

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Tijana M. Miletić

**KARAKTERIZACIJA I MODELOVANJE
PROCESA SUŠENJA RASPRŠIVANJEM
U RAZVOJU ČVRSTIH FARMACEUTSKIH OBLIKA
PRIMENOM
KONCEPTA DIZAJNIRANJA KVALITETA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Tijana M. Miletić

**SPRAY DRYING PROCESS
CHARACTERISATION AND MODELLING
IN THE SOLID DOSAGE FORMS DEVELOPMENT
BY APPLICATION OF
QUALITY BY DESIGN CONCEPT**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

Dr sci Svetlana Ibrić, vanredni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Dr sci Svetlana Ibrić, vanredni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Dr sci Zorica Đurić, redovni profesor, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Dr sci Vjera Pejanović, naučni savetnik, Sektor istraživanja i razvoja, Hemofarm a.d.,
Vršac

Ova doktorska disertacija je urađena u Sektoru istraživanja i razvoja Hemofarma a.d. u Vršcu i na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Aristotelovog univerziteta u Solunu.

Želim posebno da se zahvalim prof. dr Svetlani Ibrić, pod čijim rukovodstvom je izrađena ova disertacija, na nesebičnoj pomoći, ohrabrenjima i savetima koje mi je pružila.

Zahvaljujem se prof. dr Kachrimanis Kyriakos na pruženoj mogućnosti da deo eksperimentalnog rada ove disertacije obavim na Katedri za farmaceutsku tehnologiju Aristotelovog univerziteta u Solunu, kao i na nesebičnoj pomoći i savetima prilikom obrade rezultata eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se dr Vjeri Pejanović na pruženoj podršci prilikom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Zorici Đurić na pruženoj podršci prilikom izrade doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem svim kolegama iz Sektora istraživanja i razvoja Hemofarma na saradnji, pruženoj podršci i razumevanju.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na pruženoj podršci.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem svojoj porodici i mužu koji su mi pružili beskrajnu ljubav i podršku na ovom putu.

Karakterizacija i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika primenom koncepta dizajniranja kvaliteta

Rezime

Koncept dizajniranja kvaliteta predstavlja sistematski pristup farmaceutskom razvoju proizvoda koji podrazumeva procenu, unapređenje razumevanja i optimizaciju formulacije i proizvodnog procesa kombinovanom primenom prethodnog znanja, analize rizika i izvođenja eksperimenata. Tehnologija sušenja raspršivanjem našla je primenu u farmaceutskoj industriji zahvaljujući jednostavnosti i fleksibilnosti procesa, kao jednostepeni proces kojim se tečnost pretvara u prašak čije se brojne osobine mogu kontrolisati manipulacijom procesnih promenljivih. Razumevanje kako promene procesnih parametara mogu uticati na fizičko-hemijske osobine dobijenog proizvoda posebno je važno u proizvodnji čvrstih doziranih oblika koja ima za cilj obezbeđenje predviđanja i kontrole performansi. Cilj ovog istraživanja je unapređenje razumevanja sušenja raspršivanjem kroz karakterizaciju i modelovanje procesa, primenom koncepta dizajniranja kvaliteta. Istraživanje se sastoji iz dva dela sa ciljevima: razvoja procesa sušenja raspršivanjem kao tehnologije pogodne za obezbeđivanje homogenosti praškova i, posledično, ujednačenosti doziranja nisko doziranih lekovitih supstanci (model supstance naratriptan hidrohlorid); i razvoja procesa sušenja raspršivanjem u postupku proizvodnje praška sa teško rastvorljivim model supstancama, u cilju poboljšanja rastvorljivosti formiranjem kompleksa sa ciklodekstrinima (model supstance vorikonazol i aripiprazol). Istraživanje takođe obuhvata ispitivanje mogućnosti primene dva derivata beta-ciklodekstrina: 2-hidroksipropil-beta-ciklodekstrina (HPBCD) i 2-O-metil-beta-ciklodekstrina (2-O-MBCD) u razvoju formulacije rastvora za raspršivanje sa ciljem poboljšanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja odabranih model supstanci.

Tokom razvoja, u skladu sa ciljanim profilom praška kao međuproizvoda definisanom u smislu kvaliteta, identifikovani su kritični atributi kvaliteta međuproizvoda, zatim definisani kritični atributi kvaliteta ulaznih parametara (osobine materijala, procesni parametri) i određivane su njihove funkcionalne veze sa kritičnim atributima kvaliteta proizvoda. U prvom delu istraživanja ispitivani su efekti procesnih parametara sušenja raspršivanjem (temperatura ulaznog vazduha, brzina pumpe, brzina aspiratora, koncentracija rastvora) na karakteristike procesa i kompozitnog praška naratriptan/laktoza/maltodekstrin (proizvodni prinos, sadržaj vlage i srednja veličina čestica). U drugom delu istraživanja sprovedene su studije rastvorljivosti teško rastvorljivih model supstanci sa ciklodekstrinima, simulacije molekularnog vezivanja, izvršena je karakterizacija praškova dobijenih sušenjem raspršivanjem rastvora lek:ciklodekstrin. Na odabranoj formulaciji sa aripiprazolom i HPBCD, izvršena je karakterizacija i modelovanje sušenja raspršivanjem. Ispitivani su efekti procesnih parametara sušenja raspršivanjem (temperatura ulaznog vazduha, brzina pumpe, koncentracija rastvora) na karakteristike procesa i kompozitnog praška lek:ciklodekstrin (proizvodni prinos, sadržaj vlage). U karakterizaciji i modelovanju procesa primenjeni su eksperimentalni dizajn, metodologija površine odgovora (RSM) i veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona (MLP). Primena frakcionog faktorijalnog dizajna (2^{4-1}) kao skrining metode omogućila je procenu značajnosti ispitivanih parametara, na osnovu koje je iz daljeg istraživanja isključena brzina aspiratora. Primena centralnog kompozitnog dizajna (CCD), RSM i MLP omogućila je

modelovanje i karakterizaciju procesa sušenja raspršivanjem ispitivanih formulacija sa sve tri model supstance, tako što su razvijeni značajni modeli (p -vrednost <0.05). Analizom rezultata primene RSM opisane su funkcionalne veze između ulaznih parametara i praćenih odgovora. U slučaju naratriptan hidrohlorida i aripiprazola, postojala su slična zapažanja. Parametar koji je imao najveći uticaj na svaki ispitivani odgovor bila je brzina pumpe. U slučaju naratriptan hidrohlorida polinom drugog reda dobijen je samo za sadržaj vlage, i za ovaj odgovor, interakcija između temperature ulaznog vazduha i koncentracije rastvora je bila jedina statistički značajna interakcija. Analiza rezultata za formulaciju sa aripiprazolom nije pokazala postojanje statistički značajnih interakcija među faktorima, a samo kod proizvodnog prinosa su dobijeni polinomi drugog reda koji opisuju postojanje kvadratnog efekta brzine pumpe. Sa obe model supstance modelovanjem sušenja raspršivanjem primenom MLP mreže koja optimizuje odgovore istovremeno, dobijeni su modeli sa boljom korelacijom između predviđenih i zabeleženih rezultata, jer MLP poseduje bolju sposobnost modelovanja nelinearnih, složenih sistema u odnosu na RSM. Za prašak sa naratriptan hidrohloridom dobijeni su koeficijenti korelacije: za prinos $R^2_{MLP1}=0.898$, $R^2_{RSM1}=0.842$; sadržaj vlage $R^2_{MLP1}=0.642$, $R^2_{RSM1}=0.550$; srednju veličinu čestica $R^2_{MLP1}=0.779$, $R^2_{RSM1}=0.712$ i temperaturu izlaznog vazduha $R^2_{MLP1}=0.933$, $R^2_{RSM1}=0.862$. Za prašak sa aripiprazolom dobijeni su rezultati: za prinos $R^2_{MLP1}=0.854$, $R^2_{RSM1}=0.846$; sadržaj vlage $R^2_{MLP1}=0.886$, $R^2_{RSM1}=0.871$; temperaturu izlaznog vazduha $R^2_{MLP1}=0.893$, $R^2_{RSM1}=0.899$.

Ispitivanjem novih načina kombinovanja RSM i MLP prepoznat je potencijal primene MLP u dopunjavanju podataka u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM, tako da se omogući smanjenje broja praktično izvedenih eksperimenata. Za prašak sa naratriptan hidrohloridom dobijeni su koeficijenti korelacije: za prinos: $R^2_{RSM2}=0.828$; za temperaturu izlaznog vazduha $R^2_{RSM2}=0.786$. Za prašak sa aripiprazolom dobijeni su rezultati: za prinos $R^2_{RSM2a}=0.828$, $R^2_{RSM2b}=0.338$; sadržaj vlage $R^2_{RSM2a}=0.783$, $R^2_{RSM2b}=0.656$, i temperaturu izlaznog vazduha $R^2_{RSM2a}=0.856$, $R^2_{RSM2b}=0.737$. Model sa boljom sposobnošću predviđanja je bio RSM2a model, što je bila posledica boljih performansi MLP2a modela koji je korišćen za dopunjavanje grupe podataka u sklopu CCD. Naime, u slučaju praška sa aripiprazolom, u dopunjavanju dela podataka korišćene su dve veštačke neuronske mreže sa različitim kvalitetom predviđanja (MLP2a i MLP2b modeli). Dobijeni rezultati potvrdili su pretpostavku da se pomoću eksperimentalnog dizajna (DOE) mogu obezbediti podaci boljeg kvaliteta jer iz njih proizilaze modeli koji bolje opisuju sistem i vrše tačnija predviđanja. Međutim, važno je da je mreža MLP koja se koristi u ove svrhe dovoljno robusna.

Takođe je prepoznat i potencijal primene modelovanja zasnovanog na DOE u dešifrovanju "crne kutije" veštačkih neuronskih mreža (definisanje značaja i veza među faktorima). Predviđanja MLP1 modela (najbolji R^2) za sve eksperimente u okviru CCD, obrađena su primenom RSM i dobijeni su modeli RSM3. Za prašak sa naratriptan hidrohloridom dobijeni su koeficijenti korelacije: za prinos $R^2=0.994$; sadržaj vlage $R^2=0.961$; temperaturu izlaznog vazduha $R^2=0.916$. Za prašak sa aripiprazolom dobijeni su rezultati: za prinos $R^2=0.931$; sadržaj vlage $R^2=0.920$; temperaturu izlaznog vazduha $R^2=0.941$. Ovaj pristup modelovanju procesa omogućio je prikaz veza između faktora i odgovora koje su mnogo složenije nego što pokazuju modeli RSM1, što bi mogao biti razlog za bolju sposobnost predviđanja modela MLP1. Zaključeno je da se kombinovanom primenom RSM i MLP objedinjuju prednosti obe metodologije zahvaljujući čemu je poboljšano razumevanje procesa.

Primenom pristupa poželjnosti izvršena je numerička optimizacija procesnih parametara za rastvor koncentracije 25%, sa zahtevima za postizanje što većeg prinosa i što manjeg sadržaja

vlage u prašku. Korišćenjem modela RSM1 odvojeno razvijenih za svaku model supstancu, definisani su optimalni procesni parametri za prašak sa naratriptan hidrohloridom: brzina pumpe 10%, temperatura ulaznog vazduha 190°C, i za prašak sa aripiprazolom: brzina pumpe 10 %, temperatura ulaznog vazduha 180°C. Izvedeni su eksperimenti pod definisanim procesnim parametrima, i rezultati dobijeni za prinos, sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha bili su slični sa predviđenim vrednostima kod obe formulacije. Jedino je u slučaju aripiprazola za proizvodni prinos uočena nešto veća razlika između predviđenih i realno dobijenih vrednosti, što je objašnjeno većom vrednošću parametra *Lack of fit* (mera neusklađenosti).

Karakterizacija praškova dobijenih sušenjem raspršivanjem ispitivanih formulacija sa sve tri model supstance pokazala je određene sličnosti među praškovima. Proizvodi osušeni raspršivanjem čuvani tokom dužeg vremena (6-12 meseci) u blagim ambijentalnim uslovima su bili bez kristalne lekovite supstance (odsustvo karakterističnih pikova kod DSC termograma i FTIR spektara) ukazujući na relativno dobru fizičku stabilnost formulacija. Na laboratorijskom uređaju za raspršivanje prilikom sušenja rastvora u skladu sa očekivanjima, dobijen je sitan, voluminozni prašak koji se karakteriše lošom protočnošću. Međutim, u pilot i industrijskim uređajima se zbog veće komore za sušenje i mogućnosti da se ostvari dobro sušenje krupnijih kapi i dobiju krupnije sferne čestice, može očekivati da bi se dobili znatno protočniji praškovi. Vizuelizacija čestica je vršena pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Fotomikrografije pokazuju da su dobijene čestice sfernog oblika, glatke do vrlo smežurane površine, a primećeno je i prisustvo šupljih čestica. U slučaju nisko dozirane model supstance, naratriptan hidrohlorida, pokazano je da se dobija prašak vrlo ujednačenog sadržaja (RSD 0.23%).

U drugom delu istraživanja pre odabira formulacije za modelovanje procesa, sa obe teško rastvorljive model supstance sprovedeno je ispitivanje uticaja ciklodekstrina na solubilizaciju leka i karakteristike praškova dobijenih sušenjem raspršivanjem pripremljenih rastvora kompleksa lek:CD. Prema izvedenim studijama rastvorljivosti sa vorikonazolom, 2-O-MBCD derivat je bio efikasniji u kompleksaciji nego HPBCD, dok u slučaju aripiprazola kompleksacija je rezultovala sličnim povećanjem rastvorljivosti leka sa oba CD. Ovi zaključci su potvrđeni studijama sprovedenim u vidu faktorijalnog eksperimentalnog dizajna. Kapacitet solubilizacije aripiprazola zavisio je od pH i jonskog sastava rastvora pufera više nego od tipa ciklodekstrina, a maksimalna solubilizacija je postignuta u citratnom puferu pH 3.0. Analizom dobijenih kriva rastvorljivosti zaključeno je da je najverovatnija stehiometrija vezivanja lek:HPBCD 1:3 sa obe model supstance, i aripiprazolom i 2-O-MBCD, a što se tiče kompleksacije vorikonazola sa 2-O-MBCD, nije mogao biti izveden zaključak. Sprovedene simulacije molekularnog vezivanja lek:CD doprinele su razumevanju prirode kompleksacije i kako ona može uticati na rastvorljivost, brzinu rastvaranja i stabilnost leka. U slučaju obe teško rastvorljive model supstance, sušenjem raspršivanjem dobijeni su praškovi sa velikom brzinom rastvaranja (više od 80 % leka za 10 minuta). Tokom kondicioniranja kompleksa sa aripiprazolom potvrđena je dobra hemijska stabilnost aripiprazola (sve nečistoće manje od 0.05%). Međutim, u kompleksu sa oba ispitivana derivata vorikonazol nije bio dovoljno zaštićen od hemijske degradacije (Nečistoća 1: 0.24%, 0.16%; Nečistoća 2: 0.46%, 0.31% sa HPBCD, odnosno 2-O-MBCD, respektivno). Stoga je za karakterizaciju i modelovanje sušenja raspršivanjem odabrana formulacija sa aripiprazolom i HPBCD čiji se kompleks priprema u citratnom puferu pH 3.0, a zatim prevodi u prašak sušenjem raspršivanjem sa koncentracijom leka u prašku od 5%. Ispitana je i primenljivost razvijenih modela na druge formulacije sa ciklodekstrinima: aripiprazol-HPBCD-PVP-citratni pufer, aripiprazol-2-O-MBCD-citratni pufer, vorikonazol-HPBCD-voda. Poređenjem dobijenih rezultata zaključeno je da se u formulacijama sa HPBCD dobija relativno

dobro slaganje sa predviđanjima modela. Sa 2-O-MBCD dobijen je nešto manji prinos i veći sadržaj vlage, jer se 2-O-MBCD derivat suši nešto teže nego HPBCD.

Sušenje raspršivanjem pokazalo se kao tehnologija pogodna za dobijanje praškova ujednačenog sastava, i u slučaju teško rastvorljivih supstanci pogodna za dobijanje lako rastvorljivih kompleksa sa ciklodekstrinima. U formulacijama sa ciklodekstrinima, kombinovanje primenjenih metoda pomoglo je u unapređenju razumevanja prirode kompleksacije lek:CD. Primenom koncepta dizajniranja kvaliteta i prikazanih metoda za karakterizaciju formulacije i procesa, postignuto je unapređenje razumevanja procesa sušenja raspršivanjem ispitivanih formulacija. Zaključeno je da je za postizanje što boljeg proizvodnog prinosa a što manjeg sadržaja vlage u prašku, kao osnovnih parametara kvaliteta procesa i proizvoda, potrebno da se procesni parametri izbalansiraju kako bi se obezbedilo što efikasnije sušenje i separacija čestica (kapi optimalne veličine, koncentracije i viskoziteta; dovoljno toplotne energije naspram količine tečnosti koja se dovodi u sistem i koja treba da ispari). Zaključeno je da svaka od primenjenih metodologija u modelovanju sušenja raspršivanjem ima svoje prednosti i nedostatke, i kada je potrebno izvršiti karakterizaciju i uspostaviti bolje razumevanje procesa najbolje je kombinovati više metoda. Koristeći RSM, moguće je identifikovati efekte nezavisnih promenljivih i njihove interakcije. Međutim, kod sistema kod kojih postoji veći broj odgovora kao što to može biti slučaj sa sušenjem raspršivanjem, primena MLP mreže rezultuje modelom koji može da optimizuje odgovore istovremeno sa boljom korelacijom između predviđenih i zabeleženih rezultata. Demonstrirani načini kombinovanja RSM i MLP prikazali su nove potencijale u karakterizaciji i modelovanju procesa.

Ključne reči: sušenje raspršivanjem, eksperimentalni dizajn, metodologija površine odgovora, veštačke neuronske mreže, naratriptan hidrohlorid, vorikonazol, aripiprazol, ciklodekstrini.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska tehnologija

UDK broj:

Spray drying process characterisation and modelling in the solid dosage forms development by application of quality by design concept

Abstract

Quality by design concept represents systematic approach to pharmaceutical product development which consists of assessment, improvement of formulation and process understanding and optimization by combined use of previous knowledge, risk analysis and experimental work. Spray drying technology has found its use in pharmaceutical industry thanks to process simplicity and flexibility, as a single-step process in which liquid is transferred into powder with properties easily controllable by process variables manipulation. Understanding how changes in process parameters can influence the physicochemical properties of resulting product, is especially important in production of solid dosage forms where assurance of predictions and control of performance are the main goals. Main goal of this research is spray drying understanding improvement through process characterization and modelling performed by quality by design concept. The research consists of two sections with following goals: spray drying process development as technology suitable for providing homogeneous powders and subsequently, dose uniformity of low-dose drug substances (model substance naratriptan hydrochloride); and spray drying process development in production of powders with poorly soluble drug substances (model substances voriconazole and aripiprazole). The research is also dealing with examination of potential use of two beta-cyclodextrin derivatives: 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPBCD) and 2-O-methyl-beta-cyclodextrin (2-O-MBCD) for the purpose of solubility and dissolution improvement of selected model substances.

Within the development process, according to quality target product profile for powder as a intermediate product, critical product quality attributes were identified, and then critical quality attributes for input parameters (material properties, process parameters) were defined and their functional relationships with critical product quality attributes were determined. In first section of research, effects of spray drying process parameters (inlet air temperature, pump speed, aspirator, feed concentration) on process and powder characteristics (production yield, moisture content and mean particle size) were examined. In the second section of research solubility studies with poorly soluble substances and cyclodextrins were conducted, as well as molecular docking simulations, and characterisation of spray dried drug:CD powders was performed. For selected formulation with aripiprazole and HPBCD, spray drying process characterisation and modelling was performed. Effects of spray drying process parameters (inlet air temperature, pump speed, feed concentration) on process and powder characteristics (production yield and moisture content) were examined. Design of experiments, response surface methodology (RSM) and artificial neural networks multilayer perceptron (MLP) were used in process characterisation and modelling.

Fractional factorial design (2^{4-1}) applied as a screening method enabled examined parameters significance assessment, based on which parameter aspirator was excluded from further study. Use of central composite design (CCD), RSM and MLP helped in spray drying process characterisation and modelling for formulations with all three model drug substances, and significant models were developed (p -value <0.05). RSM results analysis resulted in definition of functional relationships between input parameters and monitored responses. In case of naratriptan hydrochloride and aripiprazole formulation, observations were similar. Parameter

that had the greatest influence on each investigated response was pump speed. In case of naratriptan hydrochloride second order polynome was obtained only for moisture content, for which interaction between inlet air temperature and feed concentration was the only statistically significant interaction. Result analysis for aripiprazole formulation did not show any statistically significant interaction between the parameters, and only for yield second order polynomial equation were obtained which described quadratic effect of pump speed. With both model substances, models developed by MLP which considers monitored responses simultaneously, had better predictability expressed as correlation between predicted and experimental results, because MLP has the ability to better model nonlinear, intricate systems in comparison to RSM. For powder with naratriptan hydrochloride following correlation coefficients were obtained: for yield $R^2_{MLP1}=0.898$, $R^2_{RSM1}=0.842$; moisture content $R^2_{MLP1}=0.642$, $R^2_{RSM1}=0.550$; mean particle size $R^2_{MLP1}=0.779$, $R^2_{RSM1}=0.712$ and outlet air temperature $R^2_{MLP1}=0.933$, $R^2_{RSM1}=0.862$. For powder with aripiprazole following results were obtained: for yield $R^2_{MLP1}=0.854$, $R^2_{RSM1}=0.846$; moisture content $R^2_{MLP1}=0.886$, $R^2_{RSM1}=0.871$; outlet air temperature $R^2_{MLP1}=0.893$, $R^2_{RSM1}=0.899$.

