli) (Zou i Hastie, 2005; Hastie i autori, 2008).



Slika 17. Rešenja koje je dala a) laso regresija; b) elastične mreže ($\alpha = 0.5$): laso rešenja su nestabilna, dok su rešenja koja su dala elastične mreže konzistentnija i vidi se grupna selekcija varijabli x_1 , x_2 i x_3 u jednu značajnu grupu, odnosno varijabli x_4 , x_5 i x_6 u jednu trivijalnu grupu (Zou i Hastie, 2005)

Figure 17. Solutions obtained by a) lasso regression; b) elastic net ($\alpha = 0.5$): lasso solutions are unstable, the elastic net has much smoother solution paths while clearly showing the grouped selection of variables x_1 , x_2 i x_3 in one significant group and selection of variables x_4 , x_5 i x_6 in one trivial group

Poželjno je da prediktori koji će biti analizirani nekom od regresionih tehnika budu standardizovani pomoću sledeće formule:

$$z = \frac{x - \bar{x}}{\sigma} \quad (12)$$

gde je:

z - transformisana vrednost promenljive

x - originalna vrednost

\bar{x} - srednja vrednost promenljive

σ – standardna devijacija

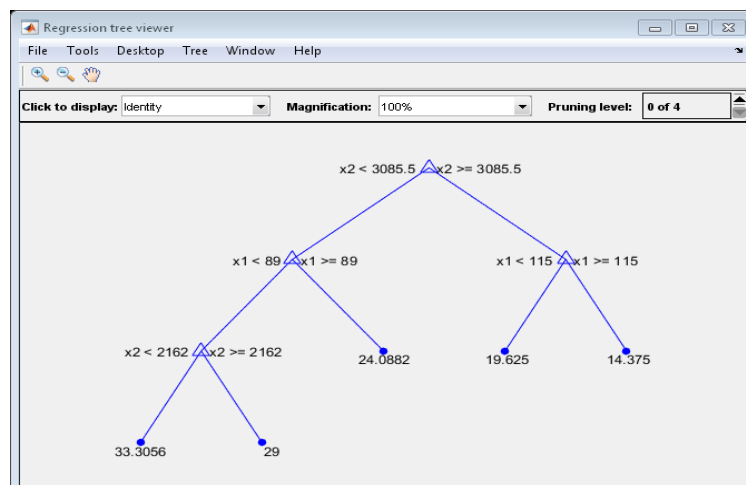
Tako da se slobodni član intepretira kao predviđena vrednost y kada ostali prediktori imaju svoju srednju vrednost. Ova tehnika se koristi kada prediktori nisu dati u istoj skali pa bi bez standardizacije slučaj bio da neki faktor ima veći uticaj na odgovor samo zbog druge skale. Kod tehnika koje koriste regularizaciju izračunate vrednost

nekih regresionih koeficijenata ne zavisi samo od razmere tog prediktora već i od razmere drugih prediktora pa se standardizacijom prediktori tretiraju na ravnopravnoj osnovi (James i autori, 2013).

1.2.5.1.6 Regresiona stabla

Regresiona stabla predstavljaju metodu IP koja se koristi za razvijanje modela za predviđanje numeričkih izlaznih varijabli. Model nastaje procesom rekurzivnog particioniranja koji predstavlja ponavljano deljenje podataka na particije, odnosno grane (Slika 18). Particije se dele na manje grupe tako da završni čvor sadrži predviđenu vrednost izlazne varijable. Na početku su svi podaci iz skupa za trening u istoj particiji koja se označava kao koren. Algoritam onda deli podatke u dve particije, odnosno grane koristeći svaku moguću binarnu podelu. Algoritam bira onu podelu u kojoj je suma kvadrata razlika od srednje vrednosti najmanja u obe particije. Particije se na ovaj način dele dalje dok svi čvorovi ne dostignu veličinu (u smislu broja primera/eksperimenata) koju je definisao korisnik ili dok suma kvadrata razlika od srednjih vrednosti ne dobije vrednost 0. Mehanizam deljenja je transparentan tako da se praćenjem strukture drveta jasno vidi kako je napravljena podela (Hastie i autori, 2008).

Najčešće se koriste binarna regresiona stabla kod kojih se svaki čvor grana na dve grane zato što su najjednostavnija za interpretaciju (Jang, 1997).



Slika 18. Primer regresionog stabla (Matlab documentation, 2016)

Figure 18. An example of a regression tree (Matlab documentation, 2016)

1.2.5.1.7 Tehnike ansambla

Tehnike ansambla podrazumevaju korišćenje više slabijih modela koje zajedno daju novi, tačniji model. Postoji više tehnika ansambla koje se razlikuju po odabiru skupa za trening slabih modela, načinu generisanja slabih modela i načinu kombinovanja izlaza. Tehnika ansambla "boosting" podrazumeva postepeno formiranje ansambla treniranjem svakog novog modela tako da se koncentriše na podatke koje su prethodni modeli loše predvideli (Hastie i autori, 2008).

1.2.5.2 Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže spadaju u grupu standardnih alata istraživanja podataka i koriste se za klasifikaciju obrazaca, analizu vremenskih serija, predviđanje i klasterovanje. To su kompjuterski modeli za obradu informacija koji su naročito korisni za identifikovanje fundamentalnih veza između seta promenljivih. Nastale su kao rezultat pokušaja imitacije bioloških neuronskih mreža, pre svega onih u ljudskom mozgu. Iako su veštačke neuronske mreže mnogo jednostavnije od bioloških poseduju dve važne zajedničke karakteristike – paralelnu obradu podataka i učenje i generalizaciju iz iskustva. Popularnost su stekle zahvaljući velikim sposobnostima modelovanja prepoznavanja obrazaca. One ne zahtevaju postojanje *a priori* pretpostavki o obrazcima između podataka jer je proces modelovanja izuzetno adaptivan i model u velikoj meri zavisi od karakteristika koje je mreža naučila iz podataka. One imaju sposobnost da matematički aproksimiraju ili predstavljaju vrlo kompleksne i nelinearne veze. Mogu da rade i sa podacima koji sadrže jako puno varijabli kao i sa nekompletnim podacima, što nije slučaj sa statističkim modelima (Zhang, 2010).

Neuronske mreže se prema arhitekturi, odnosno vrstama veza dele na (Ilić, 1996):

- **slojevite** gde su neuroni raspoređeni po slojevima tako da se na izlaz jednog neurona dovode svi izlazi iz prethodnog sloja, a njegov izlaz se vodi do ulaza svih neurona narednog sloja
- **potpuno povezane** gde se izlaz jednog neurona vodi ka ulazu svih neurona u mreži
- **celularne** gde su međusobno povezani samo susedni neuroni

Prema smeru prostiranja podataka dele se na:

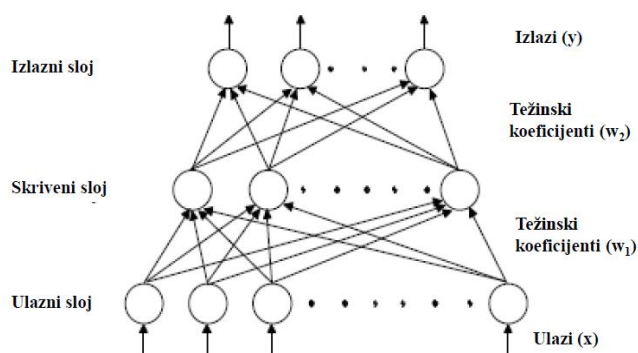
- **nerekurentne** ili nerekurzivne, nepovratne (engl. *feedforward*) gde signal prostire samo u jednom smeru od ulaza prema izlazu

- **rekurentne** ili rekurzivne, povratne (engl. *feedback*) gde viši slojevi vraćaju informacije u niže slojeve ili u isti sloj

Prema tipu učenja u mreži dele sa na:

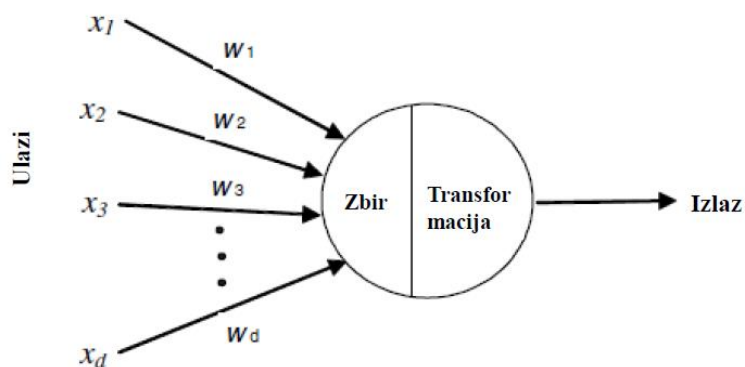
- **mreže sa nadgledanim učenjem** (engl. *supervised learning*) kada su vrednosti izlaznih varijabli skupa za učenje poznati i prikazuju se mreži
- **mreže sa nenadgledanim učenjem** (engl. *unsupervised learning*) kada vrednosti izlaznih varijabli skupa za učenje nepoznati

U praksi je najčešće korišćen model neuronskih mreža višeslojna mreža sa prostiranjem signala unapred (nerekurzivna ili nerekurentna mreža), poznata i kao višeslojni perceptron (engl. *Multilayer Perceptron- MLP*) koja je šematski prikazana na Slici 19.



Slika 19. Šematski prikaz višeslojne mreže sa prostiranjem signala u napred (Zhang, 2010)
Figure 19. Schematic overview of multilayer feedforward network (Zhang, 2010)

Ovakva mreža sastoji se od velikog broja međusobno povezanih obrađujućih jedinica koje se još nazivaju i neuroni, čvorovi ili ćelije i koji su organizovani u slojeve. Postoje ulazni i izlazni sloj i jedan ili više skrivenih slojeva. Neuroni su međusobno povezani vezama koje sadrže težinske koeficijente. Svaki neuron obrađuje informacije tako što pretvara primljene ulaze u obrađene izlaze (Slika 20).



Slika 20. Šematski prikaz pojedinačnog neurona - x :ulazni podaci, w :težinski koeficijenti (Zhang, 2010)

Figure 20. Schematic overview of a single neuron – x : input data, w : weights (Zhang, 2010)

Znanje se stvara i čuva kroz težinske koeficijente veza koji zavise od veza između različitih čvorova. Neuroni u ulaznim čvorovima odgovaraju ulaznim promenljivima, a oni u izlaznim čvorovima odgovaraju izlaznim promenljivima. Neuroni u ulaznim čvorovima ne obrađuju informacije već ih samo prenose neuronima u skrivenom sloju. Neuroni iz skrivenog sloja su ključni za učenje obrazaca iz podataka. Zahvaljujući nelinearnim funkcijama prenosa neuroni iz skrivenog sloja mogu da obrade kompleksne informacije koje su dobili od ulaznih neurona i proslede ih u sledeći sloj na dalju obradu i generisanje izlaza.

Arhitektura nerekurentne mreže je okarakterisana brojem slojeva, brojem čvorova u svakom sloju, funkcijom prenosa svakog sloja, kao i načinom na koji su neuroni iz jednog sloja povezani sa neuronima iz susednih slojeva. Najčešći je slučaj da su čvorovi jednog sloja u potpunosti povezani sa svim čvorovima iz susednih slojeva.

Obrada informacija u neuronu sastoji se iz dva koraka: u prvom koraku svi ulazi se kombinuju i daju ponderisanu sumu ulaza i težinske koeficijente veza. U drugom koraku se suma pretvara u izlaz pomoću funkcije prenosa.

$$Out_n = f(\sum_i w_i x_i) \quad (13)$$

gde je Out_n izlaz iz određenog neurona, a f je nelinearna funkcija prenosa. Najčešće korišćena funkcija prenosa je logistička (sigmoidalna) funkcija.

Treniranje mreže je proces koji podrazumeva određivanje težinskih koeficijenata. Predstavlja ponavljano prikazivanje mreži primera za trening koji se sastoje od seta ulaznih parametara i eventualno izlaza koje oni daju (Dalbelo Bašić i autori, 2008). Za svaki primer se ulazne vrednosti ponderišu i sumiraju u svakom čvoru skrivenog sloja, ponderisana suma se prenosi pomoću odgovarajuće funkcije i daje izlaznu

vrednost skrivenog čvora koja predstavlja ulazne vrednosti za čvor u sledećem sloju. Računaju se izlazne vrednosti mreže i upoređuju sa realnim vrednostima, a težinski koeficijenti se menjaju tako da omogućće bolju aproksimaciju željenih izlaza. Ovaj proces se obično ponovi puno puta dok se razlike između izlaznih vrednosti koje računa mreža i ciljnih vrednosti ne svedu na unapred zadatu meru. Skup primera za učenje se deli na: skup za učenje, skup za testiranje i skup za validaciju. Primeri iz prvog skupa služe za učenje u užem smislu (podešavanje težinskih koeficijenata). Primeri iz drugog skupa služe da se u toku učenja proverí rad mreže sa trenutnim težinskim faktorima kako bi se učenje zaustavilo u trenutku degradacije performanse mreže, odnosno da se spreči da se mreža prenauchi. Tada mreža toliko dobro nauči podatke iz skupa podataka za trening da joj opadne sposobnost da predvidi vrednosti za podatke koji joj nisu predstavljeni u fazi treninga. Stalnim praćenjem izlaza iz mreže dobijenog pomoću skupa za testiranje moguće je otkriti iteraciju u kojoj dobijeni izlaz najmanje odstupa od željenog. Tačnost i preciznost obrade podataka proverava se pomoću skupa za validaciju koji treba da sadrži primere koji nisu prikazani mreži u fazi treninga. Najbolji model je onaj koji daje najbolje rezultate na primerima za test i validaciju (Statistica Help, 2016).

1.2.5.3 Procena kvaliteta modela

Greška aproksimacije modela se najčešće procenjuje na osnovu korena kvadrata srednje greške (engl. *Root Mean Squared Error* – RMSE) koji se računa po sledećoj formuli:

$$RMSE = [\sum (y_i p - y_i m)^2 / n]^{1/2} \quad (14)$$

gde je y_p realno dobijeni odgovor, y_m odgovor koji je predvideo model, a n je broj primera koji su korišćeni za treniranje mreže (Mihajlović i autori, 2011).

Za procenu modela može da se koristi i koeficijent korelacije (R^2), ali je RMSE bolja mera korelacije eksperimentalnih i predviđenih podataka zato što je izražena u istim jedinicama kao i izlazi koji se prate pa je stoga moguće njeno direktno tumačenje (Tech info library, 2016).

2.0 Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je unapređenje farmaceutskog razvoja gastrorezistentnih peleta primenom koncepta dizajna kvaliteta i različitih tehnika veštačke inteligencije.

Istraživanje se sastoji iz tri dela koja imaju za cilj:

1. Ispitivanje uticaja različitih tehnika oblaganja peleta aktivnom supstancom i gastrorezistentnim filmom na kritične atribute kvaliteta farmaceutskog preparata i to: gastrorezistenciju, profil brzine oslobađanja lekovite supstance, jačinu i stabilnost. Tehnike nanošenja aktivne supstance koje se ispituju su: oblaganje praškovima, oblaganje rastvorenim i oblaganje suspendovanim aktivnom supstancom. Tehnike nanošenja gastrorezistentnog filma koje se ispituju su oblaganje praškom (suvo oblaganje) i oblaganje suspenzijom u kojoj je gastrorezistentni polimer rastvoren.

2. Ispitivanje uticaja formulacijskih i procesnih parametara oblaganja peleta aktivnom supstancom na efikasnost procesa i koristan prinos proizvodnog procesa. Ispitivanje interakcije lekovite supstance i polimera niske molekulske mase koji je imao ulogu vezivnog sredstva u formulaciji tečnosti za oblaganje. Definisanje prostora dizajna u kom je omogućeno postizanje maksimalne efikasnosti, odnosno korisnog prinosa u proizvodnom procesu, kao i adekvatnog oslobađanja lekovite supstance.

3. Ispitivanje mogućnosti primene različitih tehnika veštačke inteligencije, odnosno istraživanja i analize podataka u optimizaciji formulacije gastrorezistentnih peleta u cilju razvijanja modela koji mogu da se koriste za predviđanje kritičnih atributa kvaliteta: gastrorezistencije i profila brzine rastvaranja lekovite supstance na osnovu formulacijskih karakteristika.

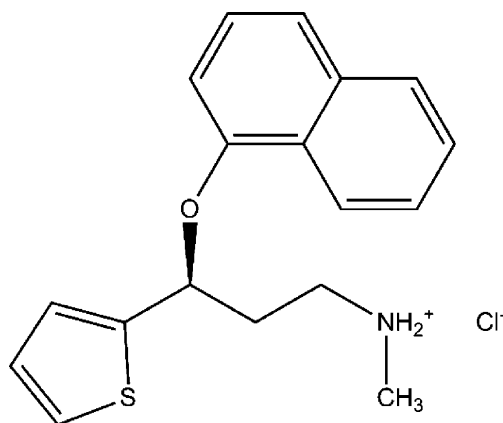
3.0 Prvi deo istraživanja

3.1 Uvod

U skladu sa principima koncepta dizajna kvaliteta u farmaceutskom razvoju prvo se definiše ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (u ovom slučaju gastrozistentnih peleta) u skladu sa zahtevima kvaliteta za gastrozistentne preparate i u skladu sa fizičko-hemijskim karakteristikama model supstance tako da se međuproizvod može koristiti u proizvodnji gotovog proizvoda koji će da odgovara zahtevima za enterosolventne farmaceutske oblike. Na osnovu ciljanog profila kvaliteta gastrozistentnih peleta definišu se važni atributi kvaliteta, a analizom rizika definišu se formulacijske karakteristike i procesni parametri koji mogu biti kritični u proizvodnji gastrozistentnih peleta. U ovom delu istraživanja ispituje se uticaj različitih tehnika nanošenja aktivne supstance i gastrozistentnog filma na odabrane kritične attribute kvaliteta gastrozistentnih peleta.

3.1.1 Fizičko-hemijske karakteristike duloksetin-hidrohlorida

Duloksetin-hidrohlrid je novija lekovita supstanca iz grupe selektivnih inhibitora preuzimanja serotonina i noradrenalina i indikovana je za lečenje depresije, anksioznosti, dijabetesnih perifernih neuropatija i stresne urinarne inkontinencije (Taita, Summary of product characteristics, 2015; Duloxetine 20 mg MHRA Assessment report). Hemijska struktura leka prikazana je na slici 21.



Slika 21. Duloksetin-hidrohlrid ((S)-(+)-N-Methyl-3-(1-naphthalenyloxy)-3-(2-thienyl)propanamine hydrochloride, molekulska formula $C_{18}H_{19}NOS.HCl$, Mr 333.88)
Figure 21. Duloxetine hydrochloride, ((S)-(+)-N-Methyl-3-(1-naphthalenyloxy)-3-(2-thienyl)propanamine hydrochloride, molecular formula $C_{18}H_{19}NOS.HCl$, Mr 333.88)

Duloksetin-hidrohlorid je beo, do skoro beo prašak sa tačkom topljenja od oko 173°C. Ispoljava polimorfizam, a u literaturi je opisan i amorfni oblik (Marjo i autori, 2011; Ini i autori, 2006). Spada u grupu slabih organskih baza sa pKa vrednošću od 9,34. Lako se rastvara u metanolu i smeši izopropanola i vode (1:1), rastvoran je u etanolu, teško rastvoran u izopropanolu, gotovo nerastvoran u heksanu, a u vodi pokazuje pH zavisnu rastvorljivost koja se ogleda u tome da mu je rastvorljivost bolja u kiselom pH, s tim što se u jako kiseloj sredini degradira. U prvom delu istraživanja ispituju se različite tehnike nanošenja aktivne supstance na pelete i pri tom koriste različiti vehikulumi: za nanošenje aktivne supstance u rastvorenom obliku koriste se smeša izopropanola i vode, za nanošenje suspendovane aktivne supstance koristi se čist izopropanol, za nanošenje aktivne supstance u obliku praška koristi se etanol. Rezultati ispitivanja rastvorljivosti model supstance na različitim pH vrednostima rastvora prikazani su u Tabeli 4 (*in-house metoda*, Hemofarm A.D.) Rastvorljivost je ispitana standardnom *shake-flask* (engl.) metodom za ispitivanje rastvorljivosti.

Tabela 4. Rastvorljivost duloksetin-hidrohlorida na različitim vrednostima pH na 37°C

Table 4. Solubility of duloxetine hydrochloride at different pH values at 37°C

0.1M HCl, pH 1.2	Rastvor acetatnog pufera, pH 4.5	Voda, pH 5.8	Rastvor fosfatnog pufera, pH 6.8	Rastvor fosfatnog pufera, pH 7.5
Degradacija supstance	75.9 mg/ml	53.9 mg/ml	2.8 mg/ml	2.1 mg/ml

Prema definicijama rastvorljivosti Evropske farmakopeje model supstanca je rastvorna u opsegu pH od 4.5 do 5.8, a sa porastom pH opada joj rastvorljivost tako da je u opsegu pH od 6.8 do 7.5 teško rastvorna. Pripada grupi 2 Biofarmaceutskog sistema klasifikacije (BCS) što znači da mu je rastvorljivost niska, a permeabilnost visoka (Pandya i autori, 2015; EMEA, 2010). Resorpcija lekova BCS klase 2 je ograničena brzinom rastvaranja in-vivo i obično je sporija nego kod lekova BCS klase 1 koji imaju visoku rastvorljivost i visoku permeabilnost. Iz tog razloga profil brzine rastvaranja kod BCS klase 2 mora biti okarakterisan većim brojem vremenskih tačaka (Rinaki i autori, 2004).

Studije rastvorljivosti i forsirane degradacije su pokazale da je model supstanca izuzetno nestabilna u jako kiseloj sredini u kojoj dolazi do znatne degradacije (Chhalotiya i autori, 2010). Pošto je model supstanca nestabilna u rastvoru čiji pH je

niži od 2.5 potrebno je formulirati je u obliku gastrozistentnog preparata da bi se sprečila njena razgradnja u kiseloj sredini želuca, a omogućilo oslobađanje u tankom crevu. Gastrozistencija se postiže oblaganjem farmaceutskog oblika polimerom koji sadrži kisele grupe te na taj način sprečava rastvaranje preparata u želucu. U prvom delu istraživanja ispituju se dve tehnike nanošenja gastrozistentnog filma na pelete: nanošenje rastvorenog gastrozistentnog polimera i nanošenje polimera u suvom obliku (suvo oblaganje). Duloksetin-hidrohlorid je inkompatibilan sa kiselim gastrozistentnim polimerima tako da njihov kontakt dovodi do porasta degradacionih proizvoda duloksetina. Da bi se sprečila reakcija model supstance i kiselih grupa polimera potrebno je odvojiti aktivnu supstancu od gastrozistentnog filma izolacionim slojem koji treba da bude dovoljno deo da onemogući migraciju slobodne kiseline ili njenog anhidrida, odnosno duloksetin hidrohlorida kroz formulaciju (Jansen i autori, 1998).

3.1.2 Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (CPK)

Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (gastrozistentnih peleta) je prikazan u Tabeli 5. Definisan je na osnovu fizičko-hemijskih, kliničkih i farmakokinetičkih osobina originalnog proizvoda Cymbalta 60 datih u sažetku karakteristika proizvoda Cymbalta[®] 60 i 30 mg kapsule i Yentreve[®] 40 i 20 mg kapsule napunjene gastrozistentnim peletama (Cymbalta[®] SMPC), kao i farmakopejskih zahteva za Duloksetin kapsule sa odloženim oslobađanjem (USP 36, 2013).

Tabela 5. Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda gastrozistentnih peleta duloksetina
 Table 5. Quality target product profile of enteric-coated pellets of duloxetine

Elementi kvaliteta	Cilj
Međuproizvod	Gastrozistentne pelete
Put primene	Oralni
Profil oslobađanja leka	Odloženo oslobađanje – ni jedna jedinica ne oslobodi više od 10% deklarisanog sadržaja duloksetina nakon dva sata u kiselom medijumu (0.1 M HCl), ne manje od 75% (Q) deklarisanog sadržaja duloksetina se oslobodi za 60 minuta u fosfatnom puferu pH 6.8. ¹
Farmakokinetičke osobine	Apsorpcija počinje nakon lag faze od 2h, a C _{max} je 6h nakon primene doze. Hrana ne utiče na C _{max} , ali produžava vreme dostizanja C _{max} od 6 do 10 sati
Koncentracija leka	14 mg duloksetina/100 mg peleta – 21 mg duloksetina/peleta ²
Stabilnost	Omogućava rok trajanja gotovog proizvoda od bar tri godine na temperaturi nižoj od 30°C.
Primarna ambalaža	Odgovarajućeg kvaliteta, da pruži zaštitu leka i obezbedi traženu stabilnost
Atributi kvaliteta	Fizički atributi Identifikacija Sadržaj Uniformnost sadržaja Brzina rastvaranja Hemijska stabilnost (proizvodi degradacije) Zaostali rastvarači Sadržaj vode Mikrobiološka čistoća

¹ Specifikacija za oslobađanje lekovite supstance je preuzeta iz USP 36

² Ciljna koncentracija leka je definisana tako da doza od 60 mg može da se napuni u kapsule veličine 0 ili 1, doza 40 mg u kapsule veličine 1 ili 2, doza 30 mg u kapsule veličine 2 ili 3, a doza 20 mg u kapsule veličine 3 ili 4

¹ Specification for dissolution was acquired from USP 36

² Aimed concentration of duloxetine was defined so as to enable filling of pellets for 60 mg dose into capsules of size 0 or 1, 40 mg dose into capsules of sizes 1 or 2, 30 mg dose into capsules of sizes 2 or 3 and 20 mg dose into capsules of sizes 3 or 4

3.1.3 Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda

Tabela 6 sumira attribute kvaliteta međuproizvoda duloksetin gastrozistentnih peleta i ukazuje na one attribute kvaliteta koji su označeni kao kritični. Atributi kvaliteta koji su označeni kao kritični za ovaj proizvod su: veličina peleta, identifikacija aktivne supstance, sadržaj aktivne supstance, ujednačenost sadržaja aktivne supstance, gastrozistentcija, profil oslobađanja lekovite supstance, rezidualni rastvarači, gubitak sušenjem, hemijska stabilnost i mikrobiološki kvalitet. Smatra se da je mali rizik da

postoji uticaj formulacijskih i procesnih parametara na identifikaciju duloksetina kao i mikrobiološke karakteristike proizvoda te ovi atributi kvaliteta neće biti detaljno razmatrani iako spadaju u važne attribute kvaliteta međuproizvoda.

Kao kritični atributi kvaliteta posebno se izdvajaju gastrozistencija, oslobađanje lekovite supstance iz peleta i hemijska stabilnost pošto na njih u velikoj meri utiču formulacijske karakteristike i procesni parametri. Formulacija gastrozistentnih peleta treba da bude takva da spreči degradaciju lekovite supstance u želucu i da omogući kompletno oslobađanje u intestinumu. Osim toga treba da spreči hemijsku degradaciju, odnosno polimorfnu konverziju lekovite supstance. Važan aspekt kvaliteta je i sadržaj duloksetina u peletama jer od njega zavisi da li će odgovarajuća doza moći da se napuni u kapsule odgovarajuće veličine. Premali sadržaj duloksetina u peletama doveo bi do toga da se pelete pune u jako velike kapsule što bi otežalo gutanje preparata, odnosno smanjilo bi komplijansu pacijenata. Dalje, velike razlike u sadržaju duloksetin sa različitim pozicija u masi peleta bi ukazale na postojanje velikih problema u procesu oblaganja (Sun i autori, 2010).

Tabela 6. Kritični atributi kvaliteta gastrorezistentnih peleta duloksetina

Table 6. Critical quality attributes of enteric-coated pellets of duloxetine

Atribut kvaliteta	Cilj	Kritičnost	Opravdanost
Izgled peleta	Bele do skoro bele pelete	Ne	Nije direktno povezan sa bezbednošću i efikasnošću leka
Veličina peleta	< 2 mm	Da	Pelete manje od 2 mm se slobodno raspoređuju po gastrointestinalnom traktu
Identifikacija	Pozitivna na lekovitu supstancu	Da*	Kritična za bezbednost i efikasnost, ali se može efikasno kontrolisati u završnoj kontroli.
Sadržaj	90% - 110% u odnosu na deklarisanu vrednost	Da	Varijabilnost sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Formulacijski i procesni paramteri mogu da utiču na sadržaj.
Ujednačenost sadržaja	90% - 110%, RSD < 5%	Da	Varijabilnost u ujednačenosti sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Formulacijski i procesni parametri mogu uticati na ovaj atribut.
Gastrorezistencija	Ni jedna jedinica ne oslobodi više od 10% deklarisanog sadržaja duloksetina nakon dva sata u kiselom medijumu (0.1 M HCl)	Da	Neusaglašenost sa zahtevom za gastrorezistenciju može negativno da utiče na bioraspoloživost usled degradacije leka u želucu.
Brzina rastvaranja lekovite supstance	ne manje od 75% (Q) deklarisanog sadržaja duloksetina se oslobodi za 60 minuta u fosfatnom puferu pH 6.8	Da	Neusaglašenost sa zahtevom za brzinu rastvaranja može da utiče na bioraspoloživost. Formulacijske i procesne promenljive mogu da utiču na ovaj atribut.
Hemijska stabilnost	Nivo degradacionih proizvoda u skladu sa oficinalnim/ICH zahtevima	Da	Degradacioni proizvodi mogu da utiču na bezbednost i efikasnost te moraju biti kontrolisani. Formulacijske i procesne promenljive mogu da utiču na ovaj atribut kvaliteta.
Rezidualni rastvarači	Nivoi rezidualnih rastvarača u skladu sa ICH limitima	Da	Rezidualni rastvarači mogu da utiču na bezbednost. Moraju se pratiti i kontrolisati.
Gubitak sušenjem	Pratiti	Da	Sadržaj vlage može uticati na degradaciju u lekovitom proizvodu
Mikrobiološki kvalitet	U skladu sa EP 2.6.12 i EP 2.6.13	Da*	Neusaglašenost sa specifikacijom može da utiče na bezbednost. Rizik od mikrobiološkog rasta je mali kod čvrstih doziranih oblika.

*Formulacijske i procesne karakteristike ne utiču na ove kritične attribute kvaliteta te se oni neće razmatrati iako su važni elementi kvaliteta

3.1.4 Definisanje potencijalno kritičnih atributa kvaliteta polaznih materijala i procesnih parametara

3.1.4.1 Analiza rizika za attribute kvaliteta duloksetin hidrohlorida

Imajući u vidu fizičko-hemijske osobine duloksetin-hidrohlorida i odabrane tehnologije izrade (nanošenje aktivne supstance u obliku praška, rastvora i suspenzije), tehnikom preliminarne analize opasnosti izvršena je analiza rizika karakteristika lekovite model supstance za kritične attribute kvaliteta međuproizvoda: sadržaj, gastrozistencija, oslobađanje lekovite supstance, hemijska stabilnost. Osobine lekovite supstance koje potencijalno mogu da utiču na izdvojene kritične attribute kvaliteta su: oblik čvrstog stanja (amorfno ili kristalno), veličina čestica, hemijska stabilnost, protočnost. Na osnovu ozbiljnosti rizika i verovatnoće dešavanja za svaku od tih osobina procenjen je nivo rizika.

Rezultati rangiranja rizika prikazani su u tabeli 7.

Oblik čvrstog stanja može da ima uticaj na brzinu rastvaranja lekovite supstance iz peleta kao i na hemijsku stabilnost preparata. Uticaj na brzinu rastvaranja potiče od činjenice da različiti polimorfni oblici mogu imati različitu rastvorljivost, a amorfne forme imaju bolju rastvorljivost od kristalnih oblika. Različiti polimorfi, odnosno amorfni oblici mogu imati različitu hemijsku stabilnost te odatle uticaj kristalnog oblika na stabilnost lekovitog proizvoda (Hancock i Zografi, 1996; Taday i autori, 2003).

Tabela 7. Analiza rizika za kritične attribute kvaliteta gastrorezistentnih peleta u odnosu attribute kvaliteta duloksetin-hidrohlorida

Table 7. Risk analysis of critical quality attributes of enteric-coated pellets with respect to attributes quality of duloxetine hydrochloride

Rizik	KAK	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Oblik čvrstog stanja	Sadržaj	1	1	L
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Gastrorezistencija	1	1	L
	Brzina rastvaranja	3	1	L
	Hemijska stabilnost	3	4	H
Veličina čestica	Sadržaj*	2	2	M
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Gastrorezistencija	1	1	L
	Brzina rastvaranja*	3	3	M
	Hemijska stabilnost	1	1	L
Hemijska stabilnost	Sadržaj	2	2	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Gastr-rezistencija	1	1	L
	Brzina rastvaranja	2	2	M
	Hemijska stabilnost	3	3	M

KAK - kritični atribut kvaliteta; L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H - visok nivo rizika

*Veličina čestica model supstance nema uticaja na sadržaj i brzinu rastvaranja kada se supstanca nanosi na pelete u rastvorenom obliku

KAK – critical quality attribute; L – low risk level; M – medium risk level; H- high risk level

*Particle size of model substance has low risk level concerning assay and dissolution if drug is applied to pellets by solution layering

3.1.4.2 Analiza rizika za različite tehnike nanošenje aktivne supstance

U Tabeli 8 prikazana je analiza rizika za tehnike nanošenja aktivne supstance koje se ispituju u prvom delu istraživanja u odnosu na izdvojene kritične attribute kvaliteta preparata. Nanošenje aktivne supstance u formi praška i suspenzije nosi veći rizik od dobijanja sadržaja van specifikacije jer adhezija lekovite supstance na pelete u velikoj meri zavisi od veličine čestica lekovite supstance tako da krupnije čestice imaju lošiju adheziju. Nanošenje aktivne supstance u formi praška takođe nosi veći rizik od dobijanja gastrorezistencije i brzine rastvaranja van specifikacije jer pelete proizvedene ovom tehnikom često imaju neravnu površinu što može povećati nanos gastrorezistentnog filma potrebnog za postizanje specificirane gastrorezistencije. Viši nanos gastrorezistentnog filma može usporiti oslobađanje lekovite supstance u fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja koja se izvodi u fosfatnom puferu te iz tog razloga ova tehnika ima veći rizik od oslobađanja lekovite supstance van specifikacije od preostale dve tehnike. Zbog neravne površine koje mogu imati pelete proizvedene ovom tehnikom moguće je da veći nanos,

odnosno debljina izolacionog sloja bude potreban za postizanje odgovarajuće stabilnosti, a sa druge strane ova tehnika nosi sa sobom najmanji rizik za polimorfnu konverziju ili nastanak amorfno oblika jer podrazumeva korišćenje malih količina rastvarača. Ako se aktivna supstanca nanosi rastvorena na pelete postoji značajan rizik od polimorfne konverzije, odnosno nastanka amorfno oblika leka jer se rastvorena lekovita supstanca raspršuje zajedno sa polimerom koji inhibira kristalizaciju. Pošto su amorfni oblici reaktivniji od kristalnih, veći je rizik od hemijske stabilnosti lekovite supstance van specifikacije. Prednost ove tehnike je što ne zahteva korišćenje mikronizirane aktivne supstance što znatno olakšava rad.

Tabela 8. Analiza rizika za kritične attribute kvaliteta gastrorezistentnih pelete u odnosu na različite tehnike nanošenja aktivne supstance

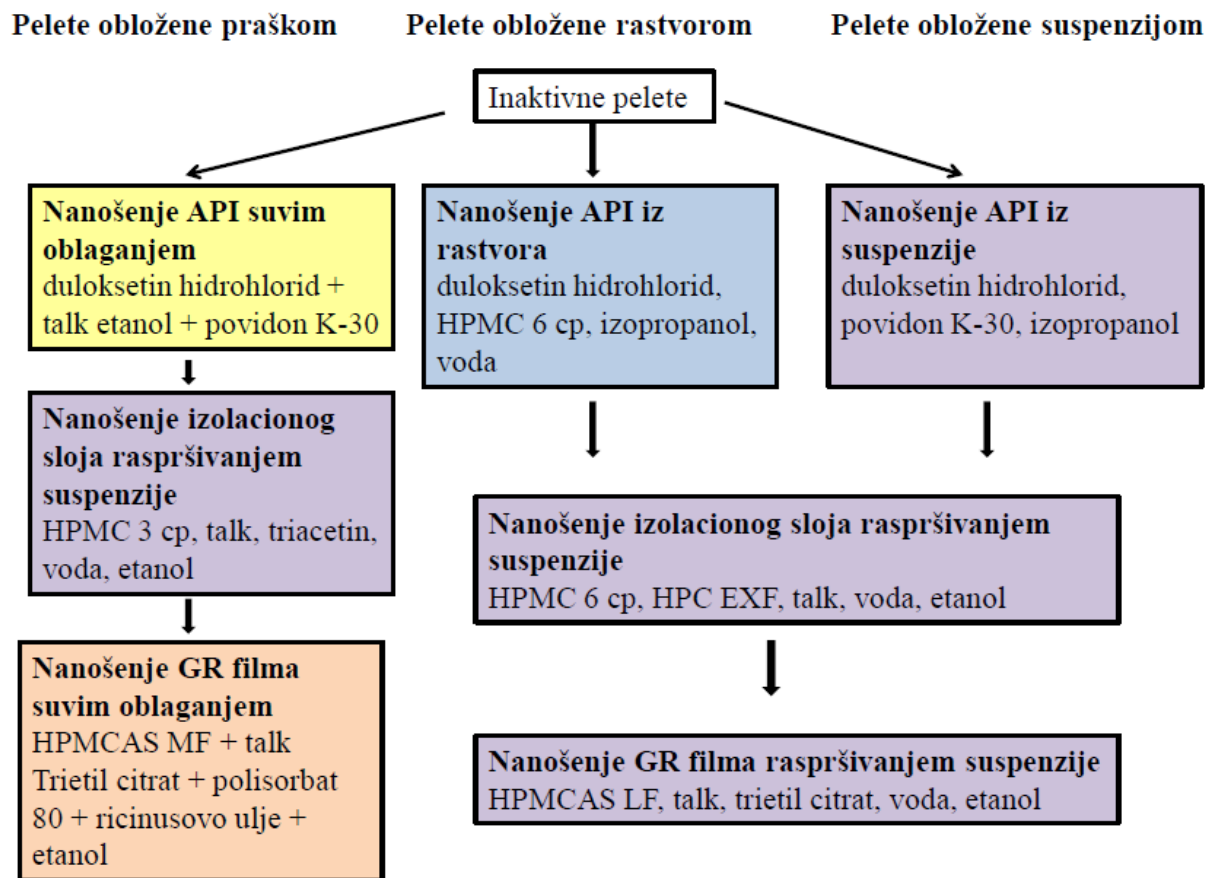
Table 8. Risk analysis for critical quality attributes of enteric-coated pellets with respect to different layering techniques

Rizik	KAK	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Nanošenje aktivne supstance oblaganjem	Sadržaj	3	2	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Gastrorezistencija	3	4	H
	Brzina rastvaranja	3	3	M
	Hemijska stabilnost	2	2	M
Nanošenje rastvorene aktivne supstance	Sadržaj	1	1	L
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Gastrorezistencija	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	3	4	H
Nanošenje suspendovane aktivne supstance	Sadržaj	3	2	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Gastrorezistencija	1	1	L
	Brzina rastvaranja	3	2	M
	Hemijska stabilnost	1	1	L

KAK - kritični atribut kvaliteta; L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H - visok nivo rizika
 KAK – critical quality attribute; L – low risk level; M – medium risk level; H- high risk level

3.1.4.3 Odabir ekscipijenasa za fazu nanošenja aktivne supstance na pelete

Šematski prikaz formulacije primenjenih u fazi nanošenja aktivne supstance prikazan je na Slici 22.



Slika 22. Šematski prikaz ekscipijenasa korišćenih u prvom delu istraživanja
 Figure 22. Schematic overview of excipients used in the first part of the research

Rastvarači koji su odabrani za ispitivane tehnike su sledeći: smeša vode i izopropanola u odnosu 1:1 za tehniku nanošenja rastvorene aktivne supstance i izopropanol za nanošenje suspendovane aktivne supstance zato što se model supstanca lako rastvara u smeši vode i izopropanola, a teško je rastvorna u čistom izopropanolu. Za tehniku suvog nanošenja aktivne supstance odabran rastvarač za vezivno sredstvo je etanol zbog lakše procesibilnosti. Prilikom odabira ekscipijenasa težilo se da nivo ekscipijenasa bude sveden na minimum da bi se povećala efikasnost procesa pošto je cilj procesa nanošenje aktivne supstance, a ne ekscipijenasa. Polimeri koji imaju ulogu vezivnog sredstva u nanošenju rastvorene ili suspendovane aktivne supstance su odabrani na osnovu rastvorljivosti u rastvaraču koji se koristi u datoj tehnici kao i na osnovu procesibilnosti tako da je za tehniku nanošenja rastvorene model supstance odabrana hidroksipropil metilceluloza 6 cp, a za tehniku nanošenja suspendovane model supstance je odabran povidon K-30. Povidon K-30 je odabran i za tehniku suvog nanošenja. U tehnici suvog oblaganja se koristi i

talk koji se meša sa aktivnom supstancom, ima ulogu lubrikansa i sprečava aglomeraciju peleta u toku procesa (Nastruzzi i autori, 2000).

3.1.4.4 Nanošenje izolacionog sloja na pelete obložene aktivnom supstancom

Izolacioni sloj ima ključnu ulogu u postizanju adekvatne hemijske stabilnosti preparata jer treba da spreči kontakt, odnosno reakciju između aktivne supstance i gastrozistentnog polimera (Jansen i autori, 1998). Šematski prikaz formulacija primenjenih u fazi nanošenja izolacionog sloja je prikazan na Slici 22. Literaturni podaci ukazuju da suviše tanak izolacioni sloj omogućava migraciju model supstance ili anhidrida sukcinatne kiseline te da kao rezultat njihove reakcije dolazi do porasta srodne supstance označene kao duloksetin sukcinamid. Da bi bio efikasan potrebno je da izolacioni sloj ima odgovarajuću debljinu i da bude što manje porozan te je odlučeno da se ovaj sloj na pelete nanese tehnikom oblaganja suspenzijom. Minimalna debljina izolacionog sloja od 30 µm je definisana na osnovu analize peleta originalnog proizvoda skenirajućom elektronskom mikroskopijom, a odabrana je formulacija na bazi hidroksipropil metilceluloze.

3.1.4.5 Analiza rizika za tehnike nanošenja gastrozistentnog filma

U Tabeli 9 prikazana je analiza rizika za tehnike nanošenja gastrozistentnog filma koje se ispituju u prvom delu istraživanja.

Tabela 9. Analiza rizika za kritične attribute kvaliteta gastrozistentnih peleta u odnosu na različite tehnike nanošenja gastrozistentnog filma
Table 9. Risk analysis for critical quality attributes of enteric-coated pellets with respect to different techniques of application of enteric-coating

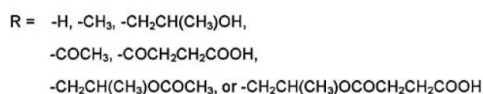
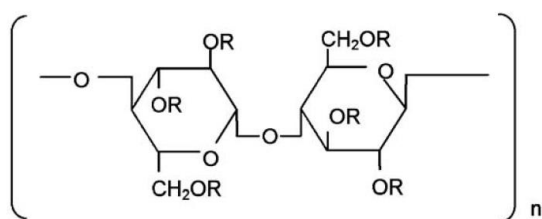
Rizik	KAK	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika	
Nanošenje	Sadržaj	1	1	L	
gastrozistentnog	Ujednačenost sadržaja	1	1	L	
filma	suvim	Gastrozistentcija	3	4	H
oblaganjem	Brzina rastvaranja	3	3	M	
	Hemijska stabilnost	1	1	L	
Nanošenje	Sadržaj	1	1	L	
gastrozistentnog	Ujednačenost sadržaja	1	1	L	
filma iz suspenzije u	Gastrozistentcija	2	1	L	
kojoj je polimer	Brzina rastvaranja	2	1	L	
rastvoren	Hemijska stabilnost	1	1	L	

KAK - kritični atribut kvaliteta; L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H - visok nivo rizika
KAK – critical quality attribute; L – low risk level; M – medium risk level; H- high risk level

U odnosu na oblaganje peleta rastvorenim polimerom, nanošenje gastrozistentnog filma tehnikom suvog oblaganja nosi veći rizik od pojave rezultata gastrozistencije i brzine rastvaranja van specifikacije zato što nanos filma nije ujednačen kao kada se polimer nanosi na pelete u rastvorenom obliku.

3.1.4.6 Odabir ekscipijensa za fazu nanošenja gastrozistentnog filma

Formulacije primenjene u fazi nanošenja gastrozistentnog filma na pelete obložene izolacionim slojem su šematski prikazane na Slici 22. Za obe ispitane tehnike oblaganja odabrani polimer je hipromeloza acetat sukcinat čija je hemijska struktura prikazana na Slici 23. Temperatura staklastog prelaza ovog polimera je 130 °C, a zahvaljujući prisustvu karboksilnih grupa ovaj enterosolventni polimer je rastvoran u vodenim rastvorima sa pH višim od 5.5. Spada u grupu stabilnijih gastrozistentnih polimera. Hemijska stabilnost enterosolventnih polimera je mera nivoa slobodne kiseline koja nastaje u toku ispitivanja stabilnosti, a koji je za ovaj polimer niža nego kod drugih ispitivanih polimera. Postoji više tipova ovog polimera koji se razlikuju po pH vrednosti na kojoj se rastvaraju (L tip – nizak pH, M tip – srednji pH i H tip – visok pH) kao i po veličini čestica polimera (F tip - fini kohezivni prah srednje veličine čestica 5 μm i G tip-protočne granule srednje veličine čestica 1 mm). Različita pH na kojoj se rastvaraju tipovi ovog polimera posledica je različitih nivoa sukcinatnih i acetatnih grupa u polimeru tako da se L tip kod koga je nivo sukcinatnih grupa najveći u odnosu na acetil grupe rastvara na najnižem pH (oko 5.5), dok se H tip kod koga je nivo sukcinatnih grupa najniži u odnosu na acetil grupe rastvara na najvišem pH (oko 6.5 - 7) (Tajarobi i autori 2011; Obara i Kokubo, 2008).



Slika 23. Hemijska struktura polimera hipromeloza acetat sukcinat (Obara i Kokubo, 2008)

Figure 23. Chemical structure of the polymer hypromellose acetate succinate (Obara and Kokubo, 2008)

Ovaj polimer se može primeniti u obliku vodene disperzije, rastvoren u smeši etanola i vode ili rastvoren u vodi pomoću neke bazne supstance, amonijum hidroksida ili amonijum karbonata i može se primeniti bez tečnosti kao vehikuluma za prenos do supstrata, odnosno može se primeniti za tehniku suvog oblaganja. Za suvo oblaganje i primenu u formi disperzije preporuka je da se koristi mikronizirani, F tip polimera dok u slučaju rastvaranja nije važna veličina čestica polimera. Za primenu ovog polimera u obliku disperzije neophodno je koristiti posebnu mlaznicu za raspršivanje disperzije koja omogućava odvojeno raspršivanje disperzije polimera i plastifikatora pošto postoji velika tendencija ka zapušavanju mlaznice u slučaju kada se polimer i plastifikator primenjuju u smeši (Obara i Kokubo, 2009).

3.2 Materijali i metode

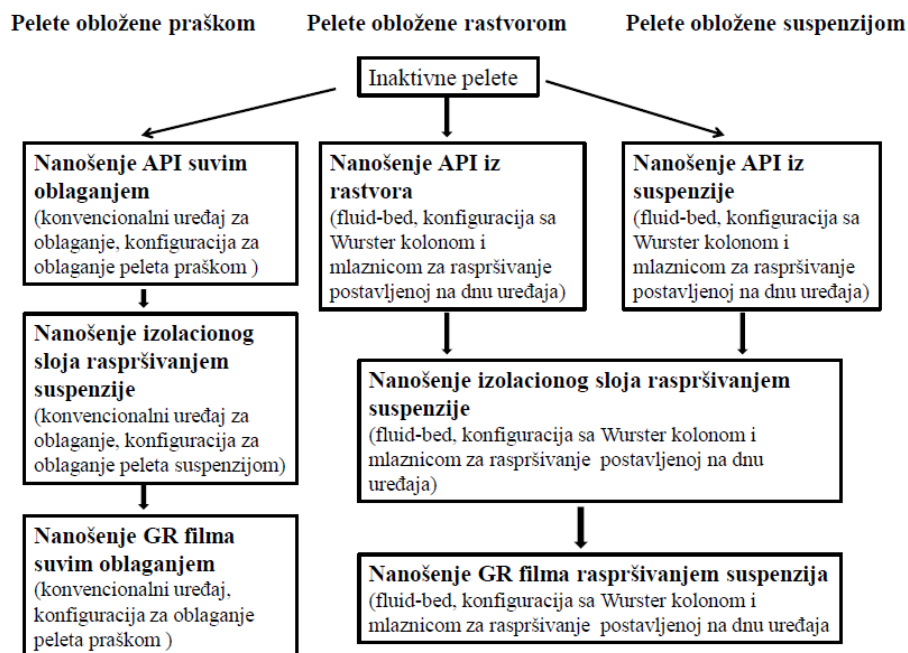
3.2.1 Materijali

Duloksetin-hidrochlorid veličine čestica $d(90) < 10 \mu\text{m}$ (JiuZhou, Kina), inaktivne pelete od saharoze i skroba, 20 – 25 mesh (JRS Pharma, Nemačka), povidon K-30 (ISP, Švajcarska), hidroksipropil metilceluloza 3 cp (Taian Ruitai Cellulose Co. Ltd., Kina), triacetin (Eastman Chemical B.V., Švajcarska), talk (Imerys Talc, Italija), hipromeloza acetat sukcinat tip MF (Shin-Etsu, Japan), hipromeloza acetat sukcinat tip LF (Shin-Etsu, Japan), trietil citrat (Jungbunzlauer, Nemačka), polisorbat 80 (Oleon, Belgija), ulje ricinusa (Henry Lamotte Oils, Nemačka), hidroksipropilmetil celuloza 6 cp (The Dow Chemical Company, Velika Britanija), hidroksipropil celuloza EXF (Ashland, Holandija), izopropanol (Brenntag-CEE, Nemačka) i etanol koncentrovani (Swan Lake, Srbija) su korišćeni u eksperimentima. Svi ostali reagensi su bili analitičkog kvaliteta.

3.2.2 Metode

3.2.2.1 Proizvodnja obloženih peleta

Šematski prikaz procesnih koraka proizvodnje peleta prezentovan je na Slici 24. Formulacije su označene prema tehnici oblaganja korišćenoj za nanošenje sloja sa aktivnom supstancom.



Slika 24. Šematski prikaz eksperimenata izvedenih u prvoj fazi istraživanja
 Figure 24. Schematic overview of experiments performed in the first part of the research

Svi eksperimenti koji su podrazumevali korišćenje tehnike suvog oblaganja su izvedeni na uređaju za oblaganje GS 25 HT/PRA/M (IMA, Italija) u konfiguraciji sa perforiranim imerzionim mačevima za oblaganje peleta praškovima (Slika 25). Ovaj sistem su detaljno opisali Nastruzzi i autori (2000). Izolacioni sloj je na pelete obložene aktivnom supstancom tehnikom suvog oblaganja nanesen takođe u uređaju GS 25 HT/PRA/M tehnikom raspršivanja suspenzije za oblaganje. Svi ostali eksperimenti koji su podrazumevali oblaganje peleta raspršivanjem tečnosti za oblaganje su izvedeni na uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha Glatt GPCG2 (Glatt GmbH, Nemačka) u konfiguraciji sa Wurster kolonom i mlaznim 1.2 mm raspršivačem za dva fluida postavljenim na dnu uređaja.

U svim eksperimentima ciljni udeo duloksetina u fazi nanošenja aktivne supstance je bio 31%, a ciljni nanos izolacionog sloja je bio 25% u odnosu na masu peleta obloženih slojem aktivne supstance. Nanos duloksetin hidrohlorida je definisan tako da se postigne dovoljno veliki udeo leka koji će omogućiti da se gotove pelete pune u kapsule željene veličine. Nanos izolacionog sloja je definisan tako da se smanji rizik kontakta duoksetin hidrohlorida i hipromeloze acetat skucinata. Ciljani nanos gastrozistentnog sloja je bio 60% u odnosu na masu izolovanih peleta kada se film nanosio tehnikom suvog oblaganja i 40% kada se film nanosio tehnikom

raspršivanja tečnosti za oblaganje, a definisan je tako da se postigne specificirana gastrozistencija i oslobađanje duloksetina.



Slika 25. Uređaj za oblaganje tableta i peleta GS 25 HT/PRA/M
Figure 25. Automatic coating machine for tablets and pellets GS 25 HT/PRA/M

Procesni parametri u svim prikazanim eksperimentima su postavljeni na osnovu preliminarnih proba i imajući u vidu osnovne principe oblaganja peleta - da treba što više smanjiti aglomeraciju peleta u toku procesa, bez narušavanja adhezivnosti filma na pelete.

3.2.2.1.1 Oblaganje peleta tehnikom suvog oblaganja

Kvalitativni i kvantitativni sastav praškova i tečnosti za oblaganje koje su korišćene za oblaganje peleta duloksetin hidrokloridom, izolacionim i gastrozistentnim slojem su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Kvalitativni i kvantitativni sastav tečnosti za oblaganje i praškova korišćenih za oblaganje aktivnom supstancom, izolacionim i gastrozistentnim slojem peleta proizvedenih tehnikom suvog oblaganja

Table 10. Qualitative and quantitative composition of coating liquids and powders used for drug layering, isolation and enteric coating of pellets produced by drug layering

Materijal (%)	Nanošenje API suvim oblaganjem	Nanošenje izolacije raspršivanjem tečnosti za oblaganje	Nanošenje GR filma suvim oblaganjem
Tečna faza			
Povidon K-30	5	/	/
HPMC 3 cp	/	7	/
Talk	/	8	/
Triacetin	/	1	/
Trietil citrat			35
Polisorbat 80	/	/	4.5
Ulje ricinusa	/	/	7.5
Voda*	/	42	/
Etanol koncentrovani*	95	42	53
Praškasta faza			
Model supstanca	85	/	/
Talk	15	/	20
Hipromeloza acetat sukcinat	/	/	80

API – aktivna supstanca; GR – gastrozistentni

*Rastvarači koji nestaju u toku proizvodnog procesa

API – active pharmaceutical ingredient; GR – enteric-coating

* Solvents that disappear during the coating process

Nanošenje aktivne supstance na pelete. Oblaganje inaktivnih peleta aktivnom supstancom tehnikom suvog oblaganja je izvedeno sa 13.6 kg inaktivnih peleta. Materijali za smešu praškova su prositani na situ 1.00 mm, izmešani i prositani opet kroz sito 1.00 mm. Rastvor vezivnog sredstva pripremljen je rastvaranjem povidona u koncentrovanom etanolu pomoću propelerske mešalice (IKA Eurostar Power control visc, IKA-Werke GmbH, Nemačka). Parametri procesa nanošenja aktivne supstance su prikazani u Tabeli 11. Pre početka nanošenja rastvora vezivnog sredstva i smeše praškova pelete su zagrejane na temperaturu od 26°C i pri brzini rotiranja bubnja od 5 rpm. Nanošenje praška na pelete se izvodilo u ciklusima. Svaki ciklus se sastojao od pet faza: raspršivanje tečnosti za vezivanje da bi se pelete učinile lepljivim, pauza za homogenizaciju

peleta, nanošenje praška, pauza i sušenje da bi se uklonio rastvarač. U toku svih faza ciklusa bubanj za oblaganje rotira maksimalnom brzinom. Proces je u potpunosti automatizovan i kontroliše se preko digitalnog panela. Obložene pelete su osušene pri brzini rotiranja bubnja od 5 rpm i temperaturi ulaznog vazduha od 45°C dok nije postignuta temperatura peleta od 35°C.

Tabela 11. Parametri procesa nanošenja aktivne supstance, izolacionog i gastrozistentnog filma na pelete u konvencionalnom uređaju za oblaganje sa imerzionim mačevima

Table 11. Parameters of processes of drug powder layering, spray coating of isolating layer and application of enteric-coating by dry coating in a conventional coating pan with immersion swords

Procesni parametri	Oblaganje model supstancom	Oblaganje izolacionim filmom	Oblaganje gastrozistentnim
Temperatura ulaznog vazduha (°C)	40	57	40
Temperatura peleta (°C)	26 - 28	37	26 – 30
Pritisak ulaznog vazduha (mmH ₂ O)	5 – 6	5 – 6	5 – 6
Negativni pritisak u bubnju (mm H ₂ O)	2	2	2
Brzina rotiranja bubnja (rpm)	19	19	19
Vreme prskanja (s)	4 – 3	Nije primenljivo	3 – 2
Pauza nakon prskanja (s)	3	Nije primenljivo	3
Trajanje doziranja praška (s)	2	Nije primenljivo	2
Pauza nakon doziranja praška (s)	10	Nije primenljivo	10
Sušenje (s)	12	Nije primenljivo	12
Pritisak recirkulacije (bar)	0.4	Nije primenljivo	0.4
Pritisak raspršivanja (bar)	0.5	Nije primenljivo	0.5
Brzina pužnog transportera (rpm)	40	Nije primenljivo	40
Protok suspenzije (ml/min)	Nije primenljivo	22	Nije primenljivo
Pritisak atomizacije (bar)	Nije primenljivo	1	Nije primenljivo
Brzina rotiranja bubnja (rpm)	19	19	19

Nanošenje izolacionog sloja na pelete obložene model supstancom. Pelete obložene duloksetin hidrohloridom tehnikom suvog oblaganja su obložene izolacionim slojem tehnikom raspršivanja suspenzije. Izolacionim slojem je obloženo 11 kg peleta obloženih aktivnom supstancom. Pre početka nanošenja suspenzije za oblaganje pelete su zagrejane do temperature od 40°C pri temperaturi ulaznog vazduha od 60°C, količini ulaznog vazduha od 5 mm H₂O i brzini rotiranja bubnja od 3 rpm. Parametri pri kojima je vršeno oblaganje peleta suspenzijom su prikazani u Tabeli 11. Nakon nanošenja suspenzije za oblaganje obložene pelete su sušene 15 minuta na temperaturi ulaznog vazduha od 60°C, pritisku ulaznog vazduha od 5 mm H₂O stuba, brzini rotiranja bubnja od 3 rpm i sa negativnim pritiskom od 1 mm H₂O.

Nanošenje gastrozistentnog filma na izolovane pelete. Parametri procesa nanošenja gastrozistentnog filma tehnikom suvog oblaganja su prikazani u Tabeli 11. Pre početka nanošenja tečnosti za plastifikaciju i smeše praškova, pelete su zagrejane do temperature od 26°C pri brzini rotiranja bubnja od 5 rpm. Materijali za pripremu smeše praškova su prositani na situ otvora 1.00 mm, izmešani, a smeša je ponovo prositana na situ otvora 1.00 mm. Plastifikatori su izmešani pomoću propelerske mešalice (IKA Eurostar Power control visc, IKA-Werke GmbH, Nemačka). Da bi došlo do formiranja koherentnog filma obložene pelete su povrgnute procesu sazrevanja (engl. *curing*) u trajanju od 15 sati na temperaturi proizvoda od 57°C.

3.2.2.1.2 Proizvodnja obloženih peleta tehnikom oblaganja raspršivanjem u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha

Kvalitativni i kvantitativni sastav suspenzija za oblaganje peleta u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha je prikazan u Tabeli 12. Priprema tečnosti za oblaganje sastojala se od rastvaranja rastvornih supstanci u rastvaraču ili smeši rastvarača pomoću propelerske mešalice Ika Werke RW20 (Ika Werke, Nemačka), dispergovanju i homogenizaciji (Ultra-Turrax® T-50, Ika-Werke, Nemačka) nerastvornih sirovina u vehikulumu u drugom sudu i dodavanju disperzije rastvoru. U svim eksperimentima oblaganja peleta u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha pelete su prvo zagrejane, zatim je vršeno oblaganje i obložene pelete su osušene. Parametri procesa oblaganja peleta u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha su prikazani u Tabeli 13. Svi eksperimenti su rađeni sa 750 g peleta na početku procesa i visinom Wurster-ove kolone od 2.5 cm.



Slika 26. Uređaj sa fluidizirajućim kretanjem vazduha Glatt GPCG2 (Glatt, 2016)
 Figure 26. Fluid-bed device Glatt GPCG2 (Glatt, 2016)

Tabela 12. Formulacije tečnosti za oblaganje korišćenih za oblaganje peleta aktivnom supstancom, izolacionim slojem i gastrozistentnim filmom
 Table 12. Formulations of coating liquids used for drug layering and application of isolating and enteric-coating

Materijal (%)	Nanošenje model supstance iz suspenzije	Nanošenje model supstance iz rastvora	Nanošenje izolacionog filma	Nanošenje gastrozistentnog filma
Duloksetin HCl	10	5.7	/	/
Povidone K-30	5	/	/	/
Hipromeloza 6 cp	/	6.3	2	/
Hidroksipropil celuloza EXF	/	/	2	/
Hipromeloza acetat sukcinat LF	/	/	/	5
Talk	/	/	8	1.5
Trietil citrat	/	/	/	0.5
Voda*	/	22	44	18.6
Etanol koncentrovani*	/	/	44	74.4
Izopropanol*	85	66	/	/

*Rastvarač koji nestaje u toku procesa proizvodnje

* Solvent that disappears during the production process

Tabela 13. Parametri procesa oblaganja peleta u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha
 Table 13. Coating parameters of experiments performed in a fluid-bed device

	Nanošenje model supstance iz suspencije	Nanošenje model supstance iz rastvora	Nanošenje izolacionog filma	Nanošenje gastrorezistentnog Filma
Zagrevanje peleta				
Protok ulaznog vazduha (m ³ /h)	40	40	50	50
Temperatura ulaznog vazduha (°C)	60	60	60	60
Temperatura proizvoda (°C)	39	40	40	39
Raspršivanje tečnosti za oblaganje				
Temperatura ulaznog vazduha (°C)	51 ± 3	52 ± 3	53 ± 3	52 ± 3
Protok ulaznog vazduha (m ³ /h)	50 – 75	50 – 100 m ³ /h	65 – 75	65- 75
Protok tečnosti za oblaganje (g/min)	6 – 14 g	4 – 11	5 – 11	6 – 15
Pritisak atomizacije (bar)	1.8	2.0	1.8	2.0
Temperatura proizvoda (°C)	38 ± 1	40 ± 1	39 ± 1	37 ± 1
Sušenje peleta				
Protok ulaznog vazduha (m ³ /h)	60	60	60	60
Temperatura ulaznog vazduha (°C)	55	55	55	55
Vreme sušenja (minuti)	10	10	10	10

3.2.2.2 Karakterizacija obloženih peleta

3.2.2.2.1 Sadržaj duloksetina

Sadržaj duloksetina u obloženim peletama određivan je odgovarajućom HPLC metodom. Analize su izvršene na uređaju Agilent HPLC system, 1100 series (Agilent Technologies, SAD). Korišćena je kolona 4.6 mm x 15 cm Zorbax XDB C-18, 3.5µm (Agilent Technologies, SAD). Korišćen je UV detektor na 225 nm. Mobilna faza se sastojala od filtrirane i degazirane smeše pufera, acetonitrila HPLC kvaliteta i tetrahidrofurana HPLC kvaliteta u odnosu 65:20:15. Pufer je pripremljen rastvaranjem 7.4 g natrijum perhlorat monohidrata u 1000 ml prečišćene vode, dodavanjem 3 ml trietilamina i podešavanjem pH rastvora perhlorom kiselinom do 2.0. Hromatografija je izvođena na sobnoj temperaturu na protoku 1.5 ml/min. Podaci su beleženi pomoću softvera OpenLabCDS Ezchrom (Agilent Technologies, SAD).

3.2.2.2 Brzina rastvaranja peleta obloženih aktivnom supstancom i izolacionim slojem

Brzina rastvaranja je ispitana na uređaju DT800 Dissolution Tester (Erweka, Nemačka) pomoću aparature sa rotirajućim korpicama, na brzini rotiranja od 100 rpm, u 1000 ml fosfatnog pufera pH vrednosti 6.8 ± 0.5 i temperaturi medijuma od 37 ± 0.5 °C. U određenim vremenskim tačkama uzorkovano je 4 ml medijuma, filtrirano kroz filter od staklenih vlakana od 1.0 μm , a prva 2 ml filtrata su odbačena. Uzorkovana količina medijuma nije nadoknađena. Koncentracija duloksetina je određena validiranom HPLC metodom opisanom u prethodnoj tački. Oslobođanje duloksetina je ispitano u najmanje tri uzorka.

3.2.2.3 Brzina rastvaranja peleta obloženih gastrozistentnih filmom

Brzina rastvaranja je ispitana na uređaju DT800 Dissolution Tester (Erweka, Nemačka) prema EP monografiji 2.9.3, metoda B. Korišćena je aparatura sa rotirajućim korpicama, na brzini rotiranja od 100 rpm i 1000 ml medijuma za ispitivanje brzine rastvaranja na 37 ± 0.5 °C. U prvih 120 minuta testa medijum za ispitivanje brzine rastvaranja je 0.1M hlorovodonična kiselina (pH 1.2), a u sledećih 120 minuta testa brzina rastvaranja se ispituje u fosfatnom puferu pH 6.8. U određenim vremenskim tačkama uzorkuje se 4 ml medijuma, filtrira kroz filter od staklenih vlakana otvora pora od 1.0 μm , a prva dva ml filtrata se odbacuju. Zapremina uzorkovanog medijuma se ne nadoknađuje. Koncentracija duloksetina u uzorku se određuje validiranom HPLC metodom opisanom u tački 3.2.2.2.1. Oslobođanje duloksetina je ispitano u najmanje tri uzorka.

3.2.2.4 Obrada podataka

Rezultati ispitivanja profila brzine rastvaranja duloksetina su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Sličnost profila oslobađanja ispitana je pomoću testa sličnost (FDA, 1997). Faktor sličnosti, f_2 , je računat prema jednačini 15 i korišćen za poređenje profila brzine rastvaranja model supstance iz peleta:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ 1 + \left(\frac{1}{n} \sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (15)$$

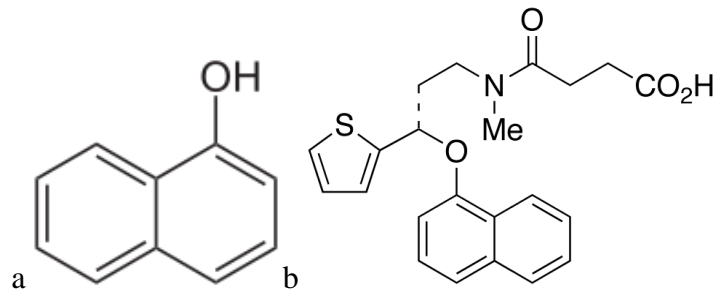
gde su R_t i T_t procenti od deklarisanе vrednosti rastvorene lekovite supstance iz ispitivanih šarži u vremenu t , a n je broj vremenskih tačaka uključenih u kalkulaciju. Za računanje faktora sličnosti f_2 korišćene su sve vremenske tačke pre nego što je otpušteno 85% model supstance i samo jedna tačka na kojoj je otpušteno više od 85% lekovite supstance.

3.2.2.2.5 Određivanje nečistoća duloksetina u gastrozistentnim peletama

U gastrozistentnim peletama praćene su sledeće nećistoće: Nećistoća 1 (1-naftol) i Nećistoća 2 (4-[-Metil[(3S)-3-(1-naftaleniloksi)-3-(2-tienil)propil]amino]-4-oksobutanoićna kiselina) koje su degradacioni proizvodi i Nećistoća 3 ((3S)-N-metil-3-(naftalen-1-iloksi)-3-(tiofen-3-il)propan-1-amin) i Nećistoća 4 ((S)-(+)-N,N-Dimetil-3-(1-naftiloksi)-3-(2-tienil)propanamin 2-hidroksi-sukcinat) koje nisu proizvod degradacije duloksetina, već potiću od procesa sinteze. Nećistoće koje su proizvodi degradacije duloksetina su prikazane na slici 27. Nećistoće su određene odgovarajućom HPLC metodom. Analize su raćene na urećaju Agilent HPLC sistem, 1100 Series (Agilent Technologies, SAD). Za hromatografiju je korišćena kolona C-18, 250 x 4.16 mm napunjena hemijski modifikovanim silika ćesticama (5µm) (Luna, Phenomenex Inc, SAD). Mobilna faza A je pripravljena rastvaranjem 0.69 g natrijum dihidrogen fosfat monohidrata u 300 ml vode i razblaćivanjem tog rastvora do 1000 ml. Dodato je 1.0 ml trietanol amina i pH rastvora podešen na 2.5 razblaćenom fosfatnom kiselinom. Rastvor je filtriran kroz 0.45 µm filter od regenerisane celuloze (RC 55 0.45 µm membrana, Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Nemaćka) i degaziran. Mobilna faza B sastojala se od vode i acetonitrila u odnosu 10:90. Diluent se sastojao od vode i acetonitrila u odnosu 55:45. Primenjen je protok od 1.0 ml/min, injekciona zapremina od 10 µl, temperatura kolone 25°C, a UV detektor je podešen na 215 nm. Za razdvajanje nećistoća moće da se koristi gradijent. Standardni rastvori su pripravljeni pomoću model supstance, referentnih standarda nećistoća, acetonitrila i diluenata. Test rastvori su pripravljeni od fino usitnjenih peleta. Pomoću jednaćine 16 izraćunat je sadržaj nećistoća u odnosu na deklarisanu sadržaj duloksetina:

$$\% \text{ pojedinaćne nećistoće} = \frac{Pa \times Wst \times c \times A \times CF}{Wa \times D \times Pst \times 5} \quad (16)$$

gde je Pa površina nećistoće pojedinaćne u test rastvoru date u mAUxs, Pst je površina pika referentnog rastvora u mAUxs, Wst je masa test supstance u mg, D je deklarisanu sadržaj u mg, A je prosećna masa punjenja u mg, c je sadržaj internog standarda u mg duloksetina/mg i CF je faktor korekcije koji je bezdimenzioni parametar.



Slika 27. a) Nečistoća 1 (1-naftol); b) Nečistoća 2 (4-[-Metil[(3S)-3-(1-naftaleniloksi)-3-(2-tienil)propil]amino]-4-oksobutanoična kiselina) b)

Figure 27. a) Impurity 1 (1-naphthol); b) Impurity 2 (: 4-[-Methyl[(3S)-3-(1-naphtalenyloxy)-3-(2-thienyl)propyl]amino]-4-oxobutanoic acid

3.2.2.2.6 Vizuelizacija čestica

Vizuelizacija peleta sa ciljem opisivanja morfoloških karakteristika peleta i određivanja debljine pojedinih slojeva izvršena je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) Phenom G2 Pro (Phenom-World, Holandija). Uzorci su fiksirani na aluminijski držač pomoću podloge koja je sa obe strane obložena karbonskim adhezivom. Aluminijski držač je postavljen u vakuumsku komoru, a uzorak je posmatran pri naponu od 5 kV na uvećanjima od 290 do 295 puta.

3.2.2.2.7 Određivanje veličine peleta, oblika i karakteristika površine

Parametri koji karakterišu veličinu i oblik peleta su određeni pomoću optičkog mikroskopa (*Leica DM3000*, Wetzlar, Nemačka) sa kamerom (*Clemex L*, Clemex, Kanada) povezanog sa računarom opremljenim softverom za analizu slika (engl. *image analysis*) (*Clemex Vision PE*, Clemex, Kanada). Uzorak peleta bio je raspoređen na transparentni plastični nosač i sniman na uvećanju od 25 puta. Veličina, oblik i karakteristike površine peleta su izračunate pomoću softvera za analizu slike. Iz dvodimenzionalne projekcije su određeni sledeći parametri: kružni prečnik, stepen izduženosti (engl. *aspect ratio* – AR), sferičnost projekcije i hrapavost. Kružni prečnik se računa za dvodimenzionalni objekat po sledećoj formuli:

$$R = 2\sqrt{\frac{\text{površina}}{\pi}} \quad (17)$$

Stepen izduženosti je jedan od najstarijih i najčešće primenjivanih parametara za procenu sferičnosti čestice i predstavlja odnos najduže dimenzije i na nju upravne dimenzije objekta. Idealno sferni objekti imaju stepen izduženosti 1.

Sferičnost projekcije (engl. *roundness*) je karakteristika oblika koja kvantifikuje zaobljenost ivica objekta i računa se po formuli 18, a grafički je prikazana na slici 28:

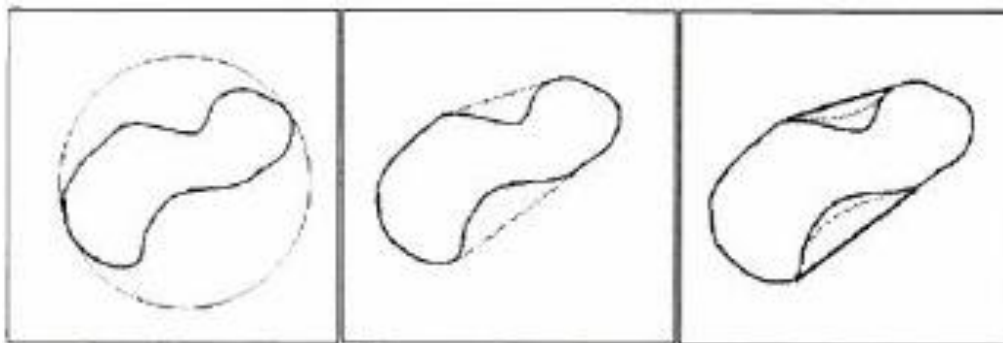
$$\text{Sferičnost projekcije} = \frac{4 \times \text{površina}}{\pi \times L \times L} \quad (18)$$

gde je L maksimalni Feretov prečnik čestice. Za idealno sferne čestice sferičnost projekcije ima vrednost 1.

Hrapavost (engl. *roughness*) je računata po formuli 19 i grafički je prikazana na slici 28:

$$\text{Hrapavost} = \frac{\text{konveksni perimetar}}{\text{perimetar}} \quad (19)$$

konveksni perimetar i perimetar su prikazani na slici 28.



Slika 28. Levo: Sferičnost projekcije, sredina:konveksni perimetar, desno: hrapavost (Clemex, User guide)
Figure 28. Left: roundness; middle: convex perimeter; right: roughness (Clemex, user guide)

3.2.2.2.8 Gubitak sušenjem peleta

Gubitak sušenjem se određuje iz spršenih peleta, termogravimetrijskom metodom na 2.5 mg uzorka i uređaju Mettler-Toledo HR 83 (Mettler-Toledo, Švajcarska). Analize su rađene na temperaturi od 105°C i u trajanju testa do postizanja pada mase manjeg od 1 mg za 50 s.

3.2.2.2.9 Nasipna gustina

Nasipna gustina peleta je određena pomoću graduisane menzure tako što su pelete sipane u menzuru do 100 ml i zapremina koju se pelete zauzele je očitana do najbližeg mililitra. Nasipna

gustina je izračunata kao odnos mase i zapremine peleta. Prikazani rezultati predstavljaju prosek od tri merenja.

3.2.2.2.10 Viskozitet tečnosti za oblaganje

Viskozitet tečnosti za oblaganje je meren na temperaturi od 25 °C na rotacionom reometru Malvern Kinexus KNX 2100 (Malvern Instruments, Velika Britanija) u konfiguraciji sa geometrijom čelična kupa-ploča (engl. *steel cone plate geometry*). Prečnik kupe je bio 60 mm sa uglom od 1°, a prečnik ploče 65 mm. Brzina smicanja se povećavala od 0.1 do 100 s⁻¹, faze merenja su bile podeljene logaritamski tako da svaka dekada sadrži deset izmerenih vrednosti viskoziteta. Svaki uzorak je analiziran tri puta, a prikazane su srednje vrednosti viskoziteta na brzini smicanja 100 s⁻¹

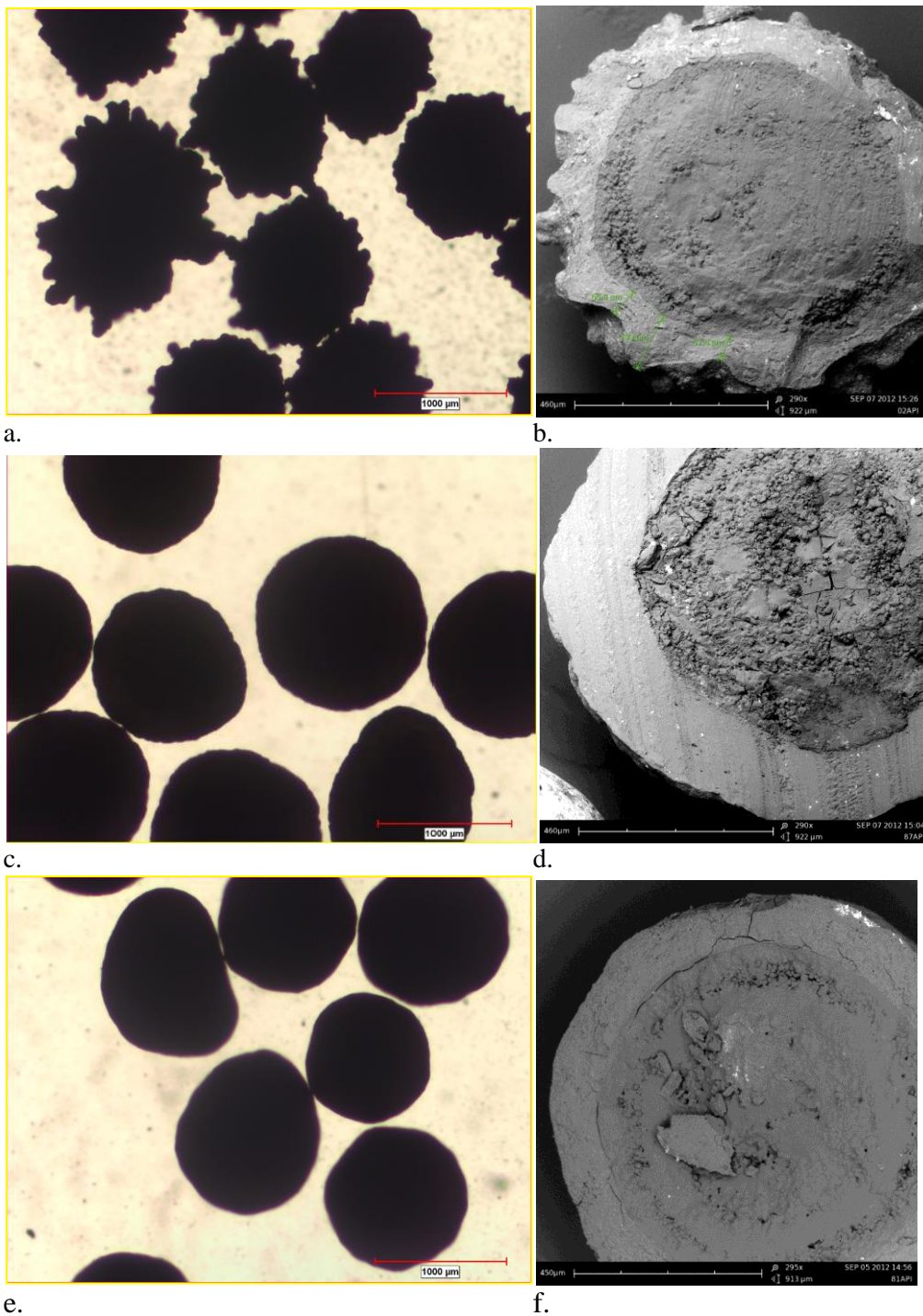
3.2.2.2.11 Studija stabilnosti

Gastrorezistentne pelete su čuvane 36 meseci u polietilenskim kesama na sobnoj temperaturi (24 ± 2 °C) i 60% relativne vlage vazduha. Stabilnost peleta nakon 12, 24 i 36 meseci čuvanja je procenjena određivanjem nivoa nečistoća duloksetina u gastrorezistentnim peletama.

3.3 Rezultati i diskusija

3.3.1 Priprema peleta obloženih aktivnom supstancom

Fotografije dobijene pomoću optičkog mikroskopa (Slika 29 a, c, e) kao i mikrografije sa skenirajućeg elektronskog mikroskopa (Slika 29 b, d, f) pokazuju da postoje značajne razlike između karakteristika površine peleta obloženih tehnikom suvog oblaganja i onih koje su obložene duloksetin hidrohloridom tehnikama oblaganja rastvorom i suspenzijom.



Slika 29. Slike peleta obloženi lekovitom supstancom sa optičkog mikroskopa proizvedene tehnikom a) suvog oblaganja; c) oblaganjem rastvorom; e) oblaganjem suspenzijom; SEM mikrografije peleta proizvedeni tehnikom b) suvog oblaganja; d) oblaganjem rastvorom; f) oblaganjem suspenzijom
 Figure 29. Photographs of drug layered pellets made by optical microscope produced by a) powder layering; c) solution layering; e) suspension layering; SEM micrographs of pellets produced by b) powder layering; d) solution layering; f) suspension layering

Te razlike su kvantifikovane pomoću softvera za analizu slika (engl. *image analysis*) i prikazane u Tabeli 14. Vidimo da su vrednosti parametara oblika peleta kod kojih je za nanošenje aktivne supstance tečnost korišćena kao vehikulum slične i mnogo bliže vrednosti 1 koja označava idealno sferan oblik i glatku površinu nego što je slučaj sa peletama koje su obložene suvom aktivnom supstancom i kod kojih je vrednost stepena izduženosti 1.17, sferičnosti projekcije 0.77 i hrapavosti površine 0.84. SEM mikrografije dodatno potvrđuju rezultate dobijene pomoću softvera za analizu slike. Površina peleta obloženih aktivnom supstancom tehnikom suvog oblaganja je vrlo gruba sa debljinom sloja aktivne supstance koji varira od oko 60 μm do oko 140 μm . Uzrok je nejednako nanošenje smeše praškova na površinu peleta. Nisu pronađeni literaturni podaci o parametrima oblika peleta proizvedenih tehnikom suvog oblaganja, ali postoji nekoliko primera SEM mikrografija objavljenih od strane Nastruzzi i autora (2000) koji su tehnikom suvog oblaganja nanosili ibuprofen na inaktivne pelete i dobili obložene pelete hrapave površine.