By investigation of new ways in combining RSM and MLP, for the purpose of lowering the necessary number of practically executed experiments, potential of MLP use for completion of the data set defined by a experimental design necessary for RSM application, was recognized. For powder with naratriptan hydrochloride following correlation coefficients were obtained: for yield $R^2_{RSM2}=0.828$; outlet air temperature $R^2_{RSM2}=0.786$. For powder with aripiprazole following results were obtained: for yield $R^2_{RSM2a}=0.828$, $R^2_{RSM2b}=0.338$; moisture content $R^2_{RSM2a}=0.783$, $R^2_{RSM2b}=0.656$; outlet air temperature $R^2_{RSM2a}=0.856$, $R^2_{RSM2b}=0.737$. Model with better predictability was RSM2a, which was the result of using MLP2a neural network with better performance for CCD data completion. Namely, in case of powder with aripiprazole, in data completion two neural networks were used, which had the different predictability performance (MLP2a and MLP2b models). Obtained results confirmed the assumption that by design of experiments (DOE) data of better quality can be provided because they render models which are better describing the system and result in more accurate predictions. However, it is important that the MLP use is robust enough.

Also, potential of DOE based modelling was recognized for decoding the black-box nature of neural networks predictions (determination of significance and relationships between factors). Predictions of MLP1 model (best R^2) for all the experiments within CCD, were processed by RSM and models RSM3 were developed. For powders with naratriptan hydrochloride following correlation coefficients were obtained: for yield $R^2=0.994$; moisture content $R^2=0.961$; outlet air temperature $R^2=0.916$. For powder with aripiprazole following results were obtained: for yield $R^2=0.931$; moisture content $R^2=0.920$; outlet air temperature $R^2=0.941$. This approach in process modelling enabled determination of relationships between factors and responses which are much more complicated than RSM1 models indicated, which could be the reason for better predictability of MLP1 model. It has been concluded that by combined application of RSM and MLP benefits of both methodologies are gained, therefore process understanding improvement was achieved.

By application of desirability approach numerical optimization of process parameters for 25% solutions was performed, with requirement for maximizing the yield while minimizing the moisture content in powder. By using the RSM1 models developed separately for each drug substance, optimal process parameters were defined for powder with naratriptan hydrochloride: pump speed 10% and inlet air temperature 190°C, and for powder with aripiprazole: pump

speed 10% and inlet air temperature 180°C. Experiments were executed under these process parameters and results obtained for yield, moisture content and outlet air temperature were similar to predicted values for both formulations. Only in case of aripiprazole, there was a slightly bigger difference in predicted and observed yield, which was explained by a larger value obtained for *Lack of fit*.

Spray dried powders characterisation of formulations with all three model substances revealed a certain similarities between the powders. Spray dried products stored under mild ambient conditions during prolonged time period (6-12 months), were all without the presence of crystalline drug (absence of characteristic peaks on DSC thermograms and FTIR spectra), indicating relatively good physical stability of formulations. As expected, on laboratory spray drying device, powder with small particles, and voluminous powder of poor flowability were obtained. However, on pilot and industrial scale devices, due to larger drying chamber and the ability for efficient drying of larger droplets and larger particle production, significant improvement in resulting powders can be expected. Particle visualization was performed by scanning electron microscopy. Photomicrographs are showing that particles are spherically shaped, with surface from smooth to shriveled, and presence of hollow particles was also observed. In case of naratriptan hydrochloride as a low-dose model drug substance it has been shown that powder of good content uniformity can be obtained (RSD 0.23%).

In second section of research, before the selection of formulation for process modelling was made, examination of cyclodextrin effect on drug solubilization was performed with both poorly soluble drug substances, and drug:CD spray dried powders were characterized. According to solubility study with voriconazole, 2-O-MBCD was found to be more efficient solubilizer than HPBCD, while in case of aripiprazole complexation resulted in similar solubility improvement with both CD. These conclusions were confirmed by factorial experimental design studies. Aripiprazole solubilization capacity was more pH and ionic composition dependent than it was influenced by CD type, and maximal solubilization was achieved in citrate buffer pH 3.0. By phase-solubility diagrams analysis, it was concluded that the most probable drug:HPBCD stoichiometry was 1:3 for both model substances, and aripiprazole and 2-O-MBCD, while for voriconazole and 2-O-MBCD conclusion could not be drawn. Performed molecular docking simulations drug:CD helped in better understanding the nature of complexation and how it can affect drug's solubility, dissolution and stability. In case of both model substances by spray drying, powders with high dissolution rate were obtained (more than 80% of drug after 10 minutes). During conditioning of complexes with aripiprazole good chemical stability was confirmed (all impurities less than 0.05%). However, in complexes with voriconazole and both CD, drug was not protected from degradation (Impurity 1: 0.24%, 0.16%; Impurity 2: 0.46%, 0.31% with HPBCD and 2-O-MBCD, respectively). For spray drying process characterisation and modelling, formulation with aripiprazole and HPBCD was therefore selected, with preparation in citrate buffer pH 3.0, and then solution transferring by spray drying into powder with drug concentration 5%. Applicability of resulting models was also examined for different CD formulations: aripiprazole-HPBCD-PVP-citrate buffer, aripiprazole-2-O-MBCD-citrate buffer, voriconazole-HPBCD-water. By comparison of predicted and experimental results it was concluded that with HPBCD formulations relatively good correlation with model predictions existed. With 2-O-MBCD lower yield and higher moisture content was obtained because drying of 2-O-MBCD was more difficult.

Spray drying proved to be technology suitable for obtaining the powders of uniform composition, and in case of poorly soluble substances, suitable for producing freely soluble

complexes with cyclodextrins. In formulation with cyclodextrins, combining the applied methods helped in understanding drug:CD complexation and how it can influence drug's solubility, dissolution and stability. By application of quality by design concept together with presented methods for process and formulation characterisation, improvement in product and process understanding was achieved for spray drying of examined formulations. It was concluded that in order to achieve the highest possible yield and the lowest possible moisture content in powders, process parameters need to be balanced in order to provide the efficient drying and separation of particles (droplets of optimal size, concentration and viscosity; sufficient heat supply against the amount of liquid that is pumped into system and that needs to be evaporated). It was concluded that each of applied methodologies in spray drying modelling has its own pros and cons, and when characterisation and better process understanding needs to be achieved, it is best to combine them. By using RSM, it is possible to identify effects of process independent variables and their interactions. However, in systems where larger number of responses exists as it can occur in spray drying process, application of MLP results in model that can optimize the responses simultaneously and result in better correlation between predicted and experimental results. Demonstrated ways of combining RSM and MLP showed the new potentials for process characterisation and modelling.

Keywords: spray drying, design of experiments, response surface methodology, artificial neural networks, naratriptan hydrochloride, voriconazole, aripiprazole, cyclodextrins.

Scientific field: Pharmacy

Specific scientific field: Pharmaceutical technology

UDK number:

Sadržaj

1.	UVOD I TEORETSKE OSNOVE ISTRAŽIVANJA U FARMACEUTSKOM RAZVOJU	1
1.1.	Koncept dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju	1
1.2.	Sušenje raspršivanjem	5
1.2.1.	Teorija procesa sušenja raspršivanjem	6
1.2.1.1.	Priprema medijum za raspršivanje	7
1.2.1.2.	Raspršivanje medijuma (atomizacija)	8
1.2.1.3.	Sušenje kapi ili formiranje čestica	9
1.2.1.4.	Odvajanje čestica od vazdušne struje	11
1.2.2.	Aspekti primene sušenja raspršivanjem odabrani za istraživanje	11
1.3.	Ciklodekstrini u farmaceutskoj industriji	12
1.3.1.	Derivati ciklodekstrina	16
1.3.2.	Prednosti i ograničenja upotrebe ciklodekstrina	18
1.3.3.	Simulacija molekularnog vezivanja lek:ciklodekstrin	19
1.3.3.1.	Početna podešavanja pre simulacije	19
1.3.3.2.	<i>Scoring</i> funkcija i algoritam pretraživanja	20
1.3.3.3.	Grupisanje konformacija (<i>clustering</i>)	20
1.3.3.4.	Optimizacija posle simulacije	21
1.3.3.5.	Vizuelizacija	22
1.4.	Metodologija za karakterizaciju i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem	22
1.4.1.	Modelovanje primenom eksperimentalnog dizajna	22
1.4.1.1.	Skrining pomoću frakcionog faktorijskog dizajna	25
1.4.1.2.	Karakterizacija i modelovanje primenom metodologije površine odgovora	26
1.4.2.	Modelovanje primenom veštačkih neronskih mreža	29
1.4.2.1.	Proces učenja veštačke neuronske mreže	30
1.4.2.2.	Višeslojni perceptron	32
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	34
3.	PRVI DEO ISTRAŽIVANJA	35
3.1.	Uvod	35
3.1.1.	Fizičko-hemijske karakteristike naratriptan hidrohlorida	35
3.1.2.	Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda	37
3.1.3.	Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda	37
3.1.4.	Definisanje potencijalno kritičnih atributa kvaliteta polaznih materijala i procesnih parametara	39
3.1.4.1.	Analiza rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance	39

3.1.4.2.	Odabir ekscipijenasa	41
3.1.4.3.	Analiza rizika za procesne parametre sušenja raspršivanjem	41
3.2.	Materijali i metode	42
3.2.1.	Materijali	42
3.2.2.	Priprema praškova	44
3.2.3.	Karakterizacija praškova	44
3.2.3.1	Sadržaj vlage	44
3.2.3.2.	Veličina čestica	45
3.2.3.3.	Vizuelizacija čestica praška	45
3.2.3.4.	Ujednačenost sadržaja naratriptan hidrohlorida praškova	45
3.2.3.5.	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	46
3.2.3.6.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	46
3.2.3.7.	Nasipna i tapkana gustina praškova	46
3.2.3.8.	Protočnost praškova	47
3.2.4.	Eksperimentalni dizajn: skrining ispitivanje i metodologija površine odgovora	47
3.2.4.1.	Skrining ispitivanje	47
3.2.4.2.	Metodologija površine odgovora	49
3.2.5.	Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona	50
3.2.6.	Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža i metodologije površine odgovora	51
3.2.7.	Optimizacija sušenja raspršivanjem	53
3.3.	Rezultati i diskusija	53
3.3.1.	Skrining ispitivanje	53
3.3.2.	Metodologija površine odgovora	55
3.3.3.	Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona	58
3.3.4.	Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža (MLP) i metodologije površine odgovora (RSM)	65
3.3.4.1.	Primena MLP u dopunjavanju podataka u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM	65
3.3.4.2.	Primena RSM u dobijanju matematičkih modela korišćenjem predviđanja MLP mreže u cilju boljeg razumevanja procesa	67
3.3.5.	Optimizacija sušenja raspršivanjem	68
3.3.6.	Karakterizacija dobijenih praškova	68
3.3.6.1.	Ujednačenost sadržaja naratriptan hidrohlorida	69
3.3.6.2.	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	69
3.3.6.3.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	72
3.3.6.4.	Nasipna i tapkana gustina praškova	73
3.3.6.5.	Protočnost praškova	74
4.	DRUGI DEO ISTRAŽIVANJA	75

4.1.	Uvod	75
4.1.1.	Fizičko-hemijske karakteristike vorikonazola	75
4.1.2.	Fizičko-hemijske karakteristike aripiprazola	76
4.1.3.	Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda	78
4.1.4.	Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda	79
4.1.5.	Definisanje potencijalno kritičnih atributa kvaliteta polaznih materijala i procesnih parametara	79
4.1.5.1.	Analiza rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance	79
4.1.5.2.	Odabir ekscipijenas	82
4.1.5.3.	Analiza rizika za pripremu rastvora kompleksa lek:ciklodekstrin	83
4.1.5.4.	Analiza rizika za procesne parametre sušenja raspršivanjem	84
4.2.	Materijali i metode	87
4.2.1.	Materijali	88
4.2.2.	Studije rastvorljivosti	88
4.2.2.1.	Studije fazne rastvorljivosti	88
4.2.2.2.	Primena faktorijskog dizajna	89
4.2.3.	Simulacija molekularnog vezivanja lek:ciklodekstrin	90
4.2.3.1	Dodatna semiempirijska optimizacija geometrije kompleksa vorikonazol:CD	92
4.2.4.	Priprema praškova	93
4.2.4.1.	Praškovi dobijeni sušenjem raspršivanjem	93
4.2.4.2.	Praškovi dobijeni drugim metodama pripreme	94
4.2.5.	Karakterizacija praškova	95
4.2.5.1.	Određivanje sadržaja vode	95
4.2.5.2.	Sadržaj vlage	95
4.2.5.3.	Termogravimetrijska analiza	95
4.2.5.4.	Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)	96
4.2.5.5.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	96
4.2.5.6.	Ispitivanje brzine rastvaranja	96
4.2.5.7.	Određivanje nečistoća vorikonazola	97
4.2.6.	Modelovanje, karakterizacija i optimizacija sušenja raspršivanjem za odabranu formulaciju sa aripiprazolom	98
4.2.6.1.	Eksperimentalni dizajn i metodologija površine odgovora	98
4.2.6.2.	Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona	100
4.2.6.3.	Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža i metodologije površine odgovora	100
4.2.6.4.	Optimizacija sušenja raspršivanjem	103
4.2.6.5.	Primenljivost dobijenih modela na različite formulacije	103
4.2.6.6.	Dodatna karakterizacija dobijenih praškova nakon optimizacije	103
4.2.6.6.1.	Vizuelizacija čestica praška	103
4.2.6.6.2.	Nasipna i tapkana gustina praškova	104
4.2.6.6.3.	Protočnost praškova	104

4.2.6.6.4.	Kondicioniranje odabranih uzoraka sa aripiprazolom u komorama za studije stabilnosti	104
4.3.	Rezultati i diskusija	106
4.3.1.	Studije rastvorljivosti sa vorikonazolom	106
4.3.1.1.	Određivanje sadržaja vode u ciklodekstrinima	106
4.3.1.2.	Studije fazne rastvorljivosti	107
4.3.1.3.	Primena faktorijalnog dizajna	109
4.3.2	Simulacija molekularnog vezivanja vorikonazol:ciklodekstrin	110
4.3.3.	Karakterizacija praškova sa vorikonazolom	112
4.3.3.1.	Termalna analiza	112
4.3.3.2.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	114
4.3.3.3.	Ispitivanje brzine rastvaranja	115
4.3.3.4.	Dugoročna stabilnost kompleksa vorikonazol:ciklodekstrin	117
4.3.4.	Studije rastvorljivosti sa aripiprazolom	119
4.3.4.1.	Studije fazne rastvorljivosti	119
4.3.4.1.1.	Uticaj pH i jonskog sastava medijuma, i dodatka polivinilpirolidona (PVP) na kompleksaciju sa HPBCD	119
4.3.4.1.2.	Analiza dijagrama fazne rastvorljivosti sa HPBCD	122
4.3.4.1.3.	Uticaj tipa ciklodekstrina na rastvorljivost – dijagrami fazne rastvorljivosti	124
4.3.4.1.4.	Uticaj tipa ciklodekstrina na rastvorljivost – primena faktorijalnog dizajna	124
4.3.5.	Simulacija molekularnog vezivanja aripiprazol:ciklodekstrin	126
4.3.6.	Karakterizacija praškova sa aripiprazolom	127
4.3.6.1.	Termalna analiza	127
4.3.6.2.	Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)	129
4.3.6.3.	Ispitivanje brzine rastvaranja	130
4.3.7.	Modelovanje, karakterizacija i optimizacija sušenja raspršivanjem za odabranu formulaciju sa aripiprazolom	133
4.3.7.1.	Eksperimentalni dizajn i metodologija površine odgovora	133
4.3.7.2.	Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona	136
4.3.7.3.	Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža (MLP) i metodologije površine odgovora (RSM)	138
4.3.7.3.1.	Primena MLP u dopunjavanju podataka u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM	138
4.3.7.3.2.	Primena RSM u dobijanju matematičkih modela korišćenjem predviđanja MLP mreže u cilju boljeg razumevanja procesa	142
4.3.7.3.3.	Kratak rezime primenjenih pristupa u modelovanju i tip informacija koje pružaju	143
4.3.7.4.	Optimizacija sušenja raspršivanjem	144
4.3.7.5.	Primenljivost dobijenih modela na različite formulacije	146

4.3.7.6.	Dodatna karakterizacija dobijenih praškova	146
4.3.7.6.1.	Vizuelizacija čestica praška	146
4.3.7.6.2.	Nasipna i tapkana gustina praškova	148
4.3.7.6.3.	Protočnost praškova merenjem protoka kroz otvor	148
4.3.7.6.4.	Ispitivanje stabilnosti kompleksa aripiprazol:ciklodekstrin	149
5.	ZAKLJUČAK	152
6.	LITERATURA	163
7.	BIOGRAFIJA AUTORA	172

1. UVOD I TEORETSKE OSNOVE ISTRAŽIVANJA U FARMACEUTSKOM RAZVOJU

1.1. Koncept dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju

U poređenju sa konvencionalnim pristupom razvoju farmaceutskog proizvoda, noviji **pristup razvoju primenom koncepta dizajniranja kvaliteta** (*quality by design* (engl.) pristup, QbD), razmatran u smernicama FDA i ICH Q8 (R2), Q9 i Q10, ima tu prednost da olakšava kontinuirano poboljšanje i uvođenje inovacija tokom celokupnog životnog ciklusa proizvoda. U pitanju je sistematski pristup razvoju proizvoda koji podrazumeva procenu, unapređenje razumevanja i optimizaciju formulacije i proizvodnog procesa kombinovanom primenom prethodnog znanja, analize rizika i izvođenja eksperimenata. Tokom farmaceutskog razvoja, u skladu sa ciljanim profilom proizvoda definisanim u smislu kvaliteta, identifikuju se kritični atributi kvaliteta proizvoda, zatim se definišu kritični atributi kvaliteta ulaznih parametara (osobine materijala, procesni parametri) i određuju se njihove funkcionalne veze sa kritičnim atributima kvaliteta proizvoda. Ovakav pristup razvoju može da unapredi postizanje željenog kvaliteta proizvoda, tako što obezbeđuje postavljanje odgovarajuće strategije kontrole (definisanje prostora za dizajn (*design space*, engl.) i obezbeđivanje izvođenja proizvodnje unutar njegovih granica). Alatke koje omogućavaju implementaciju koncepta dizajniranja kvaliteta jesu eksperimentalni dizajn, analiza rizika i procesna analitička tehnologija (engl. *Process Analytical Technology*, PAT) (FDA guidance, 2004; ICH Q8(R2), 2009; ICH Q9, 2005; ICH Q10, 2007; Woodcock, 2004).

Ciljni profil kvaliteta (CPK) proizvoda opisuje se karakteristikama koje utiču na performanse, kliničku bezbednost i efikasnost proizvoda kao što su put primene, dozirani oblik, doza, atributi koji utiču na farmakokinetičke karakteristike, stabilnost itd.

Kritični atributi kvaliteta (KAK) proizvoda se na osnovu CPK identifikuju tako da se karakteristike proizvoda koje utiču na performanse proizvoda mogu pratiti, analizirati i kontrolisati. Za čvrste oralne dozirane oblike to su obično aspekti koji utiču na čistoću

proizvoda, jačinu, oslobađanje leka i stabilnost. Lista potencijalnih KAK može se modifikovati kada su odabrani formulacija i proizvodni proces, i kako znanje o proizvodu i razumevanje procesa rastu.

Kritični atributi ulaznih parametara (atributi materijala, procesni parametri) definišu se u skladu sa potencijalom za uticaj na KAK proizvoda, koji se procenjuje primenom analize rizika obično rano u procesu razvoja i može se ponavljati kako sve više informacija postaje dostupno i kako se znanje povećava. Najpre se procenjuju KAK lekovite supstance, zatim se vrši odabir ekscipijenasa i proizvodne tehnologije i procena kritičnosti njihovih atributa i parametara na kvalitet proizvoda. Identifikacija kritičnih atributa ulaznih parametara i njihovih poželjnih opsega na osnovu ustanovljenih funkcionalnih veza sa KAK proizvoda omogućava definisanje prostora za dizajn.

Prostor za dizajn se sastoji od multidimenzionalne kombinacije i interakcija ulaznih promenljivih (atributi materijala, procesni parametri), i operacije u okviru tog prostora treba da obezbede proizvod željenog kvaliteta.

Analiza rizika se bazira na prethodnom znanju i inicijalnim eksperimentalnim podacima i lista sa potencijalnim parametrima na početku može biti opširna, ali se vremenom modifikuje kroz dalje izvođenje eksperimenata i analizu rezultata koja omogućava definisanje značajnosti pojedinih promenljivih i potencijalnih interakcija (kombinacija eksperimentalnog dizajna, matematičkih modela i drugih studija koje obezbeđuju mehanističko razumevanje).

Metode analize rizika koje se najčešće koriste u početnim fazama razvoja proizvoda su PHA analiza (engl. *Preliminary Hazard Assesment* – PHA, preliminarna analiza opasnosti) i FMEA analiza (engl. *Failure Mode Effects Analysis* – FMEA, analiza modaliteta ispada i efekata) (ICHQ9, 2005; Rausand, 2005; *Sakura tablet case study*, 2008; *RMWG-07 case study*, 2008).