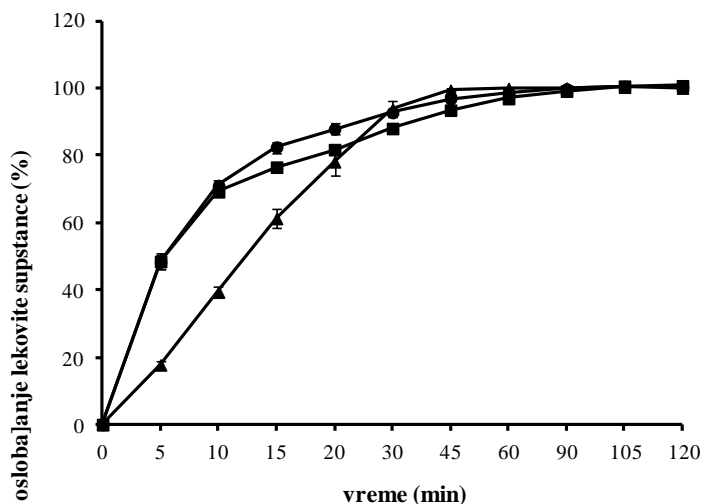
Tabela 14. Rezultati sadržaja duloksetina, gubitka sušenjem, nasipne gustine, veličine i karakteristika oblika i površine peleta
 Table 14. Results of assay of duloxetine, loss on drying and bulk density of pellets and parameters of shape of pellets

Faza proizvodnje	Uzorak	Sadržaj duloksetina (mg duloksetina/ 100 mg peleta)	Gubitak sušenjem (%)	Nasipna gustina (g/ml)	Kružni prečnik (μm)	Stepen izduženosti	Sferičnost projekcije	Hrapavost
<i>Oblaganje peleta aktivnom supstancom</i>	Suvo oblaganje	28.0	1.2	0.63	1084.4 \pm 141.1	1.17 \pm 0.09	0.77 \pm 0.06	0.84 \pm 0.04
	Oblaganje rastvorom	27.3	2.4	0.61	1270.0 \pm 52.3	1.09 \pm 0.06	0.90 \pm 0.04	0.97 \pm 0.01
	Oblaganje suspenzijom	28.2	2.8	0.67	1086.2 \pm 54.5	1.11 \pm 0.07	0.89 \pm 0.06	0.97 \pm 0.01
<i>Oblaganje peleta izolacionim slojem</i>	Pelete obložene praškom	22.5	1.1	0.75	1163.6 \pm 80.6	1.17 \pm 0.09	0.79 \pm 0.06	0.88 \pm 0.00
	Pelete obložene rastvorenim aktivnom supstancom	21.5	2.1	0.71	1309.6 \pm 55.0	1.09 \pm 0.06	0.91 \pm 0.05	0.98 \pm 0.01
	Pelete obložene suspendovanom aktivnom supstancom	23.7	2.4	0.75	1138.3 \pm 58.5	1.10 \pm 0.07	0.90 \pm 0.05	0.97 \pm 0.01
<i>Oblaganje peleta gastro rezistentnim filmom</i>	Pelete obložene praškom	14.0	1.2	0.83	1386.5 \pm 151.7	1.16 \pm 0.07	0.82 \pm 0.05	0.95 \pm 0.01
	Pelete obložene rastvorenim aktivnom supstancom	15.5	2.5	0.75	1469.7 \pm 69.5	1.08 \pm 0.06	0.92 \pm 0.04	0.97 \pm 0.01
	Pelete obložene suspendovanom aktivnom supstancom	16.4	2.8	0.80	1241.9 \pm 60.9	1.09 \pm 0.07	0.91 \pm 0.05	0.97 \pm 0.01

Terebesi i Bodmeier (2010) su ispitivali proces suvog oblaganja peleta u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha i dobili slične rezultate u smislu morfoloških karakteristika površine peleta. Sloj aktivne supstance je debeo od oko 180 μm do oko 220 μm u slučaju peleta obloženih rastvorenim supstancom dok je debljina sloja u slučaju oblaganja peleta suspendovanim aktivnom supstancom od oko 110 μm do oko 130 μm . Rezultati sadržaja duloksetina, gubitka sušenjem i nasipne gustine peleta prikazani su takođe u Tabeli 14. Iz njih vidimo da proces oblaganja rastvorenim aktivnom supstancom ima nešto nižu efikasnost od druga dva ispitana procesa, da pelete proizvedene tehnikom suvog oblaganja imaju najniži gubitak sušenjem od 1.2% u odnosu na pelete proizvedene oblaganjem suspenzijom (2.8%) i rastvorom (2.4%), a da pelete proizvedene oblaganjem suspenzijom imaju najnižu nasipnu gustinu od 0.67 g/ml. Iako je sadržaj duloksetina sličan u sve tri ispitivane šarže postoje razlike u debljini sloja aktivne supstance. Ove razlike su posledica različite formulacije slojeva proizvedenih različitim tehnikama. Prve probe oblaganja peleta rastvorenim i suspendovanim model supstancom u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha su urađene sa istim udelom povidona K-30, samo sa različitim rastvaračima. tj. sa smešom vode i izopropanola kada je model supstanca rastvorena i sa izopropanolom kada je duloksetin hidrohlorid suspendovan. Povidon je izabran zato što je što je rastvoran i u izopropanolu i u smeši vode i izopropanola. Međutim, sve probe sa rastvorenim duloksetin hidrohloridom i povidonom K-30 kao sredstvom za vezivanje nisu bile uspešne zbog jako izraženog formiranja aglomerata koji bi u potpunosti blokirali Wurster-ovu kolonu. Analize diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom izvedene u drugom delu istraživanja su pokazala da je uzrok izražene aglomeracije nastanak amorfne forme duloksetina čiji je Tg nizak. Formiranje aglomerata je bilo manje izraženo kada je kao vezivno sredstvo korišćena hidroksipropil metilceluloza 6 cp, najverovatnije zbog većeg viskoziteta tečnosti za oblaganje pripremljene sa hidroksipropil metilcelulozom (Zhao i autori, 2012). Viskozitet rastvora za oblaganje pripremljenog sa povidonom K-30 iznosila je 0.008 Pa s, a viskozitet rastvora za oblaganje pripremljenog sa istim udelom hidroksipropil metilceluloze iznosila je 0.07 Pa s. Da bi se aglomeracija peleta prilikom oblaganja rastvorenim model supstancom svela na minimum udeo hidroksipropil metilceluloze u rastvoru za oblaganje je povećan na 110% u odnosu na udeo duloksetin hidrohlorida tako da je sloj aktivne supstance proizveden ovom tehnikom najdeblji i ove pelete imaju najveći prečnik od $1270.0 \mu\text{m} \pm 52.3 \mu\text{m}$ u odnosu na pelete proizvedene

tehnikom suvog oblaganja čije je prečnik $1084.4 \mu\text{m} \pm 141.1 \mu\text{m}$, odnosno pelete proizvedene oblaganjem suspenzijom čiji je prečnik $1086.2 \mu\text{m} \pm 54.5 \mu\text{m}$. Prosečna vrednost prečnika peleta proizvedenih suvim oblaganjem i oblaganjem suspenzijom je sličan, ali je standardna devijacija skoro tri puta veća kod peleta proizvedenih suvim oblaganjem što je posledica načina kretanja peleta u uređaju za oblaganje i činjenice da se prašak ne može dozirati jednako ravnomerno kao tečnost za oblaganje.

Jasno je sa Slike 30 da je oslobađanje duloksetina potpuno u svim ispitanim uzorcima posle 120 minuta u fosfatnom puferu pH 6.8. Postoje, međutim, razlike u obliku profila oslobađanja. Pelete obložene rastvorenim duloksetin hidrohloridom pokazuju sporije oslobađanje u prve četiri tačke profila brzine rastvaranja. Ovo se može pripisati većem viskozitetu polimera koji je korišćen u formulaciji i većem udelu polimera u odnosu na druge ispitane formulacije jer rastvaranje lekovite supstance zavisi od brzine difuzije molekula vode u polimer i od difuzije rastvorenog leka iz polimera (Suhrenbrock i autori, 2011, Lust i autori, 2013). Zbog velike koncentracije polimera pelete obložene rastvorenim duloksetin hidrohloridom imaju najveći prečnik, odnosno imaju najmanju kontaktnu površinu sa medijumom za ispitivanje brzine rastvaranja. Kedzierwich i autori (1999) su zaključili da su pelete sa manjim prečnikom (najvećom kontaktnom površinom sa medijumom za ispitivanje brzine rastvaranja) one sa najbržim profilom oslobađanja lekovite supstance. U naredne tri tačke profila (30., 45., i 60. minut) količina oslobođenog duloksetina je za nekoliko procenata veća nego u druge dve formulacije. Ovo se može objasniti prisustvom bolje rastvorne amorfne forme duloksetina u formulaciji. U poslednje dve tačke profila brzine rastvaranja sve ispitivane formulacije su pokazale potpuno oslobađanje od 100%. Standardne devijacije su relativno niske za sve ispitivane uzorke, sa nešto višim vrednostima kod peleta obloženih rastvorenim duloksetin hidrohloridom u petnaestom i dvadesetom minutu. Na osnovu izračunatih faktora sličnosti, f_2 , profili oslobađanja peleta obloženih praškom i suspendovanom aktivnom supstancom se mogu smatrati sličnim ($f_2=69.8$). Suprotno tome, izračunati faktori sličnosti između profila oslobađanja peleta obloženih suspendovanom i rastvorenom model supstancom ($f_2=34.4$) i između peleta obloženih praškom i rastvorenom model supstancom ($f_2=32.5$) ukazuju da se ovi profili oslobađanja ne mogu smatrati sličnim.



Slika 30. Profili oslobađanja duloksetina iz peleta obloženih lekovitom supstancom u fosfatnom puferu pH 6.8 za pelete: proizvedene suvim oblaganjem (●), oblaganjem rastvorom (▲) i oblaganjem suspenzijom (■)

Figure 30. Release profiles of duloxetine from drug layered pellets in phosphate buffer pH 6.8: powder layered pellets (●), solution layered pellets (▲), suspension layered pellets (■)

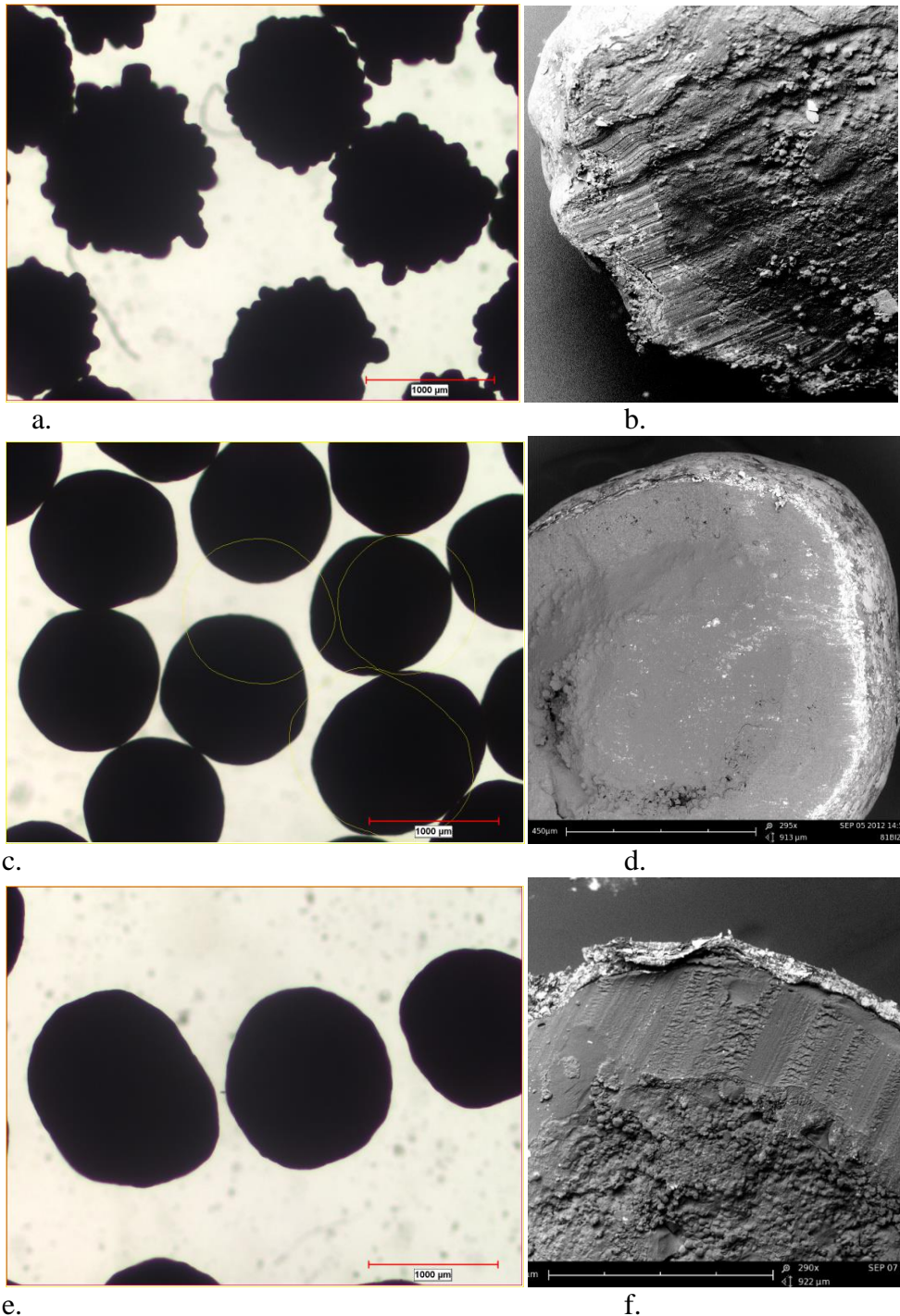
Može se zaključiti da se pelete obložene model supstancom sa zadovoljavajućim oslobađanjem mogu izraditi tehnikom oblaganja praškom, oblaganjem rastvorom i suspenzijom. Pelete proizvedene tehnikom suvog oblaganja imaju jako grubu površinu što može kasnije da utiče na fazu nanošenja gastrorezistentnog filma. Oblaganje peleta rastvorenom aktivnom supstancom zahteva veće količine polimera u odnosu na druge dve tehnike što produžava vreme trajanja procesa. S druge strane, ova tehnika ne zahteva korišćenje aktivne supstance određene i uske raspodele veličine čestica što je slučaj sa druge dve tehnike (Suhrenbrock i autori, 2011, Pearchnob i Bodmeier, 2003).

3.3.2 Priprema peleta obloženih izolacionom slojem

Sprečavanje kontakta model supstance i enterosolventnog polimera postiže se nanošenjem izolacionog filma na pelete obložene duloksetin hidrohloridom. Formulacijske razlike u izolacionim filmovima nanesenim na pelete obložene model supstancom potiču od razlika u proizvodnoj opremi koja je korišćena za oblaganje. Glavni problem prilikom oblaganja peleta izolacionom film suspenzijom u konvencionalnom uređaju za oblaganje jeste aglomeracija peleta usled načina na koji se pelete kreću u uređaju. Iz tog razloga je u toj formulaciji korišćen niži viskozitet hidroksipropil metilceluloze, 3 cp. Formulacija koja je uključivala hidroksipropil metilcelulozu 6 cp je dovodila da izražene aglomeracije peleta u toku procesa

oblaganja. Kod procesa oblaganja peleta u uređajima sa fluidizirajućim kretanjem vazduha kretanje peleta u uređaju je znatno bolje nego u konvencionalnom uređaju za oblaganje tako da prilikom oblaganje peleta izolacionim filmom u ovom uređaju glavni problem nije bila aglomeracija peleta već statičko nalektrisanje peleta. Udeo talka u formulaciji je morao da bude podignut na 200% u odnosu na nivo polimera da bi se sprečilo prekomerno naelektrisanje peleta. Da bi dobijeni film imao bolje mehaničke karakteristike korišćen je tip hidroksipropil metil celuloze višeg viskoziteta nego za oblaganje u konvencionalnom uređaju za oblaganje i to hidroksipropil metilceluloza 6 cp. Slike sa optičkog i mikrografije sa skenirajućeg elektronskog mikroskopa prikazane na Slici 31 pokazuju da je oblaganje izolacionim slojem donelo manje poboljšanje u smislu oblika i glatkoće površine peleta obloženih duloksetinom tehnikom suvog oblaganja, ali da nije u potpunosti moglo da smanji nepravilnosti površine peleta koje potiču od faze suvog oblaganja (Slika 31).

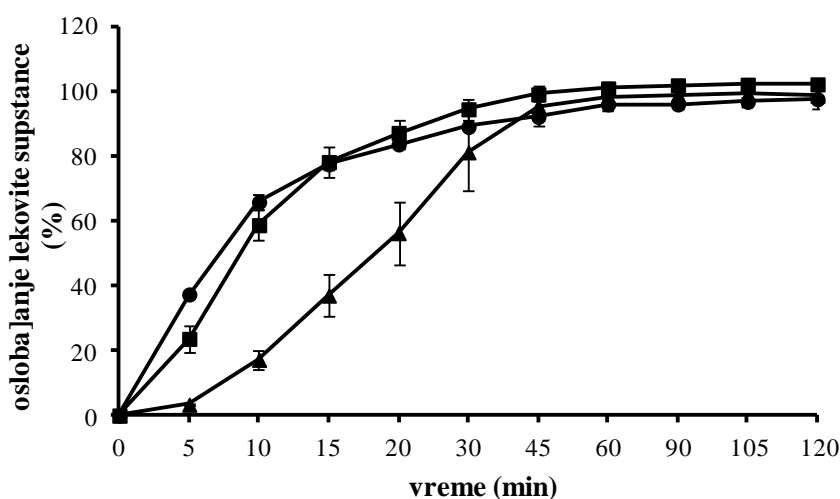
Rezultati analize slike prikazani u Tabeli 14 su u skladu sa vizuelnim opažanjima na fotografijama i mikrografijama. Step en izduženosti peleta obloženih prahom se nije promenio nakon nanošenja izolacionog sloja i dalje je iznosio 1.17, a sferičnost projekcije i hrapavost su se povećale, sa 0.77 i 0.84 na 0.79 i 0.88. Ove pelete su i dalje imale lošije parametre oblika od peleta obloženih rastvorom i suspenzijom koje su nakon ove faze imale step en izduženosti 1.09 i 1.10, sferičnost projekcije 0.91 i 0.90 i hrapavost 0.98 i 0.97. Standardna devijacija izmerenog prečnika peleta obloženih praškom se nakon faze nanošenja izolacionog sloja smanjila sa 141.1 μm na 80.6 μm što ukazuje na uniformnij nanos izolacionog filma u odnosu na sloj sa aktivnom supstancom. Standardna devijacija izmerenih prečnika peleta obloženih rastvorenim i suspendovanim duloksetin hidrohloridom imala je slične vrednosti kao i nakon nanošenja sloja aktivne supstance i iznosila je 55.0 μm za pelete obložene rastvorenom supstancom i 58.5 μm za pelete obložene suspendovanom supstancom.



Slika 31. Slike peleta obloženih izolacionim filmom sa optičkog mikroskopa - pelete proizvedene tehnikom suvog oblaganja (a), oblaganjem suspenzijom (c), oblaganjem rastvorom (e); SEM mikrografije izolovanih peleta proizvedenih tehnikom suvog oblaganja (b), oblaganjem suspenzijom (d) i oblaganjem rastvorom (f)

Figure 31. Photographs of pellets coated by isolation layer made by optical microscope produced by a) powder layering; c) solution layering; e) suspension layering; SEM micrographs of pellets produced by b) powder layering; d) solution layering; f) suspension layering

Na Slici 32 se vidi da je iz svih ispitanih uzoraka postignuto potpuno oslobađanje model supstance nakon 120 minuta u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja pH vrednosti 6.8. Razlike u brzini oslobađanja u prvim tačkama između peleta obloženih rastvorenim model supstancom, suspendovanim i praškastim duloksetin hidrohloridom, porasle su i dovele do još većih razlika u obliku krive oslobađanja. Tek nakon 45 minuta pelete obložene rastvorenim model supstancom oslobode istu količinu duloksetina kao druge dve ispitane formulacije. Standardne devijacije za pelete obložene rastvorenim duloksetinom su veće nego za druge dve formulacije za vremenske tačke 15, 20 i 30 minuta. Na osnovu izračunatog faktora sličnosti f_2 , profili oslobađanja peleta obloženih suspendovanim duloksetin hidrohloridom i praškom se mogu smatrati sličnim ($f_2=55.7$), dok to nije slučaj sa peletama obloženim suspendovanim i rastvorenim duloksetin hidrohloridom ($f_2=25.5$) i rastvorenim i praškastim duloksetin hidrohloridom ($f_2=20.7$).



Slika 32. Uporedni profili oslobađanja peleta obloženih izolacionim filmom: pelete obložene praškom (●), pelete obložene rastvorom (▲) i pelete obložene suspendovanim duloksetin hidrohloridom(■)

Figure 32. Comparative release profiles of isolation coated pellets: powder layered pellets (●), solution layered pellets (▲) and suspension layered pellets(■)

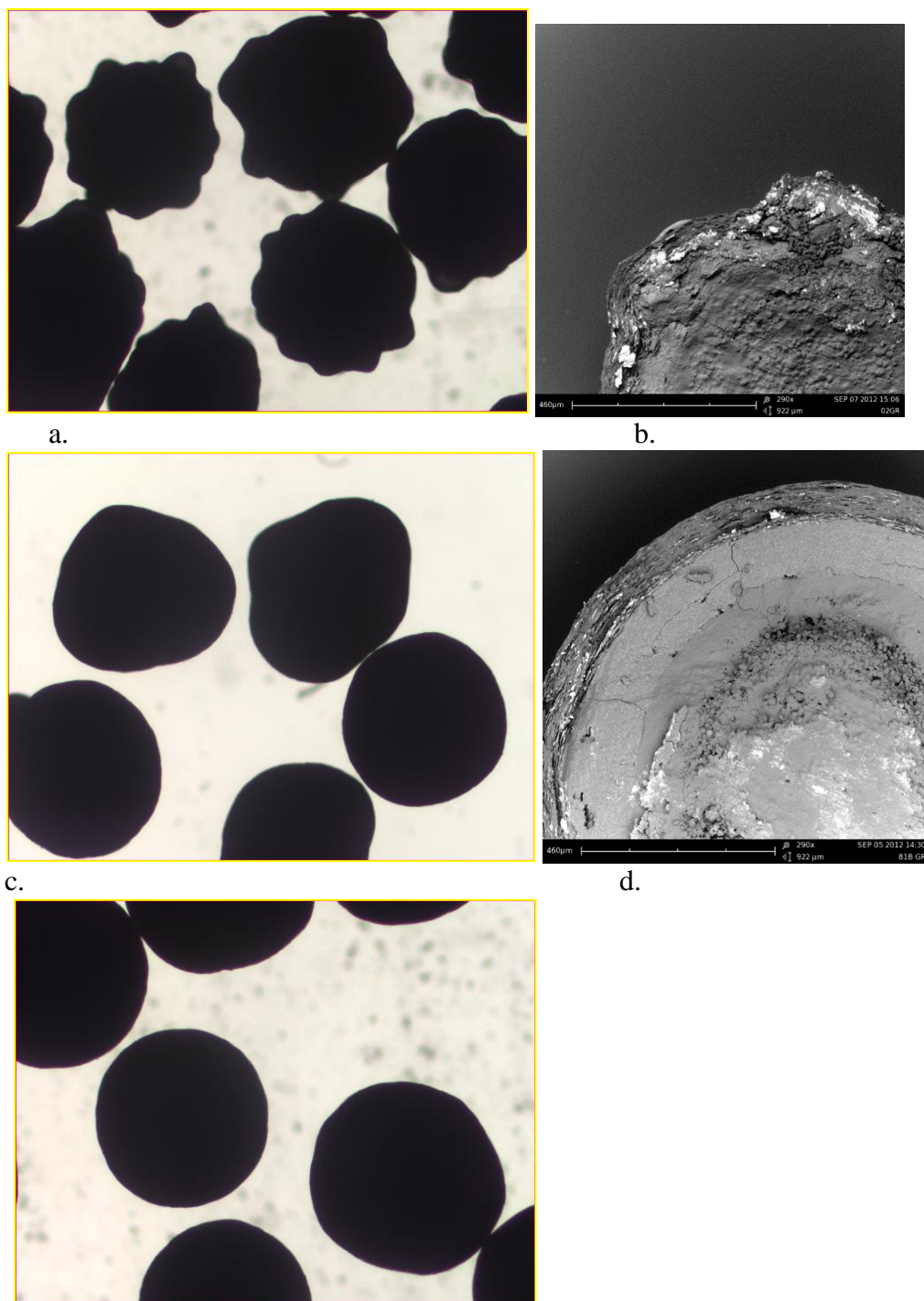
Uticaj izolacionog sloja na profil oslobađanja ocenjen je i računanjem faktora sličnosti f_2 za pojedinačne formulacije nakon oblaganja aktivnom supstancom i nakon oblaganja izolacionim slojem. Samo je za pelete obložene praškom faktor sličnosti za sloj aktivne supstance i izolacioni sloj veći od 50 i iznosi 59.6. Izolacioni sloj je usporio profil oslobađanja peleta obloženih rastvorenim i suspendovanim

duloksetin hidrohloridom toliko da više nije postojala sličnost između peleta obloženih aktivnom supstancom i izolacionim slojem. Izračunata f_2 vrednost za pelete obložene rastvorenim duloksetin-hidrohloridom iznosila je 36.2, dok je za pelete obložene suspendovanim duloksetin-hidrohloridom iznosila 45.2.

3.3.3 Priprema peleta obloženih gastrozistentnim filmom

Mikrografije preseka peleta obloženih gastrozistentnim filmom sa skenirajućeg elektronskog mikroskopa pokazuju tri sloja koji se međusobno teško razlikuju i čija debljina varira u slučaju peleta obloženih tehnikom suvog oblaganja i tri različita, glatka, homogena sloja bez pora u slučaju peleta proizvedenih na opremi sa fluidizirajućim kretanjem vazduha (Slika 33). Parametri površine i oblika peleta izračunati pomoću softvera za analizu slika takođe pokazuju da postoje velike razlike u stepenu izduženosti, sferičnosti projekcije i hrapavosti peleta proizvedenih različitim tehnikama.

Stepen izduženosti peleta obloženih suvim oblaganjem iznosio je 1.16 ± 0.07 i nije se značajno promenio u odnosu na fazu nanošenja izolacionog sloja kada mu je vrednost bila 1.17 ± 0.09 . Isto važi i za druge dve ispitane formulacije kod kojih stepen izduženosti nije značajno promenjen u odnosu na fazu nanošenja izolacionog sloja i iznosi 1.08 ± 0.06 za pelete obložene rastvorenim duloksetin hidrohloridom i 1.09 ± 0.07 za pelete obložene suspendovanim duloksetin hidrohloridom. Došlo je do manjeg poboljšanja vrednosti parametra sferičnost projekcije peleta obloženih praškom sa 0.79 ± 0.06 na 0.82 ± 0.05 i većeg poboljšanja vrednosti parametra hrapavost sa 0.88 na 95 ± 0.01 . Standardna devijacija izmerenog prečnika peleta obloženih praškom se usled neuniformnog nanošenja gastrozistentnog filma povećala na $151.7 \mu\text{m}$ tako da je nakon ove faze više nego dvostruko veća od standardne devijacije izmerenog prečnika peleta obloženih rastvorenim duloksetin hidrohloridom ($69.5 \mu\text{m}$) i suspendovanim duloksetin hidrohloridom ($60.9 \mu\text{m}$).

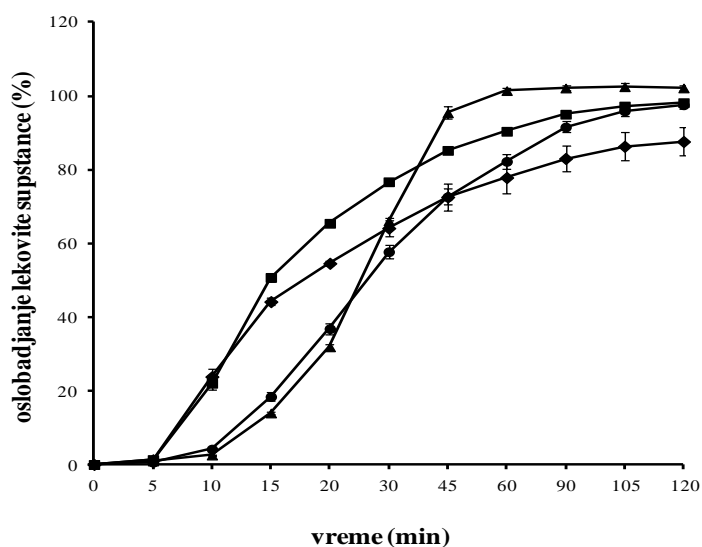


e.
 Slika 33. Slike peleta obloženih gastrorezistentnim filmom sa optičkog mikroskopa - pelete proizvedene tehnikom suvog oblaganja (a), oblaganjem model supstancom iz suspenzije (c), oblaganjem model supstancom iz rastvora (e); SEM mikrografije GR peleta proizvedenih tehnikom suvog oblaganja (b) i oblaganjem raspršivanjem suspenzije za oblaganje (d)
 Figure 33. Photographs of enteric-coated pellets made by optical microscope produced by a) powder layering; c) solution layering; e) suspension layering; SEM micrographs of pellets produced by b) powder layering; d) suspension layering

Oblaganje gastrozistentnim filmom u konvencionalnom uređaju za oblaganje i u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha nije moglo da bude izvedeno sa istim nanosom gastrozistentnog filma. Za postizanje gastrozistencije od 1.97% duloksetina oslobođenog iz peleta proizvedenih suvim oblaganjem nakon 2 sata u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja pH vrednosti 1.2, bilo je potrebno naneti 61% nanosa gastrozistentnog filma, odnosno oko 35% nanosa polimera u odnosu na masu izolovanih peleta. Ovi rezultati su uporedivi sa rezultatima koje su objavili Obara i autori (1999) koji su optimizovali formulaciju sa hipromeloza acetat sukcinatom za suvo oblaganje peleta pankreatina u centrifugalnom granulatoru i uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha i zaključili da je potrebno 30% nanosa gastrozistentnog polimera da bi se obezbedila gastrozistencija od 1.2% aktivne supstance oslobođene u kiseloj fazi testa za ispitivanje brzine rastvaranja. Za postizanje slične gastrozistencije, u našim eksperimentima je bilo potrebno da nanos gastrozistentnog filma bude 20% viši kada se film nanosi tehnikom suvog oblaganja nego kad se nanosi raspršivanjem suspenzije za oblaganje. Čak i tada je gastrozistencija peleta proizvedenih u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha bolja jer svi uzorci obloženi tehnikom raspršivanja film suspenzije oslobode manje od 0.20% duloksetina u kiseloj fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja. Uzrok ovome može da bude relativno visoka temperatura staklastog prelaza (T_g) hipromeloza acetat sukcinata od $113^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (Chen i autori, 2009) jer polimeri sa višom T_g zahtevaju veći nanos kada se nanose u suvoj formi nego kada se nanose u vidu disperzije. Drugi razlog lošije gastrozistencije peleta kod kojih je enterosolventni film nanosen suvim oblaganjem je sama tehnika oblaganja usled koje je nanos filma neuniforman te film ne može izdržati izlaganje kiselom sredini u trajanju od dva sata (Pearnchob i Bodmeier, 2003). Neravna površina peleta dobijena suvim oblaganjem u fazi nanošenja duloksetin hidrohlorida i enterosolventnog filma dovodi do neuniformne debljine filma tako da je potreban veći nanos da bi se postigla zahtevana debljina filma duž cele površine peleta. Da bi se to proverilo, pelete proizvedene u konvencionalnom uređaju za oblaganje su obložene gastrozistentnim filmom u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha sa istim sastavom i nanosom filma kao u ostalim šaržama proizvedenim u ovoj opremi. Promenom tehnike oblaganja gastrozistentnim filmom je uprkos neravnoj površini peleta bio dovoljan manji nanos (40%) za postizanje gastrozistencije od 0.1%. Ovi zaključci su u skladu sa rezultatima koje su objavili Nastruzzi i autori (2000) koji su proizveli pelete obložene

ibuprofenom tehnikom suvog oblaganja i potom ih obložili gastrozistentnim filmom raspršivanjem suspenzije za oblaganje na bazi Eudragit®-a L30D-55. Uprkos hrapavoj i nejednakoj površini peleta obloženih model supstancom tehnikom suvog oblaganja, gastrozistentne pelete su imale vreme dezintegracije duže od tri sata u 0.1M rastvoru hlorovodonične kiseline.

Profili oslobađanja lekovite supstance iz peleta u fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja koji se izvodi u medijumu pH vrednosti 6.8 su prikazani na Slici 34. Različiti uzorci imaju krive oslobađanja različitog oblika. Viši nanos gastrozistentnog filma i prisustvo ricinusovog ulja u formulaciji dovodi do sporijeg oslobađanja lekovite supstance u fosfatnom puferu pH 6.8. Preliminarne probe suvog nanošenja enterosolventnog filma su izvedene u skladu sa preporukama proizvođača enterosolventnog polimera tako da je tečnost za plastifikaciju sadržala samo trietil citrat koji je imao ulogu plastifikatora i ulje ricinusa koje je imalo ulogu promotera adhezije. Koncentrovani etanol i polisorbat 80 su u formulaciju uključeni kasnije da smanje lepljivost tečnosti i da povećaju brzinu rastvaranja lekovite supstance. Međutim, čak i sa tim formulacijskim promenama profil brzine rastvaranja peleta proizvedenih tehnikom suvog oblaganja je u fosfatnom puferu pH 6.8 sporiji u odnosu na probe u kojima je gastrozistentni film nanesen raspršivanjem rastvorenog polimera na pelete.



Slika 34. Profili oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta u fosfatnom puferu pH 6.8, pelete obložene suvim oblaganjem(●), pelete obložene rastvorenim duloksetin hidrohloridom (▲) pelete obložene suspendovanim duloksetin hidrohloridom(■), pelete obložene praškom i raspršivanjem gastrozistentne suspenzije za oblaganje (◆)

Figure 34. Release profiles of duloxetine from enteric-coated pellets in phosphate buffer pH 6.8: powder layered pellets (●), solution layered pellets (▲) suspension layered pellets ■, powder layered pellets spray coated with enteric-coating (◆)

Pelete obložene model supstancom tehnikom suvog oblaganja i gastrozistentnim filmom u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha nisu imale potpuno oslobađanje, odnosno 88% model supstance oslobođeno je nakon dva sata u fosfatnom puferu. Usled manje debljine gastrozistentnog filma brzina rastvaranja lekovite supstance iz ovih peleta je do četrdesetpetog minuta testa veća nego u slučaju peleta obloženih gastrozistentnim filmom tehnikom suvog oblaganja. Imajući u vidu da je oslobađanje iz peleta obloženih samo lekovitom supstancom, i peleta obloženih i izolacionim slojem bilo kompletno, može se zaključiti da formulacija i debljina (nanos) gastrozistentnog filma treba da se optimizuju da bi se postiglo potpuno oslobađanje iz peleta koje su dobijene oblaganjem aktivnom supstancom tehnikom suvog oblaganja, a u fazi oblaganja gastrozistentnim filmom tehnikom raspršivanja suspenzije za oblaganje. Dalje, dokazano je da je gastrozistentni film nanesen na pelete tehnikom suvog oblaganja u kiseloj fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja permeabilniji od filma koji je na pelete nanesen raspršivanjem suspenzije za oblaganje i za koji je bio dovoljan niži nanos za postizanje slične gastrozistencije. Terebesi i Bodmeier (2003) su zaključili da je za postizanje funkcionalnosti filmova na bazi Eudragit-a® RS, etil celuloze i šelaka potreban veći nanos, ako se filmovi na pelete nanose tehnikom suvog oblaganja.

Pelete obložene rastvorenim i suspendovanim model supstancom imaju profile oslobađanja koji prate profile oslobađanja izolovanih peleta, ali su od njih sporiji. Brzina oslobađanja iz peleta obloženih model supstancom iz suspenzije je veća u prvim tačkama profila. Uzrok tome može biti manja debljina gastrozistentnog filma ovih peleta i manji prečnik ovih peleta zbog čega one imaju veću kontaktnu površinu sa medijumom za ispitivanje brzine rastvaranja. Posle četrdesetpetog minuta količina model supstance koja je oslobođena iz peleta obloženih lekovitom supstancom iz rastvora, veća je od peleta obloženih model supstancom iz suspenzije. Pretpostavlja se da je to posledica prisustva amornog oblika lekovite supstance u peletama obloženim rastvorenim supstancom. Oblik krive brzine rastvaranja lekovite supstance ne zavisi samo od karakteristika gastrozistentnog filma, već i od slojeva ispod njega. Na osnovu izračunatih vrednosti f_2 nijedan par profila oslobađanja ne može se smatrati

sličnim jer je izračunati faktor sličnosti f_2 za pelete obložene rastvorenim i suspendovanim duloksetin hidrohloridom 32.5, za pelete obložene suspendovanom i praškastom lekovitom supstancom 35.3, a 46.3 za pelete obložene model supstancom iz rastvora i tehnikom suvog oblaganja.

Poređenjem profila oslobađanja gastrozistentnih peleta i iste probe peleta obložene izolacionim slojem zaključuje se da je u svim ispitanim probama gastrozistentni film usporio oslobađanje duloksetina u fosfatnom puferu pH 6.8 toliko da je izračunati faktor sličnosti f_2 za sve ispitane formulacije niži od 50 i za pelete obložene suvim oblaganjem iznosi 18.9, za pelete obložene rastvorenim duloksetin hidrohloridom iznosi 42.5, a za pelete obložene suspendovanim duloksetin hidrohloridom iznosi 32.3.

3.3.4 Dugoročna stabilnost gastrozistentnih peleta

Dugoročna stabilnost gastrozistentnih peleta je procenjena na osnovu rezultata nečistoća duloksetina nakon čuvanja peleta u ambijentalnim uslovima nakon 12, 24 i 36 meseci (Tabela 15).

Tabela 15. Rezultati nečistoća duloksetina u gastrozistentnim peletama nakon čuvanja 12, 24 i 36 meseci u ambijentalnim uslovima

Table 15. Levels of impurities of duloxetine in enteric-coated pellets after 12, 24 and 36 months of storage in ambient conditions

	Pelete obložene suvim oblaganjem			Pelete obložene rastvorom			Pelete obložene suspenzijom		
	12 mes.	24 mes.	36 mes.	12 mes.	24 mes.	36 mes.	12 mes.	24 mes.	36 mes.
Nečistoća 1 ^a	0.03%	0.04%	0.06%	0.09%	0.17%	0.57%	0.04%	0.05%	0.06%
Nečistoća 2 ^b	0.01%	0.02%	0.06%	ND ^e	ND	ND	0.01%	ND	0.06%
Nečistoća 3 ^c	0.07%	0.08%	0.08%	0.06%	0.07%	0.06%	0.08%	0.08%	0.13%
Nečistoća 4 ^d	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bilo koja nepoznata	0.03%	0.05%	0.04%	0.08%	0.11%	0.11%	0.05%	0.07%	0.06%
Ukupne nečistoće	0.14%	0.19%	0.30%	0.23%	0.35%	1.09%	0.18%	0.20%	0.37%

^a Nečistoća 1: 1-naftol

^b Nečistoća 2: 4-[-Metil[(3S)-3-(1-naftaleniloksi)-3-(2-tienil)propil]amino]-4-oksobutanoična kiselina

^c Nečistoća 3: (3S)-N-metil-3-(naftalen-1-iloksi)-3-(tiofen-3-il)propan-1-amin

^d Nečistoća 4: (S)-(+)-N,N-Dimetil-3-(1-naftiloksi)-3-(2-tienil)propanamin 2-hidroksi-sukcinat

^e Nije detektovana

^a Impurity 1: 1-naphthol

^b Impurity 2: 4-[-Methyl[(3S)-3-(1-naphthalenyloxy)-3-(2-thienyl)propyl]amino]-4-oxobutanoic acid

^c Impurity 3: (3S)-N-methyl-3-(naphthalen-1-yloxy)-3-(thiophen-3-yl)propan-1-amine

^d Impurity 4: (S)-(+)-N,N-Dimethyl-3-(1-naphthyloxy)-3-(2-thienyl)propanamine 2-hydroxy-succinate

^e Not detected

Nečistoća koja je proizvod reakcije model supstance i gastrozistentnog polimera nije uopšte detektovana ili je prisutna u vrlo niskim koncentracijama u svim ispitanim uzorcima. To ukazuje na izostanak hemijske reakcije između model supstance i gastrozistentnog polimera na osnovu čega možemo da zaključimo da izolacioni sloj efikasno sprečava kontakt ovih inkompatibilnih supstanci. Nečistoća 1 je u nešto većoj koncentraciji prisutna u uzorcima peleta na koje je model supstance nanosena iz rastvora u tačkama 12 meseci i 24 meseca dok je iznad gornje specificirane granice od 0.2 % u tački 36 meseci.

Određene koncentracije procesne nečistoće 3 su slične i niske u svim ispitanim uzorcima. Ostale procesne nečistoće nisu uopšte detektovane ni u jednom testiranom uzorku. Koncentracija neidentifikovane nečistoće je bila najviša u peletama na koje je model supstance nanosena iz rastvora, dok su koncentracije ove nečistoće bile niže i slične u ostalim uzorcima. U tački 36 meseci, koncentracija ukupnih nečistoća u gastrozistentnim peletama se kretala od 0.30% u peletama proizvedenim tehnikom suvog oblaganja i 0.37% u peletama proizvedenih oblaganjem iz suspenzije do 1.09% u peletama obloženih model supstancom iz rastvora.