PHA analiza se sastoji od identifikacije mogućnosti dešavanja rizičnog događaja, kvalitativne evaluacije ozbiljnosti uticaja i relativnog rangiranja opasnosti kombinovanjem težine (ozbiljnosti) i verovatnoće događaja, i identifikacije mogućih korisnih mera. Definicije težine (ozbiljnosti) i verovatnoće rizika su prikazani u Tabelama 1.1-1 i 1.1-2. Može se koristiti pri prioritizaciji opasnosti, u dizajnu proizvoda ili procesa. Najčešće se koristi rano u razvoju projekta kada postoji malo informacija o

detaljima dizajna ili operacijama, tako da često prethodi studijama gde se identifikovane opasnosti procenjuju dalje drugim metodama.

Tabela 1.1-1. Definicija težine rizika

Težina	Ocena	Definicija
Manja	1	Nema uticaja na karakteristike kvaliteta
Veća	2	Odstupanje od specifikacije na osnovu stepena uticaja rizika
Kritična	3	Zaustavljanje proizvodne linije na osnovu stepena uticaja rizika
Katastrofalna	4	Povlačenje proizvoda na osnovu stepena uticaja rizika

Tabela 1.1-2. Definicija verovatnoće rizika

Verovatnoća	Ocena	Definicija
Veoma neverovatno	1	Oko 1 u 100 godina ili manje
Daleko	2	Oko 1 u 10 godina
Povremeno	3	Oko 1 godišnje
Verovatno	4	Oko 1 mesečno
Često	5	Ne manje od 1 mesečno uzimajući u obzir proizvodnju od oko 100 serija godišnje

Rizik se ocenjuje prema težini posledica i verovatnoći javljanja i klasifikuje kao visoko rizičan (H), srednje-rizičan (M) i nisko-rizičan (L) (Tabela 1.1-3).

Tabela 1.1-3. Matrica rizika

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

FMEA analiza obezbeđuje evaluaciju potencijalnih modaliteta ispada u procesima i verovatnog efekta na ishod i/ili performanse proizvoda. Kada se modaliteti ispada utvrde, smanjenje rizika se može koristiti da eliminiše, ograniči, smanji ili kontroliše moguće ispaste. FMEA metodično deli analizu složenih procesa na korake koji se mogu kontrolisati i moćna je alatka za sumiranje važnih modaliteta ispada, faktora koji uzrokuju ove ispaste, i verovatne efekte ispada. Koristi se za prioritizaciju rizika i praćenje efektivnosti aktivnosti kontrole rizika. Može se primeniti u analizi proizvodnih operacija i njihovog efekta na proizvod i proces. Identifikuje elemente/operacije u sistemu koje ga čine ranjivim. Rezultati analize mogu se koristiti kao osnova za dizajn ili dalju analizu ili iskorišćenje resursa. Rizik se procenjuje na osnovu tri kriterijuma: težine, verovatnoće javljanja i detektabilnosti (vremena detekcije) (Tabele 1.1-4-6).

Tabela 1.1-4. Kategorija težine

Kategorija težine	Ocena	Napomena
Odstupanje	1	U slučaju koji značajno utiče na kvalitet, rangiranje iznosi 3 ili 4
Prošao ponovni test	2	-----
Pod-serija ili odbačena serija	3	-----
Zaustaviti tok proizvodnje	4	Utiče na stabilno snabdevanje lekom
Povlačenje	5	-----

Tabela 1.1-5. Kategorija verovatnoće

Kategorija verovatnoće	Ocena	Napomena
≤ 10000	1	Ne više od jednom na 10000 serija
1/1000	2	Ne više od jednom na 1000 serija i ne manje od jednom na 10000 serija
1/100	3	Ne više od jednom na 100 serija i ne manje od jednom na 1000 serija
1/10	4	Ne više od jednom na 10 serija i ne manje od jednom na 100 serija
$> 1/10$	5	Ne manje od jednom na 10 serija

Tabela 1.1-6. Kategorija detektabilnosti

Kategorija detektabilnosti	Ocena	Napomena
Pre svake pojedinačne operacije	1	-----
Tokom pojedinačne operacije	2	-----
Tokom serije pojedinačnih operacija	3	-----
Testiranje finalnog proizvoda	4	-----
Utvrđeno od strane korisnika	5	-----

Broj prioritarnog rizika je vrednost koja se dobija množenjem težine, verovatnoće i vremena detekcije: kada je taj broj < 20 postoji nizak rizik; kada je ≥ 20 i < 40 postoji srednji rizik; kada je vrednost ≥ 40 postoji visok rizik. U slučaju visokog ili srednjeg rizika cilj je uspostaviti kontrolu do nivoa niskog rizika, primenom odgovarajuće kontrolne strategije koja proizilazi iz dizajna lekovitog proizvoda. Smanjivanje rizika po kvalitet proizvoda zasniva se na razumevanju izvora varijabilnosti i uspostavljanju odgovarajuće kontrolne strategije u sklopu koje se vrši kontrola atributa materijala, procesnih parametara, in-procesno testiranje ili testiranje u realnom vremenu tokom proizvodnje, definiše specifikacija proizvoda i sl.

1.2. Sušenje raspršivanjem

Tehnologija sušenja raspršivanjem u farmaceutskoj industriji zastupljena je skoro 50 godina, međutim potreba za radom na novim razvojnim programima ne prestaje jer je potrebno odražavati korak sa novim zahtevima za kvalitet, efikasnost i bezbednost farmaceutskih proizvoda, imajući u vidu odgovornosti prema bezbednosti i zaštiti životne sredine, kao i ekonomske elemente. O tome koliko je ova tehnologija aktuelna svedoči i činjenica da se koristi u pogonu oko 20,000 industrijskih postrojenja širom sveta, i verovatno postoji dvostruko više lokacija dostupnih za testiranje proizvoda na laboratorijskoj i pilot opremi. U fokusu razvoja i obezbeđenja napretka ove tehnologije trenutno su sledeći izazovi: usaglašenost sa zahtevima tržišta za specifikacije praškova, smanjenje formiranja neželjenih naslaga proizvoda na opremi, smanjenje troškova proizvodnje po jedinici težine osušenog proizvoda, usaglašenost sa sve strožim zahtevima za bezbednost i zaštitu životne sredine. Posebno se izdvaja važnost bliske saradnje praktično usmerenih akademskih istraživanja i industrije, na polju poboljšanja razumevanja osnova sušenja raspršivanjem i razvoja tzv. *computer-friendly* (engl.) matematičkih modela koji će bolje predstavljati proces i omogućiti uspešno ostvarenje projekata (Masters, 2004). U farmaceutskoj industriji koja je dugo bila usmerena na šaržni tip proizvodnje, u poslednje vreme povećava se interes za sušenje raspršivanjem kao kontinuiranim procesom koji odgovara zahtevima direktiva koje su izdvojene u okviru PAT Inicijative (FDA guidance, 2004).

Tehnologija sušenja raspršivanjem je našla primenu u farmaceutskoj industriji zahvaljujući jednostavnosti i fleksibilnosti procesa. U pitanju je jednostepeni proces kojim se tečnost pretvara u prašak čije se brojne osobine mogu kontrolisati (oblik i veličina čestica, poroznost, nasipna gustina, protočnost, sadržaj vlage, stabilnost, oblik čvrstog stanja itd.), izborom odgovarajuće opreme i manipulacijom procesnih promenljivih, tako da se smanji broj procesnih koraka do finalnog proizvoda. U poređenju sa drugim konvencionalnim procesima granulacije, ovaj proces se smatra relativno robusnim i jednostavnim za *scale-up* (engl.). Sušenje raspršivanjem nudi nekoliko prednosti i kada treba promeniti osobine čvrstog stanja lekovitih supstanci, jer je moguće povećati rastvorljivost i brzinu rastvaranja teško rastvorljivih materijala, kao i ostvariti značajno poboljšanje stabilnosti amorfne oblika. Sposobnost brzog dobijanja pojedinačnih čestica obezbeđuje uslove za inženjering čestica pogodan za proizvodnju praškova za inhalacionu primenu, mikrokapsula, čestica sa kontrolisanim oslobađanjem, nanočestica, liposoma (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008; Celik i Wendel, 2005). Razumevanje kako promene procesnih parametara mogu uticati na fizičko-hemijske osobine dobijenog proizvoda posebno je važno u proizvodnji čvrstih doziranih oblika koja ima za cilj obezbeđenje predviđanja i kontrole performansi.

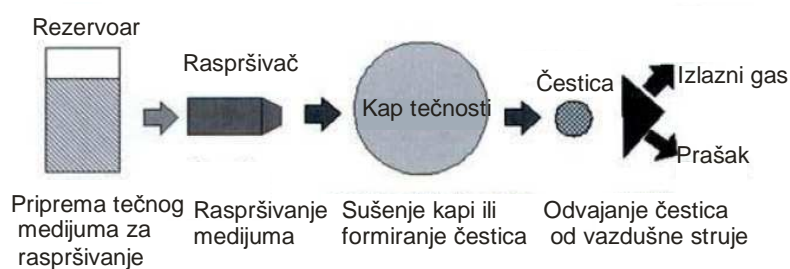
1.2.1. Teorija procesa sušenja raspršivanjem

Proces sušenja raspršivanjem je konceptualno jednostavan: tečnost (rastvor, suspenzija, emulzija) se pumpa kroz raspršivač, formiraju se kapi tečnosti sa čvrstim komponentama i izlažu se pogodnoj struji gasa koja potpomaže isparavanje putem brzog masenog transfera tečnog nosača u gas. Kada se dovoljna količina tečne mase transformiše u paru, preostali čvrsti materijal u kapi formira pojedinačnu česticu koja se zatim odvaja iz struje gasa. Vreme postojanja kapi i brzina formiranja čestice traje od nekoliko milisekundi do nekoliko minuta. Vreme potrebno za formiranje čestice kontrolisano je inicijalnom veličinom kapi i brzinom isparavanja. Isparavanje je kontrolisano transferom toplote u kapi, transferom mase pare van kapi u struju gasa i specifičnim sastojcima formulacije (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Brzina formiranja čestice je ključni parametar koji je određen veličinom komore za sušenje te stoga i dimenzijama opreme potrebne za proizvodnju čestica željene veličine,

pri željenoj brzini proizvodnje. Sušenjem raspršivanjem obično se dobijaju čestice protočnosti pogodne za prikupljanje pod uticajem silazne vazdušne struje. Ovaj koncept je implementiran u sklopu opreme različite veličine od laboratorijskih uređaja do višespratnih komercijalnih kula za sušenje. Brzina proizvodnje za tipični laboratorijski uređaj za sušenje raspršivanjem je reda veličine nekoliko grama na sat, dok komercijalni uređaji proizvode nekoliko tona godišnje (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008). Bez obzira na tip uređaja, četiri fundamentalna podprocesa moraju se dogoditi u cilju uspešnog sušenja raspršivanjem (Slika 1.2-1) (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008):

- priprema medijuma za raspršivanje;
- raspršivanje medijuma;
- sušenje kapi ili formiranje čestica;
- odvajanje čestica od vazdušne struje.



Slika 1.2-1. Šematski prikaz procesa sušenja raspršivanjem (Augsburger i Hoag, 2008).

1.2.1.1. Priprema medijuma za raspršivanje

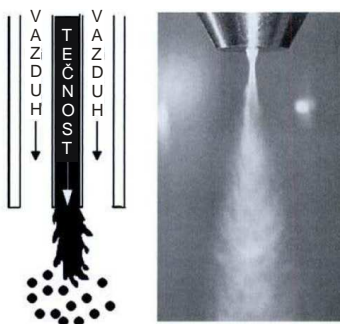
Medijumi različitih reoloških osobina se mogu sušiti raspršivanjem: rastvori, suspenzije, emulzije niskog viskoziteta ili čak i vrlo viskozne suspenzije. Dizajn medijuma vrši se u skladu sa određenim ciljnim karakteristikama proizvoda, stabilnošću, rastvorljivošću sastojaka formulacije, površinskim naponom, viskozitetom. Najjednostavnija priprema šarže podrazumevala bi pripremu vodenog rastvora niskog viskoziteta rastvaranjem svih sastojaka mešanjem u sudu i pumpanje u uređaj za sušenje raspršivanjem. Vehikulum je obično vodeni, ali koriste se i organski rastvarači uz određene mere opreza i dodatke uređaju. Priprema treba da osigura da dobijeni medijum za raspršivanje bude odgovarajućih reoloških karakteristika zbog raspršivanja, kako bi bila formirana

odgovarajuća veličina kapi i odgovarajuće osobine praška. Za bilo koju formulaciju, sistem koji se dovodi u uređaj za sušenje raspršivanjem, tj. konzistencija sistema koji se procesira tokom određenog vremena vrlo je važna kako bi se kvalitet proizvoda održavao konstantnim kroz celu šaržu. (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

1.2.1.2. Raspršivanje medijuma (atomizacija)

Medijum za raspršivanje se dovodi do raspršivača (engl. *atomization nozzle*, atomizer) gde se prevodi u kapi. Glavni parametar performansi dizajna raspršivača je rezultujuća distribucija veličine kapi, jer srednja vrednost i širina distributivne krive utiču na veličinu čestica finalnog proizvoda kao i na prinos u procesu. Idealno bi bilo da distribucija veličine kapi bude što uža, kako bi bilo obezbeđeno ujednačeno sušenje i kako bi bili izbegnuti gubici na zidu suda uređaja zbog nepotpunog sušenja krupnijih kapi (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Proizvođači opreme za sušenje raspršivanjem za farmaceutsku primenu nude više tipova raspršivača, a najčešći su mlazni raspršivač sa dva fluida i rotacioni raspršivač. Mlazni raspršivači koriste struju gasa velike brzine (vazduha u slučaju vodenih sistema ili inertnog gasa azota u slučaju rada sa organskim rastvaračima), kojim se tečnost raspršuje u kapi kao što je ilustrovano na Slici 1.2-2.



Slika 1.2-2. Mlazni raspršivač sa dva fluida (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Atomizer raspršuje tečnost u vidu pojedinačnih kapi i ovo prvobitno razdvajanje delova tečnosti u kapi prvi je faktor koji određuje veličinu osušenih čestica. Smatra se da je veličina čestica finalnog proizvoda prvenstveno zavisna od inicijalne veličine kapi, a u manjoj meri od koncentracije rastvora i odnosa gustine rastvora i čestica. Metoda kojom

se vrši ekstrakcija čestica iz struje procesnog vazduha takođe menja krajnju veličinu čestica. Ako je proizvod dobijen sušenjem raspršivanjem samo međuproizvod koji se dalje procesira kompaktiranjem, granulacijom ili tabletiranjem, stroga kontrola veličine kapi ne mora biti glavna promenljiva procesne kontrole (Snyder and Lechuga-Ballesteros, 2008).

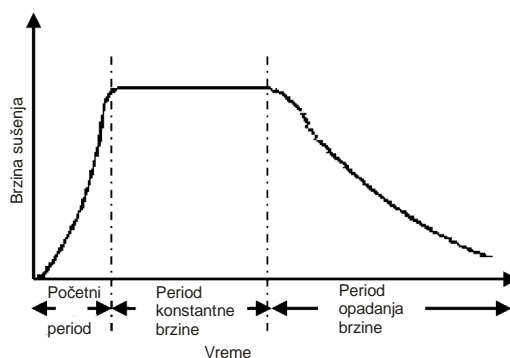
1.2.1.3. Sušenje kapi ili formiranje čestica

Proces formiranja čestica uključuje prevođenje raspršenih kapi u čvrste čestice koje je višestepeno i traje dok je kap izložena gasovitom medijumu za sušenje. Najčešća je konfiguracija uređaja u kojoj se sprej i gas za sušenje kreću kroz uređaj u istom smeru, kada postoji tzv. ko-kurentni protok (*co-current*, engl.) (Celik i Wendel, 2005).

Formiranje čestica se može podeliti u tri faze (Slika 1.2-3):

- inicijalna faza porasta brzine sušenja koja se dešava neposredno nakon kontakta kapi sa gasom za sušenje;
- faza u kojoj je brzina sušenja najveća i konstantna;
- finalna faza u kojoj brzina sušenja opada.

Brzina sušenja se menja tokom vremena i zavisi od oblika kapi, sastava, fizičke strukture, koncentracije čvrstih materija, temperature i vlažnosti vazduha koji okružuje kap (Celik i Wendel, 2005).



Slika 1.2-3. Kriva brzine sušenja (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Najpre se temperatura kapi menja u skladu sa temperaturom u okolini raspršivača. Kod raspršivača sa dva fluida koji koristi vazduh za raspršivanje, zbog jakog pritiska pod kojim je gas koji vrši atomizaciju tečnosti, dolazi do pada lokalne temperature kapi.

Temperatura kapi zatim postepeno raste, kako se raspršene kapi mešaju sa gasom za sušenje.

Druga faza dešava se kada je u kapi postignut ekvilibrijum isparavanja rastvarača u okolnu struju gasa. Tokom perioda sušenja konstantnom brzinom, brzina isparavanja će biti pokretana toplotnim transferom na kap, koji mora da izbalansira energiju koja se uklanja usled efekta hlađenja tokom isparavanja. Dok traje period konstantne brzine isparavanja, kap tečnosti dostiže temperaturu koja je značajno ispod lokalne temperature gasa kojim se vrši sušenje. Na primer, kap tečnosti dostiže temperaturu samo 40°C kada je unutrašnjost komore za sušenje ispunjena vrućim vazduhom koji ima temperaturu 80°C i relativnu vlažnost 10 % (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Treća faza formiranja čestica dešava se pošto deo rastvarača nosača ispari, i kada čvrsti sadržaj u kapi utiče na brzinu isparavanja u gasoviti medijum. Obično ovo redukuje maseni transfer preostalog rastvarača i zbog toga se ova faza često zove period opadanja brzine sušenja. U ovoj vremenskoj tački, pošto koncentracija rastvorka dostiže vrednost koja odgovara njegovoj rastvorljivosti, površina kapi počinje da očvršćava i da formira ljusku. Ovo stvara maseni transfer kontrolisan unutrašnjom fuzijom u kapi, kojim se usporava bekstvo rastvarača iz unutrašnjeg jezgra na površinu pre isparavanja u gasoviti medijum (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Za medijum za raspršivanje tipa rastvora, čestična morfologija se formira u ovoj trećoj fazi sušenja. Kinetika formiranja čestice, kontrolisana brzinom isparavanja u kombinaciji sa porastom viskoziteta kapi, stvara izvesne stresne uslove koji utiču na formiranje površine čime se kontroliše morfologija čestica. Čestice dobijene pri većoj brzini sušenja imaju površinu sa otvorima, dok niža brzina sušenja dovodi do stvaranja sfernijih čestica sa manje naboranom površinom. Detaljniji mehanizmi nastanka kompletnih čestica od kapi, vrlo su kompleksni i zavise od velikog broja međusobno isprepletenih faktora, kao što su procesni parametri i fizičko-hemijske karakteristike formulacije (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Tokom procesa se dešavaju promene u energiji koje rezultuju poremećajem kristalne rešetke, formiranjem polimorfnih i/ili pseudopolimorfnih oblika, eliminisanjem kristalnosti ili u slučaju višekomponentnih sistema formiranjem kompleksa. Navedene promene mogu značajno uticati na biofarmaceutske osobine i stabilnost doziranih oblika

i mogu se kvalitativno i kvantitativno evaluirati primenom termalnih analitičkih metoda (Corrigan, 1995).

1.2.1.4. Odvajanje čestica od vazdušne struje

Na završetku faze formiranja čestica, u uređaju za sušenje raspršivanjem stvara se dispergovani aerosol u kome je visoka koncentracija čvrstih čestica koje treba odvojiti iz struje procesnog vazduha. Kod farmaceutskog sušenju raspršivanjem, postoje dve različite metode prikupljanja proizvoda i to su separacija ciklonom i filtracija pomoću vrećastih filtera. Ciklonski separatori imaju prednost u prikupljanju čestica u farmaceutskim procesima sušenja raspršivanjem, uključujući mehaničku jednostavnost bez pokretnih delova, visoku efikasnost i pogodnost primene čišćenja u mestu (engl. *cleaning in place*, CIP). Nedostaci uključuju veličinu opreme i efikasnost prikupljanja zavisnu od veličine čestica koje treba imati u vidu tokom transfera procesa i *scale-up-a*. Ciklon, ili inerciona separaciona metoda zasniva se na razlici u gustinama između faza. Ovaj koncept je pogodan za guste čestice jer dolazi do usporavanja brzine kretanja ovakvih čestica u odnosu na vazduh kao medijum niske gustine u polju rotirajućeg vrtloga. Efikasnost separacije ciklonom zavisna je od dizajna ciklona, procesnih parametara, čestične raspodele ulaznog materijala i mehaničkih osobina čvrstih čestica (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

1.2.2. Aspekti primene sušenja raspršivanjem odabrani za istraživanje

Primenom sušenja raspršivanjem mogu se kontrolisati brojne osobine praška kao što su oblik, veličina čestica, nasipna gustina, poroznost, sadržaj vlage, protočnost, čvrsto stanje, stabilnost, disperzibilnost, frijabilnost. Sušenje raspršivanjem ima veliki broj ulaznih parametara kojima se može uticati na ishod procesa i definisati prostor za dizajn, i neophodno je sprovesti sistematičan pristup izučavanja kao što je QbD pristup kako bi se prepoznali faktori najznačajniji za određeni cilj primene (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008; Gonnissen i autori, 2008; Nekkanti i autori, 2009; Billon i autori, 2000; Vaithiyalingam i Khan, 2002; Tagne i autori, 2006; Tajber i autori, 2009).

Obezbeđenje ujednačenosti doziranja u smešama praškova za tabletiranje, ponekad može biti problematično zbog raslojavanja čestica različitih veličina ili različite adhezivnosti na unutrašnje zidove mešača. Dovoljna ujednačenost smeše se ponekad teško može postići posebno kod smeša koje sadrže male doze lekova. Sušenje raspršivanjem multikomponentnih rastvora mogla bi biti alternativna i pogodnija metoda za dobijanje kompozitnih praškova sa niskom dozom leka, obezbeđujući konstantan sastav svake čestice (Corrigan i autori, 2006). Naratriptan hidrohlorid je odabran kao model supstance koja je prisutna u čvrstim doziranim oblicima u malim dozama.

Poznato je da je broj novih lekovitih supstanci koje su teško rastvorljive u vodi u porastu, tako da je istraživanje načina poboljšanja njihove rastvorljivosti i bioraspoloživosti vrlo aktuelna tema. Jedna od strategija u poboljšanju rastvorljivosti lekova je kompleksiranje sa ciklodekstrinima, sa kojima je moguće na relativno jednostavan način pripremiti vodeni rastvor kompleksa lek:ciklodekstrin i prevesti ga u čvrsto stanje sušenjem raspršivanjem (Nekkanti i autori, 2009, Brewster i Loftsson, 2007; Challa i autori, 2005; Szejtli, 2004). Vorikonazol i aripiprazol su odabrani kao model supstance koje su teško rastvorljive.

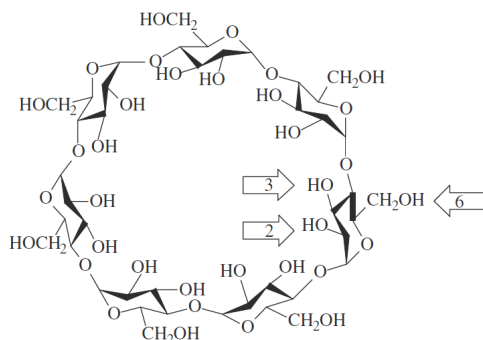
Bez obzira na cilj primene, procesni parametri treba da obezbede postizanje najboljeg procesnog prinosa kao jednog od glavnih pokazatelja kvaliteta procesa. Među brojnim osobinama proizvoda dobijenog sušenjem raspršivanjem, sadržaj vlage i veličina čestica se izdvajaju kao najčešće praćeni zbog njihovog uticaja na procesibilnost, performanse i stabilnost proizvoda (Adamiec i Modrezejewska, 2005; Chegini i Ghobadian, 2005; Goula i Adamopoulos, 2004; Goula i Adamopoulos, 2008; Goula i autori, 2004).

1.3. Ciklodekstrini u farmaceutskoj industriji

Komercijalna upotreba ciklodekstrina (CD) u farmaceutskoj industriji ustanovljena je prisustvom brojnih lekova sa ovim ekscipijensima na tržištu. Njihova primena pruža nove mogućnosti za poboljšanje kvaliteta lekova (neželjena dejstva, terapijska aktivnost, rastvorljivost), jer proces kompleksacije lekova i ciklodekstrina može da

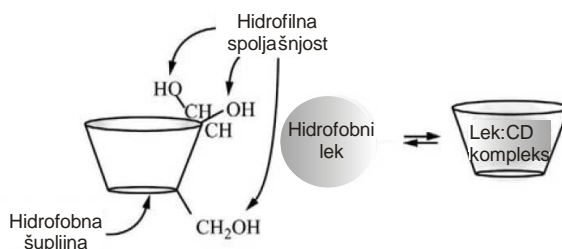
doprinese poboljšanju fizičko-hemijskih svojstava farmaceutskih supstanci (Szejtli, 2004; Challa i autori, 2005; Brewster i Loftsson, 2007; Mosher i Thompson, 2007).

Ciklodekstrini su ciklični oligosaharidi koji se sastoje od 6, 7, ili 8 glukopiranoznih jedinica i nazivaju se α -, β -, i γ -CD. Svaka jedinica ima dva sekundarna alkohola na C-2 i C-3 i primarni alkohol na C-6 poziciji, tako da postoji 18-24 mesta za hemijsku modifikaciju i derivatizaciju (Slika 1.3-1) (Mosher i Thompson, 2007).



Slika 1.3-1. Hemijska struktura β -CD. Strelice pokazuju 2-, 3- i 6-hidroksilne grupe glukopiranozne jedinice (Mosher i Thompson, 2007).

Trodimenzionalna struktura ciklodekstrina može se ilustrovati kao šupljina koja je hidrofobna u odnosu na vodenu sredinu (Slika 1.3-2).

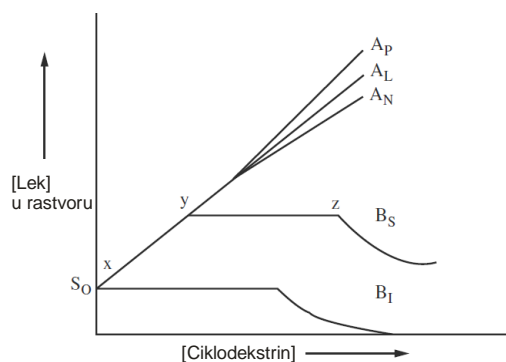


Slika 1.3-2. Kompleksacija leka unutar hidrofobne šupljine CD (Mosher i Thompson, 2007).

Ciklodekstrini su primer supstanci koje grade inkluzione komplekse koji nastaju tako što se molekul gost delimično ili potpuno uklapa u molekul ciklodekstrina bez kovalentnog povezivanja. Uključivanje hidrofobnih lekova unutar šupljine CD može poboljšati rastvorljivost i stabilnost leka u vodi, i brzinu rastvaranja kompleksa lek:CD, i potencijalno bioraspoloživost (Challa i autori, 2005; Brewster i Loftsson, 2007; Mosher i Thompson, 2007). Obično su poželjne sledeće karakteristike lekovite supstance kako bi bila pogodna za kompleksaciju sa ciklodekstrinom: skelet molekula sa ne više od pet atoma (C, P, S, N), temperatura topljenja supstance ispod 250°C ,

rastvorljivost u vodi manje od 10 mg/ml, molekulska struktura sa manje od pet kondenzovanih prstenova, molekulska masa između 100 i 400 (Vyas i autori, 2008).

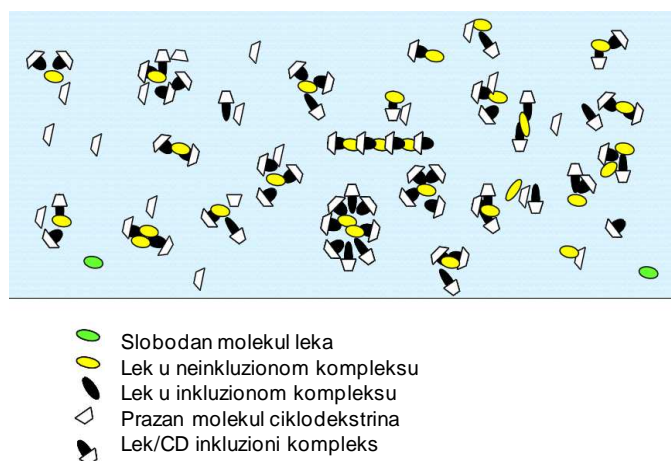
Prilikom rada na formulaciji sa CD potrebno je na odgovarajući način proceniti njihovu sposobnost kompleksacije sa određenim lekom. Jedna od najčešće korišćenih metoda je tehnika fazne rastvorljivosti (engl. *phase-solubility*). Tehnika podrazumeva dodavanje jednake količine supstance koja treba da se kompleksira (količina veća od rastvorljivosti) u nekoliko sudova, jednake količine rastvarača i sukcesivno rastućih količina kompleksirajućeg agensa, koji se zatim zatvoreni mešaju određeno vreme i na određenoj temperaturi. U fazi rastvora se zatim određuje količina rastvorene supstance. Fazni dijagram se konstruiše u vidu zavisnosti molarne koncentracije rastvorene supstance (y-osa) od molarne koncentracije dodatog kompleksirajućeg agensa (x-osa). Generalno postoje dva tipa faznih dijagrama: tip A gde se formiraju rastvorljivi kompleksi, i tip B gde se formiraju kompleksi sa ograničenom rastvorljivošću (Slika 1.3-3). Kod tipa A dijagrama, rastvorljivost supstance raste sa porastom količine kompleksirajućeg agensa i u zavisnosti od tipa kompleksa koji se formira dijagram može biti linearan (A_L), pozitivno (A_P) ili negativno zakrivljen (A_N) (Brewster i Loftsson, 2007; Mosher i Thompson, 2007).



Slika 1.3-3. Mogući tipovi dijagrama fazne rastvorljivosti (Mosher i Thompson, 2007).

A_L tip dijagrama se tumači kao posledica toga da u svakom kompleksu učestvuje jedan molekul kompleksirajućeg agensa, A_P kada je to više molekula, a A_N može biti posledica samoasocijacije, ili promene prirode rastvarača pri visokim koncentracijama kompleksirajućeg agensa. U slučaju postojanja kompleksa višeg reda tumačenje rezultata dobijenih primenom ne samo *phase-solubility* tehnike, nego i drugih različitih metoda u karakterizaciji kompleksa može biti veoma složeno (Loftsson i autori, 2005).

Razlog tome može biti i to što se razmatra samo model koji pretpostavlja da se između leka i CD dešava samo interakcija u vidu formiraja nekovalentnih inkluzionih kompleksa, a ne uzimaju se u obzir moguće međusobne interakcije ovih kompleksa, neinkluzione interakcije, interakcije slične onima kod površinski aktivnih supstanci i molekularna agregacija, koji takođe doprinose korisnim efektima ciklodekstrina (Slika 1.3-4) (Loftsson i autori, 2002; Loftsson i autori, 2004; Messner i autori 2010; Mosher i Thompson, 2007).



Slika. 1.3-4. Ilustracija nekonvencionalnih kompleksa ciklodekstrina

Faktori koji utiču na kompleksaciju pored tipa CD i dimenzija šupljine jesu sterni efekti, stanje jonizacije odnosno naelektrisanje CD i leka (Li i autori, 1998). Ciklodekstrini formiraju komplekse sa supstancama čija je veličina kompatibilna sa dimenzijama šupljine. Kada je lekovita supstanca veća od šupljine, kompleksi se mogu graditi tako da samo određene grupe ili bočni lanci ulaze u ugljovodonični kanal. Derivatizacija hidroksilnih grupa CD tj. prisustvo voluminoznih grupa može sterno da ometa prilaz supstance šupljini CD. Međutim, moguće je i da određene grupe, u zavisnosti od njihovog broja, fleksibilnosti i pozicije dovedu do proširenja šupljine i olakšaju kompleksaciju. Tako na primer, metil supstitucija na pozicijama 2- i 6- dovodi do proširenja, dok istovremeno postojanje supstituenata na pozicijama 2-, 3- i 6- dovodi do smanjenja šupljine. Krupniji supstituent kao što je hidroksipropil grupa, iako je hidrofilnija i povećava rastvorljivost CD u vodi, voluminoznija je od metil grupe i zahteva manji stepen supstitucije kako bi se olakšalo vezivanje bez sternog ometanja ulaza u šupljinu CD. Može se reći da postoji kompromis između sternog ometanja supstituenata i njihove sposobnosti da prošire hidrofobnu šupljinu, kao i između

sposobnosti formiranja kompleksa i povećanja rastvorljivosti u vodi. Što se tiče naelektrisanja, ukoliko je suviše blizu šupljine CD može poremetiti termodinamiku koja dovodi do kompleksacije. Takođe je važna međusobna pozicija i interakcija naelektrisanih grupa leka i CD. Faktori koji mogu dodatno olakšati solubilizaciju i povećati kompleksaciju CD i leka su podešavanje pH medijuma u kojem se vrši rastvaranje, hidrosolubilni polimeri, hidroksi kiseline (Brewster i Loftsson, 2007; Challa i autori, 2005; Loftsson i autori, 1999; Messner i autori, 2010; Mosher i Thompson, 2007; Redenti i autori, 2000).

Postoji nekoliko metoda pripreme kompleksa lek:CD, a najefikasnijima se smatraju sušenje raspršivanjem i sušenje zamrzavanjem (Challa i autori, 2005).

Kompleksacija lekova pomoću ciklodekstrina poboljšava karakteristike njihove isporuke i ne utiče na njihovu aktivnost jer je kompleksacija reverzibilan proces. U vodenom rastvoru, kompleksi lek:CD se kontinuirano formiraju i disociraju sa vremenima trajanja od milisekunde ili manje. Iako spora kinetika disocijacije postoji kod jačeg vezivanja, brzina je i dalje velika i suštinski trenutna. Razblaženje 1:100 se ostvaruje za intravenske proizvode kao i tokom razblaženja u stomaćnom i crevnom sadržaju. Posle primene, lek se oslobađa iz kompleksa tokom razblaženja, i u nekim slučajevima tome doprinosi kompetitivna zamena sa endogenim lipofilnim supstancama. (Mosher i Thompson, 2007; Challa i autori, 2005).

1.3.1. Derivati ciklodekstrina

Među brojnim derivatima CD, samo oni koji se sastoje od hidroksipropil (HP), metil (M) i sulfobutiletar (SBE) supstituenata u poziciji su da se koriste komercijalno kao farmaceutski ekscipijensi. Dobijaju se reakcijom sa jednom ili više hidroksilnih grupa glukopiranoznih jedinica.

Hidroksipropilacija se izvodi na primarnim i sekundarnim alkoholnim grupama, dovodeći do stvaranja smeše brojnih izomernih formi, što rezultuje heterogenim proizvodima amorfne prirode. Hidroksipropil derivati γ - i β -CD su derivati od interesa za farmaceutsku industriju, od kojih je hidroksipropil- β -CD (HPBCD) među najčešće korišćenim i izučavanim derivatima CD, zahvaljujući velikoj rastvorljivosti u vodi i pogodnosti za oralnu i parenteralnu primenu, sa već registrovanim proizvodima

(Mosher i Thompson, 2007; Brewster i Loftsson, 2007; Szejtli, 2004; Loftsson i autori, 2005).

Uvođenjem metil supstituenata rastvorljivost u vodi se povećava u odnosu na roditeljski ciklodekstrin do broja metil grupa 14, pa se smanjuje kako se broj približava 21. Supstitucija na pozicijama C-2 i C-6 povećava sposobnost kompleksiranja. Supstitucija na poziciji C-3 smanjuje sposobnost kompleksiranja, verovatno zbog promene konformacije koja se dešava (Mosher i Thompson, 2007). Metil derivati su lipofilniji od hidroksipropil derivata, i imaju veći toksični potencijal pa je njihova primena ograničena (Brewster i Loftsson, 2007; Mosher i Thompson, 2007). Metil derivati koji su od interesa za farmaceutsku industriju su randomizirano metilovani β -CD (RAMEB), dimetilovani (DIMEB) i monometilovani (2-O-MBCD). 2-O-MBCD je noviji derivat i stoga manje izučavan i za sada ne postoje proizvodi registrovani na tržištu (Mosher i Thompson, 2007). Prednosti primene u odnosu na HPBCD bi mogle biti potencijalno veća efikasnost kompleksacije usled blago proširene šupljine i linearnog porasta rastvorljivosti sa porastom koncentracije CD, bez pojave samoasocijacije pri višim koncentracijama (Roquette, Francuska).

Ciklodekstrini koji su odabrani za istraživanje su HPBCD i 2-O-MBCD i njihove osnovne karakteristike prikazane su u Tabeli 1.3-1.

Tabela 1.3-1. Osnovne karakteristike odabranih ciklodekstrina (www.roquette-pharma.com)

Ciklodekstrin	2-hidroksipropil-beta-ciklodekstrin (HPBCD)	2-O-metil-beta-ciklodekstrin (2-O-MBCD)
Izgled	Beli amorfni prašak	Beli prašak sa sposobnošću kristalizacije iz vode i nastanka štapićastih bezbojnih kristala koji sadrže 13% vode
Prosečna molekulska masa	1135 + 7 x MS x 58.1	1135 + 7 x MS x 14
Rastvorljivost u vodi	65 % (25°C) 80 % (50°C)	20 % (20°C) 65 % (70°C)
Temperatura raspadanja	>300°C	>300°C
Sadržaj vlage	Max. 5 %	Max. 5 %
Unutrašnji prečnik šupljine	0.62 nm, delimično zaklonjena	0.62 nm, blago proširena

MS je prosečni molarni stepen supstitucije

1.3.2. Prednosti i ograničenja upotrebe ciklodekstrina

Formulacije sa ciklodekstrinima obezbeđuju rastvorljivost u vodi lekovima koji su teško rastvorljivi, i kompleksi lek:CD često ispoljavaju poboljšane karakteristike brzine rastvaranja u poređenju sa drugim formulacijama leka. Poboljšanje brzine rastvaranja leka može poboljšati brzinu resorpcije leka. Smanjenje vremena kontakta između leka i tkiva sluzokože može da doprinese smanjenoj iritaciji tkiva od strane lekova. Takođe, kompleksacija može dovesti do maskiranja neprijatnog gorkog ukusa lekova (Mosher i Thompson, 2007; Challa i autori, 2005; Szejtli, 2004).

Ciklodekstrini se uobičajeno smatraju stabilizirajućim agensima u farmaceutskim formulacijama. Postoje primeri stabilizacije ali i destabilizacije lekova na hidrolizu, hidrolitičku dehalogenizaciju, oksidaciju, dekarboksilaciju i izomerizaciju, i u rastvoru i u čvrstom stanju. Priroda uticaja korišćenog CD zavisi i od pozicije molekula unutar CD. Kada pozicija dozvoljava interakciju sa mestom podložnom hidrolizi može doći do smanjenja stabilnosti, ali ako je to mesto locirano potpuno unutar CD obično to rezultuje poboljšanjem stabilnošću. Stepen stabilizacije/destabilizacije leka kompleksiranog sa CD zavisi ne samo od brzine degradacije unutar kompleksa, nego i od frakcije leka koja je u kompleksu i od stehiometrije kompleksa. Povećana stabilnost se često zapaža za supstance koje imaju visoke konstante asocijacije i one koji imaju sklonost ka formiranju kompleksa višeg reda (Mosher i Thompson, 2007; Challa i autori, 2005; Vyas i autori, 2008).

Primena CD je ograničena samo na lekove određenih fizičko-hemijskih osobina koje moraju biti ispunjene da bi kompleksacija sa CD bila moguća. Neizbežan ograničavajući faktor je i doza kompleksa odnosno leka koja mora da se primeni. Ako se ima u vidu da je poželjno da masa tablete ne bude veća od 500 mg i da je molekulska masa lekova koji se kompleksiraju 100-400 i da CD imaju veliku molekulsku masu (>1000), 100 mg kompleksa obično sadrži oko 5-25 mg leka. Ako je doza leka manja od 25 mg onda je i koncentracija 5% leka u kompleksu dovoljna da obezbedi potrebnu dozu u tableti od 500 mg. Ako je doza veća od 25 mg, treba razmotriti mogućnost formulacije u vidu praška u kesicama (engl. *sachet*) ili šumećih tableta. U slučaju kompleksacije lekova, odnos između potrebne doze i molekulske težine određuje izvodljivost oralne primene u obliku kompleksa sa CD (Szejtli, 2012).

1.3.3. Simulacija molekularnog vezivanja lek:ciklodekstrin

Simulacija molekularnog vezivanja je računarska procedura koja pokušava na efikasan način da predvidi nekovalentno vezivanje makromolekula ili čestice, makromolekula (receptor, protein, ciklodekstrin) i malog molekula (ligand, lek), polazeći od njihove strukture u nevezanom obliku (Trott i Olson, 2009). Ova metoda predviđa orijentaciju molekula u prostoru nakon povezivanja s drugim molekulom. Poznavanje orijentacije molekula pruža informacije o tome koliko čvrsta veza će se uspostaviti između ta dva molekula. Cilj je predvideti vezane konformacije i afinitet vezivanja, tako da je tačnost predviđanja najveća a vreme potrebno za proračun najkraće. U tom smislu neophodno je da postoje određene aproksimativne pretpostavke. Pretpostavlja se da se određeno protonovano stanje molekula i raspored naelektrisanja ne menjaju u njihovim vezanim i nevezanim stanjima. Dodatno, pretpostavlja se da je veći deo makromolekula rigidan, kovalentne dužine i uglovi konstantni, dok se samo izabrani set kovalentnih veza smatra slobodno rotirajućim. Simulacija se bavi aproksimacijom hemijskih potencijala sistema koji određuju najverovatniju konformaciju u vezanom stanju i slobodnu energiju vezivanja, pri čemu softverski programi koriste *scoring* funkciju tj. funkciju ocenjivanja (engl. *scoring function*) (Trott i Olson, 2009).

1.3.3.1. Početna podešavanja pre simulacije

Za male molekule (ligande, lekove) dobra početna tačka je njihova kristalna struktura. Koordinate kristalne strukture se mogu pronaći u bazi podataka *Cambridge Structural Database* ili, kreira se molekularni model i njegova geometrija se optimizuje na nivou molekularne mehanike (*CHARMm force field parameters*, Momany i Rone, 1992).