Granične vrednosti koncentracija nečistoća za prijavljivanje i kvalifikaciju su izračunate prema vodiču Međunarodne konferencije za harmonizaciju Q3B (ICH, 2006). Na osnovu maksimalne dnevne doze od 120 mg proizvoda izračunata je granica od 0.2% za specificirane identifikovane (poznate) nečistoće. Na osnovu iste maksimalne dnevne doze izračunat je i limit od 0.2% za neidentifikovane (nepoznate) nečistoće. Rezultati srodnih supstanci dobijenih u toku ispitivanja stabilnosti ukazuju da je hemijska stabilnost peleta obloženih rastvorenim model supstancom lošija od druge dve ispitane formulacije tako da je nakon 36 meseci u ovoj formulaciji srodna supstance 1-naftol porasla iznad gornje granice postavljene na osnovu ICH preporuka. Ove razlike u stabilnosti se mogu objasniti razlikama u kristalnoj formi model supstance u ispitanim formulacijama koje su potvrđene analizama diferencijalne skenirajuće kalorimetrije u drugoj fazi istraživanja. Formulacije u kojima je model supstance zadržala svoj kristalni oblik imaju zadovoljavajuću hemijsku stabilnost dok se formulacija koja sadrži amorfnu fazu model supstance pokazala manje stabilnom usled značajnog porasta srodne supstance koja je proizvod hidrolize. Zna se da amorfne supstance pokazuju veću reaktivnost usled veće pokretljivosti molekula i da u većoj meri adsorbuju vodu prisutnu u formulaciji. Adsorbovana voda se raspoređuje

u amorfnoj supstanci i snižava joj Tg te tako dodatno povećava njenu reaktivnost i učestvuje u hemijskim reakcijama ne samo kao reaktant (u reakcijama hidrolize i oksidacije na primer) već i kao plastifikator (Ahlneck i Zografi, 1990; Gerhardt, 2009)

U prvom delu istraživanja je dokazano da gastrozistentne pelete model supstance mogu biti izrađene različitim tehnikama oblaganja. Pelete obložene model supstancom je moguće proizvesti suvim oblaganjem, oblaganjem iz rastvora i iz suspenzije. Svim isprobanim tehnikama proizvodnje peleta bilo je moguće proizvesti pelete koje odgovaraju ciljnom profilu kvaliteta proizvoda u smislu, ali postoje bitne razlike u formulacijskim karakteristikama i karakteristikama površine proizvedenih peleta na osnovu kojih je moguće odabrati tehniku izbora. Pelete obložene aktivnom supstancom tehnikom suvog oblaganja imaju vrlo neravnu površinu što ih čini manje pogodnim za dalje oblaganje funkcionalnim filmom. Izolacioni sloj je nanesen na sve tri vrste peleta obloženih model supstancom tehnikom raspršivanja suspenzije za oblaganje. Njena efikasnost u sprečavanju kontakta između model supstance i gastrozistentnog polimera je potvrđena na osnovu rezultata studije stabilnosti u periodu od 36 meseci u ambijentalnim uslovima. Gastrozistencija peleta je mogla biti postignuta oblaganjem peleta tehnikom suvog oblaganja gastrozistentnim filmom i oblaganjem peleta raspršivanjem suspenzije za oblaganje. Film dobijen suvim oblaganjem se u kiseloj fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja pokazao permeabilnijim od filma dobijenog oblaganjem raspršivanjem film suspenzije te ova tehnika zahteva veći nanos gastrozistentnog filma za postizanje gastrozistencije. Profil oslobađanja enterosolventnih peleta u najvećoj meri zavisi od formulacije gastrozistentnog filma, ali i slojevi ispod njega imaju uticaj. Obe tehnike nanošenja gastrozistentnog filma omogućavaju potpuno oslobađanje model supstance u fosfatnom puferu čija je pH vrednost 6.8 tako da zadovoljavaju kriterijum za ispitivanje brzine rastvaranja od ne manje od 75%(Q) nakon 60 minuta. Ni jedan par ispitanih formulacija gastrozistentnih peleta nema slične profile oslobađanja jer je izračunati faktor sličnosti f_2 za pelete obložene rastvorenim i suspendovanim duloksetin hidrohloridom 32.5, za pelete obložene suspendovanom i praškastom lekovinom supstancom 35.3, a 46.3 za pelete obložene model supstancom iz rastvora i tehnikom suvog oblaganja.

Rezultati ispitivanja stabilnosti sve tri formulacije na ambijentalnim uslovima pokazali su da postoje razlike u fizičko-hemijskoj stabilnosti formulacija. U peletama

proizvedenim oblaganjem rastvorenim model supstancom, proizvod hidrolize, 1-naftol, porastao je iznad gornje granice koja je dozvoljena prema ICH smernici Q3B. Iz daljih eksperimenata je isključena tehnika suvog oblaganja aktivnom supstancom i gastrozistentnim filmom jer se pokazala pokazala suviše zahtevnom i manje robusnom od druge dve ispitane tehnike i jer nudi manje mogućnosti (fleksibilnosti) u razvoju proizvoda.

4.0 Drugi deo istraživanja

4.1 Uvod

Oblaganje peleta tehnikama raspršivanja rastvorene i suspendovane model supstance u uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha daje glatke, sferične pelete pogodne za dalje oblaganja te su ove tehnike odabrane za optimizaciju u drugom delu istraživanja.

Ciljevi drugog dela istraživanja su bili sledeći:

- odabir optimalne tehnike za nanošenje model supstance na inaktivne pelete od dve ispitane tehnike: oblaganje rastvorenom i suspendovanom aktivnom supstancom
- određivanje odgovarajućeg vezivnog sredstva kao i optimalne koncentracije vezivnog sredstva, lubrikansa i suvih supstanci u tečnosti za oblaganje peleta
- određivanje optimalnih parametara procesa oblaganja
- korišćenjem eksperimentalnog dizajna objasniti statistički interakcije model supstance, ekscipijenasa i procesnih parametara

4.1.1 Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda

Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (peleta obloženih aktivnom supstancom) prikazan je u Tabeli 16. Definisano je na osnovu ciljanog profila kvaliteta gastrozistentnih peleta datih u Tabeli 5.

Tabela 16. Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda peleta obloženih aktivnom supstancom

Table 16. Quality target product profile of drug layered pellets

Elementi kvaliteta	Cilj
Međuproizvod	Pelete obložene aktivnom supstancom
Profil oslobađanja leka	Ne manje od 90% deklarisanog sadržaja duloksetina se oslobodi za 60 minuta u fosfatnom puferu pH 6.8. ¹
Koncentracija leka	31.0 mg duloksetina/100 mg peleta \pm 10 % ²

¹ Specifikacija je postavljena tako da gastrozistentne pelete ispune zahtev za oslobađanje lekovite supstance iz USP 36

² Ciljna koncentracija leka je definisana tako da doza od 60 mg može da se napuni u kapsule veličine 1, doza 40 mg u kapsule veličine 2, doza 30 mg u kapsule veličine 3, a doza 20 mg u kapsule veličine 4

¹ Dissolution specification is set in order to ensure compliance of enteric-coated pellets with the dissolution specification given in USP 36

² Assay of duloxetine is specified so as to enable filling of 60 mg dose to capsules size 1, 40 mg dose to capsules size 2, 30 mg dose to capsules size 3, 20 mg dose to capsules size 4.

4.1.2 Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda

Tabela 17 sumira attribute kvaliteta međuproizvoda peleta obloženih slojem duloksetin hidrohlorida. Kritični atributi kvaliteta peleta obloženih slojem model supstance su: prečnik peleta, identifikacija aktivne supstance, sadržaj i ujednačenost sadržaja duloksetin hidrohlorida, brzina rastvaranja lekovite supstance, zaostali rastvarači, gubitak sušenjem, hemijska stabilnost i mikrobiološki kvalitet. Pošto je u prvom delu istraživanja pokazano da je sa obe tehnike oblaganja moguće proizvesti proizvod sa potrebnim sadržajem aktivne supstance i sa oslobađanjem koje odgovara farmakopejskim zahtevima, zaključeno je da se u ovom delu istraživanja treba fokusirati na optimizaciju formulacije i procesnih parametara tako da se dobije što efikasniji proces proizvodnje, odnosno što veći koristan prinos. U tom smisli izvršena je analiza rizika uticaja ekscipijenasa u formulaciji kao i parametara proizvodnog procesa na kritične attribute kvaliteta međuproizvoda i dato je obrazloženje za odabir ekscipijenasa i opsega procesnih parametara.

Tabela 17. Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda peleta obloženih model supstancom

Table 17. Critical quality attributes of drug layered pellets

Atribut kvaliteta	Cilj	Kritičnost	Opravdanost
Izgled peleta	Bele do skoro bele pelete	Ne	Nije direktno povezan sa bezbednošću i efikasnošću leka
Veličina peleta	≤ 1.1 mm	Da	Obezbeđivanje prečnika manjeg od 2 mm nakon nanošenja svih slojeva
Identifikacija	Pozitivna na lekovitu supstancu	Da*	Kritična za bezbednost i efikasnost, ali se može efikasno kontrolisati u završnoj kontroli.
Sadržaj	90% - 110% u odnosu na deklarisanu vrednost	Da	Varijabilnost sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Formulacijski i procesni paramteri mogu da utiču na sadržaj.
Ujednačenost sadržaja	90% - 110%, RSD < 5%	Da	Varijabilnost u ujednačenosti sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Formulacijski i procesni parametri mogu uticati na ovaj atribut.
Brzina rastvaranja lekovite supstance	ne manje od 90% deklarisanog sadržaja duloksetina se oslobodi za 60 minuta u fosfatnom puferu pH 6.8	Da	Specificirano oslobađanje duloksetina omogućava da se nakon nanošenja izolacionog i gastrozistentnog sloja obezbedi oslobađanje od ne manje od 75%(Q) za 60 minuta u fosfatnom puferu pH 6.8
Hemijska stabilnost	Nivo degradacionih proizvoda u skladu sa oficinalnim/ICH zahtevima	Da	Degradacioni proizvodi mogu da utiču na bezbednost i efikasnost te moraju biti kontrolisani. Formulacijske i procesne promenljive mogu da utiču na ovaj atribut kvaliteta.
Rezidualni rastvarači	Nivoi rezidualnih rastvarača u skladu sa ICH limitima	Da	Rezidualni rastvarači mogu da utiču na bezbednost. Moraju se pratiti i kontrolisati.
Gubitak sušenjem	Pratiti	Da	Sadržaj vlage može uticati na degradaciju u lekovitom proizvodu
Mikrobiološki kvalitet	U skladu sa EP 2.6.12 i EP 2.6.13	Da*	Neusaglašenost sa specifikacijom može da utiče na bezbednost. Rizik od mikrobiološkog rasta je mali kod čvrstih doziranih oblika.

*Formulacijske i procesne karakteristike ne utiču na ove kritične attribute kvaliteta te se oni neće razmatrati iako su važni elementi kvaliteta

4.1.3 Analiza rizika uticaja ekscipijenasa na efikasnost procesa i koristan prinos

U Tabeli 18 prikazana je analiza rizika uticaja ekscipijenasa na attribute kvaliteta međuproizvoda, uzimajući u obzir potencijalni uticaj osobina ekscipijenasa na efikasnost procesa i koristan prinos.

Tabela 18. Analiza rizika uticaja ekscipijenasa na attribute kvaliteta peleta obloženih aktivnom supstancom

Table 18. Risk analysis for critical quality attributes of drug layered pellets with respect to quality of excipients used

Rizik	KAK	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Rastvarač	Sadržaj	1	1	L
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	4	3	H
Vezivno sredstvo	Sadržaj	2	2	M
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Brzina rastvaranja	2	1	L
	Hemijska stabilnost	1	1	L
Lubrikans	Sadržaj	2	2	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	1	1	L

KAK - kritični atribut kvaliteta; L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H – visok nivo rizika

KAK – critical quality attribute; L – low risk level; M – medium risk level; H- high risk level

Rastvarač može da utiče na hemijsku stabilnost preparata zbog mogućnosti promene kristalnog oblika lekovite supstance i potencijala za nastanak manje stabilnih formi. Viskozitet vezivnog sredstva može imati uticaj na sadržaj lekovite supstance jer vezivno sredstvo suviše niskog viskoziteta može imati nedovoljnu moć vezivanja te dovesti do sadržaja lekovite supstance ispod donje specificirane granice. Suprotno, ako je viskozitet vezivnog sredstva preveliki može doći do stvaranja aglomerata u toku procesa oblaganja što potencijalno može ugroziti uniformnost sadržaja aktivne supstance. Preveliki viskozitet vezivnog sredstva može imati i negativan uticaj na brzinu oslobađanja model supstance. Lubrikans u formulaciji može imati povoljan uticaj na koristan prinos usled smanjenja adhezivnosti filma, odnosno aglomeracije u toku procesa oblaganja, ali može ukoliko je prisutan u prevelikoj koncentraciji toliko da smanji adhezivnost filma da sadržaj aktivne supstance bude ispod donje specificirane granice.

4.1.4 Odabir ekscipijenasa

U funkciji vezivnog sredstva ispitana je hidroksipropil metilceluloza viskoziteta 3 cp i 6 cp zato što je rastvorna u rastvaračima koji se koriste u planiranim eksperimentima i zato što ne postoje literaturni podaci o primeni ovih tipova hidroksipropil metilceluloze zajedno sa duloksetin hidrohloridom. Hidroksipropil metilceluloza 3 cp, pri istoj koncentraciji, daje rastvore nižeg viskoziteta od tipa 6 cp što omogućava pripremu koncentrovanijih rastvora i skraćuje trajanje procesa oblaganja. Hidroksipropil metil celuloza 6 cp daje mehanički jače filmove od tipa 3 cp. Talk je najšire primenjivani lubrikans te je zato odabran da bude uključen u ispitivane formulacije. Koncentracije ekscipijenasa koje su ispitane u ovom delu istraživanja odabrane su na osnovu literaturnih podataka i prethodnog znanja (Obara i Kokubo, 2008; Kállai i autori, 2010).

Rastvarači koji su ispitani u ovoj fazi su voda (V) i smeša vode i izopropanola (IPA) u odnosu 1:1. Duloksetin hidrohlorid je suspendovan u tečnosti za oblaganje ako se kao rastvarač koristi voda, a rastvorena je ako se koristi smeša vode i izopropanola (European Pharmacopeia, 2010; Kolatkar i Zisman, 2007). Voda je rastvarač izbora zbog prednosti koje ima u odnosu na izopropanol u smislu zagađenja životne sredine i cene. Prednost korišćenja smeše vode i izopropanola se sastoji u tome da u slučaju kada je model supstanca rastvorena veličina čestica ne mora da se kontroliše i uzima u obzir prilikom nabavke sirovine.

4.1.5 Analiza rizika za procesne parametre oblaganja peleta model supstancom

Analiza rizika za kritične attribute kvaliteta peleta obloženih aktivnom supstancom u odnosu na parametre proizvodnog procesa prikazana je u Tabeli 19.

Tabela 19. Analiza rizika za kritične attribute kvaliteta u odnosu na procesne parametre oblaganja inaktivnih peleta duloksetin hidrohloridom

Table 19. Risk analysis for critical quality attributes of drug layered pellets with respect to parameters of drug layering process

Rizik	KAK	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Protok ulaznog vazduha	Sadržaj	2	3	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
Temperatura proizvoda	Hemijska stabilnost	2	3	M
	Sadržaj	1	1	M
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	M
Brzina pumpe	Hemijska stabilnost	3	2	M
	Sadržaj	2	1	L
	Ujednačenost sadržaja	3	3	M
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	4	2	H

KAK - kritični atribut kvaliteta; L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H – visok nivo rizika

KAK – critical quality attribute; L – low risk level; M – medium risk level; H – high risk level

Protok ulaznog vazduha može imati uticaja na sadržaj model supstance jer pri suviše velikom protoku može doći do gubitka proizvoda, a sa druge strane pri suviše malom protoku sušenje proizvoda može biti nedovoljno što može da izazove probleme sa hemijskom stabilnošću proizvoda. Suviše niska temperatura proizvoda u toku procesa oblaganja može dovesti do aglomeracije i problema sa uniformnošću sadržaja kao i do problema sa hemijskom stabilnošću proizvoda. Suviše visoka brzina pumpe može dovesti do aglomeracije peleta kao i do problema sa stabilnošću zbog suviše velike vlage u proizvodu. Opsezi procesnih parametara koji su ispitani u fazi skrininga su odabrani tako da se proces usmeri u cilju postizanja maksimalne efikasnosti za najkraće vreme. Niži nivo protoka ulaznog vazduha dovoljan je tek da obezbedi fluidizaciju proizvoda, a viši nivo je nešto niži od protoka vazduha pri kom dolazi do zaostajanja proizvoda u filterima. Opsezi za temperaturu proizvoda u toku procesa kao i protok suspenzije su odabrani na osnovu prethodnog iskustva i literaturnih podataka (Shravani i autori, 2011).

4.2 Materijali i metode

4.2.1 Materijali

Duloksetin hidrohlorid veličine čestica $d(90) < 10 \mu\text{m}$ (JiuZhou, Kina), inaktivne pelete od saharoze i skroba, veličine 20 – 25 mesh (JRS Pharma, Nemačka), hidroksipropil metilceluloza (HPMC) 3 cp (Taian Ruitai Cellulose Co. Ltd., Kina), HPMC 6 cp (Dow Chemical Company, SAD), talk (Imerys Talc, Italija) i izopropanol (Brenntag-CEE, Austrija) su korišćeni u eksperimentima. Svi ostali reagensi su bili analitičkog kvaliteta.

4.2.2 Metode

4.2.2.1 Priprema peleta obloženih model supstancom

Svi eksperimenti su izvedeni na laboratorijskoj opremi. Tečnosti za oblaganje u kojima je duloksetin hidrohlorid rastvoren su pripremljene prema sledećoj proceduri: 1. rastvaranje polimera u vodi, 2. dodavanje izopropanola, 3. rastvaranje duloksetin hidrohlorida, 4. dodavanje talka u suspenziji pripremljenoj pomoću homogenizatora Ultra Turrax[®] T-25 (Ika-Werke, Nemačka). Tečnosti za oblaganje u kojoj je model supstance suspendovana su pripremljene prema sledećoj proceduri: 1. rastvaranje polimera u vodi, 2. suspendovanje model supstance ili model supstance i talka i homogenizacija pomoću homogenizatora Ultra-Turrax[®] T-25 u trajanju od 1 – 2 minuta. Oblaganje peleta je izvršeno na uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha Glatt GPCG-2 (Glatt GmbH, Nemačka) u konfiguraciji sa Wurster kolonom i mlaznicom za raspršivanje veličine otvora 1.2 mm postavljenoj na dnu uređaja. Svi eksperimenti su izvedeni sa 700 g inaktivnih peleta. Ciljani sadržaj model supstance je u fazi screening-a bio 5 %, a u fazi optimizacije je bio 10%. Procesni parametri su postavljeni u skladu sa zahtevima za pojedinačne eksperimente u frakcionom faktorijalnom i centralnom kompozitnom planu eksperimenata. Brzina pumpe je podešena tako da se postigne željeni protok tečnosti za oblaganje. Pritisak atomizacije je u svim eksperimentima bio 2.0 bar. Obložene pelete su sušene 5 minuta na protoku ulaznog vazduha od $40 \text{ m}^3/\text{h}$ i temperaturi ulaznog vazduha od 55°C

4.2.2.2 Kvantifikovanje efikasnosti procesa oblaganja i korisnog prinosa

Obložene pelete su razdvojene u tri frakcije sitanom analizom uz korišćenje sita od 710 μm i 1000 μm i uređaja "KS 500" (Ika-Werke, Nemačka) koristeći 300 oscilacija u minuti u trajanju od 3 minuta. Čestice model susptance i ekscipijenasu manje od 710 μm koje nisu vezane za površinu peleta se ne uzimaju u obzir prilikom preračuna efikasnosti procesa oblaganja. Efikasnost procesa (CE) je računata prema formuli g, u kojoj se realno postignut nanos filma, w_{g_a} , deli sa teoretskim nanosom, w_{g_t} , i množi sa 100 (Suhrenbrock i autori, 2011):

$$CE(\%) = \frac{w_{g_a}}{w_{g_t}} \cdot 100 \quad (20)$$

Frakcija peleta koja je prošla kroz sito 1000 μm , a zadržala se na situ 710 μm je označena kao koristan prinos. Čestice koje su se zadržale na situ 1000 μm su aglomerati.

4.2.2.3 Viskozitet tečnosti za oblaganje

Viskozitet tečnosti za oblaganje je meren na temperaturi od 25 °C na rotacionom reometru Malvern Kinexus KNX 2100 (Malvern Instruments, Velika Britanija) u konfiguraciji sa geometrijom čelična kupa-ploča (engl. *steel cone plate geometry*). Prečnik kupe je bio 60 mm sa uglom od 1°, a prečnik ploče 65 mm. Brzina smicanja se povećavala od 0.1 do 100 s^{-1} , faze merenja su bile podeljene logaritamski tako da svaka dekada sadrži deset izmerenih vrednosti viskoziteta. Svaki uzorak je analiziran tri puta, a prikazane su srednje vrednosti viskoziteta na brzini smicanja 100 s^{-1} .

4.2.2.4 Priprema slobodnih filmova

Rastvori i suspenzije za oblaganje su pripremljeni prema proceduri opisanoj u tački 4.2.2.1 i izliveni na foliju za izlivanje koja je pomoću vakuuma fiksirana na uređaj za aplikaciju filmova (Erichsen, Nemačka) pomoću koga je obezbeđena da debljina vlažnih filmova bude 250 μm . Filmovi su sušeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 48 sati. Uzorci osušenih filmova su analizirani tehnikom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije. Pripremani su filmovi sa duloksetin hidrohloridom i placebo filmovi. Odnosi duloksetin hidrohlorida i hidroksipropil metilceluloze u pripremljenim

filmovima je sledeći: 2:1, 2:1.1, 2:1.3, 2:1.52, 2:2.52. Odnos duloksetin hidrohlorida i povidona K-30 u pripremljenim filmovima je sledeći: 1:1 i 1:2.6.

4.2.2.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Termička karakterizacija filmova vršena je pomoću diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra Mettler Toledo DSC-1 (Mettler Toledo, Nemačka). Masa analiziranih uzoraka je bila u opsegu od 3 mg do 10 mg. Slepa proba je bila prazna aluminijumska posudica. Model supstanca (amorfna i kristalna) je analizirana zagrevanjem od 0 °C do 200 °C pri brzini od 10 °C u minutu. Slobodni filmovi su prvo zagrevani od 20 °C do 120 °C pri brzini od 10 °C u minuti da bi se uklonili zaostali rastvarači pa su zatim hlađeni od 120 °C do 20 °C pri brzini od 20 °C u minuti i zagrejani ponovo od 20 °C do 200 °C pri brzini od 10 °C u minuti.

4.2.2.5.1 Raman spektroskopija

Raman spektroskopija je korišćena za spektroskopsku karakterizaciju obloženih peleta u cilju uočavanja potencijalnih promena polimornog oblika. Za snimanje Raman spektara korišćen je Raman Analyzer RXN2 Hybrid (Kaiser optical system, Ann Arbour SAD) u konfiguraciji sa PHAT sondom za beskontaktnu analizu uzorka. Talasna dužina lasera je 785 nm.

4.2.2.6 Proizvodnja amorfne model supstance tehnikom sušenja raspršivanjem

Amorfna model supstanca je proizvedena tehnikom sušenja raspršivanjem iz metanolnog rastvora na uređaju za sušenje raspršivanjem Büchi 290 – Mini Spray Dryer (Büchi Laboratoriums-Technik AG, Švajcarska) opremljenim standardnim raspršivačem za dva fluida veličine otvora 0.7 mm. Za sušenje raspršivanjem korišćeno je 50 g 10% metanolnog rastvora model supstance. Primenjeni su sledeći procesni parametri: aspirator 100%, brzina pumpe 10%, temperatura ulaznog vazduha 40 °C, atomizacija 40 mm (oko 600 L/h), a temperatura izlaznog vazduha je bila 30 °C. Formulacija i procesni parametri su odabrani na osnovu podataka iz literature (Parthasardhi i autori, 2005).

4.2.2.7 Dizajn eksperimenata

Efekti formulacije i procesnih parametara na efikasnost procesa, koristan prinos i karakteristike model supstance su ispitani pomoću dizajna eksperimenata. Za analizu podataka korišćen je softver Design-Expert[®] 7.0.0 (Stat-Ease Inc., SAD). Eksperimentalni dizajn je sproveden u dve faze. U prvoj fazi je primenjen frakcioni faktorijalni dizajn, a u drugoj fazi je za optimizaciju formulacije primenjen centralni kompozitni dizajn. Za definisanje optimalnih karakteristika formulacije korišćen je i softver Modde Pro[®] ver. 11 (Umetrix, Švedska).

4.2.2.7.1 Faza skrininga

U fazi skrininga je pomoću frakcionog faktorijalnog dizajna 2^{8-4} ispitan uticaj 8 formulacijskih i procesnih faktora na efikasnost procesa i koristan prinos nakon proizvodnje peleta. Faktori su ispitani na dva nivoa tako da je u fazi skrininga izvršeno 16 eksperimenata sa različitim kombinacijama nivoa varijabli. Realne i kodirane vrednosti ispitanih promenljivih zajedno sa praćenim odgovorima i matricom eksperimenata su prikazane u Tabeli 20. Za računanje regresionih koeficijenata korišćene su kodirane vrednosti što omogućava direktno poređenje ulaznih promenljivih bez uticaja njihove veličine (skale). Rezultati frakcionog faktorijalnog dizajna su procenjeni korišćenjem linearnog modela čija je opšta formula:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8 \quad (21)$$

Gde je Y odgovor, β_0 konstanta, $\beta_1 - \beta_8$ su regresioni koeficijenti koji karakterišu glavne efekte, a $X_1 - X_8$ su ulazne promenljive čiji se uticaj ispituje.

Opsezi ispitanih promenljivih su odabrani tako da se postigne najviša moguća efikasnost procesa i koristan prinos, za najkraće vreme i sa što manje ekscipijenasa.

Tabela 20. Nezavisne formulacijske i procesne promenljive u 2^{8-4} frakcionom faktorijalnom dizajnu (realne i kodirane vrednosti) i dobijeni odgovori

Table 20. Independent process and formulation variables in 2^{8-4} fractional factorial design (real and coded values) and obtained responses

Eks. br.	X ₁ = HPMC tip (cp)		X ₂ = udeo HPMC* (%)		X ₃ = udeo talka** (%)		X ₄ = tip rastvarača [#]		X ₅ = konc. suvih supstanci (%)		X ₆ = protok ulaznog vazduha (m ³ /h)		X ₇ = temperatura proizvoda (°C)		X ₈ = brzina pumpe (%)		Odgovori	
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	Y ₁ , Efikasnost procesa (%)	Y ₂ , Koristan prinos (%)
1	-1	3	-1	55	+1	40	-1	V	+1	16	+111	52	+1	42	-1	3	29.6	97.7
2	+1	6	+1	75	-1	0	+1	V/IPA	-1	11	-1	45	-1	38	+1	5	45.3	95.8
3	-1	3	+1	75	-1	0	+1	V/IPA	+1	16	-1	45	+1	42	-1	3	15.2	93.1
4	+1	6	-1	55	-1	0	-1	V	+1	16	-1	45	+1	42	+1	5	64.6	99.4
5	+1	6	-1	55	+1	40	-1	V	-1	11	+1	52	-1	38	+1	5	34.8	98.1
6	+1	6	+1	75	-1	0	-1	V	-1	11	+1	52	+1	42	-1	3	70.2	99.9
7	+1	6	+1	75	+1	40	+1	V/IPA	+1	16	+1	52	+1	42	+1	5	46.4	89.0
8	-1	3	-1	55	-1	0	+1	V/IPA	-	11	+1	52	+1	42	+1	5	13.8	75.5
9	+1	6	+1	75	+1	40	-1	V	+1	16	-1	45	-1	38	+1	5	81.2	96.0
10	+1	6	-1	55	+1	40	+1	V/IPA	-1	11	-1	45	+	42	-1	3	58.5	95.3
11	-1	3	-1	55	+1	40	+1	V/IPA	+1	16	-1	45	-1	38	+1	5	20.3	72.8
12	-1	3	+1	75	-1	0	-1	V	+1	16	+1	52	-1	38	+1	5	75.3	97.7
13	+1	6	-1	55	-1	0	+1	V/IPA	+1	16	+1	52	-1	38	-1	3	79.8	86.4
14	-1	3	-1	55	-1	0	-1	V	-1	11	-1	45	-1	38	-1	3	47.8	96.8
15	-1	3	+1	75	+1	40	+1	V/IPA	-1	11	+1	52	-1	38	-1	3	11.9	92.5
16	-1	3	+1	75	-1	0	-1	V	-1	11	-1	45	+1	42	+1	5	57.4	97.0

*Koncentracija hidroksipropil metilceluloze je data u odnosu na količinu duloksetin-hidrohlorida; **Koncentracija talka je data u odnosu na količinu model supstance; # V – voda; IPA – izopropanol

*Concentration of hypromellose is given as a percentage of the amount of duloxetine hydrochloride; ** Concentration of talc is given as a percentage of duloxetine hydrochloride; # V – water; IPA – isopropanol

Formulacijske promenljive koje su bile ispitane su: tip i udeo hidroksipropil metil celuloze, udeo talka i koncentracija suvih supstanci u tečnosti za oblaganje. Opsezi ispitanih procesnih parametara: protok ulaznog vazduha, temperatura proizvoda i brzina pumpe su odabrani tako da se postigne maksimalni proizvodni prinos za najkraće vreme, imajući u vidu osnovne principe oblaganja peleta u uređaju sa Wursterovom kolonom (Christensen and Bertelsen, 1997; Shrivani et al., 2011).

4.2.2.7.2 Faza optimizacije

Nakon skrining studije, cilj je bio da se detaljnije ispituju odabrani parametri i njihove interakcije pomoću centralnog kompozitnog dizajna. Prema centralnom kompozitnom eksperimentalnom planu izvedeno je 13 eksperimenata u kojima su varirane dve formulacijske promenljive – nivo hidroksipropil metilceluloze i koncentracija suvih supstanci u tečnosti za oblaganje). Realne i kodirane vrednosti zajedno sa odgovorima koji su praćeni i matricom eksperimenata su prikazane u Tabeli 21.

Tabela 21. Nezavisne formulacijske promenljive u centralnom kompozitnom dizajnu eksperimenata (realne i kodirane vrednosti) i dobijeni odgovori
Table 21. Independent formulation variables in the central composite design (real and coded values) and obtained responses

Eks. br.	X ₁ = Udeo HPMC* (%) kodirano realno		X ₂ = Koncentracija suvih supstanci (%) kodirano realno		Odgovori			
	R ₁ , Efikasnost procesa (%)	R ₂ , Koristan prinos (%)	R ₃ , viskozitet tečnosti za oblaganje (mPa*s)	R ₄ , Trajanje procesa (min)				
1	+1	75	-1	11	81.4	99.7	57	231
2	-1.414	50.86	0	13.5	83.8	63.9	67	172
3	0	65	+1.41	17.04	90.5	94.0	214	162
4	+1.41	79.14	0	13.5	90.5	97.1	122	210
5	0	65	0	13.5	89.8	99.5	90	191
6	-1	55	+1	16	90.9	75.1	121	155
7	0	65	0	13.5	91.6	99.9	93	192
8	-1	55	-1	11	79.9	73.2	43	215
9	+1	75	+1	16	90.6	94.2	215	167
10	0	65	0	13.5	91.2	99.9	101	191
11	0	65	-1.414	9.96	72.5	99.4	35	272
12	0	65	0	13.5	92.3	97.4	91	191
13	0	65	0	13.5	91.4	97.6	86	191

*udeo hidroksipropil metilceluloze 6 cp je dat u odnosu na količinu model supstance

* level of hypromellose 6 cp is given as a percentage of duloxetine hydrochloride

Veze između faktora i odgovora su opisane polinomnim jednačinama. Značajnost svakog faktora je određena analizom varijanse (ANOVA). Numerički izlaz ANOVA testa uključuje i F vrednost koja ukazuje na stepen efekta svakog faktora. Nivo značajnosti (p vrednost) je mera statističke značajnosti tako da manje vrednosti ukazuju na veću važnost faktora na odabranom nivou značajnosti. Odgovori koji su praćeni u fazi optimizacije su bili: R₁, efikasnost procesa (%); R₂, koristan prinos (%) i dodatno u odnosu na fazu skrininga R₃, viskozitet tečnosti za oblaganje (mPa·s) i R₄, vreme trajanja procesa (min). Optimalni nivoi ispitanih faktora su ispitani metodologijom površine odgovora.

4.3 Rezultati i diskusija

4.3.1 Skrining studija

Preliminarni eksperimenti u okviru skrining studije bili su potrebni da bi se odredili adekvatni procesni uslovi kao i formulacijski pravac. Rezultati eksperimenata koji su izvedeni prema 2⁸⁻⁴ frakcionom faktorijalnom planu su uklopljeni u linearni model i dobijene su sledeće jednačine (u obliku kodiranih faktora):

$$Y_1 \text{ (efikasnost procesa)} = 47.0 + 13.1 \times X_1 + 3.4 \times X_2 - 4.5 \times X_3 - 10.6 \times X_4 + 4.6 \times X_5 - 1.8 \times X_6 - 2.5 \times X_7 - 2.3 \times X_8 \quad (22)$$

$$Y_2 \text{ (koristan prinos)} = 92.7 + 2.3 \times X_1 + 2.4 \times X_2 - 0.4 \times X_3 - 5.1 \times X_4 - 1.2 \times X_5 - 0.6 \times X_6 + 0.7 \times X_7 - 2.0 \times X_8 \quad (23)$$

gde je:

X₁ – tip hidroksipropil metilceluloze

X₂ – udeo hidroksipropil metilceluloze dat u procentima u odnosu na aktivnu supstancu

X₃ – udeo talka dat u procentima u odnosu na aktivnu supstancu

X₄ – tip rastvarača

X₅ – koncentracije suvih supstanci u suspenziji za oblaganje

X₆ – protok ulaznog vazduha

X₇ – temperatura proizvoda

X₈ – protok suspenzije za oblaganje

Vrednosti koeficijenta u obe jednačine ukazuje da je formulacija kritična za postizanje visoke efikasnosti procesa i korisnog prinosa u ispitanom opsegu procesnih parametara. Proces se pokazao robusnim u ispitanom opsegu procesnih parametara pošto rezultati ukazuju da nema statistički značajnog uticaja ovih faktora na ispitivane odgovore.

Viši viskozitet hidroksipropil metilceluloze kao i veće koncentracije hidroksipropil metilceluloze u tečnosti za oblaganje omogućavaju veću efikasnost procesa zato što se manje materijala gubi usled trenja i habanja peleta. Ovi rezultati su u skladu sa radom Suhrenbrock i autora (2011). Više koncentracije suvih supstanci u tečnosti za oblaganje su omogućavale bolju efikasnost procesa u ispitanom opsegu brzina pumpe i temperatura proizvoda. Potrebno je više energije za prevazilaženje viskoznih sila prilikom raspršivanja tečnosti većih koncentracija te dolazi do formiranja većih kapi. Rastvarač teže isparava iz većih kapi tako da se manje tečnosti gubi usled sušenja tečnosti pre nego što dođe u kontakt sa supstratom (Aulton i Twitchel, 2002). Talk i smeša rastvarača vode i izopropanola su imali negativan efekat na efikasnost procesa. Poznato je da talk može da smanji adheziju filma za supstrat usled povećanja unutrašnjeg stresa filma. Manja efikasnost procesa kod formulacija koje sadrže smešu vode i izopropanola pripisuje se slabijim adhezionim karakteristikama filmova na bazi hidroksipropil metilceluloze raspršenih iz vodeno-izopropanolnih suspenzija u odnosu na one koji su raspršeni iz vodenih suspenzija (Pheiff i autori, 2015).

Faktori sa najvećim pozitivnim efektom na koristan prinos su bili tip i koncentracija hidroksipropil metil celuloze u tečnosti za oblaganje. Talk nije pokazao da ima pozitivan efekat na koristan prinos u ispitanom opsegu koncentracija. Na osnovu ovih rezultata je odlučeno da se eksperimenti nastave sa hidroksipropil metilcelulozom višeg viskoziteta i bez talka u formulaciji. Tip korišćenog rastvarača je imao najveći negativan uticaj na koristan prinos jer je smeša vode i izopropanola izazivala mnogo izraženiju aglomeraciju peleta u toku procesa oblaganja u odnosu na eksperimente u kojima je korišćena samo voda odnosno model supstanca je nanošena u suspendovanom obliku. Prvobitni plan je bio da se i eksperimenti u fazi skrininga i eksperimenti u fazi optimizacije izvede to postizanja 10% nanosa model supstance. Međutim, zbog vrlo izražene aglomeracije u toku pojedinih skrining eksperimenata proces nije mogao da se izvede do postizanja 10% nanosa, već samo do postizanja 5%. Iz tog razloga je ciljani nanos model supstance u fazi skrininga promenjen na 5%. Primećeno je i da pelete obložene rastvorenom model supstancom (gde je korišćena

smeša vode i izopropanola) pokazuju tendenciju ka formiranju čvrstih aglomerata tokom čuvanja međuproizvoda. Zbog ovih razloga je odlučeno da se dalji eksperimenti nastave sa vodom kao rastvaračem za pripremu suspenzije za oblaganje. Oblaganje peleta rastvorenim aktivnim supstancama je često opisivano u literaturi i nije označavano kao "problematičan" proces te je odlučeno da se proba da se identifikuje uzrok izražene aglomeracije do koje dolazi u toku oblaganja peleta rastvorenom model supstancom (Nikowitz i autori, 2013; Sovany i autori, 2009).

U cilju razumevanja fenomena koji se dešavaju tokom oblaganja peleta rastvorenom model supstancom pripremljene su suspenzije i rastvori koji su korišćeni u eksperimentima oblaganja kao i placebo rastvori i suspenzije koji su iskorišćeni za pripremu izlivenih slobodnih filmova. Cilj je bio da se filmovi podvrgnu analizi diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom da bi se videlo da li prisustvo model supstance utiče na Tg polimera. Suviše niska Tg materijala koji se koriste za oblaganje može da izazove povećanu lepljivost filma i aglomeraciju u toku oblaganja i čuvanja proizvoda. Zato je neophodno da proizvod u svim fazama procesa i čuvanja bude na temperaturama nižim od Tg filma (Baird i Taylor, 2012; Harris i Ghebressellassie, 2008). Duloksetin hidrohlorid je takođe analiziran, a rezultati su prikazani u Tabeli 22 i na Slici 35 . Temperature označene kao Tg su one koje su zabeležene u fazi drugog zagrevanja. Tm je temperatura topljenja evidentirana na DSC termogramu.

Tabela 22. Rezultati DSC analiza duloksetin hidrohlorida i slobodnih filmova
Table 22. Results of DSC analysis of duloxetine hydrochloride and free films

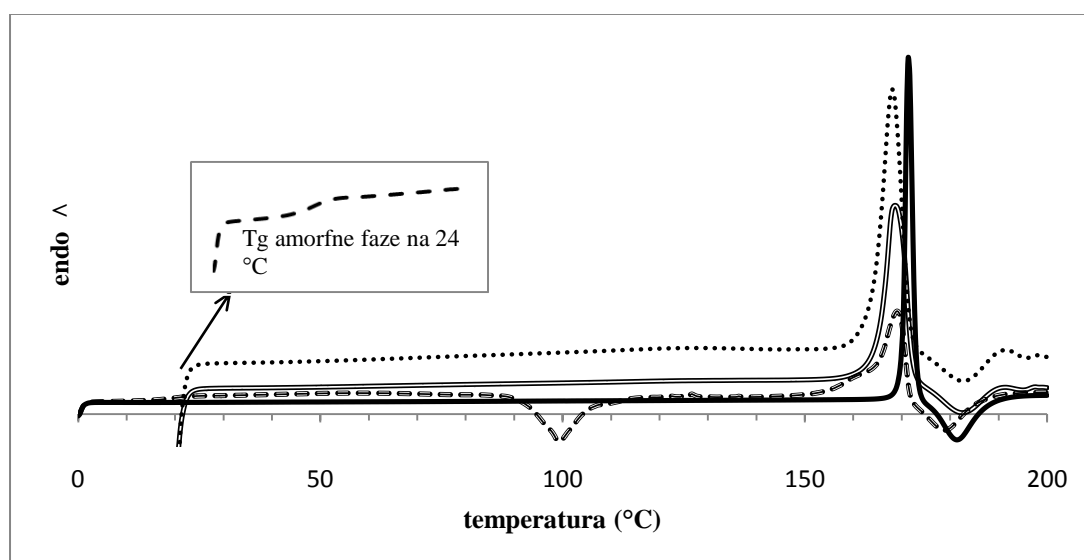
Uzorak	Temperature evidentirane na DSC termogramima	
	Tg (°C)*	Tm (°C)
Duloksetin hidrohlorid	/	170
Placebo film FFD Eksper. 4	167	/
FFD Eksper. 4 film	/	168
Placebo film FFD Eksper. 13	167	/
FFD Eksper. 13 film	54	163

Tg – temperatura staklastog prelaza, prikazana kao središnja tačka; Tm – temperatura topljenja; FFD – frakcioni faktorijalni dizajn

Tg – glass transition temperature presented as midpoint; Tm – melting temperature; FFD – fractional factorial design

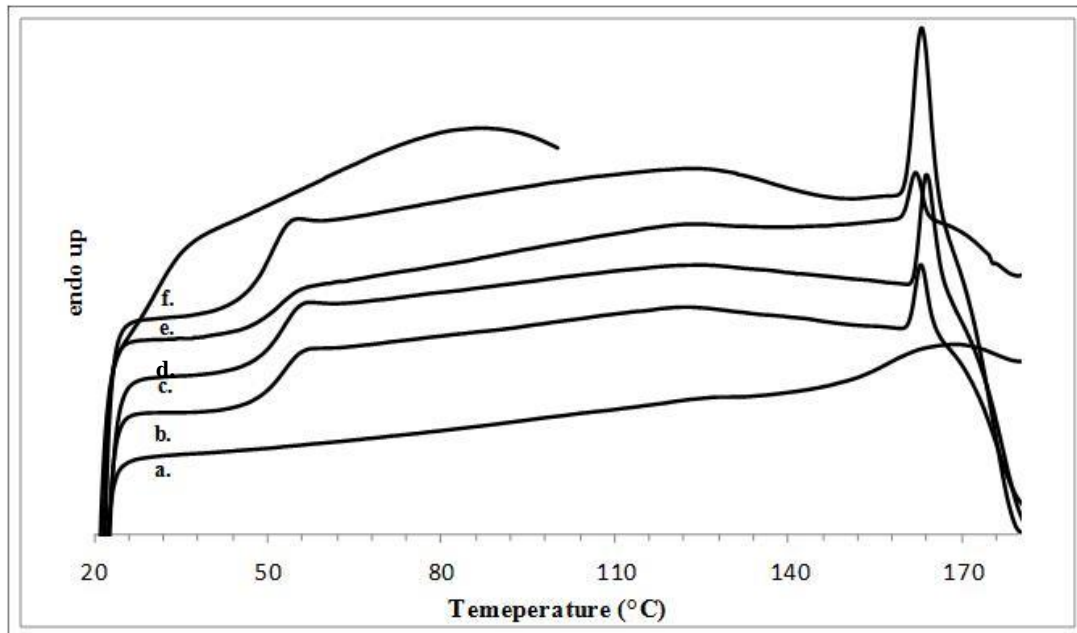
Značajne promene stanja duloksetin hidrohlorida i hidroksipropil metilceluloze se na DSC termogramima pojavljuju na vrlo sličnim temperaturama. DSC analiza duloksetin hidrohlorida pokazuje samo jedan endotermni (pozitivni) pik na

temperaturi od 170 °C usled topljenja supstance koji je praćen egzotermnim pikom sa početkom na 174 °C i potiče od degradacije leka (Slika 35). DSC termogrami placebo filmova pripremljenih iz vodenih rastvora (placebo film FFD Eksperiment 4) i iz vodeno/izopropanolnih rastvora (placebo film FFD Eksperiment 13) pokazuju Tg na temperaturi od 167 °C i prikazani su na Slici 36. Na DSC krivoj filma pripremljenog sa suspendovanom model supstancom (FFD Eksperiment 4) vidi se samo jedna promena stanja i to topljenje model supstance na temperaturi od 168 °C. Smatra se da topljenje leka maskira Tg hidroksipropil metilceluloze. Međutim, analiza filma pripremljenog sa rastvorenim model supstancom pokazuje Tg na temperaturi od 54 °C (Slika 36). Imajući u vidu činjenicu da je u toku oblaganja u sistemu prisutna fina magla koja sadrži kapljice rastvarača, a da se rastvarači ponašaju kao plastifikatori, Tg ovog filma je u toku procesa oblaganja bila dosta niža i izazvala povećanu lepljivost filma i aglomeraciju peleta (Dereymaker i Van Den Mooter, 2015).