Neki programi za simulaciju, kao *AutoDock Vina*, zahtevaju specifikaciju prostora za pretraživanje u koordinatnom sistemu receptora u okviru koga se razmatraju razni položaji liganda, koji treba da bude dovoljno veliki da omogući rotaciju liganda (Trott i Olson, 2009). Program zahteva i da se ligandima dodele parcijalna atomska naelektrisanja. Grafički interfejs *AutoDockTools* (ADT) se koristi da se nepolarni atomi vodonika (vezani za atome ugljenika) identifikuju i izostave iz razmatranja, a da se polarni atomi vodonika zadrže (atomi vezani za elektronegativne atome kao što su

kiseonik i azot), i da se molekulima dodaju parcijalna naelektrisanja (korišćenjem metoda dodavanja *Kollman united-atom* ili *Gasteiger* naelektrisanja). Takođe je potrebno opisati rotirajuće veze u ligandu (Morris i autori, 1998; Huey i autori, 2011; Stigliani i autori, 2012). Ono što čini program kao što je *AutoDock Vina* lakim za korišćenje, je to što nije potrebno ručno podešavanje parametara jer program automatski brzo vrši potrebna izračunavanja i rangira i grupiše rezultate bez predstavljanja međukoraka korisniku (Trott i Olson, 2009). Atomiški parametri solvatacije se takođe mogu dodeliti pomoću ADT (Morris i autori, 1998). Softverski programi kao *NAMD molecular dynamics program* (Phillips i autori, 2005), omogućavaju minimizaciju energije vezivanja.

1.3.3.2. *Scoring* funkcija i algoritam pretraživanja

Ključni rezultati u simulaciji su dobijene vezane konformacije i energije ovih vezanih struktura i njihova međusobna sličnost. Najbolji rezultati vezivanja se rangiraju na osnovu određene *scoring* funkcije (engl. *scoring*). Koliko će simulacija biti uspešna zavisi od *scoring* funkcija i algoritma pretraživanja. *Scoring* funkcije predstavljaju skup matematičkih metoda koje služe za eliminaciju netačnih struktura kompleksa dobijenih eksperimentalnim metodama. Njima se može ustanoviti afinitet vezivanja između liganda i receptora, a temelje se na električnim karakteristikama molekula, hidrofobnosti površina i raznim drugim hemijskim i mehaničkim karakteristikama interakcija. Algoritam pretraživanja pronalazi strukture za koje *scoring* funkcija daje visoku verovatnoću vezivanja, koja je zavisna od konformacije i intermolekularnih i intramolekularnih doprinosa. *AutoDock Vina* program koristi sofisticirani metod optimizacije gradijenta u svojoj proceduri lokalne optimizacije. Optimizacioni algoritam pokušava da nađe globalni minimum funkcije tokom čega se vrši prečišćavanje strukture, a zatim se konformacije grupišu (Trott i Olson, 2009).

1.3.3.3. Grupisanje konformacija (*clustering*, engl.)

Sličnost vezanih struktura (konformacija) koje se grupišu meri se proračunavanjem RMSD vrednosti (engl. *root-mean-square-deviation*), koja predstavlja meru prosečne

udaljenosti koja se meri uz pomoć koordinata atoma. Ovaj proces uključuje rangiranje svih konformacija prema energiji od najniže do najviše. Konformacija sa najnižom energijom se koristi kao prvi član prve grupe (engl. *cluster*). Zatim se druga konformacija poredi sa prvom. Ako se dobija rezultat u okviru RMSD tolerancije, pridodaje se prvoj grupi. U suprotnom, postaje prvi član nove grupe. Proces se ponavlja sa ostalim rezultatima simulacije vezivanja, grupisanjem u porodice sličnih konformacija (Huey i autori, 2011).

Za dve strukture, a i b , identičnog molekula, RMSD se definiše na sledeći način:

$$\text{RMSD}_{ab} = \max(\text{RMSD}'_{ab}, \text{RMSD}'_{ba}), \quad (1.3-1)$$

gde je

$$\text{RMSD}'_{ab} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i \min_j r_{ij}^2} \quad (1.3-2)$$

i sumiranje se vrši za svih N teških atoma u strukturi a ; minimum udaljenosti $\min r$ se odnosi na sve atome u strukturi b sa istim tipom elementa kao atom i u strukturi a (Trott i Olson, 2009).

Tokom proračuna vezivanja program računa slobodnu energiju vezivanja (Huey i autori, 2011).

1.3.3.4. Optimizacija posle simulacije

Kombinovanje simulacije vezivanja i semiempirijske optimizacije geometrije je pogodno jer može da poveća tačnost simulacije. Svođenje energije na minimum (minimizacija) svih vezanih konformacija može da se izvede korišćenjem semiempirijskih izračunavanja. Na primer, *PM6 Hamiltonian* metod se koristi u proceni entalpija interakcija i u cilju boljeg opisa nekovalentnih interakcija kao što su interakcije vodoničnih veza. Dodavanjem korekcije prenosivih vodoničnih veza korišćenjem modifikovane *PM6-DH2* metode može se izvršiti dalja minimizacija energije (Stigliani i autori, 2012).

Energije vezivanja ΔE , mogu se izračunati iz razlike u toploti formiranja, $\Delta_f H$, individualnih komponenti i njihovih kompleksa, prema jednačini:

$$\Delta E = \Delta_f H(\text{ligand-receptor kompleks}) - \Delta_f H(\text{ligand}) - \Delta_f H(\text{receptor}), \quad (1.3-3)$$

gde na primer, ligand može biti lek, a receptor ciklodekstrin.

Potrebni proračuni se mogu vršiti korišćenjem programa MOPAC koji se inače koristi za izučavanje hemijskih reakcija među molekulima, jonima i linearnim polimerima, tako što se vrši implementacija semiempirijske metode *Hamiltonian* i kombinuju se razni proračuni vibracionih spektara, termodinamičkih parametara itd. u potpuno integrisanom programu (Stewart, 1990). Dodatno se mogu simulirati i efekti solvatacije pomoću kontinuum modela COSMO (Klamt i Schümann, 1993).

1.3.3.5. Vizuelizacija

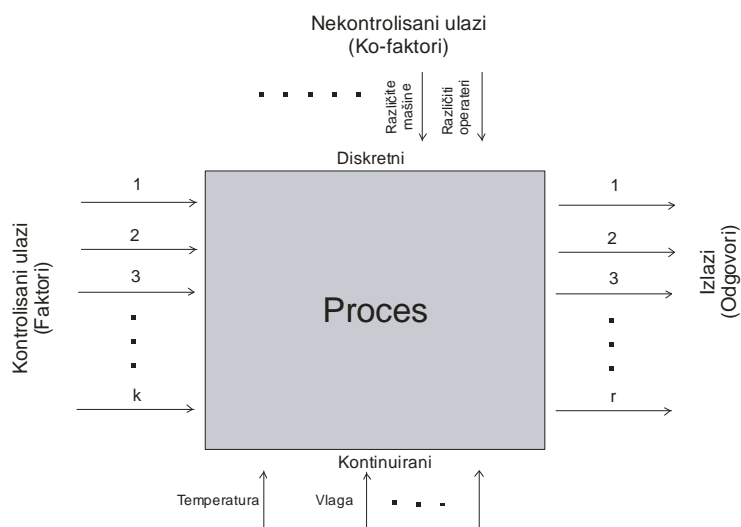
Program simulacije molekularnog vezivanja može dati vizuelnu prezentaciju vezanih konformacija. Vizuelna provera interakcija između vezanog liganda i makromolekula se koristi za evaluaciju da li su, na primer, nepolarni atomi u ligandu pozicionirani blizu okolnih nepolarnih atoma u receptoru, polarni atomi u ligandu blizu polarnih atoma u receptoru, da li su neke poznate interakcije prikazane i u simuliranom rezultatu, da li interakcije deluju razumno u kontekstu onoga što se već zna o izučavanom kompleksu ligand-receptor na osnovu drugih eksperimentalnih rezultata (Huey i autori, 2011).

1.4. Metodologija za karakterizaciju i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem

1.4.1. Modelovanje primenom eksperimentalnog dizajna

Primena eksperimentalnog dizajna je sistematičan pristup u izučavanju faktora koji mogu uticati na kvalitet procesa i proizvoda. Da bi eksperimentalni dizajn bio što je moguće jednostavniji i usklađen sa zahtevima problema, neophodno je da postoji dobro definisan cilj istraživanja, zatim poznavanje ne samo teorije eksperimenata već i teorijskih osnova i prirode objekta istraživanja. (Billon i autori, 2000; Gonnissen i autori, 2008; Ibrić, 2006; Nekkanti i autori, 2009; Snyder i Lechuga-Ballestros, 2008; Tagne i autori, 2006; Tajber i autori, 2009; Vaithiyalingam i Khan, 2002).

Dizajn je zapravo skup eksperimenata u eksperimentalnom prostoru. Eksperiment je termin koji opisuje eksperimentalnu probu kao praktičnu manipulaciju faktorima izvedenu pod definisanim uslovima (nivo različitih faktora, nezavisno promenljivih, koji se menjaju u dizajnu i onih koji se održavaju na konstantnom nivou), tako da se dobija jedna vrednost za svaki odgovor, zavisno promenljivu, koja se meri. Obično se polazi od modela tipa “crne kutije” koji se sastoji od nekoliko diskretnih ili kontinualnih ulaznih faktora koji se mogu kontrolisati, i nekoliko izlaznih odgovora, za koje se pretpostavlja da su kontinualni (Slika 1.4-1). Na rezultate eksperimenata često utiču i nekontrolisani faktori koji mogu biti diskretni (mašine, operateri) ili kontinualni (ambijentalni uslovi) (*e-Handbook of Statistical Methods*, 2012).



Slika 1.4-1. Šema tipičnog procesa sa kontrolisanim ulazima, izlazima i nekontrolisanim faktorima tipa “crne kutije” (*e-Handbook of Statistical Methods*, 2012).

Nakon odabira dizajna, formira se eksperimentalni plan za određeni broj eksperimenata sa definisanim uslovima i poretkom izvođenja eksperimenata koji treba da bude nasumični (randomizacija) (Ibrić, 2006).

Treba istaći prednosti koje eksperimentalni dizajn (višefaktorski metod) ima u poređenju sa klasičnim konceptom promene samo po jednog faktora (jednofaktorski metod): (Lazić, 2004)

- mogućnost uočavanja određenih zakonitosti ispitivanog fenomena u okviru celog domena prostora tako da zaključivanje na osnovu rezultata ima širu upotrebu;

- šira mogućnost testiranja efekata variranja faktora na finalni rezultat jer se koriste rezultati svih eksperimenata u izračunavanju efekata;
- mogućnost određivanja jačine interakcije faktora;
- bolja tačnost prikupljenih podataka nudi kompletnije i preciznije informacije;
- krajnji cilj istraživanja se ostvaruje na sistematičan, dobro osmišljen i organizovan način za kratko vreme sa značajno smanjenim brojem eksperimenata i smanjenim troškovima materijala;
- randomizacija omogućava postizanje nasumičnog karaktera faktora koji su nekontrolisani i koji se teško stabilišu (onemogućava uticaj nekontrolisanih faktora na rezultat);
- postoji osobina sukcesivnosti, što znači da je svaka sledeća faza izvođenja eksperimenata bazirana na rezultatima prethodne serije eksperimenata;
- menja se način razmišljanja istraživača, povećava se njegova intuicija i povećava aktivno učešće u planiranju narednih faza izvođenja eksperimenata, koje zahteva upotrebu empirijskog i naučnog predznanja;
- dobija se informacija o ukupnom efektu promenljivih jer se sve istovremeno variraju u eksperimentima.

Eksperimentalni dizajn koristi dobijene eksperimentalne podatke u razvijanju matematičkih modela sistema. Važno je imati na umu da je svaki model približno rešenje i generalno nije tačan opis predmeta istraživanja što je sa jedne strane dobro jer model nije previše komplikovan, ali sa druge strane je nedovoljno realan što smanjuje pouzdanost rešenja (Lazić, 2004).

Najčešće se dobijaju modeli koji odgovaraju linearnom ili kvadratnom modelu.

Primer linearnog modela sa tri faktora, i jednim odgovorom bi izgledao ovako:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 + \text{exp. greška}; \quad (1.4-1)$$

gde je Y posmatrani odgovor, X su glavni efekti, zatim postoje 3 dvostruke i jedna trostruka interakcija (koja se često izostavlja zbog jednostavnosti). Kada se podaci analiziraju, svi nepoznati parametri β se procenjuju i koeficijeni uz X se testiraju da se proceni koji su značajni.

Kvadratni model se uobičajeno koristi kod metodologije površine odgovora i ne uključuje trostruke interakcije ali uključuje nove članove kao na primer $\beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2$. Pun model bi podrazumevao uključivanje mnogih ukrštenih činilaca i interakcije sa X^2 , ali generalno oni nisu neophodni i većina softvera ih izostavlja iz modela (*e-Handbook of Statistical Methods*, 2012).

Među često korišćenim metodama eksperimentalnog dizajna u farmaceutskom razvoju nalaze se frakcioni faktorijalni dizajn kao skrining metoda (engl. *screening*) pomoću koje se od mnogih faktora izdvajaju oni koji su najznačajniji, i metodologija površine odgovora koja pomaže u razumevanju efekata interakcija odnosno kombinovanih efekata i u predviđanju performansi (Allen, 2006).

1.4.1.1. Skrining pomoću frakcionog faktorijalnog dizajna

Skrining dizajn je ekonomični eksperimentalni plan čiji cilj nije dobijanje kompletnih i egzaktnih numeričkih podataka o osobinama sistema koji omogućavaju kompletan opis sistema, već dobijanje odgovora da li određeni faktori imaju ili nemaju efekta na ispitivani proces ili sistem. Izvodi se na samom početku istraživanja kako bi se pojednostavio problem i omogućilo eksperimentatoru da obrati pažnju na detaljnija ispitivanja faktora od značaja (Ibrić, 2006). Eksperimentalni plan se naziva frakcionim jer su zasnovani na frakciji svih kombinacija nivoa svih faktora od interesa (Allen, 2006).

Primena skrining dizajna podrazumevala bi nekoliko koraka: definisanje problema, definisanje eksperimentalnog polja, dizajn eksperimenata pomoću kodiranih vrednosti promenljivih, definisanje eksperimentalnog plana zamenom kodiranih vrednosti faktora realnim vrednostima, definisanje redosleda izvođenja eksperimenata (randomizacija), dobijanje matematičkog modela, izračunavanje efekata, izračunavanje preciznosti eksperimenta (eksperimentalna ponovljivost), određivanje aktivnih efekata, odluka da li će se manje aktivni efekti držati na konstantnom nivou u sledećim istraživanjima, ili će biti nekontrolisani (Ibrić, 2006).

Vrednosti izračunatih efekata ovakvog dizajna su uvek pomešane, pa je potrebno imati na umu koliko je ozbiljno mešanje efekata, što je definisano rezolucijom. Na primer 2^{4-1} dizajn ima rezoluciju IV što znači da se svi glavni efekti mogu izračunati nezavisno i

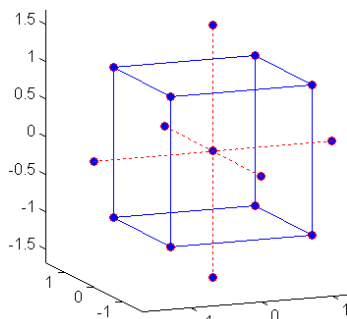
nisu pomešani sa interakcijama prvog reda, već samo sa interakcijama drugog reda. Međutim, vrednosti interakcija prvog reda su pomešane jedne sa drugim.

Kada se faktori variraju na dva nivoa obično su predstavljena kodiranim vrednostima -1 i + 1, tako da -1 zamenjuje realnu vrednost za faktor na nižem nivou, a +1 na višem nivou, što pojednostavljuje postavljanje matematičkih modela i interpretaciju dobijenih koeficijenata. Koeficijenti jednačina se računaju korišćenjem kodiranih vrednosti; na taj način se različite promenljive mogu direktno porediti bez obzira na njihovu veličinu. Izračunavanje koeficijenata modela izvodi se uobičajeno primenom kompjuterskih programa korišćenjem multiple regresije zasnovane na metodi najmanjih kvadrata (Ibrić, 2006). Pozitivan predznak koeficijenta za određeni parametar govori da se izlaz povećava povećanjem nivoa promenljive, a negativan predznak govori da se izlaz povećava smanjenjem nivoa promenljive. Pritom treba definisati i koja je željena verovatnoća da se pod standardnim pretpostavkama pronađe da je značajan bar jedan faktor, kada u realnosti nijedan faktor ne utiče na izlaz i obično se uzima da je ta verovatnoća 5 % (Allen, 2006).

1.4.1.2. Karakterizacija i modelovanje primenom metodologije površine odgovora

Nakon skrining studije koja se izvodi u početnoj fazi istraživanja, i nakon izbora nekoliko faktora koji imaju uticaj na odgovore ispitivanog sistema, sledi detaljna kvantitativna studija uticaja faktora od značaja. Metodologija koja se često koristi prilikom razvoja formulacije i procesa je metodologija površine odgovora (engl. *Response Surface Methodology*, RSM), koja predstavlja sistematsku i istovremenu evaluaciju više promenljivih (procesnih ili formulacionih) u cilju razvoja proizvoda sa željenim atributima kvaliteta. Ova metodologija između ostalog pruža mogućnost i predviđanja odgovora u celoj eksperimentalnoj oblasti budući da se dobijaju matematički modeli koji adekvatno opisuju promene, zahvaljujući tome što se uzimaju u obzir i interakcije odnosno kombinovani efekti faktora (Gonnissen i autori, 2008; Nekkanti i autori, 2009; Billon i autori, 2000; Vaithiyalingam i Khan, 2002; Tagne i autori, 2006; Tajber i autori, 2009). Stoga je prilikom primene ove metode važnije definisati adekvatnost modela od interpretacije individualnih koeficijenata u modelu. Modeli koji se koriste za opisivanje odgovora su najčešće polinomi prvog i drugog reda.

Često se u farmaceutskim realnim sistemima zavisnosti bolje opisuju modelima drugog reda tj. kvadratnim modelima, koji uključuju i kvadratne efekte promenljivih pri čemu je površina takvog modela zakrivljena. Za izračunavanje koeficijenata kvadratnog modela potrebno je vrednost faktora varirati na najmanje tri nivoa (Ibrić, 2006). Jedan od često korišćenih metoda je centralni kompozitni dizajn (engl. *central composite design*, *Box-Wilson* dizajn), koji odgovara eksperimentalnom planu koji varira faktore na 5 nivoa (Allen, 2006). U svom sastavu sadrži faktorijalni ili frakcioni faktorijalni dizajn rezolucije V (jasno određivanje glavnih efekata i dvofaktorskih interakcija), centralne tačke, i još dodatno grupu zvezdastih (aksijalnih, osovinskih) tačaka koje omogućavaju procenu kvadratnih efekata odnosno zakrivljenosti površine odgovora. Centralni kompozitni dizajn uvek sadrži duplo više zvezdastih tačaka nego ispitivanih faktora. One predstavljaju nove ekstremne vrednosti (niske i visoke) za svaki faktor u dizajnu. Originalni oblik centralnog kompozitnog dizajna za tri faktora omogućava kvalitetna predviđanja u okviru celog prostora za dizajn zahvaljujući podešavanjima ispitivanih faktora van opsega obuhvaćenog faktorijalnim delom dizajna. Naziva se sfernim, jer tačke njegovog dizajna opisuju loptu oko faktorijalne kocke (Slika 1.4-2) (*e-Handbook of Statistical Methods*, 2012).



Slika 1.4-2. Šematski prikaz kružnog centralnog kompozitnog dizajna (MathWorks , *e-Documentation Center*).

Pošto ove metode zahtevaju više eksperimenata za određeni broj faktora, nego što je to slučaj sa skrining metodom kao što je frakcioni faktorijalni dizajn, za dobijanje odgovarajućih modela važno je da su svi faktori koji se ispituju značajni. Naziv metodologije potiče od mogućnosti da se modeli za predviđanje mogu iskoristiti za dobijanje trodimenzionalnih dijagrama površine (Allen, 2006).

Značaj uticaja faktora se ispituje primenom raznih statističkih analiza kao što je ANOVA test koji u okviru multiple regresije omogućava ispitivanje odnosa između

jedne zavisno promenljive i jedne ili više nezavisno promenljivih koristeći metodu najmanjih kvadrata. F-test ili Fišerov odnos varijanse predstavlja vrlo pouzdan test za ispitivanje stepena uticaja faktora pri uklapanju modela u eksperimentalne podatke i često se naziva testom značaja regresije. Ovaj test pruža mogućnost za istovremeno ispitivanje značaja više parametara ili za ispitivanje slaganja multiparametarskog modela sa eksperimentalnim podacima. Izračunate vrednosti F_{cal} testiraju se u odnosu na tabelarne vrednosti F_{crit} pri datom nivou pouzdanosti i ukoliko je $F_{cal} > F_{crit}$, uticaj faktora je značajan. Test koji se koristi za procenu adekvatnosti modela je tzv. *Lack of fit* test, kojim se utvrđuje da li se neusklađenost eksperimentalno dobijenih odgovora i onih predviđenih modelom može objasniti eksperimentalnom greškom. Za ovaj test neophodno je izvesti ponovljeni eksperiment u centru eksperimentalnog polja. Dobijena F vrednost za ovaj test mora biti manja od teorijske F vrednosti pri datom nivou verovatnoće. Ukoliko je veća, zaključuje se da se neusklađenost eksperimentalnih podataka i onih dobijenih modelom ne može objasniti eksperimentalnom greškom i tada se model odbacuje.