Slika 35. DSC termogrami kristalnog duloksetin hidrohlorida (—), filma koji sadrži suspendovani duloksetin hidrohlorid i 55% HPMC-a u odnosu na model supstancu (=), film koji sadrži suspendovani duloksetin hidrohlorid i 75% HPMC-a u odnosu na model susptancu (...), duloksetin hidrohlorid proizveden sušenjem raspršivanjem (- - -) sa zumiranim regionom Tg

Figure 35. DSC thermograms of crystalline duloxetine hydrochloride (—), film containing suspended duloxetine hydrochloride and 55% HPMC in relation to the drug (=), film containing suspended duloxetine hydrochloride and 75% of HPMC in relation to the drug (...), spray dried duloxetine hydrochloride (- - -) with zoomed region of Tg



Slika 36. DSC termogrami čistog HPMC (a), rastvorene model supstance sa 75% HPMC (b), rastvorene model supstance sa 51% HPMC (c), rastvorene model supstance i 126% HPMC (d), rastvorene model supstance i 55% HPMC (e), faze prvog zagrevanja DSC analize filma pripremljenog sa rastvorenom model supstancom i 51% HPMC (f)

Figure 36. DSC thermograms of pure HPMC (a), dissolved duloxetine hydrochloride with 75% of HPMC in relation to the drug (b), dissolved duloxetine hydrochloride with 51% of HPMC in relation to the drug (c), dissolved duloxetine hydrochloride with 126% of HPMC in relation to the drug (d), dissolved duloxetine hydrochloride with 55% of HPMC in relation to the drug (e), phase of the first heating of DSC analysis of duloxetine hydrochloride with 51% of HPMC in relation to the drug (f)

Postoje literaturni podaci da neke lekovite supstance mogu da budu plastifikatori za određene polimere pa je posumnjano da je to slučaj sa našom model supstancom i hidroksipropil metilcelulozom (Wu i McGinity, 1999). Da bi se proverila ova hipoteza pripremljeno je još filmova sa različitim odnosima hidroksipropil metilceluloze i rastvorene, odnosno suspendovane model supstance i izvršena je analiza diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Neki odnosi model supstance i polimera su bili isti kao u eksperimentima frakcionog faktorijalnog dizajna, ali su pripremljene i neke različite koncentracije polimera i model supstance tako da su testirani nivoi polimera od 51% do 126% u odnosu na model supstancu. Rezultati ovih analiza su prikazani u Tabeli 23 i na Slici 36. Temperatura staklastog prelaza označena kao T_{g1} je ona koja je zabeležena u fazi prvog zagrevanja filma koje služi da se ukloni zaostali rastvarač iz filma. Ovakav sistem u kome je prisutna izvesna količina rastvarača je sličnija realnom sistemu u toku oblaganja nego što je to slučaj sa filmom iz koga je sav rastvarač uklonjen.

Tabela 23. Temperature zabeležene na DSC termogramima slobodnih filmova koji su sadržali duloksetin-hidrohlorid i hidroksipropil metilcelulozu

Table 23. Events observed in DSC thermograms of cast films of duloxetine hydrochloride and hypromellose

Oblik leka u tečnosti za oblaganja	Udeo HPMC u odnosu na model supstancu (%)	Temperature zabeležene na DSC termogramima		
		Tg ₁ (°C)	Tg (°C)	Tm (°C)
Rastvoren	51	34	51	164
Suspendovan	51	/	/	168
Rastvoren	65	37	51	163
Suspendovan	65	/	/	168
Rastvoren	75	38	51	163
Suspendovan	75	/	/	168
Rastvoren	84	nije detektovana	51	163
Rastvoren	105	nije detektovana	51	162
Rastvoren	120	37	51	163

Tg – temperatura staklastog prelaza, predstavljena kao središnja tačka; Tm – temperatura topljenja

Tg – glass transition temperature presented as midpoint; Tm – melting temperature; FFD – fractional factorial design

Svi filmovi koji su pripremljeni sa suspendovanom model supstancom pokazuju tačku topljenja na temperaturi od 168 °C, a Tg hidroksipropil metilceluloze ne može da se vidi jer se pojavljuje na istoj temperaturi kao i topljenje model supstance. Tg svih filmova pripremljenih sa rastvorenim model supstancom i različitim udelima polimera je ista i iznosi 51 °C. U fazi DSC analize tokom koje se uklanja rastvarač iz filma evidentirane su i niže vrednosti Tg u opsegu od 34 °C do 38 °C koje su niže ili slične temperaturama proizvoda na kojima su izvedeni eksperimenti u fazi skrininga (Slika 36). Znajući da proces oblaganja treba voditi na temperaturama nižim od Tg filma da bi se izbegla njegova prekomerna lepljivost još jednom je potvrđeno da je razlog izražene aglomeracije peleta u toku procesa oblaganja peleta rastvorenim model supstancom jako niska Tg filma. Međutim, hipoteza da model supstanca ima efekat plastifikatora na polimer nije potvrđena jer je Tg svih filmova pripremljenih sa različitim odnosima polimera i rastvorene model supstance ista. Da model supstanca ima efekat plastifikatora na polimer, Tg filmova pripremljenih sa različitim masenim odnosima rastvorene model supstance i polimera bi bila različita u skladu sa Gordon-Tejlorovom jednačinom:

$$Tg(\text{mix}) = \frac{[w_1 Tg_1 + (K w_2 Tg_2)]}{[w_1 + (K w_2)]} \quad (24)$$

gde su w_1 i w_2 masene frakcije komponente 1 i 2, Tg_1 i Tg_2 njihove temperature staklastog prelaza, a K konstanta koja zavisi od stvarne gustine svake komponente i promena u njihovoj termalnoj ekspanzivnosti na temperaturi staklastog prelaza. Ova

jednačina predviđa da će se Tg smeše dve amorfne supstance povećati proporcionalno povećanju masenog udela komponente sa višom temperaturom staklastog prelaza. Ako se Tg smeše amorfni supstanci može predvideti Gordon-Tejlor-ovom jednačinom smatra se da su komponente smeše u potpunosti izmešane na molekularnom nivou i čine jednofazni sistem čije su karakteristike drugačije od karakteristika pojedinačnih komponenti (Dereymaker and Van Den Mooter, 2015). Ovo nije bio slučaj u ispitanim smešama model supstance i polimera ukazujući da se ne radi o jednofaznom sistemu, već o sistemu koji se sastoji od više faza. Smatra se da je Tg evidentiran na temperaturi od 51°C u stvari Tg amorfne frakcije model supstance dok je Tg hidroksipropil metilceluloze na 167 °C maskiran topljenjem kristalne frakcije model supstance na 163 °C i njenom degradacijom koja započinje na temperaturi od oko 170 °C. Hidroksipropil metilceluloza je poznati inhibitor kristalizacije te može biti odgovorna za pojavljivanje amornog oblika model supstance u filmovima pripremljenim sa rastvorenim duloksetin hidrohloridom.

Usled izostanka mešanja model supstance i polimera na molekularnom nivou, inhibicija kristalizacije model supstance od strane polimera nije bila potpuna te je u sistemu bila prisutna i kristalna faza model supstance. Da bi se ovo dokazalo, pripremljeni su filmovi sa rastvorenom model supstancom i drugim polimerom, a sa različitim masenim odnosima model supstance i polimera. Korišćen je polimer povidon K-30 (PVP), a rastvarač je činila smeša vode i izopropanola u odnosu 1:1. Filmovi su analizirani diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom. Placebo filmovi koji su sadržali samo PVP su takođe pripremljeni. Temperature evidentirane na DSC termogramima su prikazane u Tabeli 24.

Tabela 24. Temperature evidentirane na DSC termogramima slobodnih filmova koji su sadržali duloksetin hidrohlorid i povidon K-30

Table 24. Events observed in DSC thermograms of cast films of duloxetine hydrochloride and povidone K-30

Udeo model supstance u uzorku	Udeo PVP-a u uzorku	Evidentirane temperature na DSC termogramima	
		Tg (°C)	Tm (°C)
0	1	165	/
1	1	89	/
1	1.3	96	/

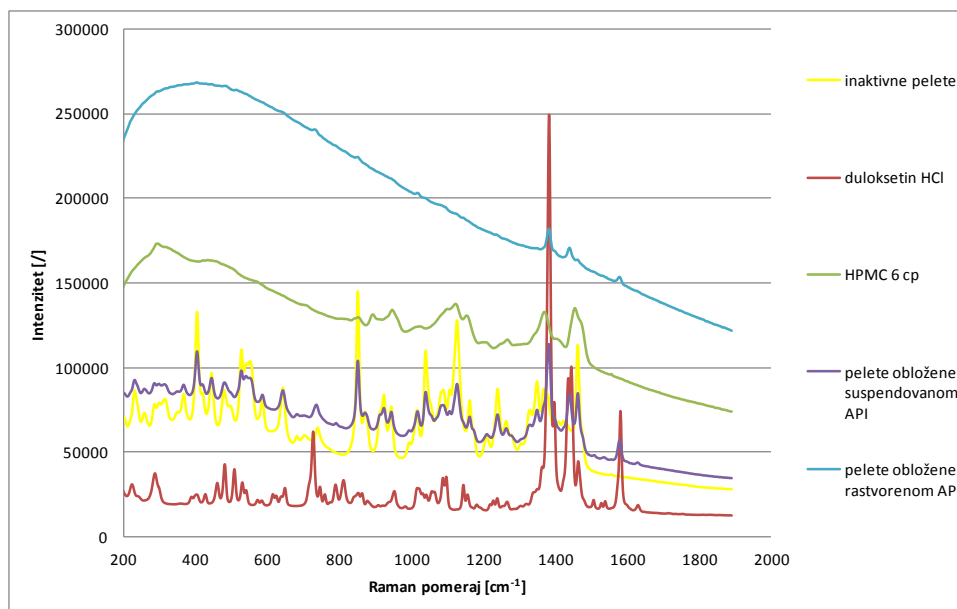
Tg – temperatura staklastog prelaza, prikazana kao središnja tačka; Tm – temperatura topljenja

Tg – glass transition temperature presented as midpoint; Tm – melting temperature; FFD – fractional factorial design

Na DSC termogramu placebo filma koji sadrži samo povidon K-30 evidentirana je jedino Tg polimera na 165 °C. Na termogramima filmova koji su sadržali model supstancu i PVP takođe je evidentirana samo jedna temperatura i to Tg što ukazuje da se radi o jednofaznom sistemu, odnosno da je nastao čvrsti rastvor. Evidentirana Tg se nalazila između temperatura staklastog prelaza polimera i pretpostavljene temperature staklastog prelaza model supstance. Tg filma sa više povidona K-30 je viša od Tg filma pripremljenog sa manje polimera što ukazuje da su supstance izmešane na molekularnom nivou.

Da bi se dodatno potvrdilo da u toku procesa oblaganja peleta raspršivanjem tečnosti za oblaganje koja sadrži rastvorenu model supstancu nastaje amorfna model supstanca sa niskom Tg, pripremljena je amorfna model supstanca sušenjem raspršivanjem i podvrgnuta DSC analizi. DSC termogram supstance proizvedene sušenjem raspršivanjem prikazan je na Slici 35. Na njemu se vidi da je Tg ovako proizvedene amorfne model supstance oko 24°C što je niže od očekivane vrednosti od 51 °C koje su zabeležene za filmove koji su sadržali hidroksipropil metilcelulozu i rastvorenu model supstancu. Pretpostavlja se da je niža Tg od očekivane posledica prisustva izvesne količine plastificirajućeg rastvarača u uzorku pošto sušenje raspršivanjem nije izvršeno na temperaturama dovoljno visokim da se rastvarač efikasnije ukloni da bi se sprečila kristalizacija. Na DSC termogramu se dalje vidi egzotermni pik na 100 °C koji potiče od kristalizacije model supstance i topljenje kristalne faze na oko 170°C.

Razlike u kristalnom obliku model supstance u peletama pripremljenim sa suspendovanim i rastvorenim duloksetin hidrohloridom potvrđene su i Raman spektroskopijom. Obe vrste peleta kao i svi materijali koji su korišćeni za njihovu pripremu su ispitani ovom metodom i dobijeni spektri su prikazani na Slici 37.



Slika 37. Raman spektri peleta obloženih suspendovanom i rastvorenom model supstancom kao i spektri materijala koji su korišćeni za pripremu peleta.

Figure 38. Raman spectra of suspension and solution layered pellets together with spectra of materials used for the preparation of pellets

Spektri model supstance i peleta pripremljenih sa suspendovanom model supstancom su okarakterisani oštrim pikovima velikog intenziteta koji su karakteristični za kristalne supstance. S druge strane, pikovi spektra peleta pripremljenih sa rastvorenom model supstancom su mnogo manje oštri i mnogo manjeg intenziteta što je karakteristično za amorfne supstance tako i da na osnovu Raman spektara može da se zaključi da je kristalni oblik model supstance u peletama pripremljenih oblaganjem rastvorenom i suspendovanom model supstancom različit (Raman FAQs, 2016).

4.3.2 Optimizaciona studija (Metodologija površine odgovora)

Na osnovu rezultata skrining studije odlučeno je da se studija optimizacije izvede sa hidroksipropil metilcelulozom 6 cp kao vezivnim sredstvom i vodom kao rastvaračem. U fazi optimizacije ispitan je efekat nezavisnih varijabli: koncentracija vezivnog sredstva i koncentracija suvih supstanci u suspenziji za oblaganje na odabrane odgovore. Razvijeni su modeli koji pomoću polinomnih jednačina opisuju vezu između ispitanih ulaznih promenljivih i izlaza koji se prate. Opšti oblik jednačine je sledeći:

$$R = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (25)$$

gde je X ulazna promenljiva (X_1 – nivo hidroksipropil metil celuloze 6 cp u suspenziji za oblaganje, X_2 – koncentracija suvih supstanci u suspenziji za oblaganje), β_0 je konstanta, a ostali β parametri označavaju koeficijente koji karakterišu glavne efekte (β_1 and β_2), efekte interakcija (β_{12}) i kvadratne efekte (β_{11} i β_{22}).

Svi razvijeni kvadratni modeli se na osnovu p vrednosti mogu smatrati statistički značajnim. Koeficijenti polinomnih jednačina koji povezuju odgovore sa eksperimentalnim varijablama i interakcijama su prikazani u Tabeli 25. Promenljive sa najviše uticaja su izdvojene na osnovu izračunatih p vrednosti i diskutovane. Grafici površine odgovora koji pokazuju uticaj ispitivanih ulaznih promenljivih na izlaze koji su praćeni su prikazani na Slici 38.

Koncentracija suvih supstanci je faktor sa najvećim uticajem na efikasnost procesa te su eksperimenti broj 3 i broj 6 sa najvećom koncentracijom suvih supstanci i najkraćim trajanjem procesa imali najbolju efikasnost procesa od 90.5%, odnosno 90.9%. Za efikasnost procesa su značajni bili i kvadratni efekti koncentracije suvih supstanci i koncentracije vezivnog sredstva. Iako je izračunata p-vrednost od 0.0565 za efekat koncentracije hidroksipropil metilceluloze viša od 0.05 može se zaključiti da ovaj faktor ima značajan uticaj na efikasnost procesa zato što je izračunata p-vrednost vrlo bliska graničnoj p-vrednosti od 0.05 i zato što kvadratni efekat udela hidroksipropil metilceluloze ima statistički značajan efekat.

Rezultati eksperimenata su pokazali da veće koncentracije hidroksipropil metilceluloze u suspenziji za oblaganje smanjuju tendenciju ka aglomeraciji peleta. Suhrenbrock i autori (2011) su proučavali uticaj veličine čestica suspendovanog leka u tečnosti za oblaganje na aglomeraciju peleta i zaključili da tendencija ka aglomeraciji raste sa smanjenjem veličine čestica lekovite supstance usled veće ukupne površine čestica u slučaju čestica manjeg prečnika. Pri višim koncentracijama hidroksipropil metilceluloze u našim eksperimentima manji je udeo unutrašnje faze (duloksetin hidrohlorida) u suspenziji za oblaganje te se usled toga smanjuje preterano kvašenje i nastanak aglomerata u toku oblaganja peleta. Značajni za koristan prinos su bili i kvadratni efekat hidroksipropil metilceluloze i kvadratni efekat koncentracije suvih supstanci u suspenziji za oblaganje.

Viskozitet suspenzija primenjenih u optimizacionoj studiji kretao se od 43 mPa·s do 215 mPa·s. Prema literaturnim podacima odgovarajuća atomizacija se može postići do viskoziteta tečnosti za oblaganje od 250 mPa·s što je prilično iznad najviših vrednosti viskoziteta suspenzija ispitanih u našoj studiji (Kolter, 2004). Međutim, postoji mali

pad u korisnom prinosu u eksperimentima broj 3 i broj 9 koje su bile one sa najvišim viskozitetom suspenzije za oblaganje.

To ukazuje da primenjen pritisak vazduha za atomizaciju nije optimalan za raspršivanje tečnosti za oblaganje čiji je viskozitet veći od 200 mPa·s. Najznačajniji uticaj na viskozitet suspenzija za oblaganje je imala koncentracija suspenzije što se može objasniti Ajnštajnovom jednačinom za viskozitet razblaženih suspenzija:

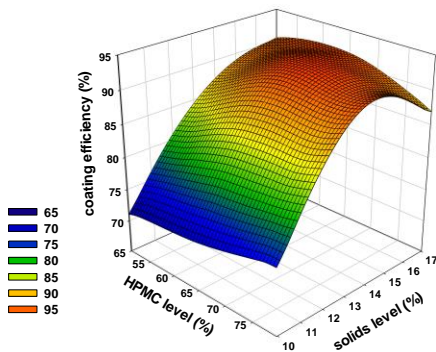
$$\eta_s = \eta_0[1 + 2.5 \varphi] \quad (26)$$

gde je η_s viskozitet suspenzije, η_0 je viskozitet spoljašnje faze, a φ je sadržaj unutrašnje faze izražen kao odnos zapremina unutrašnje faze i suspenzije (Nguyen i autori, 2007).

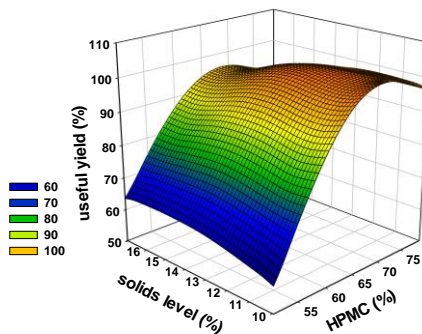
Tabela 25. Koeficijenti kvadratnih jednačina koji povezuju ulazne promenljive sa odgovorima
 Table 25. Coefficients of the quadratic equations linking independent variables with responses

	R ₁ , Efikasnost procesa		R ₂ , Koristan prinos		R ₃ , Viskozitet suspenzije		R ₄ , Trajanje procesa	
	Koeficijent	F-vrednost (p-vrednost)	Koeficijent	F-vrednost (p-vrednost)	Koeficijent	F-vrednost (p-vrednost)	Koeficijent	F-vrednost (p-vrednost)
Model	-	31.27 (0.0001)	-	92.26 (<0.0001)	-	192.07 (<0.0001)	-	32.24 (0.0001)
Konstanta	91.0	-	98.9	-	92.2	-	191.2	-
A, udeo HPMC 6 cp	+1.3	5.21 (0.0565)	+11.6	275.94 (<0.0001)	23.2	110.15 (<0.0001)	+10.2	11.78 (0.0109)
B, koncentracija suvih supstanci	+5.7	95.26 (<0.0001)	-1.4	4.07 (0.0835)	61.1	763.56 (<0.0001)	-35.0	137.83 (<0.0001)
AB, interakcija između nivoa HPMC 6 cp i koncentracije suvih supstanci	-0.4	0.30 (0.6032)	-1.8	3.53 (0.1024)	20.0	40.85 (0.0004)	-1.0	0.056 (0.8190)
A ² , kvadratni efekat nivoa HPMC 6 cp	-1.7	7.45 (0.0294)	-9.9	177.22 (<0.0001)	1.0	0.19 (0.6788)	-3.1	0.94 (0.3638)
B ² , Kvadratni efekat koncentracije suvih supstanci	-4.5	52.34 (0.0002)	-1.8	6.09 (0.0430)	16.0	45.61 (0.0003)	+9.9	9.62 (0.0173)
R ²	0.9571		0.9851		0.9928		0.9584	

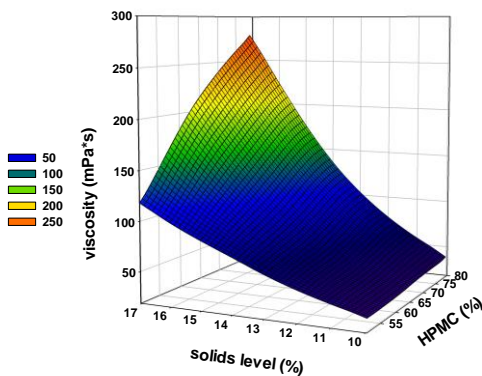
Značajni efekti (na osnovu p-vrednosti) su prikazani u tamnijoj štampi
 Significant influences (based on p-value) are shown in bold



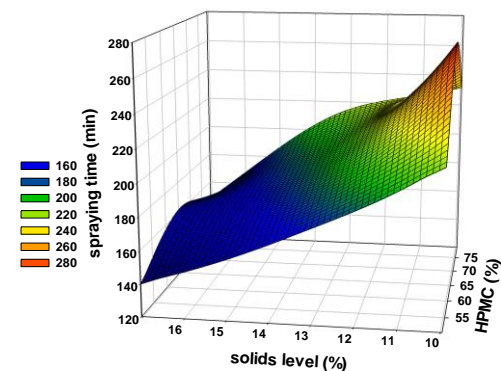
(a)



(b)



(c)



(d)

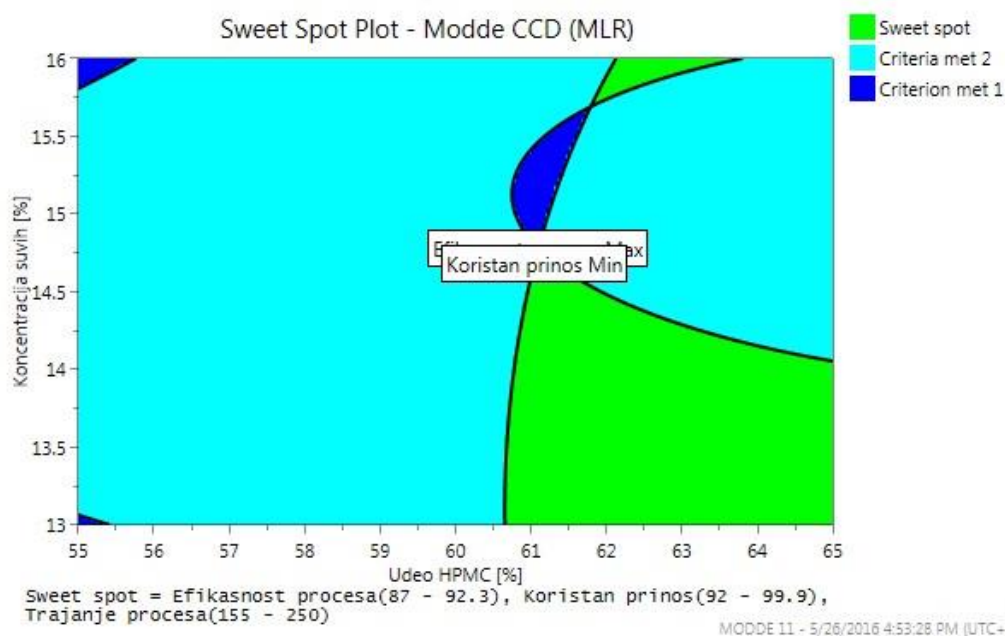
Slika 38. Grafici površine odgovora koji pokazuju efekte ulaznih varijabli na ispitivane odgovore: (a) efikasnost procesa, (b) koristan prinos, (c) viskozitet suspenzije za oblaganje i (d) vreme oblaganja

Figure 38. Response surface plots showing the effects of independent variables on investigated responses: (a) coating efficiency, (b) useful yield, (c) viscosity of coating liquid and (d) spraying time.

Statistički značajni modeli sa R^2 većim od 0.90 (Tabela 25) su dobijeni pomoću metodologije površine odgovora i iskorišćeni su za definisanje faktorskog prostora koji istovremeno zadovoljava kriterijume postavljene za više odgovora. Cilj ovog dela istraživanja je bio da se postigne maksimalna efikasnost procesa oblaganja i koristan prinos sa što je moguće manje vezivnog sredstva i za što kraće vreme. Da bi se pronašli uslovi pri kojima su svi od ciljeva u najvećoj mogućoj meri ispunjeni korišćena je funkcija poželjnosti koja je deo softvera za eksperimentalni dizajn. U softveru korisnik definiše željene vrednosti za izlaze i značajnost faktora. Pošto je viskozitet svih testiranih suspenzija bila ispod kritične vrednosti za postizanje adekvatne atomizacije, nije postavljena ciljna vrednost za ovaj izlazni parametar.

Promenljivima: udeo hidroksipropil metilceluloze, efikasnost procesa i koristan prinos data je ocena značaja 5 od 5, dok je promenljivima: vreme trajanja procesa i koncentracija suspenzije za oblaganje dodeljena ocena značaja 3 od 5. Numerička optimizacija je dala dva rešenja sa istim nivoom poželjnosti od 0.738. Vrednost nivoa poželjnosti ukazuje na to u kojoj su meri postignuti zadati ciljevi tako da više vrednosti nivoa značajnosti znače bolje slaganje sa zadatim ciljevima. Dobijena rešenja su ukazivala da je optimalni nivo hipromeloze u tečnosti za oblaganje između 60% i 61% u odnosu na model supstancu, dok je u oba rešenja optimalna koncentracija suspenzije za oblaganje 16%.

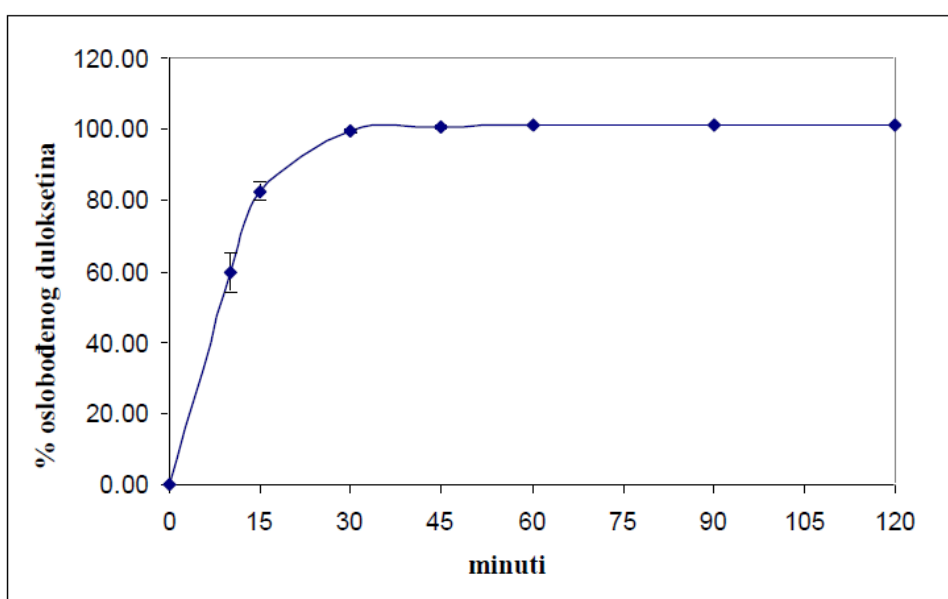
U softveru za eksperimentalni dizajn Modde[®], maksimalne vrednosti su odabrane kao željeni kriterijumi za efikasnost procesa i koristan prinos. Minimalne vrednosti su odabrane kao željeni kriterijumi za nivo vezivnog sredstva u formulaciji i vreme trajanja procesa, a ciljna vrednost viskoziteta nije odabrana. Na Slici 39 je grafički prikazan rezultat numeričke optimizacije. koji je sličan onima koje je dala funkcija poželjnosti softvera Design Expert[®]. Zeleno polje na slici predstavlja kombinacije koncentracije suspenzije i udela hidroksipropil metilceluloze pri kojima su zadati kriterijumi zadovoljeni.



Slika 39. Dijagram opsega udela hidroksipropil metilceluloze i koncentracije suspenzije za oblaganje pri kojima su ispunjeni zadati kriterijumi za efikasnost procesa, koristan prinos i trajanje procesa.

Figure 39. Diagram showing the range of hypromellose 6 cp and level of solids in the coating suspension within which set criteria for process efficiency, useful yield and process time are fulfilled

Na osnovu rezultata studije optimizacije pripremljene su pelete obložene aktivnom supstancom oblaganjem iz suspenzije čija je koncentracija bila 16% i koja je sadržala 61% hidroksipropil metilceluloze u odnosu na količinu duloksetin hidrohlorida. Oblaganje je vršeno do postizanja teoretskog sadržaja od 31% duloksetina u peletama. Efikasnost procesa i koristan prinos za datu šaržu iznosili su 92.2% i 91.2%, a sadržaj duloksetina u obloženim peletama je bio 28.19 mg duloksetina/100 mg peleta. Oslobođanje duloksetina ispitano je u fosfatnom puferu pH 6.8 i profil oslobođanja je prikazan na Slici 40. Potpuno oslobođanje je postignuto nakon 30 minuta. Proizvedene pelete odgovaraju zahtevima kvaliteta u smislu sadržaja i oslobođanja aktivne supstance te se zaključuje da su pogodne za dalje procesiranje (oblaganje izolacionim i gastrozistentnim filmom).



Slika 40. Profil brzine rastvaranja duloksetina iz peleta obloženih slojem aktivne supstance u fosfatnom puferu pH 6.8

Figure 40. Release profile of duloxetine layered pellets in phosphate buffer pH 6.8

Na osnovu rezultata skrining studije zaključeno je da je adekvatna tehnika za oblaganje inaktivnih peleta model supstancom tehnika oblaganja suspendovanom model supstancom jer omogućava očuvanje kristalnog oblika lekovite supstance u toku procesa oblaganja. Ispitivanjem interakcija model supstance i polimera koji je korišćen kao vezivno sredstvo zaključeno je da u toku oblaganja peleta rastvorenom model supstancom dolazi do nastajanja amorfne faze model supstance koja ima nisku tačku staklastog prelaza, između 24 °C i 51 °C, što izaziva izraženu aglomeraciju peleta. Kada se model supstanca rastvori u tečnosti za oblaganje, u zavisnosti od

polimera koji se koristi, u toku oblaganja nastaje jednofazni ili dvofazni sistem. Rezultati skrining studije su takođe ukazali da formulacija ima najveći uticaj na efikasnost procesa i koristan prinos, a proces se pokazao robusnim u okviru ispitanih opsega procesnih parametara. Faktori sa najvećim pozitivnim efektom na koristan prinos u skrining studiji su bili nivo i viskozitet hidroksipropil metilceluloze. Prisustvo talka nije pokazalo da ima pozitivan efekat ni na efikasnost procesa ni na koristan prinos te je talk isključen iz formulacije.

Studija optimizacije je izvedena sa hidroksipropil metilcelulozom višeg viskoziteta. Koncentracija suspenzije i nivo vezivnog sredstva u suspenziji su optimizovani tako da se postigne maksimalna efikasnost procesa i koristan prinos. U ovoj fazi su dodatno praćeni i viskozitet tečnosti za oblaganje i vreme trajanja procesa. Parametar sa najvećim uticajem na efikasnost procesa je bio koncentracija suspenzije, dok je nivo veziva u formulaciji imao najveći uticaj na koristan prinos. Metodologijom površine odgovora su dobijeni statistički značajni modeli pomoću kojih su definisani optimalna koncentracija suspenzije za oblaganje kao i nivo vezivnog sredstva u formulaciji potrebni za postizanje efikasnog procesa.

5.0 Treći deo istraživanja

5.1 Uvod

U trećem delu istraživanja ispitana je mogućnost primene različitih tehnika veštačke inteligencije, odnosno istraživanja i analize podataka u modelovanju formulacije gastrozistentnih peleta. Cilj ovog dela istraživanja bio je da se na osnovu istorijskih podataka koji su dobijeni u laboratorijskim probama izvođenim po principu proba – greška, razviju modeli za predviđanje gastrozistencije i oslobađanja model supstance u zavisnosti od karakteristika formulacije. Obzirom da je duloksetin hidrohlorid slabo rastvorna supstanca, bilo je potrebno razviti modele ne samo za predviđanje gastrozistencije i oslobađanja lekovite supstance u jednoj tački, već da se predvidi oslobađanje u osam tačaka profila oslobađanja. Zadatak predviđanja gastrozistencije i procenta oslobođene model supstance u određenim vremenskim intervalima je formalizovan kao regresioni problem i ispitana je pogodnost primene različitih regresionih tehnika za njegovo rešavanje. U skladu sa principima dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju proizvoda (QbD), na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika model supstance i kritičnih atributa kvaliteta gastrozistentnih peleta datih u tački 3.1.3 izvršena je analiza rizika u cilju definisanja potencijalnih kritičnih formulacijskih promenljivih za gastrozistenciju i profil brzine rastvaranja model supstance iz gastrozistentnih peleta.

5.1.1 Analiza rizika za formulacijske karakteristike gastrozistentnih peleta

Analizom rizika (Tabela 26) je označeno 16 kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika formulacije koji potencijalno mogu imati uticaj na gastrozistenciju i profil brzine oslobađanja model supstance iz gastrozistentnih peleta. Očekivano je da formulacija gastrozistentnog sloja nije jedina koja utiče na gastrozistenciju i profil brzine rastvaranja model supstance iz peleta, već i da formulacija oba sloja koja se nalaze ispod njega mogu uticati na ove kritične attribute kvaliteta, ali uglavnom u manjoj meri. Karakteristike model supstance koje mogu da imaju uticaj na ova dva kritična atributa kvaliteta gastrozistentnih peleta nisu diskutovane jer su svi eksperimenti rađeni sa istim kvalitetom model supstance u smislu fizičko-hemijskih karakteristika i raspodele veličine čestica.

Tabela 26. Analiza rizika za kritične atribute kvaliteta gastrozistentnih peleta u odnosu na karakteristike formulacije gastrozistentnih peleta

Table 26. Risk analysis for critical quality attributes of enteric-coated pellets with respect to formulation characteristics of enteric-coated pellets

Rizik	KAK	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Kristalni oblik model supstance	Gastrozistentcija	2	1	L
	Profil brzine rastvaranja	2	3	M
Nivo inaktivnih peleta	Gastrozistentcija	2	3	M
	Profil brzine rastvaranja	2	3	L
Veličina inaktivnih peleta	Gastrozistentcija	2	3	M
	Profil brzine rastvaranja	2	2	L
Tip polimera u API sloju*	Gastrozistentcija	2	1	L
	Profil brzine rastvaranja	3	3	M
Nivo polimera u API sloju*	Gastrozistentcija	2	1	L
	Profil brzine rastvaranja	3	4	H
Rastvarač u API sloju*	Gastrozistentcija	1	1	L
	Profil brzine rastvaranja	3	2	M
Nanos izolacionog sloja	Gastrozistentcija	2	1	L
	Profil brzine rastvaranja	3	3	M
Nivo polimera u izolacionom sloju	Gastrozistentcija	2	3	M
	Profil brzine rastvaranja	3	4	H
Nivo talka u izolacionom sloju	Gastrozistentcija	2	1	L
	Profil brzine rastvaranja	2	2	L
Nivo rastvornog punioca u izolaciji	Gastrozistentcija	2	2	L
	Profil brzine rastvaranja	3	4	H
Tip polimera u izolacionom sloju	Gastrozistentcija	3	2	M
	Profil brzine rastvaranja	3	3	M
Nanos gastrozistentnog sloja	Gastrozistentcija	4	5	H
	Profil brzine rastvaranja	3	4	H
Nivo polimera u gastrozistentnom sloju	Gastrozistentcija	4	5	H
	Profil brzine rastvaranja	4	4	H
Nivo talka u gastrozistentnom sloju	Gastrozistentcija	3	4	H
	Profil brzine rastvaranja	2	2	M
Nivo plastifikatora u gastrozistentnom sloju	Gastrozistentcija	3	4	H
	Profil brzine rastvaranja	3	3	M
Tip polimera u gastrozistentnom sloju	Gastrozistentcija	3	4	H
	Profil brzine rastvaranja	4	4	H
Rastvarač u gastrozistentnom sloju	Gastrozistentcija	2	1	L
	Profil brzine rastvaranja	3	3	M

KAK - kritični atribut kvaliteta; L - nizak nivo rizika; M - srednji nivo rizika; H - visok nivo rizika; API sloj – sloj sa lekovitom supstancom

KAK – critical quality attribute; L- low risk level; M – medium risk level; H – high risk level

5.1.2 Modelovanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta

Da bi se uticaj 16 promenljivih ispitao punim faktorijalnim dizajnom na dva nivoa bilo bi potrebno 256 eksperimenata, a za ispitivanje frakcionim faktorijalnim dizajnom rezolucije IV bilo bi potrebno bar 32 eksperimenata. Izvođenje tako velikog broja eksperimenata zahtevalo bi previše vremena i materijala tako da je odlučeno da se za modelovanje formulacije gastrozistentnih peleta ne izvode novi eksperimenti prema frakcionom faktorijalnom planu, već da se iskoriste rezultati preliminarnih proba, a da se za modelovanje koriste soft computing tehnike istraživanja podataka koje ne zahtevaju izvođenje eksperimenata prema tačno definisanom eksperimentalnom planu. U literaturi postoje podaci o primeni veštačkih neuronskih mreža i regresionih stabala u optimizaciji formulacije i procesa (Mihajlović i autori 2011; Mendyk i autori, 2010; Ronowicz i autori, 2015) tako da je odlučeno da se ispita mogućnost primene ove dve tehnike istraživanja podataka, ali i da se dodatno ispita mogućnost primene drugih regresionih tehnika koje do sada nisu korišćene u modelovanju formulacije i to: laso regresija, grebenasta (engl. *ridge* – greben) regresija, elastična mreža, stepwise regresija i ansambl regresionih stabala dobijen tehnikom "boosting" (engl. *boost* – pojačati).

5.1.3 Ekscipijensi

Pregled ispitanih formulacija gastrozistentnih peleta sa pripadajućim rezultatima gastrozistencije i profilima oslobađanja duloksetina u fosfatnom puferu pH 6.8 dat je u Tabeli 27. Prilikom odabira ekscipijenasa koji će biti ispitani u ovoj fazi istraživanja uzete su obzir fizičko-hemijske osobine model supstance i rezultati analize rizika. Ispitano je ukupno 6 kvalitativnih i 10 kvantitativnih promenljivih. Ispitane su dve veličine inaktivnih peleta i to inaktivne pelete veličine 20-25 mesh i inaktivne pelete veličine 25-30 mesh jer se u zavisnosti od veličine inaktivnih peleta menja i ukupna površina peleta koja je u kontaktu sa medijumom za ispitivanje brzine rastvaranja. Pošto inaktivne pelete sadrže saharozu koja je osmotski aktivna supstanca, inaktivne pelete mogu da utiču i na brzinu oslobađanja model supstance tako da je i nivo inaktivnih peleta u formulaciji uzet u obzir. U formulaciji sloja sa aktivnom supstancom ispitan je uticaj polimera koji mogu da utiču na brzinu rastvaranja slabo rastvorne model supstance i to: hidroksipropil metilceluloze 6 cp, povidona K-30, hidroksipropil celuloze LF i hidroksipropil celuloze EF. Ispitana su i

tri rastvarača koja se koriste za pripremu tečnosti za oblaganje u API sloju: voda, izopropanol, i smeša vode i izopropanola. U formulaciji izolacionog sloja ispitane su četiri varijante polimera: hidroksipropil metilceluloza 6 cp, kombinacija hidroksipropil metilceluloze 6 cp i hidroksipropil celuloze EF, kombinacija hidroksipropil metilceluloze 6 cp i hidroksipropil celuloze LF i kombinacije hidroksipropil metilceluloze 6 cp i etil celuloze koje mogu različito da utiču na profil brzine oslobađanja model supstance iz peleta. U formulaciji izolacionog sloja ispitano je i prisustvo različitih nivoa talka i različitih nivoa punioca (saharoze). U formulaciji gastrozistentnog filma ispitana su dva gastrozistentna polimera: hipromeloza acetat sukcinat MF i hipromeloza acetat sukcinat LF. U ovom sloju je takođe ispitano i prisustvo različitih nivoa talka koji ima funkciju lubrikansa, trietil citrata koji ima ulogu plastifikatora, kao i vrsta rastvarača korišćenog za pripremu suspenzije.

5.2 Materijali i metode

5.2.1 Materijali

U istraživanju su korišćeni sledeći materijali: duloksetin hidrohlorid (JiuZhou, Kina), inaktivne pelete od saharoze i skroba, veličine 25-30 mesh i 20-25 mesh (JRS Pharma, Nemačka), povidon K-30 (ISP, Švajcarska), hidroksipropil celuloza EF i LF (Ashland, SAD), hidroksipropil metilceluloza 6 cp (The Dow Chemical Company, Velika Britanija), etil celuloza (Ashland, SAD), hipromeloza acetat sukcinat LF i MF (Shin-Etsu, Japan), saharoza (Sunoko, Srbija), talk (Imerys Talc, Italija), koncentrovani amonijak (Merck, Nemačka), izopropanol (Brenntag-CEE, Nemačka) i etanol koncentrovani (Swan Lake, Srbija).

5.2.2 Metode

5.2.2.1 Proizvodnja gastrozistentnih peleta

Sve probe oblaganja su izvršene u laboratorijskom uređaju sa fluidizirajućim kretanjem vazduha Glatt GPCG2 (Glatt GmbH, Nemačka) u konfiguraciji sa Wurster kolonom i mlaznim 1.2 mm raspršivačem za dva fluida postavljenim na dnu uređaja.

Parametri proizvodnog procesa su podešeni imajući u vidu osnovne principe oblaganja peleta ovom tehnikom tako da se spreči aglomeracija peleta i spreči uticaj procesnih parametara na izlaze koji se prate. Sve tečnosti za oblaganje su pripremljene tako što su rastvorni materijali rastvoreni u predviđenom rastvaraču, a

nerastvorni (ako ih ima u formulaciji) su dispergovani i homogenizovani odvojeno pa su dodati rastvorenim materijalima u formi suspenzije.

5.2.2.2 Gastrozistencija i profil brzine rastvaranja

Metode ispitivanja gastrozistencije i profila brzine rastvaranja su opisane u tačkama 3.2.2.2.3.

5.2.2.3 Set podataka

Pregled ulaznih i izlaznih promenljivih koje su uključene u razvoj modela prikazan je u Tabeli 27.

Tabela 27. Ulazne i izlazne varijable koje su uključene u modelovanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta

Table 27. Input and output variables included in the modelling of release of duloxetine from enteric-coated pellets

<i>Kvalitativne ulazne varijable</i>		
Prečnik inaktivnih peleta	20 – 25 mesh, 25 – 30 mesh	
Polimer u API sloju	HPMC 6 cp, PVP K-30, HPC EF, HPC LF	
Rastvarač u API sloju	voda, izopropanol, smeša vode i izopropanola	
Polimer u izolaciji	HPMC 6 cp, HPMC 6 cp + HPC EF, HPMC 6 cp + HPC LF, HPMC 6 cp + EC	
Polimer u GR sloju	HPMCAS LF, HPMCAS MF	
Rastvarač u GR sloju	voda, smeša vode i etanola (20:80)	
<i>Kvantitativne ulazne varijable</i>		
	<i>Minimum (%)</i>	<i>Maksimum (%)</i>
Udeo inaktivnih peleta	20	36
Udeo polimera u API sloju	20	52
Nanos izolacionog sloja	18	47
Udeo polimera u izolacionom sloju	10	41
Udeo talka u izolacionom sloju	10	67
Udeo punioca u izolacionom sloju	0	80
Nanos gastrozistentnog filma	20	66
Udeo polimera u gastrozistentnom filmu	37	100
Udeo lubrikansa u gastrozistentnom filmu	0	56
Udeo plastifikatora u gastrozistentnom filmu	0	20
<i>Izlazne varijable</i>		
Gastrozistencija	0.01	18.10
% oslobođene supstance posle 5 minuta	0.2	4.3
% oslobođene supstance posle 10 minuta	2.5	26.5
% oslobođene supstance posle 15 minuta	13.9	51.8
% oslobođene supstance posle 20 minuta	31.9	72.4
% oslobođene supstance posle 30 minuta	46.5	82.3
% oslobođene supstance posle 45 minuta	57.5	95.5
% oslobođene supstance posle 60 minuta	64.9	101.4
% oslobođene supstance posle 90 minuta	73.7	102.1

Za modelovanje formulacije korišćen je set istorijskih podataka iz 19 eksperimenata koji nisu izvedeni prema nekom faktorijalnom ili frakcionom faktorijalnom eksperimentalnom planu. Set podataka je sadržao sve raspoložive informacije o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu gastrozistentnih peleta. Priprema podataka za obradu je podrazumevala prevođenje kvalitativnih podataka u kodirane numeričke vrednosti. Kada god je bilo moguće kodirane numeričke vrednosti su logički dodeljivane kvalitativnim promenljivima. Tako su pelete 20-25 mesh su dobile oznaku 0 zato što imaju manju površinu od peleta 25-30 mesh koje imaju oznaku 1. Isto tako polimer hipromeloza acetat sukcinat MF koji se rastvara na nižoj pH vrednosti rastvora je dobio oznaku 0, a LF tip je dobio oznaku 1 jer se rastvara na višoj pH vrednosti rastvora. Ostalim kvalitativnim promenljivima su numeričke vrednosti dodeljene nasumično. Za sve modele, osim za regresiona stabla i ansambl regresionih stabala dobijen tehnikom "boosting", su kategorički atributi transformisani tako da mogu imati vrednosti 0 ili 1. Na primer, ako kategorički atribut "polimer u sloju aktivne supstance" ima vrednosti 0, 1, 2 i 3, atribut se transformiše u četiri kategorička atributa: polimer 0, polimer 1, polimer 2 i polimer 3 od kojih svaki može da ima vrednost 0 ili 1 tako da je nakon transformacije bilo ukupno 27 ulaznih promenljivih. To se radi jer bi regresija tretirala 0, 1, 2 i 3 kao brojeve između kojih je razlika tačno 1, a realno to nije tako jer su to u stvari kodirani kategorički atributi. Regresiona stabla su modeli koji mogu da funkcionišu sa kategoričkim atributima koji imaju ne-numeričke vrednosti, a ostale ispitane tehnike to ne mogu te se zato vrši transformacija kategoričkih atributa tako da imaju vrednosti 0 ili 1. Vrednosti kvantitativnih promenljivih su za sve modele, osim za regresiona stabla i ansambl regresionih stabala dobijen tehnikom "boosting" standardizovane/normalizovane upotrebom z-transformacije.

Odgovori koji su praćeni su gastrozistentencija i količina oslobođenog duloksetina nakon 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 i 90 minuta testa ispitivanja brzine rastvaranja. Podaci o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu ispitanih formulacija prikazani su u Tabeli 28, a gastrozistentencija i profili oslobađanja duloksetina iz tih formulacija prikazani su u Tabeli 29.

5.2.2.4 Metode modelovanja oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta

Razmotreno je više pristupa modelovanju oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta i to: multipla linearna regresija, stepwise regresija, laso regresija, grebenasta regresija (engl. *ridge regression*), elastična mreža, regresiona stabla, ansambl regresionih stabla dobijen tehnikom "boosting" i veštačke neuronske mreže.

Za modelovanje multiplom linearnom regresijom, stepenastom regresijom, laso regresijom, grebenastom regresijom, elastičnim mrežama, regresionim stablima i ansamblom regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting" korišćen je softver Matlab[®] 2013b (MathWorks, SAD). U softveru Matlab korišćena su podrazumevana (engl. *default*) podešavanja softvera. Podaci su podeljeni na skup za trening i test skup tako da je 17 primera korišćeno za trening, a 2 primera (odnosno 10% ukupnih primera) su metodom slučajnog izbora odabrani za testiranje modela.

Za modelovanje veštačkim neuronskim mrežama korišćen je softver Statistica[®] 8.0 (StatSoft, SAD). Podaci su podeljeni u tri grupe: set za trening, test set i set za validaciju. Od rezultata 19 eksperimenata, 15 je korišćeno za trening, 2 za testiranje i 2 za validaciju mreže. Primeri za testiranje su isti kao i primeri koji su korišćeni u softveru Matlab[®]. Validacioni skup primera je metodom slučajnog izbora odabrao softver od preostalih primera trening skupa. Za modelovanje formulacije gastrozistentnih peleta korišćene su neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona (MLP – engl. *Multilayer Perceptron*). Implementirane su različite aktivacione funkcije skrivenih i izlaznih neurona: linearna, logistička, tangencijalna i eksponencijalna. Arhitektura mreža je varirana tako da sadrži od 5 do 27 skrivenih slojeva. Trening mreže trajao je dok nije postignuta najmanja greška na validacionim podacima. Greška je predstavljena sumom kvadrata razlika između predviđenih i tačnih vrednosti u okviru seta podataka:

$$E = \sum_{i=1}^N (y_i - t_i)^2 \quad (27)$$

gde je N broj slučajeva koji se koriste u datoj fazi, y_i je vrednost koje je predvidela mreža, a t_i realna vrednost za i-ti podatak.

5.2.2.5 Evaluacija modela

Evaluacija modela razvijenih različitim tehnikama vršena je poređenjem vrednosti RMSE za test skupove podataka primenjenih na date modele. RMSE se računa po sledećoj formuli:

$$RMSE = [\sum (y_{ip} - y_{im})^2 / n]^{1/2} \quad (28)$$

gde je RMSE koren srednje vrednosti kvadrata greške, y_p tačna vrednost odgovora, y_m vrednost odgovora koji je predvideo model, a n je broj primera koji su korišćeni za treniranje modela.

Ibrić i autori (2002) su modelovali formulaciju matriks tableta aspirina sa produženim oslobađanjem korišćenjem veštačkih neuronskih mreža. Podaci su prikupljeni u eksperimentalnom dizajnu, a RMSE za procenat oslobođene supstance koju su postigli u fazi treninga iznosila je 1.04%. RMSE za test podatke se kretao od 1.85% za procenat oslobođenog aspirina nakon 2 h do 5.19% za procenat oslobođenog aspirina nakon 8h.

Eksperimentalno dobijeni i profili oslobađanja duloksetina koje su predvideli modeli su poređeni pomoću faktora sličnosti f_2 koji je računat po sledećoj formuli (FDA, 1997):

$$f_2 = 50 \cdot \log\left\{1 + \left(\frac{1}{n}\right) \sum_{t=1}^{t=n} (R_t - T_t)^2\right\}^{-0.5} \cdot 100 \quad (29)$$

gde su R_t i T_t procenti od deklarisanе vrednosti rastvorene lekovite supstance iz ispitivanih proba u vremenu t , a n je broj vremenskih tačaka uključenih u kalkulaciju. Za računanje faktora sličnosti f_2 korišćene su sve vremenske tačke pre nego što je otpušteno 85% model supstance i samo jedna tačka na kojoj je otpušteno više od 85% lekovite supstance. Ako je izračunat faktor sličnosti za eksperimentalne rezultate i rezultate predviđene modelom (za test skup podataka) veći od 50 zaključuje se da model može da se koristi za predviđanje oslobađanja duloksetina iz peleta u zavisnosti od karakteristika njihove formulacije

Tabela 28. Ispitane ulazne promenljive
Table 28. Evaluated input variables

Eksp.	Inaktivne pelete		Sloj aktivne supstance			Izolacioni sloj					Gastrorezistentni sloj					
	Prečnik ¹	Udeo (%)	Polimer ²	Udeo polimera (%)	Rastvarač ³	Nanos (%)	Polimer ⁴	Udeo polimera (%)	Udeo lubrikansa (%)	Udeo punioca (%)	Nanos (%)	Polimer ⁵	Rastvarač ⁶	Udeo polimera (%)	Udeo lubrikansa (%)	Udeo plastifikatora (%)
1	0	29	0	40	0	20.3	0	41	39	20	34.0	0	0	71	21	7
2	0	30	0	40	0	20.3	0	41	39	20	31.6	1	1	63	19	18
3	1	24	0	44	0	25.0	0	33	67	0	66.0	1	1	53	32	15
4	1	23	0	44	0	35.5	0	40	20	40	42.4	0	1	53	32	15
5	0	27	1	35	1	21.7	0	33	67	0	59.3	1	0	72	22	6
6	0	30	1	35	1	18.8	1	33	67	0	44.3	1	0	71	21	7
7	0	22	0	52	2	23.4	0	33	67	0	31.6	1	0	71	21	7
8	0	20	0	52	2	27.0	1	33	67	0	39.0	1	0	71	21	7
9	0	26	1	35	1	21.5	1	33	67	0	30.2	1	0	40	40	20
10	0	26	1	35	1	31.1	2	33	67	0	20.6	1	0	40	40	20
11	0	24	1	35	1	46.6	2	33	67	0	19.8	1	0	37	56	7
12	0	25	1	35	1	46.6	2	33	67	0	15.4	1	0	37	56	7
13	0	30	1	35	1	17.4	3	33	67	0	21.8	1	1	100	0	0
14	0	28	1	35	1	21.3	3	33	67	0	23.6	1	1	100	0	0
15	0	28	1	35	1	21.3	3	33	67	0	24.2	1	1	50	50	0
16	0	36	2	20	1	17.6	0	40	20	40	23.8	1	1	100	0	0
17	0	31	2	20	1	38.6	0	40	20	40	23.2	1	1	100	0	0
18	0	34	3	20	1	22.7	0	10	10	80	26.8	1	1	100	0	0
19	0	32	3	20	1	34.3	0	10	10	80	20.4	1	1	100	0	0

¹ 0 – inaktivne pelete 20 – 25 mesh; 1- inaktivne pelete 25-30 mesh; ² 0 – Hidroksipropil metilceluloza 6 cp; 1 – Povidon K-30; 2-Hidroksipropil celuloza LF; 3-Hidroksipropil celuloza EF; ³ 0 – voda; 1-izopropanol; 2- voda + izopropanol; ⁴ 0 – Hidroksipropil metilceluloza 6 cp; 1- Hidroksipropil metilceluloza 6 cp + Hidroksipropil celuloza EF; 2- Hidroksipropil metilceluloza 6 cp + Hidroksipropil celuloza LF; 3- Hidroksipropil metilceluloza 6 cp + Etil celuloza; ⁵ 0- Hipromeloza acetat sukcinat MF; 1 – Hipromeloza acetat sukcinat LF; ⁶ 0 – voda + etanol (20:80), 1 – voda;

¹ 0 – inactive pellets 20 – 25 mesh; 1- inactive pellets 25-30 mesh; ² 0 – Hypromellose 6 cp; 1 – Povidone K-30; 2-Hydroxypropylcellulose LF; 3-Hydroxypropylcellulose EF; ³ 0 – water; 1-isopropanol; 2- water + isopropanol; ⁴ 0 – Hypromellose 6 cp; 1- Hypromellose 6 cp + Hydroxypropylcellulose EF; 2- Hypromellose 6 cp + Hydroxypropylcellulose LF; 3- Hypromellose 6 cp + Ethylcellulose; ⁵ 0- Hypromellose acetate succinate MF; 1 – Hypromellose acetate succinate LF; ⁶ 0 – water + ethanol (20:80), 1 – water

Tabela 29. Gastrozestencija i profil brzine rastvaranja duloksetina iz gastrozestentnih peleta koji su modelovani tehnikama istraživanja podataka

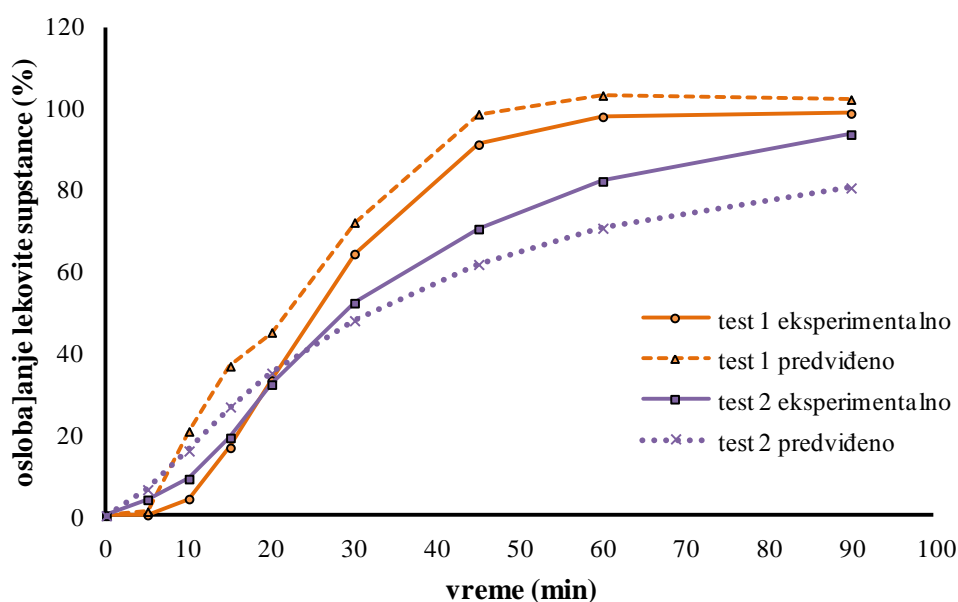
Table 29. Gastric-resistance and release profiles of duloxetine from enteric-coated pellets that were modelled by data mining techniques

Eksperiment	Gastrozestencija (%)	5. minut (%)	10. minut (%)	15. minut (%)	20. minut (%)	30. minut (%)	45. minut (%)	60. minut (%)	90. minut (%)
1	0.2	0.2	6.5	28.1	50.3	77.1	93.8	99.0	100.4
2	0.1	0.4	5.4	23.1	42.8	66.0	87.0	96.9	100.2
3	0.9	2.4	9.4	34.1	55.9	77.5	92.8	98.6	100.6
4	0.1	1.6	12.4	37.9	60.0	82.3	95.5	99.4	100.0
5	0.2	2.3	5.5	35.8	60.4	77.1	87.0	92.7	97.5
6	0.1	1.3	22	50.7	65.4	76.7	85.2	90.4	95.0
7	0.2	0.2	4.1	16.7	33.2	64.3	91.1	98.0	98.8
8	0.2	0.9	2.5	13.9	31.9	66.1	95.4	101.4	102.1
9	0.3	1.9	26.5	55.0	68.6	78.8	86.7	91.5	96.3
10	0.4	3.8	23.2	51.8	69.5	82.2	90.8	94.9	98.0
11	0.3	2.1	16.7	45.7	65.4	80.0	89.9	94.6	97.6
12	3.0	3.2	25.7	57.1	72.4	83.5	90.8	94.2	96.2
13	0.3	2.2	23.2	43.5	56.1	69.7	82.5	91.2	97.3
14	0.1	1.7	24.0	44.6	56.7	70.7	83.0	92.3	99.4
15	18.1	1.7	12.2	24.6	34.5	46.5	57.5	64.9	73.7
16	0.4	3.9	9.0	19.1	32.2	52.2	70.4	82.1	93.6
17	0.9	4.3	9.9	20.0	32.1	49.6	66.2	77.9	89.8
18	0.0	2.8	10.4	27.3	44.5	64.3	80.0	89.0	96.2
19	0.1	2.1	9.3	27.1	44.4	63.8	80.3	90.6	98.0

5.2.3 Rezultati i diskusija

5.2.3.1 Modelovanje oslobađanja gastrorezistentnih peleta primenom multiple linearne regresije

Izračunata vrednost RMSE u fazi treninga kreće se od 0.09% za procenat oslobođene supstance posle 5 minuta do 1.36% za procenat oslobođene supstance nakon 15 minuta. Izračunate vrednosti RMSE za test formulacije su znatno više u svim tačkama profila oslobađanja, za oslobađanje nakon 10 i 15 minuta izračunata vrednost RMSE iznosi 12.78, odnosno 15.11. Vrednosti RMSE izračunate za test i trening skup podataka prikazane su u Tabeli 30. Eksperimentalno dobijeni rezultati i vrednosti predviđene modelom su prikazani u Tabeli 31. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je prođvideo model za test skup podataka prikazan je na slici 40.



Slika 40. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom multiple linearne regresije

Figure 41. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by multiple regression model

Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 48.8 za formulaciju test 1 i 54.6 za formulaciju test 2. Pošto nije postignut faktori sličnosti veći od 50 za obe test formulacije zaključuje se da ova tehnika nije pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastrorezistentnih peleta.

Tabela 30. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom multiple linearne regresije
 Table 30. RMSE values for models developed by multiple linear regression technique

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE trening	0.50	0.09	1.09	1.36	0.74	0.30	0.14	0.26	0.25
RMSE test	4.53	1.86	12.78	15.11	8.58	6.24	8.09	8.93	9.56

Tabela 31. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom multiple linearne regresije za trening i test* skup podataka
 Table 31. Experimentally obtained and values predicted by multiple linear regression technique for training set and test* set of data

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno
0.2	0.2	0.2	0.2	6.5	6.5	28.1	28.1	50.3	50.3	77.1	77.1	93.8	93.8	99.0	99.0	100.4	100.4
0.1	0.1	0.4	0.4	5.4	5.4	23.1	23.1	42.8	42.8	66.0	66.0	87.0	87.0	96.9	96.9	100.2	100.2
0.9	0.9	2.4	2.4	9.4	9.4	34.1	34.1	55.9	55.9	77.5	77.5	92.8	92.8	98.6	98.6	100.6	100.6
0.1	0.1	1.6	1.6	12.4	12.4	37.9	37.9	60.0	60.0	82.3	82.3	95.5	95.5	99.4	99.4	100.0	100.0
0.2	0.2	2.3	2.3	5.5	5.5	35.8	35.7	60.4	60.4	77.1	77.1	87.0	87.0	92.7	92.7	97.5	97.5
0.1	-0.1	1.3	1.3	22.0	21.6	50.7	50.3	65.4	65.2	76.7	76.6	85.2	85.2	90.4	90.5	95.0	95.1
0.2	0.2	0.9	0.9	2.5	2.5	13.9	13.9	31.9	31.9	66.1	66.1	95.4	95.4	101.4	101.4	102.1	102.1
0.3	0.4	1.9	1.9	26.5	26.8	55.0	55.4	68.6	68.8	78.8	78.9	86.7	86.7	91.5	91.4	96.3	96.2
0.4	0.2	3.8	3.8	23.2	22.9	51.8	51.4	69.5	69.3	82.2	82.1	90.8	90.8	94.9	95.0	98.0	98.1
0.3	1.5	2.1	2.3	16.7	19.3	45.7	48.9	65.4	67.1	80.0	80.7	89.9	89.6	94.6	94.0	97.6	97.0
3.0	1.9	3.2	3.0	25.7	23.4	57.1	54.3	72.4	70.9	83.5	82.9	90.8	91.1	94.2	94.7	96.2	96.7
0.3	1.3	2.2	2.4	23.2	25.3	43.5	46.1	56.1	57.5	69.7	70.3	82.5	82.2	91.2	90.7	97.3	96.8
0.1	-0.8	1.7	1.5	24.0	22.1	44.6	42.2	56.7	55.4	70.7	70.2	83.0	83.2	92.3	92.8	99.4	99.8
18.1	18.0	1.7	1.7	12.2	12.0	24.6	24.3	34.5	34.4	46.5	46.4	57.5	57.5	64.9	65.0	73.7	73.8
0.9	0.9	4.3	4.3	9.9	9.9	20.0	20.0	32.1	32.1	49.6	49.6	66.2	66.2	77.9	77.9	89.8	89.8
0.0	0.0	2.8	2.8	10.4	10.3	27.3	27.2	44.5	44.5	64.3	64.3	80.0	80.0	89.0	89.0	96.2	96.2
0.1	0.1	2.1	2.1	9.3	9.4	27.1	27.2	44.4	44.4	63.8	63.8	80.3	80.3	90.6	90.6	98.0	98.0
0.2	0.2	0.2	1.0	4.1	20.7	16.7	36.7	33.2	45.0	64.3	72.0	91.1	98.6	98.0	103.2	98.8	102.2
0.4	6.8	3.9	6.4	9.0	15.9	19.1	26.7	32.2	35.0	52.2	47.9	70.4	61.7	82.1	70.6	93.6	80.5

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; * Test data are given in bold print

Tabela 32. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom stepwise regresije
 Table 32. RMSE values for models developed by stepwise regression technique

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE trening	4.21	0.64	5.93	11.08	11.01	8.50	7.84	7.23	6.28
RMSE test	1.18	1.35	4.02	18.13	16.35	9.88	5.05	2.37	2.59

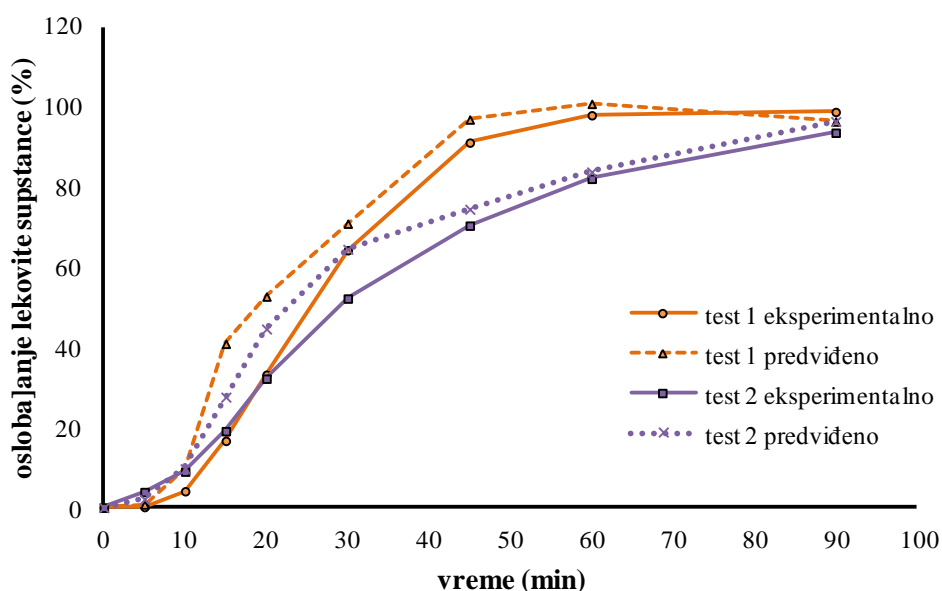
Tabela 33. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom stepwise regresije za trening i test* skup podataka
 Table 33. Experimentally obtained and values predicted by stepwise regression for training set and test* set of data

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno
0.2	1.5	0.2	0.7	6.5	9.7	28.1	33.1	50.3	52.7	77.1	70.9	93.8	88.6	99.0	94.5	100.4	96.4
0.1	1.5	0.4	0.6	5.4	9.7	23.1	33.1	42.8	55.0	66.0	80.2	87.0	88.6	96.9	94.5	100.2	96.4
0.9	1.5	2.4	1.5	9.4	9.7	34.1	40.9	55.9	57.8	77.5	77.7	92.8	91.5	98.6	96.7	100.6	96.4
0.1	1.5	1.6	1.7	12.4	9.7	37.9	27.6	60.0	57.8	82.3	77.7	95.5	91.5	99.4	96.7	100.0	96.4
0.2	1.5	2.3	2.4	5.5	9.7	35.8	40.9	60.4	52.5	77.1	69.9	87.0	84.7	92.7	91.6	97.5	96.4
0.1	1.5	1.3	1.4	22.0	14.1	50.7	40.9	65.4	52.7	76.7	70.9	85.2	84.7	90.4	91.6	95.0	96.4
0.2	1.5	0.9	1.3	2.5	14.1	13.9	40.9	31.9	52.7	66.1	70.9	95.4	96.9	101.4	100.8	102.1	96.4
0.3	1.5	1.9	2.4	26.5	14.1	55.0	40.9	68.6	61.5	78.8	82.2	86.7	84.9	91.5	91.7	96.3	96.4
0.4	1.5	3.8	2.4	23.2	18.6	51.8	40.9	69.5	61.5	82.2	82.2	90.8	84.9	94.9	91.7	98.0	96.4
0.3	1.5	2.1	3.1	16.7	18.6	45.7	40.9	65.4	62.4	80.0	71.1	89.9	84.9	94.6	91.7	97.6	96.4
3.0	1.5	3.2	2.8	25.7	18.6	57.1	40.9	72.4	62.4	83.5	71.1	90.8	84.9	94.2	91.7	96.2	96.4
0.3	1.5	2.2	1.4	23.2	23.0	43.5	40.9	56.1	44.6	69.7	64.5	82.5	84.9	91.2	91.7	97.3	96.4
0.1	1.5	1.7	1.9	24.0	23.0	44.6	40.9	56.7	44.6	70.7	64.5	83.0	84.9	92.3	91.7	99.4	96.4
18.1	1.5	1.7	2.0	12.2	23.0	24.6	40.9	34.5	58.7	46.5	64.5	57.5	84.9	64.9	91.7	73.7	96.4
0.9	1.5	4.3	3.6	9.9	9.7	20.0	27.6	32.1	44.6	49.6	64.5	66.2	74.5	77.9	83.8	89.8	96.4
0.0	1.5	2.8	2.6	10.4	9.7	27.3	24.7	44.5	44.6	64.3	64.5	80.0	74.5	89.0	83.8	96.2	96.4
0.1	1.5	2.1	3.1	9.3	9.7	27.1	24.7	44.4	44.6	63.8	64.5	80.3	74.5	90.6	83.8	98.0	96.4
0.2	1.5	0.2	0.8	4.1	9.7	16.7	40.9	33.2	52.7	64.3	70.9	91.1	96.9	98.0	100.8	98.8	96.4
0.4	1.5	3.9	2.1	9.0	9.7	19.1	27.6	32.2	44.6	52.2	64.5	70.4	74.5	82.1	83.8	93.6	96.4

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; * Test data are given in bold print

5.2.3.2 Modelovanje oslobađanja gastrozistentnih peleta primenom tehnike stepwise regresije

Izračunate vrednosti RMSE i za trening i za test skup podataka su više od vrednosti RMSE za test skup podataka modela razvijenih tehnikom multiple linearne regresije. Raspon izračunatih vrednosti RMSE za test skup podataka kreće se od 0.64 za procenat oslobođenog duloksetina posle 5 minuta do 11.08 za procenat oslobođenog duloksetina posle 15 minuta. Izračunate vrednosti RMSE za test skup podataka su nešto više i kreću se od 1.18 za gastrozistenciju do 18.13 za procenat oslobođenog duloksetina posle 15 minuta. Vrednosti RMSE za skup podataka za trening i testiranje za sve ispitivane izlaze prikazani su u Tabeli 32, a predviđene i eksperimentalno dobijene vrednosti za prikazane u Tabeli 33. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je prodvideo model za test skup podataka prikazan je na slici 41.



Slika 41. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom stepwise regresije

Figure 41. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by stepwise regression model

Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 43.9 za formulaciju test 1 i 57.1 za formulaciju test 2. Pošto nije postignut faktori sličnosti veći od 50 za obe test formulacije zaključuje se da ova tehnika nije pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta.

Tabela 34. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom laso regresije
 Table 34. RMSE values for models developed by lasso regression technique

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE trening	4.21	0.45	1.18	10.09	5.46	5.41	6.32	3.78	6.29
RMSE test	1.18	0.66	3.46	14.36	3.42	4.51	3.13	2.51	2.59

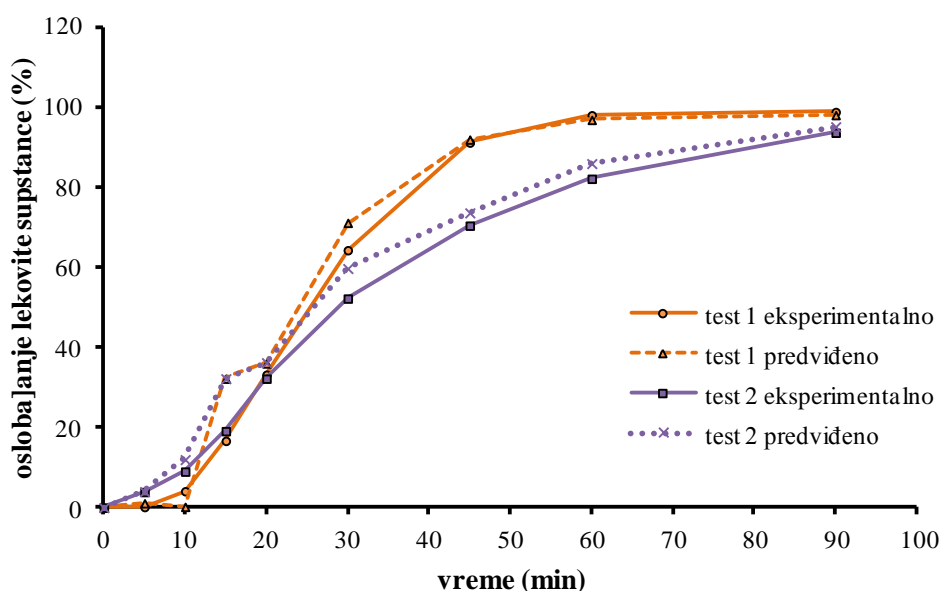
Tabela 35. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom laso regresije za trening i test* skup podataka
 Table 35. Experimentally obtained and values predicted by lasso regression model for training and test* set of data

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno
0.2	1.5	0.2	0.7	6.5	6.5	28.1	32.2	50.3	52.8	77.1	75.3	93.8	91.7	99.0	96.4	100.4	98.0
0.1	1.5	0.4	1.0	5.4	5.5	23.1	32.2	42.8	47.9	66.0	69.8	87.0	86.7	96.9	94.0	100.2	97.3
0.9	1.5	2.4	1.9	9.4	9.3	34.1	32.2	55.9	55.2	77.5	75.3	92.8	91.1	98.6	96.3	100.6	98.0
0.1	1.5	1.6	1.6	12.4	12.4	37.9	32.2	60.0	55.2	82.3	77.0	95.5	92.9	99.4	97.3	100.0	98.3
0.2	1.5	2.3	2.0	5.5	5.4	35.8	40.3	60.4	60.7	77.1	73.8	87.0	86.0	92.7	91.9	97.5	96.4
0.1	1.5	1.3	1.9	22.0	22.1	50.7	40.3	65.4	61.0	76.7	73.4	85.2	85.5	90.4	91.5	95.0	96.2
0.2	1.5	0.9	1.0	2.5	2.6	13.9	32.2	31.9	36.0	66.1	71.9	95.4	92.8	101.4	97.1	102.1	98.0
0.3	1.5	1.9	1.9	26.5	26.2	55.0	40.3	68.6	64.0	78.8	75.7	86.7	86.9	91.5	92.1	96.3	96.3
0.4	1.5	3.8	2.8	23.2	23.6	51.8	40.3	69.5	68.9	82.2	77.8	90.8	88.3	94.9	92.6	98.0	96.2
0.3	1.5	2.1	2.8	16.7	19.7	45.7	40.3	65.4	65.9	80.0	76.8	89.9	87.1	94.6	91.8	97.6	95.9
3.0	1.5	3.2	2.8	25.7	22.3	57.1	40.3	72.4	65.9	83.5	76.6	90.8	86.8	94.2	91.6	96.2	95.8
0.3	1.5	2.2	2.0	23.2	24.2	43.5	40.3	56.1	51.3	69.7	65.9	82.5	78.4	91.2	87.6	97.3	95.0
0.1	1.5	1.7	2.0	24.0	22.7	44.6	40.3	56.7	51.3	70.7	66.3	83.0	78.9	92.3	87.9	99.4	95.1
18.1	1.5	1.7	2.0	12.2	12.6	24.6	40.3	34.5	51.3	46.5	67.1	57.5	77.7	64.9	86.9	73.7	94.6
0.9	1.5	4.3	4.0	9.9	9.8	20.0	32.2	32.1	36.2	49.6	60.7	66.2	74.9	77.9	86.5	89.8	95.3
0.0	1.5	2.8	2.3	10.4	10.0	27.3	32.2	44.5	43.7	64.3	63.9	80.0	79.1	89.0	88.8	96.2	95.9
0.1	1.5	2.1	2.3	9.3	9.8	27.1	32.2	44.4	43.7	63.8	64.6	80.3	79.8	90.6	89.1	98.0	96.0
0.2	1.5	0.2	1.1	4.1	0.2	16.7	32.2	33.2	36.0	64.3	71.1	91.1	91.9	98.0	96.8	98.8	98.0
0.4	1.5	3.9	4.0	9.0	12.0	19.1	32.2	32.2	36.2	52.2	59.7	70.4	73.6	82.1	85.9	93.6	95.1

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; *Test data are given in bold print

5.2.3.3 Modelovanje oslobađanja gastrozistentnih peleta primenom tehnike laso regresije

Izračunate vrednosti RMSE za trening i test skup podataka za modele razvijene tehnikom laso regresije prikazane su u Tabeli 34. Vrednosti RMSE za trening skup podataka kreću se u opsegu od 0.45 za oslobađanje posle 5 minuta do 10.09 za procenat oslobođene supstance nakon 15 minuta i, uopšteno gledano, su više od vrednosti RMSE za isti skup podataka modela razvijenih tehnikom multiple linearne regresije. Vrednosti RMSE za test skup podataka se kreću od 0.66 za oslobađanje posle 5 minuta do 14.36 za oslobađanje nakon 15 minuta. Vrednosti RMSE za test skup podataka za sve tačke profila oslobađanja osim oslobađanja posle 15 minuta se mogu smatrati niskima jer su manje od 5. Predviđeni i eksperimentalno dobijeni rezultati za trening i test skup primera su prikazani u Tabeli 35. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je provideo model za test skup podataka prikazan je na slici 41.



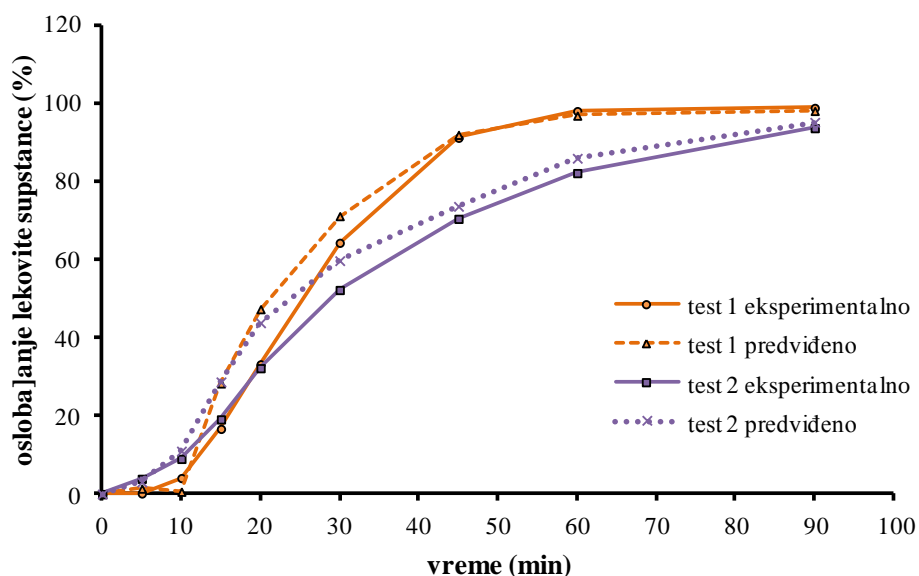
Slika 41. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom laso regresije

Figure 41. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by lasso regression model

Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 56.9 za formulaciju test 1 i 60.2 za formulaciju test 2. Izračunati faktori sličnosti f_2 veći od 50 za obe test formulacije te se zaključuje da je ova tehnika pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta.

5.2.3.4 Modelovanje oslobađanja tehnikom grebenaste regresije

Izračunate vrednosti RMSE za trening i test skup podataka za modele razvijene tehnikom grebenaste regresije prikazane su u Tabeli 36. Vrednosti RMSE za trening skup podataka kreću se u opsegu od 0.61 za oslobađanje posle 5 minuta do 8.59 za procenat oslobođene supstance nakon 20 minuta, uopšteno gledano, su više od vrednosti RMSE za isti skup podataka modela razvijenih tehnikom multiple linearne regresije. Vrednosti RMSE za test skup podataka prate trend vrednosti za trening set tako da je najniža izračunata vrednost RMSE za test podatke 1.03 za oslobađanje posle 5 minuta do 12.88 za oslobađanje nakon 20 minuta. RMSE za procenat oslobođene supstance nakon 15 minuta je isto prilično visoka, što je bio slučaj sa svim do sada prikazanim tehnikama, i iznosi 10.68. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom grebenaste regresije za trening i test skup podataka prikazani su u Tabeli 37. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je prodivideo model za test skup podataka prikazan je na slici 42.