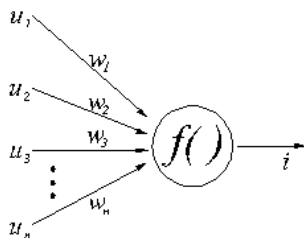
Prilikom primene metodologije površine odgovora, u cilju optimizacije procesa sa više praćenih odgovora, može se primeniti pristup funkcije poželjnosti kao jedan od često korišćenih metoda u industriji (Castillo, 2007). Proizvod ili proces retko imaju samo jednu poželjnu karakteristiku. Obično ih ima više i često su tako povezane da poboljšanje jedne uzrokuje pogoršanje druge karakteristike. Bilo koji proizvod je zapravo kompromis između tih raznih poželjnih izlaznih karakteristika. Razumevanje ograničenja kompromisa omogućava pravljenja ispravnih izbora. Ovo se postiže ili konstrukcijom težinske objektivne funkcije (funkcija poželjnosti) i njene optimizacije, ili ispitivanjem konturnih dijagrama odgovora kreiranih kompjuterskim programom (*e-Handbook of Statistical Methods*, 2012). Metod pronalazi uslove pod kojima se dobijaju najpoželjnije vrednosti odgovora. Za svaki odgovor funkcija poželjnosti dodeljuje brojeve između 1 i 0 mogućim vrednostima odgovora, gde 0 predstavlja potpuno nepoželjnu vrednost odgovora, a 1 predstavlja potpuno poželjnu ili idealnu vrednost odgovora. Pojedinačne poželjnosti su zatim iskombinovane koristeći geometrijsku srednju vrednost, što rezultuje ukupnom poželjnošću. U zavisnosti da li je za pojedini odgovor cilj da bude najveći, najmanji ili da ima konkretnu ciljnu vrednost, koriste se različite funkcije poželjnosti (Castillo, 2007). Pristup poželjnosti se sastoji od nekoliko

koraka: posle izvođenja eksperimenata se razvijaju modeli za sve odgovore, zatim se definišu pojedinačne funkcije poželjnosti za svaki odgovor, i na kraju se maksimizira ukupna poželjnost odgovarajućim odabirom faktora uticaja (*e-Handbook of Statistical Methods*, 2012).

1.4.2. Modelovanje primenom veštačkih neuronskih mreža

Primena veštačkih neuronskih mreža sa eksperimentalnim dizajnom je noviji pristup u proučavanju farmaceutskih sistema koji ima značajne prednosti kao što su modelovanje i optimizacija. Koriste se u dizajniranju formulacija lekova (Ibrić i autori, 2002; Ivić i autori, 2010), optimizaciji proizvodnih procesa (Turkoglu i autori, 1999), kontroli kvaliteta, stabilnosti lekova (Ibrić i autori, 2007), in vitro ispitivanjima oslobađanja leka (Leane i autori, 2003), i in vitro-in vivo korelaciji (Parojčić i autori, 2007). Novi aspekti primene obuhvataju kombinovanje eksperimentalnog dizajna, metodologije površine odgovora i veštačkih neuronskih mreža u modelovanju i karakterizaciji farmaceutsko-tehnoloških proizvodnih procesa (Hussain i autori, 1994; Plumb i autori, 2002; Miguelez-Moran, 2009).

Veštačke neuronske mreže (engl. *Artificial Neural Networks*, ANN) su biološki inspirisani sistemi za obradu podataka i daju dobre rezultate prilikom predviđanja i modelovanja sistema gde fizički procesi nisu jasni ili su veoma kompleksni. Sačinjene su od velikog broja međusobno povezanih obrađujućih elemenata (neurona) koji su, slično biološkim neuronima, povezani vezama koje sadrže propusne (težinske) koeficijente, koje su po ulozi slične sinapsama (Slika 1.4-3).



Slika 1.4-3. Šematski prikaz strukture neurona ($u_{1..n}$ – ulazni podaci; $w_{1..n}$ – težinski koeficijenti; $f()$ – aktivaciona funkcija; i – izlazni podatak) (Ilić, 1999).

Većina mreža ima neku vrstu pravila za obučavanje, čime se koeficijenti veza između neurona podešavaju na osnovu ulaznih podataka. Zbir ulaznih vrednosti neurona pomnoženih sa odgovarajućim težinskim koeficijentima se propušta kroz aktivacionu funkciju i dobijena vrednost predstavlja izlaz iz neurona (Ilić, 1999; Kasabov, 1996; Krose i van der Smagt, 1996).

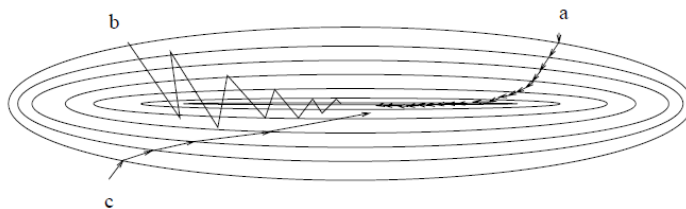
1.4.2.1. Proces učenja veštačke neuronske mreže

Postoji tri tipa obučavanja u zavisnosti od vrste podataka koji se predstavljaju mreži (nadgledano, obučavanje ocenjivanjem, samoorganizacija), i najčešće se koristi nadgledano obučavanje gde se mreži predstavljaju ulazni podaci i očekivani izlazni podaci. Generalno je proces učenja neuronske mreže opisan karakteristikom koja se zove konvergencija. Učenje se odigrava kroz nekoliko ciklusa (iteracija, epoha) propagacije jednog ili više primera za trening kroz mrežu, dobijene vrednosti na izlazu mreže se upoređuju sa očekivanim, vrši se izračunavanje greške i podešavanje težine veza kako bi se smanjila razlika između trenutnog i željenog izlaza. Mreža reaguje sve bolje na podatke za treniranje što se više puta predstavljaju mreži tokom treniranja, sve dok se ne postigne željeni izlaz. Učenje je završeno kada se težine sinaptičkih veza više ne menjaju (Ilić, 1999; Kasabov, 1996).

Druga generalna karakteristika neuronskih mreža je generalizacija. Po završenom treniranju mreže, novi ulazni podaci predstavljeni mreži aktiviraju poznate procedure, tj. mreža proizvodi izlaz sličan izlazu prilikom treniranja, ukoliko je ulaz sličan onom iz faze treniranja, tj. slični stimulusi izazivaju slične reakcije (Kasabov, 1996).

Tokom učenja mreže dolazi do podešavanja težine veza između jedinica u skladu sa određenim pravilima modifikacije (Krose i van der Smagt, 1996). Primena generalizovanog delta pravila omogućava pronalaženje optimalnih vrednosti težina koje minimizuju grešku metodom koja se zove pad gradijenta. Pravi pad gradijenta zahteva da se izvršavaju vrlo mali koraci. Iz praktičnih razloga treba izabrati što veću brzinu učenja, a bez stvaranja oscilacija. Jedan od načina da se izbegnu velike oscilacije je stvaranje zavisnosti promene težine od prethodne promene težine veze, dodavanjem momentuma koji doprinosi inerciji pre sledeće promene težine u zavisnosti od pravca prethodne promene. Kada se ne koristi momentum, pri malim brzinama učenja potrebno

je mnogo vremena kako bi se postigao minimum greške, dok se pri velikim brzinama učenja minimum nikada ne postiže zbog oscilacija. Uvođenjem momentuma minimum se postiže brže (Slika 1.4-4) (Krose i van der Smagt, 1996).



Slika 1.4-4. Prostor opadanja težine: (a) mala brzina učenja; (b) velika brzina učenja gde su primetne oscilacije; (c) velika brzina učenja sa dodatim momentumom (Krose i van der Smagt, 1996).

Evaluacija greške aproksimacije mreže može da se izvede kroz procenu dva tipa greške. Prvi tip je greška koja procenjuje koliko dobro trenirana mreža aproksimira primere korišćene za trening. Drugi tip greške procenjuje koliko dobro mreža može da generalizuje odnosno reaguje na nove ulazne vektore (Kasabov, 1996).

Opšta formula za izračunavanje greške bila bi:

$$RMSE = [\sum (y_{ip} - y_{im})^2 / n]^{1/2} \quad (1.4-2)$$

gde je RMSE koren kvadrata srednje greške, y_p je predviđeni odgovor, y_m je odgovor dobijen u eksperimentu, i n je broj eksperimenata, podataka za treniranje MLP (Bishop, 1995).

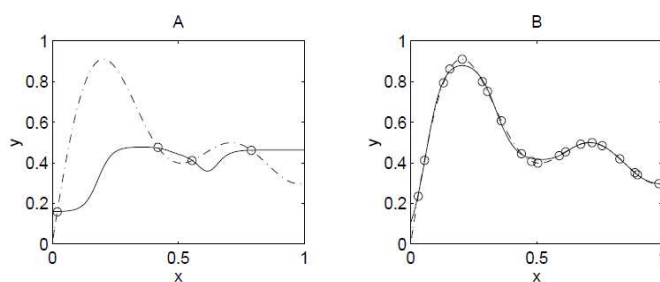
Greška aproksimacije je pod uticajem nekoliko faktora: algoritma za učenje i broja ciklusa jer to određuje koliko je greška smanjena posle treniranja, zatim od broja i kvaliteta uzoraka za učenje jer je pitanje koliko dobro uzorci predstavljaju aktuelnu funkciju, i na kraju od broja skrivenih jedinica jer to određuje ekspresivnu moć mreže (Krose i van der Smagt, 1996).

Veliki broj skrivenih jedinica vodi ka maloj grešci tokom treniranja ali to ne vodi obavezno ka maloj grešci kod testiranja. Može se da desiti da je mreža odlično usklađena sa uzorcima za učenje ali zbog prevelikog broja skrivenih jedinica njena funkcija može biti mnogo složenija u odnosu na originalnu funkciju i sa test podacima može davati loša predviđanja. Mreža takođe može da fituje i “šum” koji postoji kod

svakog realnog uzorka, umesto da izvrši aproksimaciju tako da “šum” ne narušava predviđanje sa test podacima (Krose i van der Smagt, 1996).

Preterano treniranje (engl. *overtraining*) je fenomen koji se dešava kada posle određenog broja ciklusa greška testiranja počinje da raste a greška treniranja nastavi da opada i u tom trenutku bi trebalo prekinuti proces treniranja (Kasabov, 1996).

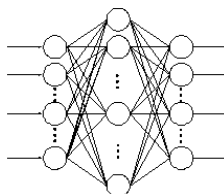
Sa porastom broja uzoraka za učenje obično greška učenja raste, a test greška opada (Slika 1.4-5). (Krose i van der Smagt, 1996).



Slika 1.4-5. Efekat grupe podataka za učenje na generalizaciju. Isprekidana linija predstavlja željenu funkciju, primeri za učenje su kružići, aproksimacija od strane mreže je puna linija. Korišćeno je 5 skrivenih jedinica i (a) 4 primera za učenje; (b) 20 primera za učenje (Krose i van der Smagt, 1996).

1.4.2.2. Višeslojni perceptron

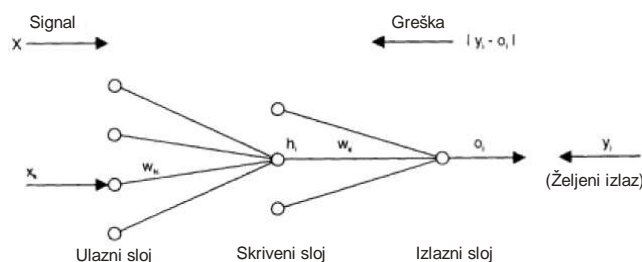
Najčešće korišćena veštačka neuronska mreža danas je višeslojni perceptron (engl. *Multiple Layer Perceptron*, MLP). U pitanju je višeslojna neuronska mreža koja pored ulaznog i izlaznog sloja sadrži neurone na bar jednom srednjem (skrivenom) sloju (Slika 1.4-6).



Slika 1.4-6. Model neuronske mreže sa ulaznim, skrivenim i izlaznim slojem (Ilić, 1999).

Povezivanje neurona u višeslojnu mrežu omogućava obradu veoma složenih (nelinearnih) funkcija, zahvaljujući nelinearnim aktivacionim funkcijama na skrivenim slojevima. Arhitekturu ANN određuju broj neurona, broj neuronskih slojeva i specifično uređenje i povezivanje neurona u okviru mreže. Prvi sloj (ulazni) je jedini sloj koji prima signale iz okruženja i prenosi ih sledećem sloju (skriveni sloj), koji obrađuje ove

podatke i izdvaja osobine i šeme iz primljenih signala. Podaci koji se smatraju važnim upućuju se izlaznom, poslednjem sloju mreže kada se dobijaju konačni rezultati obrade (Ilić, 1999). Informacije se pri tom prostiru samo u jednom smeru, od ulaza ka izlazu (engl. *feedforward*). Prilikom obučavanje mreže koristi se nelinearna, sigmoidna aktivaciona funkcija, a algoritam koji nadzire obučavanje je BP algoritam, što znači da se signal propagira unapred a greška unazad (*error backpropagation* (engl.)) (Slika 1.4-7) (Ilić, 1999).



Slika 1.4-7. Šematski prikaz učenja MLP (Kasabov, 1996).

Algoritam se razvija postupno kroz određen broj epoha. U svakoj epohi podaci za treniranje se ponovo šalju u mrežu, i ciljni i realni izlazi se porede i računa se greška. Početna konfiguracija mreže je nasumična a treniranje prestaje kada prođe određeni broj epoha, kada greška dostigne prihvatljivi nivo, ili kada prestane smanjenje greške.

Jedan od problematičnih aspekata primene višeslojnog perceptrona sa BP algoritmom je rešavanje pitanja na koji način izabrati optimalne parametre kao što su broj skrivenih slojeva i broj jedinica u ovim slojevima i podesiti nekoliko kontrolnih parametara kao što su broj epoha (ciklusa), brzina učenja, momentum i dr (Bishop, 1995; Haykin, 1994; Kasabov, 1996).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA:

Cilj istraživanja je unapređenje razumevanja procesa sušenja raspršivanjem primenom koncepta dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju (*Quality by Design, engl.*).

Istraživanje se sastoji iz dva dela koja imaju za cilj:

1. Razvoj procesa sušenja raspršivanjem kao tehnologije pogodne za **obezbeđivanje homogenosti praškova i, posledično, ujednačenosti doziranja nisko doziranih lekovitih supstanci** (model supstanca **naratriptan hidrohlorid**). Istraživanje obuhvata karakterizaciju i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem odabrane formulacije, kao i optimizaciju procesa primenom metodologije površine odgovora i veštačkih neuronskih mreža, uz fizičko-hemijsku karakterizaciju polaznih materijala (lekovite supstance i ekscipijensa) i dobijenog praška.
2. Razvoj procesa sušenja raspršivanjem u postupku proizvodnje praška sa **teško rastvorljivim model supstancama**, u cilju poboljšanja rastvorljivosti formiranjem kompleksa sa ciklodekstrinima (model supstance **vorikonazol i aripiprazol**). Istraživanje obuhvata ispitivanje mogućnosti primene dva derivata beta-ciklodekstrina i razvoj formulacije rastvora za raspršivanje sa slabo rastvorljivim supstancama, karakterizaciju i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem odabrane formulacije, kao i optimizaciju procesa primenom metodologije površine odgovora i veštačkih neuronskih mreža, uz fizičko-hemijsku karakterizaciju korišćenih polaznih materijala (lekovite supstance i ekscipijensa) i dobijenih praškova.

U okviru razvoja procesa sušenja raspršivanjem cilj je definisati **kritične attribute kvaliteta proizvoda, kritične attribute polaznih materijala i procesa**, a zatim okarakterisati **prostor za dizajn kvaliteta**.

3. PRVI DEO ISTRAŽIVANJA

3.1. UVOD

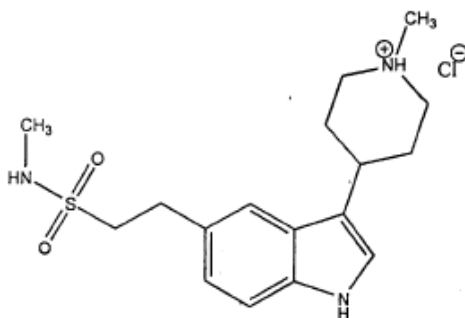
U skladu sa principima dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju proizvoda (QbD), na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika odabrane model lekovite supstance i karakteristika čvrstih farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem leka, najpre je definisan ciljani profil kvaliteta praška kao međuproizvoda koji se može u daljim fazama razvoja koristiti u proizvodnji čvrstih doziranih oblika.

Na osnovu ciljanog profila kvaliteta praška definisani su kritični atributi kvaliteta praška, i izvršena je analiza rizika u cilju definisanja potencijalno kritičnih formulacijskih i procesnih promenljivih za sušenje raspršivanjem vodenog rastvora formulacije sa niskom doziranom lekovitom supstancom.

3.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike naratriptan hidrohlorida

Naratriptan hidrohlorid je relativno nova lekovita supstanca iz grupe selektivnih 5-hidroksitriptamin agonista (triptana) koja se koristi u terapiji migrene.

Hemijska struktura leka prikazana je na Slici 3.1.1-1.



Slika 3.1.1-1. Naratriptan hidrohlorid (N-metil-3-(1-metil-4-piperidinil)-1H-indol-5-etansulfonamid hidrohlorid, molekulska formula $C_{17}H_{25}N_3O_2S \cdot HCl$, Mr 371.93).

Naratriptan hidrohlorid je skoro beo do bledo žut kristalan prašak sa temperaturom topljenja oko 246°C. Ne ispoljava polimorfizam. Slaba je organska baza sa pKa vrednošću 9.7 (piperidinil azot). Napolarna je lekovita supstanca sa koeficijentom distribucije $\log D = -0.34$. Naratriptan hidrohlorid je lako rastvorljiv u dimetilsulfoksidu

i teško rastvorljiv u metanolu (*Product information, Naramig tablets, GlaxoSmithKline*).

Jedna od važnijih karakteristika lekovite supstance je rastvorljivost u vodenim medijumima, jer ona može biti ograničavajući faktor u pripremi rastvora za raspršivanje, kao i faktor važan za oslobađanje iz lekovitog oblika. Rezultati ispitivanja rastvorljivosti u vodenim medijumima različitih pH vrednosti, dobijeni primenom standardne *shake-flask* (engl.) metode, prikazani su u Tabeli 3.1.1-1 (*in-house* metoda, Hemofarm a.d., Srbija). Na osnovu dobijenih rezultata rastvorljivost naratriptan hidrohlorida u ispitivanom pH opsegu definiše se kao umerena, prema definicijama rastvorljivosti iz Evropske farmakopeje.

S druge strane, prema FDA smernici za Biofarmaceutski sistem klasifikacije (BCS) u cilju klasifikacije leka potrebno je razmotriti rastvorljivost i permeabilnost leka. Moglo bi se reći da naratriptan hidrohlorid pripada BCS klasi 3 jer se odlikuje visokom rastvorljivošću i niskom permeabilnošću. Naime, lek se smatra visoko rastvorljivim ako se maksimalna doza rastvara u manje od 250 ml vode u ispitivanom opsegu pH vrednosti, što je ispunjeno za rastvorljivost maksimalne doze 2.5mg naratriptana. Što se tiče permeabilnosti, lek se smatra visoko permeabilnim ako je nivo resorpcije kod ljudi veći od 90 % od primenjene doze u poređenju sa intravenskom referentnom dozom (apsolutna bioraspoloživost). Studija u kojoj je određivana apsolutna bioraspoloživost naratriptana pokazuje da bioraspoloživost posle oralne primene u odnosu na intravenski put primene iznosi 63-74 %. (*Product information, Naramig tablets, GlaxoSmithKline*).

Tabela 3.1.1-1. Rastvorljivost naratriptan hidrohlorida u različitim vodenim medijumima

Medijum	Rastvorljivost (mg/ml)	
	na 37°C	na 25°C
Prečišćena voda	28.1	27.4
0.1M hlorovodonična kiselina pH 1.2	11.5	9.4
Acetatni pufer pH 4.5	27.6	26.8
Fosfatni pufer pH 6.8	30.4	23.6

Studije forsirane degradacije ukazuju da je u pitanju relativno stabilna lekovita supstanca, termostabilna i fotostabilna je, a kao put degradacije izdvaja se oksidacija (*Naratriptan hydrochloride Drug Master File, Hetero Drugs Limited, Indija*).

3.1.2. Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (CPK)

Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (praška) sa naratriptan hidrohloridom prikazan je u Tabeli 3.1.2-1.

Tabela 3.1.2-1. Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda

Elementi kvaliteta	Cilj	
Međuproizvod	Prašak	
Put primene	Oralni	
Profil oslobađanja leka	Trenutno oslobađanje leka	
Koncentracija leka	1.3% ¹	
Atributi kvaliteta	Izgled	
	Identifikacija	
	Sadržaj	
	Ujednačenost sadržaja	Specifikacije u skladu sa oficinalnim ili drugim standardima kvaliteta koje potvrđuju bezbednost i efikasnost tokom roka trajanja leka
	Brzina rastvaranja	
	Hemijska stabilnost	
	Fizička stabilnost	
	Rezidualni rastvarači	
Sadržaj vlage		
Mikrobiološka čistoća		

¹Terapijska oralna doza naratriptan hidrohlorida je 2.5 mg tako da bi u čvrstim doziranim oblicima koncentracija leka bila niska, a za potrebe istraživanja kao ciljna koncentracija leka u prašku kao međuproizvodu definisana je koncentracija 1.3%.