Slika 42. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom grebenaste regresije

Figure 42. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results – vs. results predicted by ridge regression model

Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 54.4 za formulaciju test 1 i 59.9 za formulaciju test 2. Izračunati su faktori sličnosti f_2 veći od 50 za obe test formulacije te se zaključuje da je ova tehnika pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastropozistentnih peleta.

Tabela 36. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom grebenaste regresije

Table 36. RMSE values for models developed by ridge regression technique

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE	4.20	0.61	3.37	8.37	8.59	6.75	5.78	6.22	5.65
trening									
RMSE test	1.18	1.03	2.83	10.68	12.88	7.17	2.34	2.79	1.23

Tabela 37. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom grebenaste regresije za trening i test* skup podataka

Table 37. Experimentally obtained and values predicted by ridge regression model for training and test* set of data

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno
0.2	1.5	0.2	0.9	6.5	7.5	28.1	32.1	50.3	52.3	77.1	75.3	93.8	91.7	99.0	96.4	100.4	98.0
0.1	1.5	0.4	1.4	5.4	7.9	23.1	30.8	42.8	49.3	66.0	69.8	87.0	86.7	96.9	94.0	100.2	97.3
0.9	1.5	2.4	1.8	9.4	8.6	34.1	33.4	55.9	53.8	77.5	75.3	92.8	91.1	98.6	96.3	100.6	98.0
0.1	1.5	1.6	1.5	12.4	10.7	37.9	32.5	60.0	53.5	82.3	77.0	95.5	92.9	99.4	97.3	100.0	98.3
0.2	1.5	2.3	2.2	5.5	11.5	35.8	38.8	60.4	56.8	77.1	73.8	87.0	86.0	92.7	91.9	97.5	96.4
0.1	1.5	1.3	1.9	22.0	19.5	50.7	41.1	65.4	57.4	76.7	73.4	85.2	85.5	90.4	91.5	95.0	96.2
0.2	1.5	0.9	1.1	2.5	5.8	13.9	30.3	31.9	48.3	66.1	71.9	95.4	92.8	101.4	97.1	102.1	98.0
0.3	1.5	1.9	2.0	26.5	21.8	55.0	43.6	68.6	60.1	78.8	75.7	86.7	86.9	91.5	92.1	96.3	96.3
0.4	1.5	3.8	2.6	23.2	22.2	51.8	45.6	69.5	62.6	82.2	77.8	90.8	88.3	94.9	92.6	98.0	96.2
0.3	1.5	2.1	2.6	16.7	20.0	45.7	45.1	65.4	61.9	80.0	76.8	89.9	87.1	94.6	91.8	97.6	95.9
3.0	1.5	3.2	2.6	25.7	20.5	57.1	45.2	72.4	61.9	83.5	76.6	90.8	86.8	94.2	91.6	96.2	95.8
0.3	1.5	2.2	2.0	23.2	19.9	43.5	37.0	56.1	51.2	69.7	65.9	82.5	78.4	91.2	87.6	97.3	95.0
0.1	1.5	1.7	2.1	24.0	19.6	44.6	37.1	56.7	51.4	70.7	66.3	83.0	78.9	92.3	87.9	99.4	95.1
18.1	1.5	1.7	2.1	12.2	18.1	24.6	39.1	34.5	53.6	46.5	67.1	57.5	77.7	64.9	86.9	73.7	94.6
0.9	1.5	4.3	3.2	9.9	10.6	20.0	29.2	32.1	44.4	49.6	60.7	66.2	74.9	77.9	86.5	89.8	95.3
0.0	1.5	2.8	2.3	10.4	10.0	27.3	29.3	44.5	45.8	64.3	63.9	80.0	79.1	89.0	88.8	96.2	95.9
0.1	1.5	2.1	2.5	9.3	10.7	27.1	30.1	44.4	46.6	63.8	64.6	80.3	79.8	90.6	89.1	98.0	96.0
0.2	1.5	0.2	1.4	4.1	0.6	16.7	28.3	33.2	47.3	64.3	71.1	91.1	91.9	98.0	96.8	98.8	98.0
0.4	1.5	3.9	3.1	9.0	11.0	19.1	28.7	32.2	43.8	52.2	59.7	70.4	73.6	82.1	85.9	93.6	95.1

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; *Test data are presented in bold print

Tabela 38. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom elastičnih mreža

Table 38. RMSE values for models developed by elastic net

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE	4.21	0.43	5.30	5.91	6.07	5.84	4.00	3.90	6.09
trening									
RMSE test	1.18	0.72	3.64	3.62	6.40	5.58	2.41	2.21	2.31

Tabela 39. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom elastičnih mreža za trening i test* skup podataka

Table 39. Experimentally obtained and values predicted by elastic net model for training and test* set of data

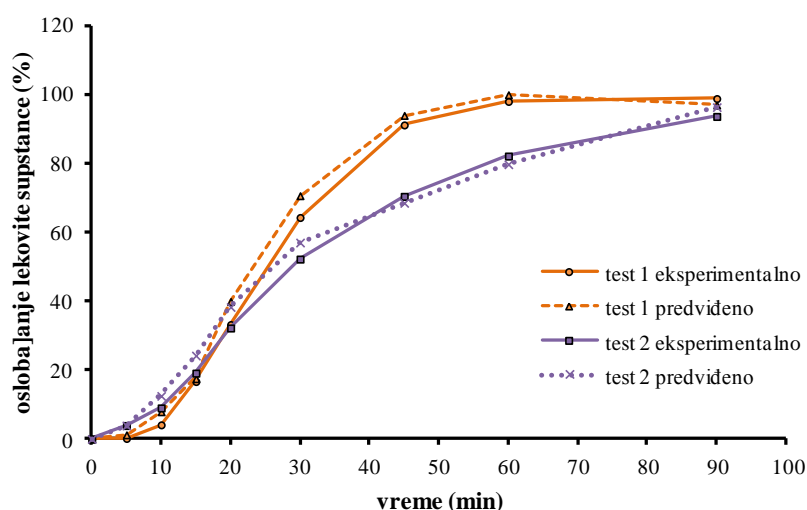
GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno
0.2	1.5	0.2	0.6	6.5	10.2	28.1	29.6	50.3	51.8	77.1	76.0	93.8	93.2	99.0	98.5	100.4	96.9
0.1	1.5	0.4	1.0	5.4	10.4	23.1	28.0	42.8	47.5	66.0	69.2	87.0	87.3	96.9	96.2	100.2	96.9
0.9	1.5	2.4	2.0	9.4	9.6	34.1	33.5	55.9	54.5	77.5	75.1	92.8	91.6	98.6	97.6	100.6	96.9
0.1	1.5	1.6	1.6	12.4	9.9	37.9	33.1	60.0	54.6	82.3	77.7	95.5	93.9	99.4	98.3	100.0	96.9
0.2	1.5	2.3	2.0	5.5	14.2	35.8	39.9	60.4	59.1	77.1	74.4	87.0	87.0	92.7	92.8	97.5	96.3
0.1	1.5	1.3	1.8	22.0	17.1	50.7	44.7	65.4	60.0	76.7	74.2	85.2	86.1	90.4	92.1	95.0	96.3
0.2	1.5	0.9	0.9	2.5	10.2	13.9	22.1	31.9	40.5	66.1	70.8	95.4	94.5	101.4	100.4	102.1	96.9
0.3	1.5	1.9	1.8	26.5	17.6	55.0	47.7	68.6	63.2	78.8	76.8	86.7	86.4	91.5	91.2	96.3	96.3
0.4	1.5	3.8	2.9	23.2	18.6	51.8	50.5	69.5	67.7	82.2	80.1	90.8	91.0	94.9	95.3	98.0	96.3
0.3	1.5	2.1	2.8	16.7	18.5	45.7	47.7	65.4	64.7	80.0	77.8	89.9	87.8	94.6	92.0	97.6	96.3
3.0	1.5	3.2	2.8	25.7	18.6	57.1	47.7	72.4	64.7	83.5	77.7	90.8	87.5	94.2	91.8	96.2	96.3
0.3	1.5	2.2	2.0	23.2	17.6	43.5	38.3	56.1	51.0	69.7	64.9	82.5	78.1	91.2	87.2	97.3	95.8
0.1	1.5	1.7	2.0	24.0	17.6	44.6	38.3	56.7	51.1	70.7	65.0	83.0	78.7	92.3	87.7	99.4	95.8
18.1	1.5	1.7	2.0	12.2	17.6	24.6	38.3	34.5	51.1	46.5	65.0	57.5	71.5	64.9	78.6	73.7	95.8
0.9	1.5	4.3	3.9	9.9	12.5	20.0	24.4	32.1	38.5	49.6	57.3	66.2	70.3	77.9	81.5	89.8	96.3
0.0	1.5	2.8	2.3	10.4	12.2	27.3	28.1	44.5	45.2	64.3	64.9	80.0	79.2	89.0	88.5	96.2	96.3
0.1	1.5	2.1	2.3	9.3	12.4	27.1	28.5	44.4	45.5	63.8	64.9	80.3	80.2	90.6	89.9	98.0	96.3
0.2	1.5	0.2	1.2	4.1	7.9	16.7	17.5	33.2	39.9	64.3	70.6	91.1	93.9	98.0	99.9	98.8	96.9
0.4	1.5	3.9	3.9	9.0	12.5	19.1	24.2	32.2	38.3	52.2	57.0	70.4	68.5	82.1	79.7	93.6	96.3

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; Test data are given in bold print

5.2.3.5 Modelovanje oslobađanja tehnikom elastičnih mreža

Izračunate vrednosti RMSE za trening i test skup podataka za modele razvijene tehnikom elastičnih mreža prikazane su u Tabeli 38. Vrednosti RMSE za trening skup podataka kreću se u opsegu od 0.43 za oslobađanje posle 5 minuta do 6.07 za procenat oslobođene supstance nakon 20 minuta i, uopšteno gledano, su niže od vrednosti RMSE za isti skup podataka modela razvijenih tehnikom multiple linearne regresije. Vrednosti RMSE za test skup podataka prate trend vrednosti za trening set tako da je najniža izračunata vrednost RMSE za test podatke 0.72 za oslobađanje posle 5 minuta do 6.40 za oslobađanje nakon 20 minuta iz kojih vidimo da za nju predviđanje oslobađanja dulosketina posle 15 i 20 minuta nije toliko problematično kao što je bio slučaj sa prethodno ispitanim tehnikama koje su imale vrednosti RMSE u jednoj ili obe ove tačke preko 10.

Tehnika elastičnih mreža se pokazala najboljom od svih do sada opisanih tehnika jer ima najniže vrednosti RMSE za test skup podataka. To je posledica sposobnosti ove tehnike da razvija jednostavne modele tako što smanjuje veličinu koeficijenata regresije, eliminiše nevažne faktore iz modela, a može da uradi grupnu selekciju međusobno koreliranih faktora. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom elastičnih mreža za trening i test skup podataka prikazan je u Tabeli 39. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je provideo model za test skup podataka prikazan je na Slici 43.



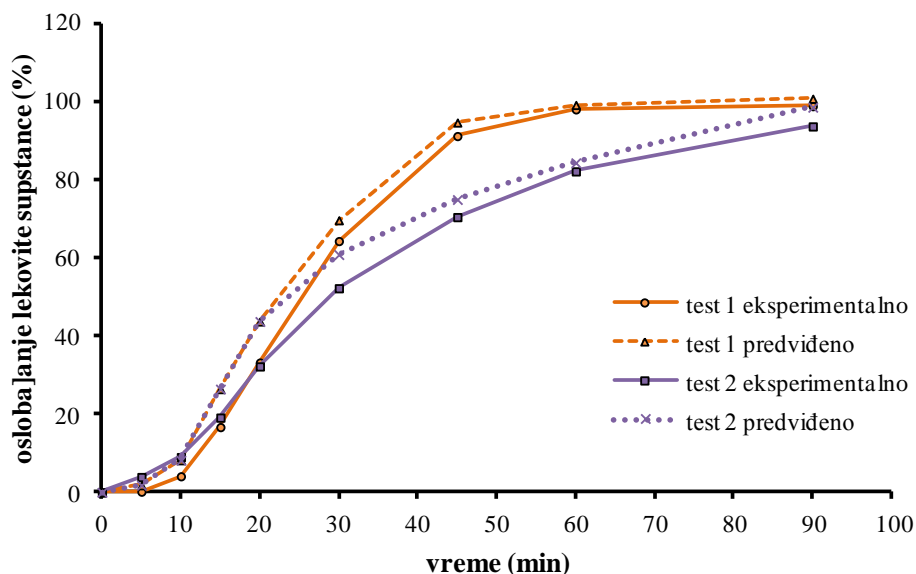
Slika 43. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom elastičnih mreža

Figure 43. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by elastic net model

Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 68.3 za formulaciju test 1 i 70.3 za formulaciju test 2 i u skladu su sa niskim izračunatim vrednostima RMSE za modele razvijene ovom tehnikom. Izračunati su faktori sličnosti f_2 veći od 50 za obe test formulacije te se zaključuje da je ova tehnika pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta.

5.2.3.6 Modelovanje oslobađanja tehnikom regresionih stabala

Izračunate vrednosti RMSE za trening i test skup podataka za modele razvijene tehnikom regresionih stabala prikazane su u Tabeli 40. Vrednosti RMSE za trening skup podataka kreću se u opsegu od 0.66 za oslobađanje posle 5 minuta do 8.51 za procenat oslobođene supstance nakon 15 minuta i, uopšteno gledano, su više od vrednosti RMSE za isti skup podataka modela razvijenih tehnikom multiple linearne regresije. Vrednosti RMSE za test skup podataka kreću se u opsegu od 0.25 za gastrozistenciju do 11.01 za procenat oslobođenog duloksetina posle 20 minuta. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom regresionih stabala za trening i test skup podataka prikazan je u Tabeli 41. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je predvideo model za test skup podataka prikazan je na Slici 44.



Slika 44. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom regresionih stabala

Figure 44. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by regression trees model

Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 58.9 za formulaciju test 1 i 59.9 za formulaciju test 2. Izračunati su faktori sličnosti f_2 veći od 50 za obe test formulacije te se zaključuje da je ova tehnika pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta.

Tabela 40. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom regresionih stabala

Table 40. RMSE values for models developed by regression trees

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE	3.29	0.66	5.25	8.51	6.85	6.18	6.04	6.03	4.70
trening									
RMSE test	0.25	1.88	2.97	8.63	11.01	7.13	4.01	1.75	3.74

Tabela 41. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom regresionih stabala za trening i test* skup podataka

Table 41. Experimentally obtained and values predicted by regression trees model for training and test* set of data

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno
0.2	0.2	0.2	0.3	6.5	8.2	28.1	26.4	50.3	43.7	77.1	79.8	93.8	88.9	99.0	99.1	100.4	100.7
0.1	0.2	0.4	0.3	5.4	8.2	23.1	26.4	42.8	43.7	66.0	69.6	87.0	88.9	96.9	99.1	100.2	100.7
0.9	0.9	2.4	1.8	9.4	8.2	34.1	26.4	55.9	60.4	77.5	79.8	92.8	94.6	98.6	99.1	100.6	100.7
0.1	0.1	1.6	1.8	12.4	8.2	37.9	26.4	60.0	60.4	82.3	79.8	95.5	94.6	99.4	99.1	100.0	100.7
0.2	0.2	2.3	1.8	5.5	19.9	35.8	45.4	60.4	60.4	77.1	79.8	87.0	88.9	92.7	93.1	97.5	97.2
0.1	0.2	1.3	1.8	22.0	19.9	50.7	45.4	65.4	60.4	76.7	69.6	85.2	88.9	90.4	93.1	95.0	97.2
0.2	0.2	0.9	1.8	2.5	8.2	13.9	26.4	31.9	43.7	66.1	69.6	95.4	94.6	101.4	99.1	102.1	100.7
0.3	0.3	1.9	1.8	26.5	19.9	55.0	45.4	68.6	69.0	78.8	79.8	86.7	88.9	91.5	93.1	96.3	97.2
0.4	0.3	3.8	3.0	23.2	19.9	51.8	45.4	69.5	69.0	82.2	79.8	90.8	88.9	94.9	93.1	98.0	97.2
0.3	7.1	2.1	3.0	16.7	19.9	45.7	45.4	65.4	69.0	80.0	79.8	89.9	88.9	94.6	93.1	97.6	89.2
3.0	7.1	3.2	3.0	25.7	19.9	57.1	45.4	72.4	69.0	83.5	79.8	90.8	88.9	94.2	93.1	96.2	89.2
0.3	0.2	2.2	3.0	23.2	19.9	43.5	45.4	56.1	43.7	69.7	60.8	82.5	74.9	91.2	84.3	97.3	97.2
0.1	0.2	1.7	1.8	24.0	19.9	44.6	45.4	56.7	43.7	70.7	60.8	83.0	74.9	92.3	84.3	99.4	97.2
18.1	7.1	1.7	1.8	12.2	19.9	24.6	45.4	34.5	43.7	46.5	60.8	57.5	74.9	64.9	84.3	73.7	89.2
0.9	0.9	4.3	3.0	9.9	8.2	20.0	26.4	32.1	43.7	49.6	60.8	66.2	74.9	77.9	84.3	89.8	89.8
0.0	0.1	2.8	1.8	10.4	8.2	27.3	26.4	44.5	43.7	64.3	60.8	80.0	74.9	89.0	84.3	96.2	97.2
0.1	0.1	2.1	3.0	9.3	8.2	27.1	26.4	44.4	43.7	63.8	60.8	80.3	74.9	90.6	84.3	98.0	97.2
0.2	0.2	0.2	1.8	4.1	8.2	16.7	26.4	33.2	43.7	64.3	69.6	91.1	94.6	98.0	99.1	98.8	100.7
0.4	0.1	3.9	1.8	9.0	8.2	19.1	26.4	32.2	43.7	52.2	60.8	70.4	74.9	82.1	84.3	93.6	98.5

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; Test data are given in bold print

Tabela 42. RMSE vrednosti za modele dobijene tehnikom ansambla regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting"

Table 42. RMSE values for models developed by an ensemble of regression trees obtained by "boosting"

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
RMSE	4.67×10^{-5}	8.75×10^{-6}	4.57×10^{-5}	0.00031	0.00011	0.00041	0.00024	0.00022	0.00018
trening									
RMSE test	0.08	1.17	4.54	8.06	5.29	3.56	2.95	3.26	3.02

Tabela 43. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom ansambla regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting" za trening i test* skup podataka

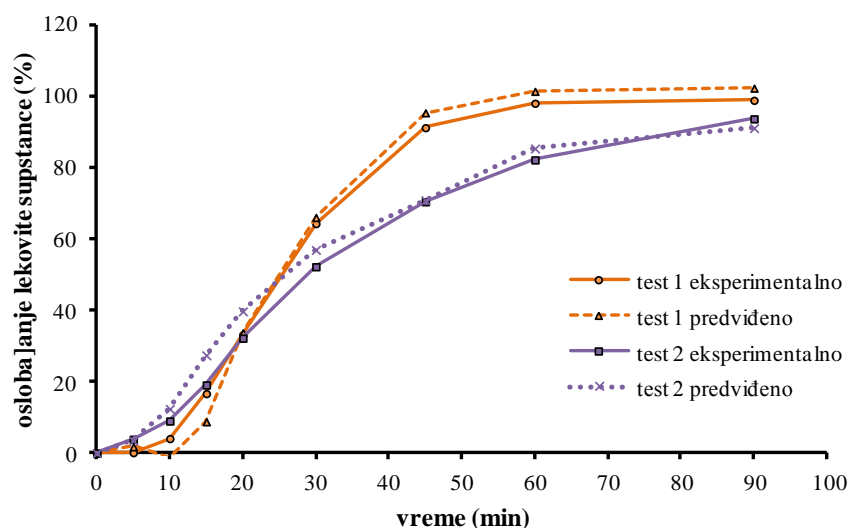
Table 43. Experimentally obtained and values predicted by an ensemble of regression trees model for training and test set* of data

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno	Eksp.	Predvideno
0.2	0.2	0.2	0.2	6.5	6.5	28.1	28.1	50.3	50.3	77.1	77.1	93.8	93.8	99.0	99.0	100.4	100.4
0.1	0.1	0.4	0.4	5.4	5.4	23.1	23.1	42.8	42.8	66.0	66.0	87.0	87.0	96.9	96.9	100.2	100.2
0.9	0.9	2.4	2.4	9.4	9.4	34.1	34.1	55.9	55.9	77.5	77.5	92.8	92.8	98.6	98.6	100.6	100.6
0.1	0.1	1.6	1.6	12.4	12.4	37.9	37.9	60.0	60.0	82.3	82.3	95.5	95.5	99.4	99.4	100.0	100.0
0.2	0.2	2.3	2.3	5.5	5.5	35.8	35.8	60.4	60.4	77.1	77.1	87.0	87.0	92.7	92.7	97.5	97.5
0.1	0.1	1.3	1.3	22.0	22.0	50.7	50.7	65.4	65.4	76.7	76.7	85.2	85.2	90.4	90.4	95.0	95.0
0.2	0.2	0.9	0.9	2.5	2.5	13.9	13.9	31.9	31.9	66.1	66.1	95.4	95.4	101.4	101.4	102.1	102.1
0.3	0.3	1.9	1.9	26.5	26.5	55.0	55.0	68.6	68.6	78.8	78.8	86.7	86.7	91.5	91.5	96.3	96.3
0.4	0.4	3.8	3.8	23.2	23.2	51.8	51.8	69.5	69.5	82.2	82.2	90.8	90.8	94.9	94.9	98.0	98.0
0.3	0.3	2.1	2.1	16.7	16.7	45.7	45.7	65.4	65.4	80.0	80.0	89.9	89.9	94.6	94.6	97.6	97.6
3.0	3.0	3.2	3.2	25.7	25.7	57.1	57.1	72.4	72.4	83.5	83.5	90.8	90.8	94.2	94.2	96.2	96.2
0.3	0.3	2.2	2.2	23.2	23.2	43.5	43.5	56.1	56.1	69.7	69.7	82.5	82.5	91.2	91.2	97.3	97.3
0.1	0.1	1.7	1.7	24.0	24.0	44.6	44.6	56.7	56.7	70.7	70.7	83.0	83.0	92.3	92.3	99.4	99.4
18.1	18.1	1.7	1.7	12.2	12.2	24.6	24.6	34.5	34.5	46.5	46.5	57.5	57.5	64.9	64.9	73.7	73.7
0.9	0.9	4.3	4.3	9.9	9.9	20.0	20.0	32.1	32.1	49.6	49.6	66.2	66.2	77.9	77.9	89.8	89.8
0.0	0.0	2.8	2.8	10.4	10.4	27.3	27.3	44.5	44.5	64.3	64.3	80.0	80.0	89.0	89.0	96.2	96.2
0.1	0.1	2.1	2.1	9.3	9.3	27.1	27.1	44.4	44.4	63.8	63.8	80.3	80.3	90.6	90.6	98.0	98.0
0.2	0.1	0.2	1.8	4.1	-1.3	16.7	8.8	33.2	33.7	64.3	66.0	91.1	95.3	98.0	101.3	98.8	102.2
0.4	0.4	3.9	3.5	9.0	12.4	19.1	27.4	32.2	39.7	52.2	56.9	70.4	70.8	82.1	85.3	93.6	91.0

*Test primeri su prikazani u tamnijoj štampi; test data are given in bold print

5.2.3.7 Modelovanje oslobađanja ansamblom regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting"

Izračunate vrednosti RMSE za trening i test skup podataka za modele razvijene ansamblom regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting" prikazane su u Tabeli 42. Vrednosti RMSE za trening skup podataka kreću su znatno niže od vrednosti RMSE za bilo koju, do sada, opisanu tehniku i kreću se u opsegu od 8.75×10^{-6} za oslobađanje posle 5 minuta do 0.00041 za procenat oslobođenog duloksetina nakon 30 minuta. Izračunate vrednosti RMSE za test skup podataka nisu tako dobre i kreću se u opsegu od 0.08 za gastrozistenciju do 8.06 za procenat oslobođenog duloksetina posle 30 minuta. To ukazuje da je model jako dobro naučio podatke za trening pa zato ne pokazuje slične rezultate na test skupu podataka. Bez obzira na to, modeli dobijeni ovom tehnikom su upotrebljivi, ali uglavnom nisu dobri kao modeli razvijeni tehnikom elastičnih mreža. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene ansamblom regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting" za trening i test skup podataka prikazan je u Tabeli 43. Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je predvideo model za test skup podataka prikazan je na Slici 45.



Slika 45. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom ansambla regresionih stabala dobijenih tehnikom "boosting"

Figure 45. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by ensemble of regression trees obtained by "boosting" technique

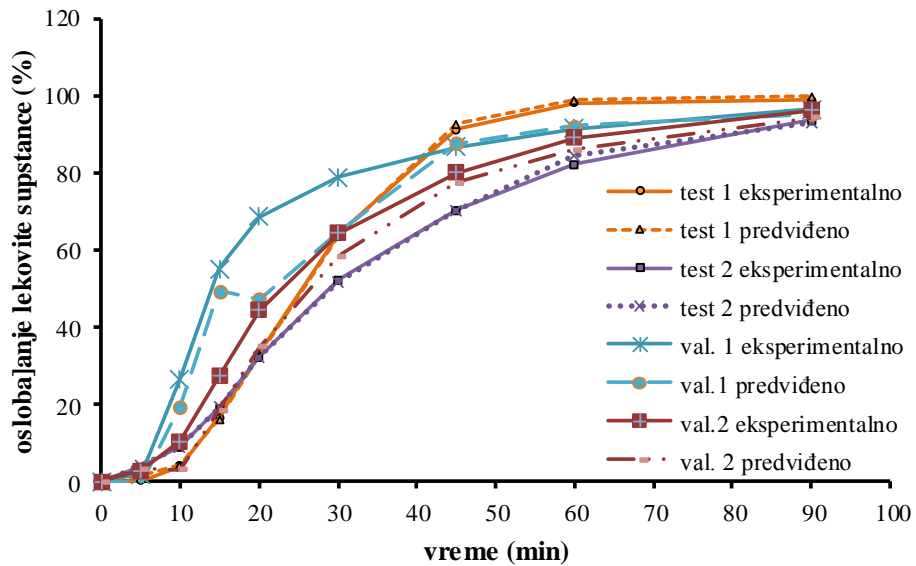
Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 68.0 za formulaciju test 1 i 66.0 za formulaciju test 2. Izračunati su faktori sličnosti f_2 veći od 50 za obe test formulacije te se zaključuje da je ova tehnika pogodna za predviđanje oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta.

5.2.3.8 Modelovanje oslobađanja gastrozistentnih peleta primenom veštačkih neuronskih mreža

Izračunate vrednosti RMSE za trening, test i validacioni skup podataka za modele razvijene veštačkim neuronskim mrežama prikazane su u Tabeli 44. Nije bilo moguće dobiti jednako dobre modele za sve ispitivane izlaze pomoću samo jedne mreže (rezultati nisu prikazani) tako da je za modelovanje svakog izlaza korišćena posebna mreža čiji su rezultati prikazani. To može da bude posledica složenosti i dinamičnosti ispitivanog sistema. Rastvaranje duloksetina iz peleta je dinamički proces, na koji različiti faktori utiču u različitim tačkama profila oslobađanja tako da se najmanje greške predviđanja postižu kada se koristi posebna neuronska mreža za svaki ispitani izlaz .

Vrednosti RMSE za trening skup podataka nalaze se u opsegu od 0.17 za oslobađanje posle 5 minuta do 6.41 za procenat oslobođenog duloksetina nakon 60 minuta. Izračunate vrednosti RMSE za test skup podataka nalaze se u opsegu od 0.15 za oslobađanje posle 20 minuta do 1.86 za oslobađanje nakon 60 minuta. Izračunate vrednosti za validacioni skup podataka nalaze se u opsegu od 1.00 za oslobađanje nakon 5 minuta do 16.59 za oslobađanje duloksetina nakon 20 minuta testa ispitivanja brzine rastvaranja. Eksperimentalno dobijene i vrednosti predviđene tehnikom veštačkih neuronskih mreža za trening, test i validacioni skup podataka prikazan je u Tabeli 45.

Uporedni prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja koje je predvideo model za test i validacioni skup podataka prikazan je na Slici 46. Izračunati faktori sličnosti f_2 za test formulacije 1 i 2 iznose: 94.6 za formulaciju test 1 i 93.1 za formulaciju test 2. Međutim izračunati faktori sličnosti za skup podataka za validaciju nisu tako dobri i iznose 47.6 i 60.3 za primere za validaciju 1 i 2.



Slika 46. Usporedni profili oslobađanja test i validacionih formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim tehnikom veštačkih neuronskih mreža
 Figure 46. Comparative release profiles of test and validation formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by artificial neural networks model

Tabela 44. Neuronske mreže koje su dale najbolje rezultate za pojedinačne odgovore i pripadajuće vrednosti RMSE

Table 44. Neural network that had the best results for single responses and their belonging RMSE

Odgovor	GR	5. min	10.min	15.min	20. min	30. min	45. min	60. min	90. min
Oznaka mreže	MLP 27-9-1	MLP 27-12-2	MLP 27-5-2	MLP 27-17-1	MLP 27-17-1	MLP 27-17-1	MLP 27-17-1	MLP 27-12-1	MLP 27-13-1
Aktivaciona funkcija	Tangencijalna	Linearna	Logistička	Linearna	Linearna	Linearna	Linearna	Eksponecijalna	Tangencijalna
skriveni sloj	–								
Aktivaciona funkcija	Eksponecijalna	Linearna	Tangencijalna	Eksponecijalna	Eksponecijalna	Eksponecijalna	Eksponecijalna	Tangencijalna	Tangencijalna
izlazni sloj	–								
RMSE trening	0.31	0.17	3.34	1.38	0.36	2.93	5.18	6.41	5.34
RMSE test	0.28	0.54	1.20	0.42	0.15	0.65	0.94	1.86	0.72
RMSE valid.	1.90	1.00	4.98	7.40	16.59	10.70	1.98	2.28	1.61

Tabela 45. Eksperimentalno dobijene i predviđene vrednosti za trening, test* i validacioni** skup podataka za neuronske mreže sa najboljim rezultatima za pojedinačne odgovore

Table 45. Experimentally obtained and predicted values for training, test and validation set of data for models developed by artificial neural network

GR (%)		5. minut (%)		10 minut (%)		15. minut (%)		20. minut (%)		30 minut (%)		45. minut (%)		60. minut (%)		90. minut (%)	
Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno	Eksp.	Predviđeno
0.1	0.2	0.4	0.5	6.5	6.4	28.1	29.5	50.3	50.5	77.1	76.7	93.8	92.8	99.0	100.0	100.4	100.0
0.1	0.7	1.6	1.6	5.4	5.1	23.1	23.1	42.8	42.8	66.0	61.8	87.0	84.0	96.9	97.1	100.2	99.2
0.2	0.2	2.3	2.2	9.4	9.4	34.1	35.2	55.9	55.9	77.5	81.2	92.8	94.7	98.6	99.3	100.6	99.6
0.1	0.2	1.3	1.5	12.4	12.5	37.9	37.4	60.0	60.0	82.3	80.3	95.5	93.6	99.4	100.0	100.0	99.9
0.2	0.1	0.2	0.2	5.5	5.6	35.8	35.5	60.4	60.4	77.1	76.6	87.0	88.6	92.7	91.6	97.5	96.1
0.2	0.1	0.9	0.8	22.0	22.0	50.7	49.7	65.4	65.4	76.7	74.6	85.2	86.2	90.4	90.8	95.0	94.7
0.3	0.6	1.9	1.7	2.5	2.5	13.9	15.6	31.9	32.6	66.1	64.9	95.4	92.2	101.4	98.8	102.1	99.3
0.4	0.6	3.8	3.9	23.2	23.1	51.8	51.6	69.5	69.4	82.2	83.2	90.8	97.0	94.9	91.8	98.0	95.2
3.0	3.0	3.2	3.1	16.7	15.8	45.7	47.0	65.4	65.6	80.0	79.9	89.9	91.4	94.6	90.9	97.6	94.0
0.3	0.4	2.2	1.8	25.7	25.1	57.1	53.5	72.4	72.2	83.5	79.5	90.8	90.9	94.2	90.8	96.2	93.9
0.1	0.4	1.7	2.0	23.2	23.7	43.5	45.7	56.1	56.7	69.7	69.0	82.5	74.6	91.2	82.7	97.3	89.3
18.1	17.9	1.7	1.8	24.0	23.4	44.6	43.6	56.7	55.8	70.7	70.6	83.0	75.1	92.3	82.8	99.4	89.5
0.9	0.1	4.3	4.3	12.2	12.4	24.6	24.9	34.5	34.3	46.5	53.9	57.5	70.8	64.9	83.3	73.7	87.9
0.0	0.1	2.8	2.8	9.9	10.1	20.0	21.0	32.1	32.6	49.6	53.3	66.2	71.5	77.9	84.9	89.8	93.4
0.1	0.1	2.1	2.1	9.3	9.4	27.1	26.9	44.4	44.4	63.8	65.1	80.3	79.3	90.6	86.0	98.0	94.3
<i>0.9</i>	<i>0.6</i>	<i>2.4</i>	<i>1.7</i>	<i>4.1</i>	<i>4.2</i>	<i>16.7</i>	<i>16.1</i>	<i>33.2</i>	<i>33.1</i>	<i>64.3</i>	<i>63.7</i>	<i>91.1</i>	<i>92.5</i>	<i>98.0</i>	<i>98.8</i>	<i>98.8</i>	<i>99.7</i>
<i>0.4</i>	<i>0.1</i>	<i>3.9</i>	<i>4.1</i>	<i>9.0</i>	<i>8.7</i>	<i>19.1</i>	<i>19.3</i>	<i>32.2</i>	<i>32.4</i>	<i>52.2</i>	<i>51.5</i>	<i>70.4</i>	<i>70.2</i>	<i>82.1</i>	<i>84.6</i>	<i>93.6</i>	<i>93.1</i>
0.3	0.1	1.9	-0.5	26.5	19.5	55.0	49.4	68.6	47.2	78.8	64.8	86.7	87.7	91.5	92.2	96.3	95.2
0.3	3.0	2.1	3.4	10.4	3.1	27.3	18.6	44.5	35.0	64.3	58.5	80.0	77.4	89.0	85.9	96.2	94.2

*test primeri su prikazani u italic štampi **validacioni primeri su prikazani u tamnijoj štampi; test data are given in italic print; validation data are presented in bold print

Grafički prikaz izračunatih vrednosti RMSE za sve ispitane tačke i za sve ispitane izlaze prikazan je u Slici 47. Sa slike možemo da zaključimo da, gledano pojedinačno po tehnikama, elastične mreže daju najbolje rezultate sa opsegom vrednosti RMSE za test skup podataka od 0.72 do 6.40. U literaturi nema podataka o modelovanju formulacije ovom tehnikom. Ibrić i autori (2002) su modelovali oslobađanje aspirina iz tableta sa produženim delovanjem korišćenjem tehnika veštačkih neuronskih mreža, podatke su prikupili na sistematičan način primenom eksperimentalnog dizajna i dobili vrednosti RMSE za test skup podataka u opsegu od 1.85 do 5.19. Modeli razvijeni elastičnim mrežama su omogućili razvijanje modela na osnovu istorijskih podataka prikupljenih na nesistematičan način sa vrednostima RMSE sličnog reda veličina u odnosu na one koje su dobili Ibrić i autori (2002).

Poređem faktora sličnosti, f_2 , za eksperimentalno dobijene i predviđene profile oslobađanja duloksetina iz gastrozistentnih peleta vidi se da najbolje rezultate imaju takođe elastične mreže. Tabela sa prikazanim vrednostima faktora sličnosti f_2 za test eksperimentalno dobijene i predviđene formulacija iz test skupa podataka su prikazane u Tabeli 46.

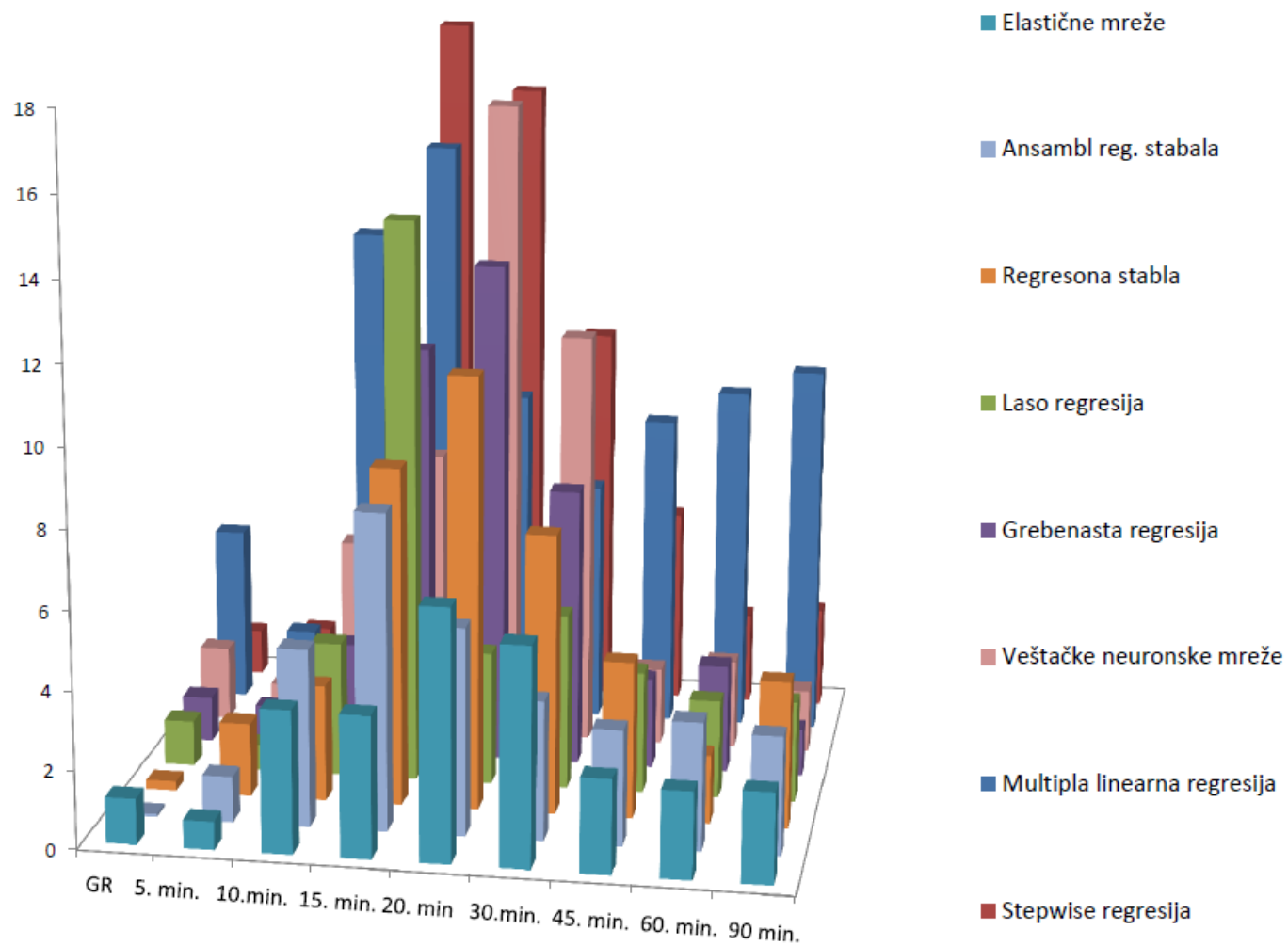
Tabela 46. Izračunate vrednosti faktora sličnosti, f_2 za test primere i za sve ispitane tehnike modelovanja

Table 46. Calculated values of similarity factors, f_2 for test data for all examined techniques

	Multipla linearna regresija	Stepwise regresija	Laso regresija	Grebenasta regresija	Elastične mreže	Regresiona stabla	Ansambl reg. stabala	VNN
Test 1	48.8	43.9	56.9	54.4	68.3	68.0	58.9	47.6
Test 2	54.6	57.1	60.2	59.9	70.3	66.0	59.9	60.3

VNN – veštačke neuronske mreže; VNN – artificial neural networks

Petrović i autori (2012) su koristili različite tipove veštačkih neuronskih mreža da bi modelovali oslobađanje diklofenaka i kofeina iz matriks tableta i poređenjem sličnosti eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila oslobađanja dobili rezultate u opsegu od 49.3 do 86.9, a podatke su prikupili na sistematičan način. Chansanroj i autori (2011) su modelovali oslobađanje iz matriks tableta primenom tehnika veštačkih neuronskih mreža i samorganizujućih mapa i za poređenjem sličnosti eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila oslobađanja model supstance dobili f_2 vrednosti u opsegu od 42.3 do 95.8.