3.1.3. Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda (KAK)

Kada je koncentracija leka u doziranom obliku niska kao što je to slučaj sa naratriptan hidrohloridom (manja od 5 %), postizanje ujednačenosti sadržaja može biti poseban izazov. Imajući to u vidu, kao i karakteristike naratriptan hidrohlorida, kao potencijalno pogodan proces izrade praška odabrana je tehnologija sušenja raspršivanjem vodenog rastvora lekovite supstance i ekscipijenasa. U odnosu na tu polaznu osnovu, kao i uzimajući u obzir ciljani profil definisani su kritični atributi kvaliteta međuproizvoda (praška dobijenog sušenjem raspršivanjem) (Tabela 3.1.3-1).

Tabela 3.1.3-1. Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda (KAK)

Atributi kvaliteta	Cilj	Kritičnost	Opravdanost
Izgled	Homogeni izgled	Ne	Izgled nije direktno povezan sa bezbednošću i efikasnošću.
Identifikacija	Pozitivna na lekovitu supstancu	Da ¹	Iako je identifikacija kritična za bezbednost i efikasnost, ovaj atribut se može efikasno kontrolisati i pratio bi se tokom puštanja leka u promet.
Sadržaj	95-105% od deklarisanе vrednosti	Da	Varijabilnost sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Ujednačenost sadržaja	90-110%, RSD ≤5%	Da	Varijabilnost u ujednačenosti sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Brzina rastvaranja	Ne manje od 80% od deklarisanе vrednosti za 45 minuta	Da	Neusaglašenost sa specifikacijom za brzinu rastvaranja može da utiče na bioraspoloživost. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Hemijska stabilnost	Profil nečistoća u skladu sa oficinalnim zahtevima/ICH smernicama i u skladu sa profilom nečistoća referentnog proizvoda.	Da	Degradacioni proizvodi mogu da utiču na bezbednost i efikasnost i moraju biti kontrolisani. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Fizička stabilnost	Što manja promena tokom vremena	Da	Fizička stabilnost može uticati na kvalitet i mora biti kontrolisana. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Rezidualni rastvarači	Profil rezidualnih rastvarača u skladu sa oficinalnim zahtevima/ICH smernicama	Da ¹	Rezidualni rastvarači mogu uticati na bezbednost. U proizvodnji se ne bi koristili organski rastvarači.
Sadržaj vlage	Pratiti	Da	Sadržaj vlage može uticati na degradaciju i mikrobiološki rast u lekovitom proizvodu. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Mikrobiološka čistoća	U skladu sa EP 2.6.12 i 2.6.13	Da ¹	Neusaglašenost sa specifikacijom utiče na bezbednost pacijenta. Generalno, rizik od mikrobiološkog rasta je mali kod čvrstih doziranih oblika.

¹Formulacijske i procesne promenljive ne utiču na ove kritične attribute kvaliteta, tako da se izostavljaju iz daljeg razmatranja iako su važni elementi kvaliteta.

Kao kritični atribut kvaliteta međuproizvoda posebno se izdvaja homogenost praška, odnosno ujednačenost sadržaja lekovite supstance u prašku. Kritični atributi kvaliteta svakako bi bili i odgovarajuća hemijska stabilnost, kao i profil oslobađanja lekovite supstance sa ciljem da se obezbedi trenutno oslobađanje. Pošto na ove attribute dodatno mogu da utiču ekscipijensi i procesni parametri proizvodnih faza koje bi usledile nakon proizvodnje praška sušenjem raspršivanjem, fokus se trenutno ne usmerava na ove attribute. S druge strane, pošto bi se u fazi proizvodnje praškova sušenjem raspršivanjem, podešavanjem procesnih parametara moglo uticati na sadržaj vlage u praškovima i sa tog aspekta potencijalno na stabilnost, kao kritični atribut kvaliteta proizvoda izdvaja se i sadržaj vlage u dobijenim praškovima.

3.1.4. Definisane potencijalno kritičnih atributa kvaliteta polaznih materijala i procesnih parametara

3.1.4.1. Analiza rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance

Na osnovu fizičko-hemijskih i bioloških osobina lekovite supstance, i u odnosu na odabranu tehnologiju izrade (sušenje raspršivanjem rastvora) izvršena je analiza rizika atributa lekovite supstance za kritične attribute kvaliteta međuproizvoda.

U analizi rizika korišćena je tehnika Preliminarne analize opasnosti (engl. *Preliminary Hazard Analysis – PHA*) (Rausand, 2005; *Sakura tablet case study*, 2008).

Najpre su iz ciljanog profila izdvojeni sledeći parametri kvaliteta: sadržaj, ujednačenost sadržaja, brzina rastvaranja, hemijska i fizička stabilnost i sadržaj vlage. Zatim su izdvojene osobine lekovite supstance koje mogu da utiču na parametre kvaliteta: oblik čvrstog stanja (amorfno ili kristalno), veličina čestica, hemijska stabilnost, protočnost. Za svaku od tih osobina procenjen je nivo rizika uticaja korišćenjem PHA na osnovu težine (ozbiljnosti) rizika i verovatnoće dešavanja.

Rezultati ocene i rangiranja rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance prikazani su u Tabeli 3.1.4-1

Tabela 3.1.4-1 Analiza rizika za atribute kvaliteta lekovite supstance

Rizik	Događaj	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Oblik čvrstog stanja	Sadržaj	1	1	L
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	2	1	L
	Hemijska stabilnost	2	1	L
	Fizička stabilnost	2	1	L
	Sadržaj vlage	2	1	L
Veličina čestica	Sadržaj	3	1	L
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Brzina rastvaranja	3	1	L
	Hemijska stabilnost	1	1	L
	Fizička stabilnost	1	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L
Hemijska stabilnost	Sadržaj	2	3	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	3	3	M
	Fizička stabilnost	2	2	L
	Sadržaj vlage	1	1	L
Protočnost	Sadržaj	2	1	L
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Brzina rastvaranja	2	1	L
	Hemijska stabilnost	1	1	L
	Fizička stabilnost	2	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L

L – nizak nivo rizika; M – srednji nivo rizika.

Proizvodni postupak podrazumeva rastvaranje lekovite supstance i sušenje rastvora raspršivanjem. Na taj način je rizik svih navedenih polaznih atributa kvaliteta lekovite supstance, osim hemijske stabilnosti, mali za sve atribute kvaliteta međuproizvoda. Hemijska stabilnost lekovite supstance kritična je za atribute kvaliteta kao što su sadržaj i degradacioni proizvodi. Iako se zahvaljujući relativno dobroj stabilnosti lekovite supstance odabrana tehnologija može smatrati pogodnom jer može rezultovati praškom homogenog sastava i dobre rastvorljivosti, zbog očekivanog prelaska u amorfni oblik stabilnost može biti smanjena što bi se ispitivalo u daljim fazama razvoja.

3.1.4.2. Odabir ekscipijenasa

Prilikom odabira ekscipijenasa pogodnih za proizvodnju praška sušenjem raspršivanjem rastvora, kritični atributi bili su njihova rastvorljivost u vodi, i procesibilnost odnosno mogućnost efikasnog sušenja raspršivanjem. Rastvaranjem polaznih materijala mogu se eliminisati razlike u osobinama među različitim proizvodnim serijama, kao što je veličina čestica koja može biti uzrok nehomogenosti praškova kao i drugih proizvodnih problema. Prednost u formulacijama sa niskim udelom lekovite supstance je ta što u formulaciji dominiraju osobine ekscipijenasa zahvaljujući kojima je olakšano izvođenje proizvodnog procesa.

Odabrani su ekscipijensi laktoza i maltodekstrin, poznati po relativno dobroj rastvorljivosti u vodi i procesibilnosti prilikom sušenja raspršivanjem (Chidavaenzi i autori, 1997; Gonnissen i autori, 2007; Goula i Adamopoulos, 2008). Vodeni rastvor naratriptana, laktoze i maltodekstrina je korišćen kao najprostiji tip medijuma za raspršivanje. Laktoza monohidrat ima ulogu punioca i prisutna je u najvećem udelu (83.4 %). Maltodekstrin (15.3 %) obezbeđuje poboljšanje proizvodnog prinosa prilikom sušenja raspršivanjem i inhibitor je kristalizacije, zahvaljujući tome što povećava temperaturu staklastog prelaza komponenata formulacije (Adhikari i autori, 2004; Goula i Adamopoulos, 2008). Lekovita supstanca prisutna je u relativno niskoj koncentraciji (1.3%).

3.1.4.3. Analiza rizika za procesne parametre sušenja raspršivanjem

Iako se smatra složenim tehnološkim procesom, sušenje raspršivanjem omogućava da se podešavanjem brojnih procesnih parametara u skladu sa postavljenim ciljem definiše širok prostor za dizajn. Kao ciljna osobina koprociranog praška sa naratriptan hidrohloridom definisana je što manja vrednost za sadržaj vlage, a što se tiče kvaliteta procesa kao cilj je definisano postizanje što većeg proizvodnog prinosa.

Za definisane ciljeve, izvršena je inicijalna analiza rizika za sledeće procesne parametre: temperaturu ulaznog vazduha (temperaturu vazduha za sušenje na ulazu u komoru), brzinu pumpe (brzinu kojom se rastvor dovodi do raspršivača), brzinu aspiratora (brzinu protoka vazduha za sušenje podešavanjem rada aspiratora tj. brzinu kojom se vazduh za

sušenje izvlači kroz uređaj), koncentraciju rastvora (medijuma koji se raspršuje), vlažnost ulaznog vazduha, i atomizaciju (količinu energije koja se troši za raspršivanje) (Tabela 3.1.4-2.). Analiza rizika izvedena je primenom FMEA analize (engl. *Failure Mode Effects Analysis*). Rizik je procenjen na osnovu tri kriterijuma: težine, verovatnoće javljanja i detektabilnosti (vremena detekcije), tako što je broj prioritarnog rizika dobijen množenjem ove tri vrednosti korišćen u rangiranju rizika (*Sakura tablet case study, 2008; RMWG-07 case study, 2008*).

Za ispitivanje uticaja i optimizaciju odabrana su četiri potencijalno kritična procesna parametra: temperatura ulaznog vazduha, brzina pumpe, brzina aspiratora i koncentracija rastvora. Temperatura ulaznog vazduha obezbeđuje dovod toplotne energije, brzina pumpe i koncentracija rastvora utiču na količinu tečnosti koja se dovodi za isparavanje i samim tim na ishod prenosa mase i energije i formiranje čestica, a aspirator može da utiče na ukupnu ulaznu energiju i da dovede do povećanja temperature izlaznog vazduha. Uticaj parametara koji nisu uključeni u optimizaciju smanjen je održavanjem u uskim granicama ili održavanjem konstantnih vrednosti (vlažnost ulaznog vazduha, atomizacija).

Parametri koji su odabrani da se dodatno prate bez unapred definisane specifikacije su temperatura izlaznog vazduha (koja odgovara temperaturi proizvoda tokom procesa) i veličina čestica dobijenog praška, i za njih nije izvršena formalna analiza rizika.

3.2. MATERIJALI I METODE

3.2.1. Materijali

Naratriptan hidrohlorid (*Hetero Drugs Limited, Indija*), maltodekstrin DE 14 (*Cargill, Belgija*), laktoza monohidrat 200 mesh (*Alpavit, Nemačka*), i prečišćena voda (*Hemofarm a.d., Srbija*) su sastojci formulacije koja je bila korišćena u eksperimentima.

Tabela 3.1.4-2. Analiza rizika za procesne parametre sušenja raspršivanjem

Ciljni profil proizvoda/svojstva kvaliteta	Potencijalni modalitet ispada	Efekat	Težina	Verovatnoća javljanja	Detektabilnost	Broj prioriternog rizika ¹
Sadržaj vlage	Temperatura ulaznog vazduha	Na nižim temperaturama zbog veće relativne vlažnosti vazduha kojim se vrši sušenje i manje efikasnosti sušenja, može doći do povećanja sadržaja rezidualne vlage u prašku.	2	5	3	30
Sadržaj vlage	Brzina pumpe	Veća brzina može da dovede do povećanja sadržaja vlage zbog toga što treba da ispari veća količina vode.	3	5	3	45
Sadržaj vlage	Brzina aspiratora	Veća brzina može da dovede do povećanja sadržaja vlage u prašku zbog skraćenog zadržavanja u komori.	1	5	3	15
Sadržaj vlage	Koncentracija rastvora	Niža koncentracija može da dovede do povećanja sadržaja vlage jer ima više vode za isparavanje.	4	5	1	20
Sadržaj vlage	Vlažnost vazduha	Veća vlažnost vazduha može da dovede do povećanja sadržaja vlage jer je smanjen kapacitet sušenja ali rad uređaja u klimatizovanom prostoru smanjuje rizik.	3	2	1	6
Sadržaj vlage	Atomizacija	Nema direktnog uticaja na sadržaj vlage u prašku.	-	-	-	-
Proizvodni prinos	Temperatura ulaznog vazduha	Viša temperatura ulaznog vazduha može da dovede do povećanja prinosa zbog toga što je suvlji proizvod manje lepljiv.	3	4	4	36
Proizvodni prinos	Brzina pumpe	Veća brzina može da dovede do smanjenja prinosa ako se dobija vlažniji proizvod pa je više lepljiv.	3	5	4	60
Proizvodni prinos	Brzina aspiratora	Veća brzina može da dovede do povećanja prinosa zbog boljeg odvajanja u ciklonu.	1	5	4	20
Proizvodni prinos	Koncentracija rastvora	Veća koncentracija može da dovede do povećanja prinosa zbog toga što se krupnije čestice bolje odvajaju u ciklonu.	4	5	1	20
Proizvodni prinos	Vlažnost ulaznog vazduha	Veća vlažnost vazduha može da dovede do smanjenja prinosa jer može da se poveća lepljivost proizvoda, ali rad uređaja u klimatizovanom prostoru smanjuje rizik.	3	2	1	6
Proizvodni prinos	Atomizacija	Nema direktnog uticaja na prinos.	-	-	-	-

¹Kada je broj prioriternog rizika: < 20, postoji nizak rizik; ≥ 20 i < 40, postoji srednji rizik; ≥ 40, postoji visok rizik.

3.2.2. Priprema praškova

Kompozitni sistemi su sušeni raspršivanjem vodenih rastvora na uređaju *Büchi 290-Mini Spray Dryer* (*Büchi Laboratoriums-Technik AG*, Švajcarska) opremljenom sa standardnim mlaznim raspršivačem sa dva fluida. U svim eksperimentima količina rastvora je bila 100 g i brzina vazduha za raspršivanje je bila podešena na 600L/h. Preostali procesni parametri su bili podešeni prema zahtevima pojedinačnih eksperimenata određenih eksperimentalnim dizajnom.

Temperatura izlaznog vazduha je merena pomoću temperaturnog senzora koji se nalazi u delu uređaja za sušenje raspršivanjem odmah posle cilindra u kome se vrši raspršivanje (koji je ujedno i komora za sušenje), tako da je omogućeno merenje temperature vazduha koji nosi čvrste čestice pre njihovog ulaska u ciklonski separator. Stoga se merena temperatura označava kao temperatura izlaznog vazduha.

Proizvodni prinos, odnosno masa praška prikupljena posle svakog eksperimenta sušenja raspršivanjem izražena je kao procenat početne količine praškova od kojih je pripremljen rastvor.

3.2.3. Karakterizacija praškova

Određivanje sadržaja vlage i veličine čestica praškova vršeno je za svaki eksperiment u okviru određenog eksperimentalnog dizajna, dok su ostale osobine praškova ispitivane na uzorcima dobijenim nakon optimizacije procesa.

3.2.3.1. Sadržaj vlage

Sadržaj vlage (gubitak sušenjem) određivan je termogravimetrijski na aparatu *Mettler-Toledo HR 83 Halogen moisture analyzer* (*Mettler-Toledo*, Švajcarska) na temperaturi 105°C i u trajanju testa do postizanja pada mase manjeg od 1 mg na 50 sekundi, na veličini uzorka od 1 g. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje dva merenja.

3.2.3.2. Veličina čestica

Veličina čestica praškova je određivana metodom koja se zasniva na difrakciji laserske svetlosti korišćenjem uređaja *Malvern Mastersizer 2000 particle size analyzer* (*Malvern Instruments*, Velika Britanija). Dispergovanje čestica je vršeno pomoću uređaja *Scirocco 2000 dry powder feeder* (*Malvern Instruments*, Velika Britanija) sa pritiskom 2 bar i brzinom rada uređaja za dispergovanje 50-70%. Raspodela veličine čestica određivana je korišćenjem pratećeg softvera uz odabir *Fraunhofer*-ovog modela. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje dva merenja.

3.2.3.3. Vizuelizacija čestica praška

Vizuelizacija praškova sa ciljem opisivanja oblika, morfologije i karakteristika površine čestica, izvršena je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa *Philips ESEM XL 30 FEG* (*Philips Electron Optics*, Holandija). Uzorci su fiksirani pomoću karbonskog adheziva na aluminijumski držač i prevučeni zlatom i zatim fotografisani pri naponu od 10kV. Posmatrani su pod uvećanjem od 1000 do 5000 puta.

3.2.3.4. Ujednačenost sadržaja naratriptan hidrohlorida

Ujednačenost sadržaja naratriptan hidrohlorida u praškovima dobijenim sušenjem raspršivanjem proverena je odgovarajućom HPLC metodom. Analiza je vršena na uređaju *Agilent HPLC system, 1200 Series* (*Agilent*, SAD). Korišćena je kolona 150x4.6mm punjena silika česticama sa hemijski vezanim fenil grupama, veličine 3 μ m (*Waters Spherisorb Phenyl*, *Waters Corporation*, SAD). Mobilna faza se sastojala od natrijum dihidrogen fosfatnog pufera (pH 5.0) i izopropanola u odnosu 90:10. Protok mobilne faze je bio 1.3 ml/min, injekciona zapremina 50 μ l, temperatura kolone 35°C, i UV detektor je bio podešen na 282 nm.

3.2.3.5 Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Termička karakterizacija praškova vršena je pomoću diferencijalnog skenirajućeg kalorimetra *Shimadzu DSC-50 Differential Scanning Calorimeter* (*Shimadzu Corporation*, Japan). Ispitivani su uzorci: polazni materijali pojedinačno (naratriptan hidrohlorid, laktoza, maltodekstrin), njihove fizičke smeše dobijene mešanjem u kesi i mešanjem pomoću tarionika i pistila, i prašak dobijen sušenjem raspršivanjem. Ispitivani uzorci (2–5 mg u zatvorenoj aluminijskoj posudici) su bili tretirani u temperaturnom opsegu 30-300°C, pri brzini zagrevanja od 10°C/min u struji inertnog gasa azota, pri protoku od 25 cm³/min. Prazna aluminijska posudica je korišćena kao slepa proba.

3.2.3.6. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

ATR-FTIR spektroskopija, primenjena je za snimanje FTIR spektara direktno iz praškova, pomoću *Shimadzu IR-Prestige-21 FT-IR spektrometra* (*Shimadzu Europa GmbH*, Nemačka), kuplovanog sa horizontalnim sistemom za smanjenje totalne refleksije *Golden Gate MKII single-reflection ATR system* (*Specac*, Velika Britanija) opremljenim sa sočivom od cink-selenida, kojim se omogućava direktno snimanje uzoraka. Ispitivani su uzorci: sirovine pojedinačno (naratriptan hidrohlorid, laktoza, maltodekstrin), njihova fizička smeša dobijena mešanjem u kesi, i prašak dobijen sušenjem raspršivanjem. Spektri su snimani u oblasti 500-4000cm⁻¹, pri rezoluciji od 4cm⁻¹, sa 32 skeniranja za svaki spektar.

3.2.3.7. Nasipna i tapkana gustina praškova

Nasipna i tapkana gustina praškova je određivana pomoću graduisane menzure i aparata za merenje tapkane zapremine *Erweka SVM* (*Erweka*, Nemačka). Nasipna gustina je određivana tako što je prethodno prositan prašak (sito 1 mm) pažljivo sipan u graduisanu menzuru od 100 ml (sa podeocima očitavanja do 1 ml), do zapremine od 100ml i nakon očitane mase m izvršen je preračun nasipne gustine $\rho_N(g/ml)=m/100$. Zatim je menzura fiksirana na aparaturu, na kojoj je vršeno tapkanje praška do

postizanja smanjenja nivoa praška u menzuri ≤ 2 ml, između dva uzastopna seta tapkanja. Pomoću vrednosti m i očitane tapkane zapremine V_f izvršen je preračun tapkane gustine $\rho_T(g/ml) = m/V_f$. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje tri merenja.

3.2.3.8. Protočnost praškova

Protočnost praškova je određivana na aparatu *Erweka GWF* (*Erweka*, Nemačka), merenjem vremena potrebnog za proticanje određene količine praška iz levka kroz kružni otvor promera 12.5 mm, sa uključenom vibracijom. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje tri merenja.

3.2.4. Eksperimentalni dizajn: skringing ispitivanje i metodologija površine odgovora

Eksperimentalni dizajn je izveden iz dva koraka: prvi korak je bila skringing studija i drugi korak je bilo modelovanje površine odgovora. Sva ispitivanja koja se zasnivaju na eksperimentalnom dizajnu bila su podržana primenom softverskog paketa *Design-Expert® 7.0.0* (*Stat-Ease Inc, SAD*).