Slika 47. Uporedni prikaz svih vrednosti RMSE za sve ispitane tehnike modelovanja; GR – gastrozestencija
 Figure 47. Overview of RMSE values for all evaluated modelling techniques; GR – gastric-resistance

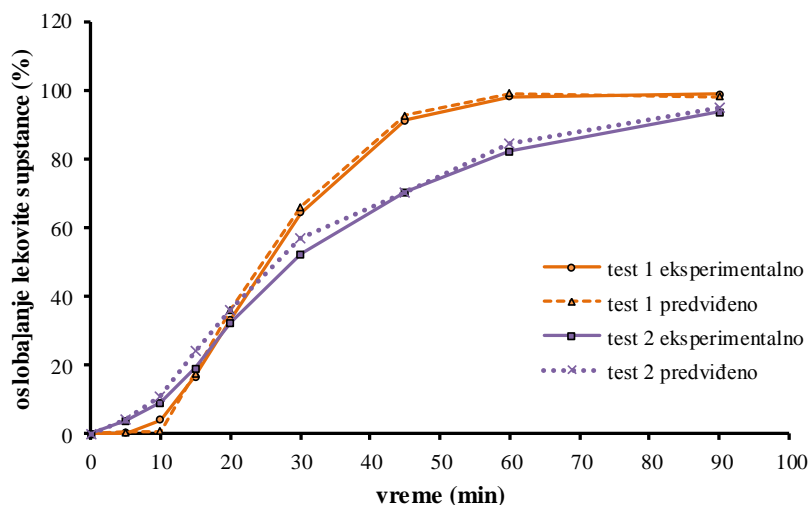
Elastične mreže, međutim, nemaju najniže vrednosti RMSE za sve izlaze koje smo pratili pa se zato najbolji rezultati predviđanja postižu kada se kombinuje više tehnika. Tehnike koje su dale najniže vrednosti izračunate RMSE za ispitane izlaze prikazane su u Tabeli 47. Za sve odgovore koji su praćeni dobijene su izračunate vrednosti RMSE za test skup podataka manje od 4.

Tabela 47. Optimalne tehnike za predviđanje oslobađanja duloksetin-hidrohlorida iz gastrorezistentnih peleta
 Table 47. Optimal techniques for predicting release of duloxetine hydrochloride from enteric-coated pellets

<i>Odgovor</i>	<i>Tehnika</i>	<i>RMSE za test skup podataka</i>
Gastrorezistencija	Ansambl regresionih stabala dobijen tehnikom "boosting"	0.08
5. minut (%)	Laso regresija	0.66
10. minut (%)	Grebenasta regresija	2.83
15. minut (%)	Elastične mreže	3.62
20. minut (%)	Laso regresija	3.42
30. minut (%)	Ansambl regresionih stabala dobijen tehnikom "boosting"	3.56
45. minut (%)	Veštačke neuronske mreže	1.98
60. minut (%)	Regresiona stabla	1.75
90. minut (%)	Grebenasta regresija	1.23

Kombinovanjem svih ovih tehnika postiže se bolja sličnost profila oslobađanja eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila. Prikaz eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja i profila oslobađanja predviđenih kombinovanjem tehnika istraživanja podataka prezentovan je na Slici 48.

Izračunate vrednosti faktora sličnosti za eksperimentalno dobijene profile oslobađanja i profile oslobađanja predviđene kombinovanjem tehnika modelovanja iz Tabele 47 iznose 82.3 za formulaciju test 1 i 74.6 za formulaciju test 2 što je bolje od rezultata koji su postignuti bilo kojom tehnikom pojedinačno.



Slika 48. Uporedni profili oslobađanja test formulacija – eksperimentalni rezultati vs. rezultati predviđeni modelom razvijenim kombinovanjem različitih tehnika

Figure 48. Comparative release profiles of test formulations – experimentally obtained results vs. results predicted by combining different techniques

Razlog tome je činjenica da je oslobađanje duloksetina iz gastrorezistentnih peleta kompleksan dinamički proces. Ponašanje sistema se menja u toku vremena pa je zato teško jednom tehnikom izvršiti predviđanja za sve vremenske tačke profila oslobađanja. Za svaku ispitanu vremensku tačku drugačiji uslovi su bili optimalni za modelovanje što je uslovljeno složenošću formulacije, odnosno prisustvom više različitih slojeva i njihove interakcije u konačnom proizvodu i u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja.

6.0 Zaključak

Prvi deo istraživanja odnosio se na ispitivanje uticaja različitih tehnika oblaganja peleta duloksetin hidrohloridom i gastrozistentnim filmom na kritične attribute kvaliteta farmaceutskog preparata:

- jačinu, odnosno sadržaj duloksetina u peletama
- gastrozistenciju
- profil brzine rastvaranja duloksetina iz peleta
- stabilnost

Tehnike oblaganja inaktivnih peleta duloksetin hidrohloridom koje su ispitane su: oblaganje praškom (suvo oblaganje), oblaganje rastvorenom aktivnom supstancom i oblaganje suspendovanom aktivnom supstancom. Tehnike nanošenja gastrozistentnog filma na pelete obložene duloksetin hidrohloridom i izolacionim slojem koje su ispitane su oblaganje praškom (suvo oblaganje) i oblaganje suspenzijom u kojoj je gastrozistentni polimer rastvoren.

- Evaluiranjem peleta obloženih slojem aktivne supstance zaključeno je sledeće:
 - Pelete proizvedene tehnikom suvog oblaganja imaju lošije parametre oblika od peleta proizvedenim ostalim tehnikama t.j. širu raspodelu veličine sa prečnikom od $1084.4 \mu\text{m} \pm 141.1 \mu\text{m}$, neravniju površinu sa hrapavošću od 0.84 ± 0.04 i lošiju sferičnost sa stepenom izduženosti od 1.17 ± 0.09 i sferičnošću projekcije od 0.77 ± 0.06 . Pelete proizvedene oblaganjem rastvorene aktivne supstance bile su okarakterisane prečnikom $1270.0 \mu\text{m} \pm 52.3 \mu\text{m}$, hrapavošću od 0.97 ± 0.01 , stepenom izduženosti od 1.09 ± 0.06 i sferičnošću projekcije od 0.90 ± 0.04 . Pelete proizvedene oblaganjem suspendovanom aktivnom supstancom su okarakterisane prečnikom od $1086.2 \mu\text{m} \pm 54.5 \mu\text{m}$, hrapavošću od 0.97 ± 0.01 , stepenom izduženosti od 1.11 ± 0.07 i sferičnošću projekcije od 0.89 ± 0.06 . Razlike u obliku peleta proizvedenih različitim tehnikama je posledica lošijeg doziranja praška prilikom suvog oblaganja u odnosu na doziranje tečnosti za oblaganje prilikom oblaganja rastvorenom i suspendovanom aktivnom supstancom.
 - Oslobođanje duloksetina u fosfatnom puferu pH 6.8 je potpuno. Na osnovu izračunatog faktora sličnosti f_2 profili oslobađanja duloksetina iz peleta obloženih tehnikom suvog oblaganja i tehnikom oblaganja suspendovanom aktivnom supstancom smatraju se sličnim ($f_2=69.8$). Izračunati faktori sličnosti između profila oslobađanja peleta obloženih suspendovanom i rastvorenom model supstancom ($f_2=34.4$) i između peleta obloženih praškom i rastvorenom

model supstancom ($f_2=32.5$) ukazuju da se ovi profili oslobađanja ne mogu smatrati sličnim. To je delimično posledica činjenice da u toku oblaganja peleta rastvorenim duloksetin hidrohloridom nastaje amorfni oblik leka što je dokazano analizama diferencijalne skenirajuće kalorimetrije u drugom delu istraživanja.

- Evaluiranjem peleta obloženih izolacionim slojem zaključeno je sledeće:

- Parametri oblika peleta obloženih suvim oblaganjem su poboljšani nakon nanošenja izolacionog sloja, ali i dalje lošiji od druge dve ispitane formulacije. Njihov prečnik je iznosio $1163.6 \mu\text{m} \pm 80.6 \mu\text{m}$, hrapavost 0.88, stepen izduženosti 1.17 ± 0.09 i sferičnost projekcije 0.79 ± 0.06 . Pelete proizvedene oblaganjem rastvorene aktivne supstance bile su okarakterisane prečnikom $1309.6 \mu\text{m} \pm 55.0 \mu\text{m}$, hrapavošću od 0.98 ± 0.01 , stepenom izduženosti od 1.09 ± 0.06 i sferičnošću projekcije od 0.91 ± 0.05 . Pelete proizvedene oblaganjem suspendovanom aktivnom supstancom su okarakterisane prečnikom od $1138.3 \pm 58.5 \mu\text{m}$, hrapavošću od 0.97 ± 0.01 , stepenom izduženosti od 1.10 ± 0.07 i sferičnošću projekcije od 0.90 ± 0.05 .

- Oslobađanje duloksetina u fosfatnom puferu pH 6.8 je potpuno. Na osnovu izračunatog faktora sličnosti f_2 , profili oslobađanja peleta obloženih suspendovanim duloksetin hidrohloridom i praškom se mogu smatrati sličnim ($f_2=55.7$), dok to nije slučaj sa peletama obloženim suspendovanim i rastvorenim duloksetin hidrohloridom ($f_2=25.5$) i rastvorenim i praškastim duloksetin hidrohloridom ($f_2=20.7$). Na osnovu izračunatog faktora sličnosti f_2 za pojedinačne formulacije nakon oblaganja aktivnom supstancom i nakon oblaganja izolacionim slojem samo se profili oslobađanja iz suvo obloženih peleta mogu smatrati sličnim ($f_2=59.6$). Izolacioni film je usporio oslobađanje duloksetina iz preostale dve formulacije pa je izračunata f_2 vrednost za pelete obložene rastvorenim duloksetin hidrohloridom iznosila 36.2, dok je za pelete obložene suspendovanim duloksetin hidrohloridom iznosila 45.2. To može biti posledica korišćenja hidroksipropil metilceluloze 3 cp u izolacionom sloju peleta obloženih praškastom aktivnom supstancom. Za druge dve formulacije korišćena je kombinacija polimera višeg viskoziteta – hidroksipropil metilceluloze 6 cp i hidroksipropil celuloze EF. Površina peleta obloženih aktivnom supstancom tehnikom suvog oblaganja je mnogo neravnija od površine peleta druge dve ispitane formulacije što joj povećava kontaktnu površinu sa medijumom za ispitivanje brzine rastvaranje te je i na taj način smanjen uticaj izolacionog filma na brzinu oslobađanja duloksetina.

- Evaluiranjem peleta obloženih gastrorezistentnim filmom zaključeno je sledeće:

- Nanošenje gastrozistentnog filma tehnikom suvog oblaganja je zbog neuniformnog nanošenja filma dovelo do povećanja standardne devijacije u prosečnoj izmerenoj vrednosti prečnika peleta koja je iznosila $1386.5 \mu\text{m} \pm 151.7 \mu\text{m}$. Došlo je do blagog poboljšanja parametara oblika stepen izduženosti (1.16 ± 0.07) i sferičnosti projekcije (0.82 ± 0.05), ali se jedino vrednost hrapavosti od 0.95 ± 0.01 približila vrednosti od 0.97 ± 0.01 koja je izmerena u probama u kojima su pelete oblagane suspenzijom za oblaganje. Prosečan prečnik peleta obloženih rastvorenim aktivnom supstancom iznosio je $1469.7 \mu\text{m} \pm 69.5 \mu\text{m}$, stepen izduženosti iznosio je 1.08 ± 0.06 , a sferičnost projekcije 0.92 ± 0.04 . Prosečan prečnik peleta obloženih suspendovanim aktivnom supstancom iznosio je $1241.9 \mu\text{m} \pm 60.9 \mu\text{m}$, stepen izduženosti iznosio je 1.09 ± 0.07 , a sferičnost projekcije 0.91 ± 0.05 .

- Permeabilnost filma nanesenog tehnikom suvog oblaganja je u kiselj fazi testa ispitivanja brzine rastvaranja veća od permeabilnosti filma nanesenog iz suspenzije tako da je za postizanje gastrozistencije od 1.97% duloksetina oslobođenog u kiselj fazi testa ovom tehnikom bio potreban nanos od 61% filma, odnosno 35% gastrozistenontog polimera. Za postizanje gastrozistencije od 0.17% za pelete obložene rastvorenim aktivnom supstancom, odnosno 0.11% za pelete obložene suspendovanim aktivnom supstancom bio je potreban 20% manji nanos gastrozistentnog filma. Oslobođanje duloksetina u fosfatnom puferu pH 6.8 je potpuno za sve tri ispitane formulacije. Proba proizvedena tehnikom suvog oblaganja koja je imala najbrži profil oslobođanja iz izolovanih peleta ima najsporiji profil oslobođanja iz gastrozistentnih peleta. Ova proba je imala najlošiju gastrozistenciju te je bilo očekivano da zbog veće permeabilnosti filma ima najbrži profil oslobođanja. Uzrok sporom profilu oslobođanja suvo obloženih peleta može biti veći nanos (debljina) gastrozistentnog filma kao i prisustvo ricinusovog ulja u formulaciji. Na osnovu izračunatih vrednosti f_2 nijedan par profila oslobođanja ne može se smatrati sličnim jer je izračunati faktor sličnosti f_2 za pelete obložene rastvorenim i suspendovanim duloksetin hidrohloridom 32.5, za pelete obložene suspendovanim i praškastom lekovitom supstancom 35.3, a 46.3 za pelete obložene model supstancom iz rastvora i tehnikom suvog oblaganja.

- Na osnovu rezultata određivanja srodnih supstanci duloksetina posle 12, 24 i 36 meseci čuvanja gastrozistentnih peleta u ambijentalnim uslovima zaključeno je sledeće:

- Izolacioni sloj efikasno sprečava kontak duloksetina i kiselog polimera jer je nivo nečistoće koja je proizvod njihove reakcije ispod granice od 0.2% koja je definisana na osnovu vodiča za nečistoće u novim lekovitim proizvodima.

- stabilnost formulacije koja je proizvedena sa rastvorenim duloksetin hidrohloridom je lošija od preostale dve ispitane formulacije jer je kod nje nakon 36 meseci zabeležen porast nečistoće 1-naftol iznad gornje granice za specificirane identifikovane nečistoće od 0.2%. Ova nečistoća je proizvod hidrolize duloksetina. Njen porast u formulaciji proizvedenoj tehnikom oblaganja rastvorenim aktivnom supstancom objašnjavaju se prisustvom amorfne forme duloksetina u formulaciji. Amorfne forme pokazuju veću hemijsku reaktivnost zbog veće pokretljivosti molekula i u većoj merni adsorbuju vodu prisutnu u formulaciji.

- Iz daljih eksperimenata je isključena tehnika suvog oblaganja peleta aktivnom supstancom i gastrozistentnim filmom jer se pokazala zahtevnijom i manje robusnom od oblaganja peleta tehnikama koje podrazumevaju korišćenje tečnosti kao vehikuluma.

Drugi deo istraživanja odnosio se na ispitivanje uticaja formulacijskih i procesnih parametara oblaganja peleta aktivnom supstancom na efikasnost procesa i koristan prinos proizvodnog procesa primenom dizajna eksperimenata.

- Primenom frakcionog faktorijalnog dizajna tipa 2^{8-4} u fazi skrininga ispitano je uticaj formulacijskih faktora (udeo i viskozitet hidroksipropil metilceluloze, prisustvo talka, rastvarač za pripremu suspenzije i koncentracija tečnosti za oblaganje) i procesnih faktora (protok ulaznog vazduha, temperatura proizvoda u toku prskanja i protok suspenzije za oblaganje).

- Na osnovu rezultata eksperimenata u fazi skrininga procenjena je značajnost ispitanih parametara te su iz daljih istraživanja isključeni svi procesni faktori formulacijski faktori: viskozitet hidroksipropil metilceluloze, prisustvo talka i rastvarač za pripremu suspenzije, što je pojednostavilo dalji razvoj proizvoda.

- Rezultati faze skrininga su neočekivano pokazali da najveći negativan uticaj na koristan prinos proizvodnog procesa ima prisustvo smeše vode i izopropanola u formulaciji, odnosno da najlošiji koristan prinos imaju probe izvedene sa rastvorenim duloksetinom. DSC analize slobodnih filmova pripremljenih sa hidroksipropil metilcelulozom i suspendovanim i rastvorenim duloksetinom su pokazale da u toku oblaganja peleta rastvorenim duloksetinom nastaje amorfni duloksetin čija je T_g bliska temperaturama proizvoda u toku procesa

proizvodnje te da je to uzrok izražene aglomeracije. Usled izostanka mešanja amornog duloksetina i hidroksipropil metilceluloze na molekularnom nivou u sistemu postoje dve faze. Povidon K-30 se sa amornim duloksetinom meša na molekulskom nivou tako da nastaje jednofazni sistem.

- Primenom centralnog kompozitnog dizajna i metodologije površine odgovora izvršena je optimizacija formulacije sloja peleta sa aktivnom supstancom. Razvijeni su značajni modeli (p -vrednost <0.05) sa $R^2>0.90$.

- Koncentracija suvih supstanci je faktor sa najvećim efektom na efikasnost proizvodnog procesa. Manji, ali značajan efekat na efikasnost procesa imali su i kvadratni efekat koncentracije suvih supstanci, udeo hidroksipropil metilceluloze i njen kvadratni efekat. Udeo hidroksipropil metilceluloze u formulaciji i njen kvadratni efekat imali su najveći efekat na koristan prinos. Koncentracija suvih supstanci u suspenziji za oblaganje je imala najveći efekat na viskozitet suspenzije za oblaganje i vreme trajanja procesa oblaganja.

- Korišćenjem modela razvijenih metodologijom površine odgovora i funkcije poželjnosti u softveru za obradu eksperimentalnih podataka definisani su optimalan udeo hidroksipropil metilceluloze i koncentracije suvih supstanci koji su potrebni za postizanje maksimalne efikasnosti i korisnog prinosa proizvodnog procesa uz korišćenje što manje količine vezivnog sredstva i za što kraće vreme. Numerička optimizacija je dala opseg rešenja koja zadovoljavaju unapred postavljene kriterijume za efikasnost procesa, koristan prinos, trajanje procesa proizvodnje i udeo hidroksipropil metilceluloze u formulaciji. Kretanjem u okviru tog opsega obezbeđen je efikasan procesa proizvodnje peleta obloženih aktivnom supstancom sa sadržajem duloksetina u okviru specificiranih granica.

Treći deo istraživanja se odnosio na ispitivanje mogućnosti primene različitih soft computing tehnika veštačke inteligencije u optimizaciji formulacije gastrozistentnih peleta u cilju razvijanja modela koji mogu da se koriste za predviđanje kritičnih atributa kvaliteta: gastrozistencije i profila brzine rastvaranja lekovite supstance na osnovu formulacijskih karakteristika.

- Sledeće tehnike su ispitane: multipla linearna regresija, stepwise regresija, laso regresija, grebenasta regresija, elastične mreže, regresiona stabla, ansambl regresionih stabala dobijen tehnikom "boosting" i veštačke neuronske mreže. Za razvijanje modela korišćeni su istorijski podaci prikupljeni u 19 nesistematično izvedenih laboratorijskih proba po principu proba -

greška. Ispitano je 6 kvalitativnih i 10 kvantitativnih ulaznih promenljivih. Tehnike modelovanja su procenjivane na osnovu izračunatih vrednosti RMSE za gastrozistenciju i svih 8 tačaka profila oslobađanja duloksetima i računanjem faktora sličnosti između eksperimentalno dobijenih profila oslobađanja duloksetina i profila oslobađanja koje je predvideo model.

- Elastične mreže su tehnika koja je imala najbolje faktore sličnosti između eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila oslobađanja duloksetina za test formulacije (68.3 za formulaciju test 1 i 70.3 za formulaciju test 2). Ova tehnika nije imala najmanje vrednosti RMSE za sve ispitane tačke profila oslobađanja tako da je zaključeno da bi se najbolja sličnost između eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila oslobađanja duloksetina dobila kada bi se iskombinovale tehnike koje su imale najmanje greške predviđanja. Na ovaj način se sličnost eksperimentalno dobijenih i predviđenih profila poveća što potvrđuju i izračunati faktori sličnosti od 82.3 za formulaciju test 1 i 74.6 za formulaciju test 2. Oslobađanje duloksetina iz gastrozistentnih peleta je kompleksan dinamički proces. Ponašanje sistema se menja u toku vremena te je teško jednom tehnikom izvršiti predviđanja za sve vremenske tačke profila oslobađanja. Za svaku ispitanu vremensku tačku profila oslobađanja duloksetina drugačiji su bili optimalni uslovi za modelovanje što je uslovljeno složenošću formulacije, odnosno prisustvom više različitih slojeva u peletama i njihovom interakcijom u konačnom proizvodu i u medijumu za ispitivanje brzine rastvaranja.

Primenom dva različita koncepta za postizanje višeg stepena znanja o farmaceutskom proizvodu, alatki dizajna kvaliteta i tehnika veštačke inteligencije, razvijeni su modeli koji mogu da se koriste u svim fazama životnog ciklusa preparata kao i u razvoju drugih preparata.

7.0 Literatura

- Ahlneck, C., Zografi, G., 1990. The molecular basis of moisture effects on the physical and chemical stability of drugs in the solid state. *International Journal of Pharmaceutics*, 62:87-95.
- Aleksić, I., Đuriš, J., Cvijić, S., Ibrić, S., Parojčić, J., 2015. Granulacija topljenjem – alternativni postupak u izradi čvrstih farmaceutskih oblika. *Arh.farm.* 65:159-177.
- Aulton ME, Twitchell AM. 2002. Solution properties and atomization in film coating. In Cole G, editor. *Pharmaceutical Coating Technology*. London:Taylor & Frances. p 64-117.
- Baird, J.A., Taylor, L.S., 2012. Evaluation of amorphous solid dispersions properties using thermal analysis techniques. *Adv Drug Deliv Rev* 64:396-421.
- Bodmeier, R.; Paeratakul, O. Suspensions and dispersible dosage forms of multiparticulates. In *Multiparticulate oral drug delivery*. Ghebre-Sellasie, I. Ed.; Marcel Dekker, Inc. USA: New York, 1994; 143-155.
- Cao, Q., Liu, Y., Xu, W., Lee, B., Lee, B., Yang, M., Cui, J., 2012. Enhanced oral bioavailability of novel mucoadhesive pellets containing valsartan prepared by a dry powder-coating technique. *Int. J. Pharm.* 434, 325 – 333.
- Chansanroj, K., Petrovic, J., Ibrić, S., Betz, G., 2011. Drug release control and system understanding of sucrose esters matrix tablets by artificial neural networks. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44, 321–331.
- Chhalotiya, U.K., Bhatt, K.K., Shah, D.A., Baldania, S.L., 2010. Development and Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for Duloxetine Hydrochloride in its Bulk and Tablet Dosage Form. *Sci Pharm.* 78: 857–868.
- Christensen, F.N., Bertelsen, P., 1997. Qualitative description of Wurster-based fluid-bed coating process. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(5), 451-463.
- Clemex PSA 6.0 User guide.
- European Pharmacopeia, 7.5. Council of Europe, EDQM, 2010.
- Cymbalta Summary of product characteristics, Eli Lilly, 2011. <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-2314-10-001.pdf>, pristupljeno februara 2016.
- Dalbelo Bašić, B., Čupić, M., Šnajder, J. Umjetne neuronske mreže. Fakultet elektrotehnike i računarstva, Zagreb, Hrvatska, 2008.
- Dereymaker, A., Van Den Mooter, G., 2015. The peculiar behaviour of the glass transition temperature of amorphous drug-polymer films coated on inert sugar spheres. *J Pharm Sci* 104:1759– 1766.
- Duloxetine 20 mg, Duloxetine 40 mg MHRA Assessment report. <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/par/documents/websiteresources/con562611.pdf>. Pristupljeno februara 2016.
- EMEA. CHMP Assessment report Pradaxa-EMA/CHMP/203468/2011. 2011.
- EMEA. Guideline on quality of oral modified release products. 2014.
- EMEA. Guideline on the investigation of bioequivalence. 2010.
- Fayyad, U., Piatetsky-Shapiro, G., Smyth, P., 1996. From data mining to knowledge discovery in databases. *Artificial Intelligence Magazine*, 17 (3) 37-54.
- FDA Guidance for industry “Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms” US Department of Health and Human Services, CDER, 1997.

- Felton, L.A., O'Donnel, P.B., McGinity, J.W. Mechanical properties of polymeric films prepared from aqueous dispersions. In *Aqueous Polymeric Coatings*, 3rd edition. McGinity, J.W., Felton, L.A. Eds.; Informa Healthcare, 2008; 105-123.
- Felton, L., 2013. Mechanisms of polymeric film formation. *International Journal of Pharmaceutics* 457, 423– 427.
- Gerhardt, A.H., 2009. Moisture effects on solid dosage forms – formulation, processing and stability. *Journal of GXP compliance* 13:1, 58-66.
- Ghebre-Sellassie, I.; Knoch, A. Pelletization techniques. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Volume 1; Swarbrick, J., Ed.; Informa Healthcare USA: New York, 2007; 2651–2663.
- Glatt. Fluid-bed systems. <http://www.glatt.com> pristupljeno aprila 2016.
- Hancock, B.C., Zografi, G., 1997. Characteristics and significance of amorphous state in pharmaceutical systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (1), 1-12.
- Hao, H., Su, W., Barrett, M., Caron, V., Healy, A., and Glennon, B., 2010. Calibration-Free Application of Raman Spectroscopy to the Monitoring of Mannitol Crystallization and Its Polymorphic Transformation. *Organic Process Research & Development*, 14, 1209–1214.
- Harris MR, Ghebre-Sellassie I. 2008. Aqueous polymeric coating for modified release solid dosage forms. In McGinity JW, Felton LA, editors. *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, 3rd ed., New York:Informa Healthcare. p 47–66.
- Hastie, T., Tibshirani, R., Friedman, J. *The Elements of Statistical Learning*, 2nd edition, Springer, New York, SAD, 2008.
- He, W.; Yang, M.; Fan, J.H.; Feng, C.X.; Zhang, S.J.; Wang, J.X.; Guan, P.P.; Wul, W., 2010. Influences of sodium carbonate on physicochemical properties of lansoprazole in designed multiple coating pellets, *AAPS PharmSciTech* 11(3) 1287-1293.
- Heng, P.W.S; Wong, T.W. Melt processes for oral solid dosage forms. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Volume 1; Swarbrick, J., Ed.; Informa Healthcare USA: New York, 2007; 2257–2261.
- Hogan, J.E. Modified release coatings. In *Pharmaceutical Coating Technology*. Cole, G., Ed.; Taylor & Francis UK: London, 1995; 409-437.
- Ibrić, S. *Primena matematičke teorije eksperimenata u farmaceutskoj tehnologiji*. Konstisi doo, Beograd, Srbija. 2006.
- Ibrić, S., Jovanović, M., Djurić, Z., Parojčić, J., Solomun, L., 2002. The application of generalized regression neural network in the modeling and optimization of aspirin extended release tablets with Eudragit RS PO as matrix substance. *J. Control. Release* 82, 213–222.
- Ibrić, S., Jovanović, M., Đurić, Z., Parojčić, J., Solomun, Lj., Lučić, B., 2007. Generalized regression neural networks in prediction of drug stability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59, 745-750.
- ICH Topic Q8(R2). *Guidance for Industry: Pharmaceutical Development*. 2009.
- ICH Topic Q9. *Guidance for Industry: Quality Risk Management*. 2005.
- ICH Topic Q10. *Guidance for Industry: Pharmaceutical Quality System*. 2008
- ICH Harmonised Tripartite Guideline "Impurities in new drug products" Q3B(R2). International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, June 2006.
- IMA. <http://www.ima-pharma.com/>, pristupljeno januara 2016.
- Ilić, V. Neuronske mreže <http://solair.eunet.rs/~ilicv/neuro.html>, pristupljeno januara 2016.

- Ini, S.; Shmueli, Y.; Koltai, T.; Gold, A.; 2006. Duloxetine.HCl Polymorphs. Publication Number: US 2006/0270859 A1. Publication Date: 30.11.2006.
- James, G., Witten, D., Hastie, T., Tibshirani, R., Introduction to statistical learning. Springer, SAD, New York, 2013.
- Jang, J.S.R. Classification and regression trees. U: Neuro-fuzzy and soft computing; Jang, J.S.R.; Sun, C.T.; Mizutani, E., Eds.; Prentice-Hall, Inc.: Upper Saddle River, 1997; 403-422.
- Jansen, P.J., Oren, P.L., Kemp, C.A., Maple, S.R., Baertschi, S.W., 1998. Characterization of impurities formed by interaction of Duloxetine HCl with enteric polymers hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate and hydroxypropyl methylcellulose phthalate. J. Pharm. Sci. 87 (1) 81-85.
- Kablitz, C.D. Dry coating – a characterization and optimization of an innovative coating technology. Ph.D. thesis, Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, 2007.
- Kablitz, C.D., Kappl, M., Urbanetz, N.A. 2008. Parameters influencing polymer particle layering of the dry coating process. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 69, 760–768.
- Kállai N, Luhn O, Dredán J, Kovács K, Lengyel M, Antal I. 2010. Evaluation of drug release from coated pellets based on isomalt, sugar and microcrystalline cellulose inert cores, AAPS Pharm Sci Tech 11 (1):383 – 91.
- Kedzierewicz, F., Lombry, C., Rios, R., Hoffman, M., Maincent, P., 1999. Effect of the formulation on the in-vitro release from propranolol from gellan gum beads. Int. J. Pharm. 178, 129-136.
- Kolatkar G, Zisman E. 2007. Duloxetine hydrochloride delayed release formulations. WIPO Patent WO 2007/139886.
- Kolter K. 2004. New instant release coating-viscosity and pigment binding capacity of Kollicoat® IR. Excipients Act. Pharma 12: 6-7.
- Lazić, Ž.R. Design of experiments in chemical engineering. A practical guide. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2004.
- Lebed, P., Potvin, S., Lariviere, D., Dai, X., 2014. Optimization of solid phase extraction chromatography for the separation of Np from U and Pu using experimental design tools in complex matrices. Anal. Methods, 6, 139.
- Lee, V. H. L.; Yang, J. J. Oral drug delivery. In Drug delivery and targeting; Hillery, A.M.; Lloyd, A.W.; Swarbrick, J., Eds.; Taylor & Francis: London, 2001; 131-167.
- Lust, A., Lakio, S., Vintsevits, J., Kozlovac, J., Veski, P., Heinämäki, J., Karin Kogermann, K., 2013. Water-mediated solid-state transformation of a polymorphic drug during aqueous-based drug-layer coating of pellets. International Journal of Pharmaceutics 456, 41– 48.
- Maimon, O., Rokach, L. Introduction to knowledge discovery and data mining. In Knowledge discovery and data mining handbook, 2nd edition. Maimon, O., Rokach, L. Eds. Springer, USA, New York, 2010; 1-13.
- Magdalena, L., 2010. What is Soft Computing? Revisiting Possible Answers. International Journal of Computational Intelligence Systems, 3:2, 148-159
- Mansa, R.F., Bridson, R.H., Greenwood, R.W., Barker, H., Seville, J.P.K., 2008. Using intelligent software to predict the effects of formulation and processing parameters on roller compaction. Powder Technology, 181, 217-225.
- Marjo CE, Bhadbhade M, Hook JM, Rich AM. 2011. Polymorphism and a metastable solvate of duloxetine hydrochloride, Mol Pharmaceutics 8:2454–2464.

- Mathworks, Matlab documentation, <http://www.mathworks.com/help/stats/stepwise-regression.html>, pristupljeno aprila 2016
- Mendyk, A., Kleinebudde, P., Thommes, M., Yoo, A., Szleka, J., Jachowicz, R., 2010. Analysis of pellets with use of artificial neural networks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 41, 421–429.
- Mihajlović, T., Ibrić, S., Mladenović, A., 2011. Application of Design of Experiments and Multilayer Perceptron Neural Network in Optimization of the Spray-Drying Process, *Drying Technology*, 29:14, 1638-1647.
- Mitra, S., Pal, S.K., Mitra, P., 2002. Data mining in soft computing framework: a survey. *IEEE Transactions on neural networks*, 13:1, 3-14.
- Myers, W.R. Response Surface Methodology. In *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*. Chow, S.C., Ed., Informa Healthcare, 2003, 858 —869.
- Miller, D.A., McGinity, J.W. Aqueous polymeric film coating. In *Pharmaceutical dosage forms: Tablets vol 1*, 3rd edition. Augsburger, L.L., Hoag, S.W., Eds. Informa Healthcare, 2008, 399-432.
- Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Genovesi, A., Vecchio, C., Menegatti, E., 2000. Influence of formulation and process parameters on pellet production by powder layering technique. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 1(2), 14 – 25
- Nguyen, C.T., Desgranges, F., Roy, G., Galanis, N., Mare, T., Boucher, S., Angue Mintsas, H., 2007. Temperature and particle size dependant viscosity data for water-based nanofluids – Hysteresis phenomenon. *Int J Heat Fluid Fl* 28:1492-1506.
- Nikowitz, K., Pintye-Hódi, K., Regdon, G. Jr., 2013. Study of recrystallization in coated pellets – Effect of coating on API crystallinity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 563 – 571.
- NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, pristupljeno januara 2016.
- Obara, S., Maruyama, N., Nishiyama, Y., Kokubo, H., 1999. Dry coating: an innovative enteric coating method using a cellulose derivative. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 47, 51–59.
- Obara S, Kokubo H. 2008. Application of HPMC and HPMCAS to aqueous film coating of pharmaceutical dosage forms. In McGinity JW, Felton LA, editors. *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*, 3rd ed., New York: Informa Healthcare. p 279–322.
- Obara, S., Kokubo, H. 2009. Aqoat. http://www.harke.com/fileadmin/images/chemicals/ShinEtsu_Aqoat.pdf, pristupljeno februara 2016.
- Pandya, P., Pandey, N.K., Singh, S.K., Kumar, M. Formulation and characterization of ternary complex of poorly soluble duloxetine hydrochloride. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 5 (06), 088-096.
- Parhi, R., Suresh, P., 2016. Formulation optimization and characterization of transdermal film of simvastatin by response surface methodology. *Materials Science and Engineering C* 58, 331–341
- Parojčić, J., Ibrić, S., Đurić, Z., Jovanović, M., Corrigan, O.I., 2007. An investigation into the usefulness of generalized regression neural network analysis in the development of level A in vitro–in vivo correlation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30, 264-272.

- Parthasardhi, R.B., Rathnakar, R.K., Reddy, R.R., Reddy, D.M., 2005. Amorphous duloxetine hydrochloride, WIPO Patent WO 2005/019199.
- Pearnchob, N., Bodmeier, R., 2003. Dry polymer powder coating and comparison with conventional liquid-based coatings for Eudragit RS, ethylcellulose and shellac. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56, 363–369.
- Petrović, J., Ibrić, S., Betz, G., Đurić, Z., 2012. Optimization of matrix tablets controlled drug release using Elman dynamic neural networks and decision trees. *International Journal of Pharmaceutics* 428, 57– 67
- Pheiff, D., Kirkland, N., Levine, S.P., Signorino, C.A., Adhesion properties in tablet coating by variation of colorants and solvent systems. <http://www.emersonresources.com/UserFiles/AdhesionProperties.pdf>, pristupljeno decembra 2015.
- Porter, S. C.; Ghebre-Sellasie, I. Key factors in the development of modified-release pellets. In *Multiparticulate oral drug delivery*. Ghebre-Sellasie, I. Ed.; Marcel Dekker, Inc. USA: New York 1994; 217–284.
- Raman FAQs, <http://www.horiba.com/scientific/products/raman-spectroscopy/raman-academy/raman-faqs/>, pristupljeno aprila 2016.
- Rinaki, E., Dokoumetzidis, A., Valsami, G., Macheras, P., 2004. Identification of biowaivers among class II drugs: theoretical justification and practical examples. *Pharm Res.* 21(9): 1567-1572
- Ronowicz, J., Thommes, M., Kleinebudde, P., Krysinski, J., 2015. A data mining approach to optimize pellets manufacturing process based on a decision tree algorithm. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 73, 44–48.
- Roos, Y., H., Nattiga Silalai, N., 2011. Glass Transitions: Opportunities and Challenges. In *Food engineering interfaces* Aguilera, J., M., Barbosa-Canovas, G., V., Simpson, R., Welti-Chanes, J., Bermudez-Aguirre, D., Eds.; Springer USA: New York; 473-490
- Sakura Tablet Case Study. National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan. 2008, <http://www.nihs.go.jp/drug/PhForum/FileCEnglish.pdf>
- Shah, N. Multi-particulate dosage form for oral controlled release: development considerations. http://mediaserver.aaps.org/meetings/09am/slides/11.8.09_sun/410/0830/navnit_shah.pdf. Pristupljeno marta 2015.
- Shravani, D., Lakshmi, P.K., Balasubramaniam, J., 2011. Preparation and optimization of various parameters of enteric coated pellets using the Taguchi L9 orthogonal array design and their characterization. *APSB* 1(1):56-63
- Sondwale, P.P., 2015. Overview of Predictive and Descriptive Data Mining Techniques. *International Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering*, 5, 263-265
- Sovany, T., Nikowitz, K., Regdon, Jr. G., Pintye-Hodi, K., 2009. Raman spectroscopic investigation of film thickness. *Polymer Testing* 28, 770–772
- Statistica help, documentation.statsoft.com/STATISTICAHelp.aspx, pristupljeno aprila 2016.
- Suhrenbrock, L., Radtke, G., Knop, K., Kleinebudde, P., 2011. Suspension pellet layering using PVA-PEG graft copolymer as a new binder. *International Journal of Pharmaceutics*, 412, 28 – 36.
- Sun, Z., Ya, N., Adams, R.C., Fang, F.S. 2010. Particle size specifications for solid oral dosage forms: a regulatory perspective. *American Pharmaceutical Review*, 13(4).

- Taday, P.F, Bradley, I.V., Arnone, D.D., Pepper, M. 2003. Using Terahertz Pulse Spectroscopy to Study the Crystalline Structure of a Drug: A Case Study of the Polymorphs of Ranitidine Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 92, 831–838.
- Taita Summary of product characteristics, 2015. <http://www.alims.gov.rs/ciril/files/lekovi/smpc/515-01-03147-14-001.pdf>, pristupljeno februara 2016.
- Tajarobi, F., Larsson, A., Matic, H., Abrahmsén-Alami, S., 2011. The influence of crystallization inhibition of HPMC and HPMCAS on model substance dissolution and release in swellable matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 78, 125–133.
- Taylor, L.S., Zografi, G.1998, The quantitative analysis of crystallinity using FT-Raman spectroscopy. *Pharmaceutical research* Vol. 15, No. 5.
- Terebesi, I., Bodmeier, R., 2010. Optimised process and formulation conditions for extended release dry polymer powder-coated pellets. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75, 63 – 70.
- Ukrainczyk, M., 2010. Planiranje pokusa u industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 5 (3-4), 96-105.
- US Department of Human Services, FDA 2004. Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance, *Pharmaceutical CGMPs*, 1- 16.
- US Department of Human Services, FDA 2007. ANDAs: Pharmaceutical Solid Polymorphism, 1- 10.
- U.S. Pharmacopeia. Duloxetine delayed release-capsules, USP 36, 2013
- Vernier Tech info library. <http://www.vernier.com/til/1014/>. Pristupljeno aprila 2016.
- Wu C, McGinity JW. 1999. Non-traditional plasticization of polymeric films. *Int J Pharm* 177:15–27.
- Young, C.J., Fegely, K.A., Rajabi-Siahboomi, A.R., 2006. Application of Powder Layering Technology and Aqueous Enteric Coating of Lansoprazole 15mg Pellets. <https://www.colorcon.com/literature> pristupljeno aprila 2016.
- Zhang, G.G.Z., Law, D., Schmitt, E.A., Qiu, Y., 2004. Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56 (3), 371– 390.
- Zhang, P.G. Neural networks for data mining. In
- Zhao, M., Barker, S.A., Belton, P.S., McGregor, C., Craig, D.Q.M., 2012. Development of fully amorphous dispersion of a low Tg drug via co-spray drying with hydrophilic polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82, 572 – 579.
- Zou, H., Hastie, T., 2005. Regularization and variable selection via the elastic net. *J. R. Statist. Soc.*, 67, Part 2, pp. 301–320. In *Knowledge discovery and data mining handbook*, 2nd edition. Maimon, O., Rokach, L. Eds. Springer, USA, New York, 2010; 419-438.

8.0 Biografija autora

Jovana Kovačević (rođeno Božić), rođena je u Vršcu 22.05.1981 gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 1999/2000. Diplomirala je 2005. sa prosečnom ocenom 8.87 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu upisala je školske 2009/2010.

Od februara 2006. je zaposlena u Hemofarmu u Vršcu, prvo kao stručni saradnik u Pogonu injekcionih proizvoda, Hemofarm proizvodnje, a od novembra 2006 radi kao saradnik u Odeljenju farmaceutskog razvoja u Službi Razvoja Hemofarma gde se najviše bavi razvojem čvrstih farmaceutskih oblika.

Jovana Kovačević (born Božić) was born in Vršac on May 22nd 1981 where she finished primary school and grammar school. She enrolled Faculty of Pharmacy in Belgrade in 1999/2000 where graduated in 2005 with an average mark of 8.87 and a mark of 10 for her diploma thesis. She started her PhD studies in the field of pharmaceutical technology at the Faculty of Pharmacy in Belgrade in 2009/2010.

Since February 2006 she has been employed in Hemofarm, Vršac, first in the position of expert associate in Injectable Products Plant in Hemofarm production, and from November 2006 on, she is working in the Pharmaceutical development department of Hemofarm Research and Development where her main area of work is development of solid pharmaceutical forms.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јована Ковачевић

број уписа 18/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Фармацеутски развој гастрорезистентних пелета применом концепта дизајна квалитета и техника вештачке интелигенције

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2016

Ј. Ковачевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Ковачевић

Број уписа 18/09

Студијски програм Фармацеутска технологија

Наслов рада Фармацеутски развој гастрорезистентних пелета применом концепта дизајна квалитета
и техника вештачке интелигенције

Ментор проф. др Светлана Ибрић

Потписани Јована Ковачевић

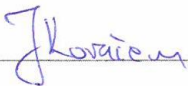
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2016.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фармацеутски развој гастрорезистентних пелета применом концепта дизајна квалитета и техника вештачке интелигенције

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 30.05.2016.