3.2.4.1. Skringing ispitivanje

Budući da izbor eksperimentalnog dizajna zavisi od ciljeva eksperimenata i broja faktora koje treba ispitati, u svrhu razvoja proizvodnog procesa, izveden je set višefaktorskih eksperimenata prema takozvanom frakcionom faktorijalnom dizajnu, koji uključuje samo deo punog seta eksperimenata. Svrha je bila da se ispita efekat četiri procesna parametra: temperature ulaznog vazduha, brzine pumpe, brzine aspiratora i koncentracije rastvora na prinos, sadržaj vlage dobijenih praškova, i na temperaturu izlaznog vazduha (Tabela 3.2.4.-1). Procesni parametri su podešavani u skladu sa 2^{4-1} frakcionim faktorijalnim dizajnom. Četiri procesne promenljive su varirane na dva nivoa, tako da je ukupno bilo osam eksperimenata sa različitim kombinacijama nivoa

promenljivih, izvedenih nasumičnim redosledom. Realne i kodirane vrednosti ispitivanih promenljivih su prikazane u Tabeli 3.2.4-1. Eksperimenti 3 i 6 su ponovljeni kako bi se izračunao statistički značaj nezavisnih promenljivih.

Tabela 3.2.4-1. Nezavisne procesne promenljive u 2^{4-1} frakcionom faktorijalnom dizajnu (kodirane i realne vrednosti) i praćeni odgovori

Eksp. br.	$X_1 =$ Brzina aspiratora (%)		$X_2 =$ Brzina pumpe (%)		$X_3 =$ Temp. ulaznog vazduha ($^{\circ}\text{C}$)		$X_4 =$ Konc. rastvora (%)		Odgovori
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	
1	-1	80	-1	10	-1	170	-1	10	
2	+1	100	-1	10	-1	170	+1	30	$Y_1 =$ Prinos (%)
3	-1	80	+1	30	-1	170	+1	30	
4	+1	100	+1	30	-1	170	-1	10	$Y_2 =$ Sadržaj vlage (%)
5	-1	80	-1	10	+1	190	+1	30	
6	+1	100	-1	10	+1	190	-1	10	$Y_3 =$ Temperatura izlaznog vazduha ($^{\circ}\text{C}$)
7	-1	80	+1	30	+1	190	-1	10	
8	+1	100	+1	30	+1	190	+1	30	

Vrednosti za brzinu aspiratora: 100% predstavlja maksimalni protok vazduha od $40 \text{ m}^3/\text{h}$ i 80% predstavlja protok vazduha od $32 \text{ m}^3/\text{h}$.

Vrednosti za brzinu pumpe: 10% odgovara protoku rastvora od oko 3 ml/min, i 30% odgovara protoku rastvora od oko 9 ml/min.

Opsezi ispitivanih parametara su izabrani kako bi se postigli najveći mogući proizvodni prinosi. Izabrane vrednosti za podešavanje brzine aspiratora i brzine pumpe su definisane prema preporukama proizvođača uređaja, imajući u vidu osnovne principe sušenja raspršivanjem. Viša vrednost za podešavanje brzine aspiratora (100%, što odgovara protoku vazduha od $40 \text{ m}^3/\text{h}$) može da obezbedi bolje ciklonsko odvajanje i bolji proizvodni prinos, dok niža vrednost za podešavanje aspiratora (80%, što odgovara protoku vazduha od $32 \text{ m}^3/\text{h}$) može da dovede do postizanja nižeg sadržaja vlage tako što se vreme zadržavanja proizvoda u komori za sušenje povećava kada je izvlačenje vazduha nižeg intenziteta. Brzina pumpe 10% (što odgovara protoku medijuma od oko 3 ml/min) ili 30% (što odgovara protoku medijuma od oko 9 ml/min) su vrednosti izabrane u skladu sa preporukom proizvođača uređaja. Uobičajeno je da se rastvori ili suspenzije laktoze suše raspršivanjem pri nešto višoj temperaturi ulaznog vazduha, oko

170-190°C, i ove vrednosti su izabrane za eksperimentalni dizajn (Berggren i Alderborn, 2004; Chidavaenzi i autori, 1997). Nivo komprimovanog vazduha kojim se vrši raspršivanje medijuma je bio podešen na 4 cm na skali na uređaju (što odgovara 400L/h), što je u okviru opsega vrednosti koje se uobičajeno koriste, i bio je fiksiran na ovoj vrednosti za sve eksperimente (Berggren i Alderborn, 2004; Goula i Adamopoulos, 2004; Mosen i autori, 2006; Murtoma i autori, 2004). Izabrane vrednosti koncentracije rastvora za sušenje raspršivanjem su bile 10% i 30% jer je ovaj opseg korišćen u nekim prethodnim studijama sušenja raspršivanjem rastvora/suspenzija koji su sadržali laktozu (Cassidy i autori, 2000; Islam i Langrish, 2010).

Rezultati dobijeni primenom FFD evaluirani su korišćenjem linearnog modela:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 \quad (3.2.4-1)$$

gde vrednosti b_1 - b_4 predstavljaju regresione koeficijente; Y je predviđena vrednost za praćeni odgovor: prinos (Y_1), sadržaj vlage (Y_2), i temperaturu izlaznog vazduha (Y_3); a vrednosti X predstavljaju glavne efekte variranih promenljivih: brzine aspiratora (X_1), brzine pumpe (X_2), temperature ulaznog vazduha (X_3), koncentracije rastvora (X_4).

3.2.4.2. Metodologija površine odgovora (engl. *Response surface methodology*, RSM)

Posle izvođenja skringing ispitivanja, tri procesna parametra: brzina pumpe (A), temperatura ulaznog vazduha (B), koncentracija rastvora (C), izabrana su za dalju analizu primenom trifaktorskog sfernog centralnog kompozitnog dizajna (engl. *Central composite design*, CCD) sačinjenog od 20 eksperimenata. Analiza varijanse (ANOVA) je izvršena kako bi se odredio značaj svakog faktora, pri nivou značajnosti od 5%. Polinomne jednačine su kreirane kako bi se ustanovile veze među faktorima i odgovorima. Praćeni odgovori su bili prinos (R_1); sadržaj vlage (R_2); srednja veličina čestica (R_3); i temperatura izlaznog vazduha (R_4). Realne i kodirane vrednosti evaluiranih promenljivih, praćenih odgovora i eksperimentalni matriks prikazani su u Tabeli 3.2.4-2.

Tabela 3.2.4-2. Nezavisne procesne promenljive u centralnom kompozitnom dizajnu (kodirane i realne vrednosti) i praćeni odgovori

Eksp. br.	A = Brzina pumpe (%)		B = Temp. ulaznog vazduha (°C)		C = Koncentracija rastvora (%)		Odgovori
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	
1	-1.68	3.18	0	180	0	20	
2	+1	30	+1	190	-1	10	
3	0	20	0	180	0	20	
4	-1	10	+1	190	+1	30	
5	+1.68	36.82	0	180	0	20	
6	0	20	0	180	0	20	R ₁ = Prinos (%)
7	0	20	0	180	+1.68	36.82	
8	0	20	0	180	0	20	
9	0	20	0	180	0	20	R ₂ = Sadržaj vlage (%)
10	0	20	-1.68	163.18	0	20	
11	-1	10	+1	190	-1	10	
12	0	20	0	180	0	20	R ₃ = Srednja veličina čestica (µm)
13	-1	10	-1	170	-1	10	
14	+1	30	-1	170	-1	10	
15	0	20	0	180	0	20	R ₄ = Temperatura izlaznog vazduha (°C)
16	-1	10	-1	170	+1	30	
17	0	20	+1.68	196.82	0	20	
18	0	20	0	180	-1.68	3.18	
19	+1	30	+1	190	+1	30	
20	+1	30	-1	170	+1	30	

Vrednosti za brzinu pumpe: 3.18% odgovara protoku rastvora od oko 1 ml/min, 10% odgovara protoku rastvora od oko 3 ml/min, 20% odgovara protoku rastvora od oko 6 ml/min, 30% odgovara protoku rastvora od oko 9 ml/min i 36.82% odgovara protoku rastvora od oko 11 ml/min.

3.2.5. Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona

U modelovanju procesa sušenja raspršivanjem korišćena je veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona (engl. *Multilayer perceptron, MLP*). Pre treniranja mreže i razvoja modela, definisana je specifikacija za broj skrivenih slojeva i broj jedinica u ovim slojevima. Za aktivaciju neurona odabrana je sigmoidna transfer funkcija. Za treniranje mreže odabran je BP algoritam (engl. *back-propagation, BP*) i podešavani su parametri kao što su broj epoha, brzina učenja, momentum, broj kombinacija. MLP je primenjen korišćenjem komercijalno dostupnog softvera *Statistica Neural Network software (StatSoft, SAD)*.

3.2.6. Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža i metodologije površine odgovora

Ispitivan je potencijal kombinovane primene metodologije površine odgovora (RSM) i veštačkih neuronskih mreža (MLP) u poboljšanju razumevanja procesa i kvaliteta razvoja procesa (Miguélez-Morán, 2009; Plumb i autori, 2002). Neuronske mreže su korišćene za upotpunjavanje liste podataka koji se dalje mogu obraditi matematičkim modelovanjem zasnovanom na eksperimentalnom dizajnu (RSM). S druge strane, metodologija površine odgovora korišćena je za dešifrovanje predviđanja veštačkih neuronskih mreža koja imaju prirodu takozvane crne kutije (Miguélez-Morán, 2009).

Šema eksperimenata koji su korišćeni u razvoju i testiranju različitih modela predstavljena je na Slici 3.2.6-1.

Eksp. br.	RSM1	RSM2	RSM3	MLP1	MLP2
1	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
2	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
3	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
4	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
5	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
6	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
7	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
8	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
9	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
10	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
11	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
12	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
13	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
14	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
15	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
16	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
17	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
18	Red	Green (MLP2)	Green (MLP1)	Red	Grey
19	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
20	Red	Red	Green (MLP1)	Red	Red
21	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

Eksperimentalni podaci korišćeni za razvoj modela

Predviđeni podaci korišćeni za razvoj modela

Eksperimentalni podaci korišćeni za testiranje modela

Eksperimenti koji nisu uključeni u analizu

Slika 3.2.6-1. Šema eksperimenata koji su korišćeni u razvoju i testiranju različitih modela.

Najpre su razvijeni modeli korišćenjem samo eksperimentalno dobijenih podataka CCD dizajna (eksperimenti 1-20, Tabela 3.2.4-2, Slika 3.2.6-1.), primenom metodologije površine odgovora (**RSM1 modeli**) i neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona (**MLP1 model**).

Zatim, kako bi se ispitao potencijal MLP za upotpunjavanje liste podataka (koja odgovara određenom eksperimentalnom dizajnu) iz koje je moguće izvršiti matematičko modelovanje (RSM), korišćenjem jednog manjeg dela eksperimentalnih podataka trenirana je neuronska mreža kako bi se dobio **model MLP2**. Korišćeni su eksperimentalni podaci koji odgovaraju 2^3 faktorijalnom dizajnu u okviru CCD (eksperimenti 2, 4, 11, 13, 14, 16, 19, 20, Tabela 3.2.4-2., Slika 3.2.6-1.). Model MLP2 korišćen je za predviđanje rezultata i upotpunjavanje grupe podataka za preostalih 12 eksperimenata koji po dizajnu odgovaraju CCD. Na ovaj način omogućeno je matematičko modelovanje (primena RSM) dobijene grupe podataka koja se sastoji od kombinacije eksperimentalnih i predviđenih rezultata, i dobijeni su **modeli RSM2** (Slika 3.2.6-1).

U cilju ispitivanja potencijala primene RSM u dešifrovanju takozvane prirode crne kutije predviđanja veštačkih neuronskih mreža, korišćeni su samo predviđeni rezultati za sve eksperimente koji pripadaju CCD, i to oni dobijeni predviđanjem MLP modela sa najboljom korelacijom između predviđenih i stvarno dobijenih rezultata. Primenom RSM na taj način dobijeni su **RSM3 modeli** za svaki odgovor kako bi bili definisani značaj i veze među faktorima (Slika 3.2.6-1). Dobijene matematičke jednačine su analizirane kako bi se na osnovu sličnosti i razlika među modelima unapredilo razumevanje procesa i objasnilo zašto jedan model ima bolju moć predviđanja od drugog.

Sposobnost predviđanja modela ispitivana je test eksperimentom (eksperiment br. 21, Slika 3.2.6-1) koristeći novi set ulaznih promenljivih (brzina pumpe 6 %, temperatura ulaznog vazduha 175°C, koncentracija rastvora 15 %).

Sposobnost predviđanja različitih modela izražavana je kroz preračun koeficijenata korelacije (R^2) za eksperimentalno dobijene i predviđene rezultate.

3.2.7. Optimizacija sušenja raspršivanjem

Nakon izvršene analize procesa, korišćenjem softverskog paketa *Design-Expert*® 7.0.0 (Stat-Ease Inc, SAD) izvršena je numerička optimizacija procesnih parametara za rastvor koncentracije 25%, sa zahtevima za postizanje najvećeg mogućeg prinosa i najmanjeg mogućeg sadržaja vlage, primenom takozvanog pristupa poželjnosti (engl. *Desirability approach*) (Nekkanti i autori, 2009). Zatim je izvršena fizičko-hemijska karakterizacija dobijenog praška.

3.3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.3.1. Skrining ispitivanje

Dobijene eksperimentalne vrednosti (Tabela 3.3.1-1.) za praćene odgovore nakon sprovedenog 2^{4-1} FFD dizajna uklapane su u linearni model i dobijene su sledeće jednačine (u obliku kodiranih faktora):

$$Y_1 = 78.05 + 0.72*X_1 - 6.28*X_2 + 1.85*X_3 - 2.50*X_4 \quad (3.3.1-1)$$

$$Y_2 = 3.26 - 0.013*X_1 + 0.29*X_2 - 0.24*X_3 - 0.29*X_4 \quad (3.3.1-2)$$

$$Y_3 = 81.00 + 0.25*X_1 - 0.25*X_2 + 2.50*X_3 + 0.00*X_4 \quad (3.3.1-3)$$

gde vrednosti Y predstavljaju predviđene vrednosti za praćene odgovore: prinos (Y_1), sadržaj vlage (Y_2), i temperaturu izlaznog vazduha (Y_3); a vrednosti X predstavljaju glavne efekte variranih promenljivih: brzine aspiratora (X_1), brzine pumpe (X_2), temperature ulaznog vazduha (X_3), koncentracije rastvora (X_4).

Tabela 3.3.1-1. Nezavisne procesne promenljive u 2^{4-1} frakcionom faktorijalnom dizajnu (kodirane i realne vrednosti) i dobijeni odgovori

Br. probe	X ₁ = Brzina aspiratora (%)		X ₂ = Brzina pumpe (%)		X ₃ = Temperatura ulaznog vazduha (°C)		X ₄ = Koncentracija rastvora (%)		Y ₁ = Prinos (%)	Odgovori	
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno		Y ₂ = Sadržaj vlage (%)	Y ₃ = Temperatura izlaznog vezduha (°C)
1	-1	80	-1	10	-1	170	-1	10	84.4	3.1	81
2	+1	100	-1	10	-1	170	+1	30	84.6	3.0	81
3	-1	80	+1	30	-1	170	+1	30	62.7	3.8	77
4	+1	100	+1	30	-1	170	-1	10	73.1	4.1	75
5	-1	80	-1	10	+1	190	+1	30	82.9	2.5	80
6	+1	100	-1	10	+1	190	-1	10	85.4	3.3	83
7	-1	80	+1	30	+1	190	-1	10	79.3	3.7	85
8	+1	100	+1	30	+1	190	+1	30	72.0	2.6	86

Vrednosti za brzinu aspiratora: 100% predstavlja maksimalni protok vazduha od 40 m³/h i 80% predstavlja protok vazduha od 32 m³/h.
 Vrednosti za brzinu pumpe: 10% odgovara protoku rastvora od oko 3 ml/min, i 30% odgovara protoku rastvora od oko 9 ml/min.

Dobijeni rezultati za 2^{4-1} FFD pokazali su da samo za proizvodni prinos (Y_1) postoji statistički značajan faktor, brzina pumpe (X_2), gledajući izračunatu p-vrednost $<0,05$ (5% nivo značajnosti). Veća brzina pumpe je rezultovala smanjenim proizvodnim prinosom jer je uticala na razliku u temperaturi između ulaznog i izlaznog vazduha, odnosno pad temperature izlaznog vazduha je bio veći. Što je protok rastvora veći potrebno je više energije za sušenje kapi i ako rezultujuće čestice nisu dovoljno osušene, dolazi do lepljenja proizvoda na zidove u cilindru i smanjenja prinosa. Za odabrani faktorijski dizajn i formulaciju, nisu pronađeni značajni modeli. Stoga su izračunati regresioni koeficijenti iskorišćeni da se na osnovu njihove apsolutne vrednosti eliminiše iz daljeg ispitivanja faktor sa najmanjim uticajem na praćene odgovore, a to je brzina aspiratora. Uticaj tri preostala procesna parametra (brzina pumpe, temperatura ulaznog vazduha i koncentracija rastvora) ispitivan je primenom CCD.

3.3.2. Metodologija površine odgovora (RSM)

Primenom metodologije površine odgovora (RSM) izvršena je obrada rezultata svih 20 eksperimenata CCD dizajna (Tabela 3.3.2-1) i razvijeni su modeli RSM1 za praćene odgovore.

Za većinu odgovora, interakcija između faktora nije bila statistički značajna za ispitivani sistem ispitivan pri nivou značajnosti 5%. S druge strane, neki autori su zaključili da kod sušenja raspršivanjem mnoge interakcije među procesnim parametrima mogu biti značajne za osobine praškova, kao što su veličina čestica i efikasnost separacije u kolektoru, odnosno proizvodni prinos (Chawla i autori, 1994; Tajber i autori, 2009).

Polinom drugog reda je dobijen samo za sadržaj vlage, gde je interakcija između temperature ulaznog vazduha i koncentracije rastvora bila najznačajnija. Svi dobijeni RSM1 modeli su procenjeni kao značajni. Regresioni koeficijenti koji povezuju odgovore sa eksperimentalnim promenljivama i interakcijama su prikazani u Tabeli 3.3.2-2. Posmatranjem izračunatih p-vrednosti, identifikovani su najznačajniji parametri i detaljnije analizirani nakon sagledavanja rezultata primene obe razmatrane metodologije u modelovanju i karakterizaciji procesa.

Tabela 3.3.2-1. Nezavisne procesne promenljive u centralnom kompozitnom dizajnu (kodirane i realne vrednosti) i dobijeni odgovori

Br. probe	A = Brzina pumpe (%)		B = Temperatura ulaznog vazduha (°C)		C = Koncentracija rastvora (%)		R ₁ = Prinos (%)	R ₂ = Sadržaj vlage (%)	Odgovori	
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno			R ₃ = Srednja veličina čestica (μm)	R ₄ = Temperatura izlaznog vazduha (°C)
1	-1.68	3.18	0	180	0	20	87.3	3.0	4.94	105
2	+1	30	+1	190	-1	10	74.7	3.6	4.52	90
3	0	20	0	180	0	20	74.2	3.2	5.16	90
4	-1	10	+1	190	+1	30	83.3	2.3	5.64	106
5	+1.68	36.82	0	180	0	20	63.8	3.3	6.30	82
6	0	20	0	180	0	20	81.2	3.2	5.21	94
7	0	20	0	180	+1.68	36.82	72.7	2.9	6.25	89
8	0	20	0	180	0	20	79.0	3.1	6.14	95
9	0	20	0	180	0	20	79.5	3.1	5.87	95
10	0	20	-1.68	163.18	0	20	81.2	3.3	5.18	78
11	-1	10	+1	190	-1	10	80.0	2.7	3.92	104
12	0	20	0	180	0	20	77.2	3.2	5.38	89
13	-1	10	-1	170	-1	10	85.0	2.6	3.72	97
14	+1	30	-1	170	-1	10	72.0	2.9	5.43	79
15	0	20	0	180	0	20	79.4	2.9	4.35	94
16	-1	10	-1	170	+1	30	82.6	2.8	6.89	101
17	0	20	+1.68	196.82	0	20	79.6	2.7	5.67	103
18	0	20	0	180	-1.68	3.18	78.3	2.8	2.67	95
19	+1	30	+1	190	+1	30	65.9	2.4	5.77	96
20	+1	30	-1	170	+1	30	67.3	2.8	7.28	85

Vrednosti za brzinu pumpe: 3.18% odgovara protoku rastvora od oko 1 ml/min, 10% odgovara protoku rastvora od oko 3 ml/min, 20% odgovara protoku rastvora od oko 6 ml/min, 30% odgovara protoku rastvora od oko 9 ml/min i 36.82% odgovara protoku rastvora od oko 11 ml/min.

Tabela 3.3.2-2. Regresioni koeficijenti koje povezuju parametre sušenja raspršivanjem (kodirani faktori) sa odgovorima

	R ₁ / Prinos		R ₂ / Sadržaj vlage		R ₃ / Srednja veličina čestica		R ₄ / Temperatura izlaznog vazduha	
		F-vrednost (p-vrednost)		F-vrednost (p-vrednost)		F-vrednost (p-vrednost)		F-vrednost (p-vrednost)
Model	77.21	28.52	3.03	3.43	5.31	21.03	93.35	33.31
A / Brzina pumpe	-6.63	80.45 (< 0.0001)	+0.13	3.81 (0.0710)	+0.37	4.95 (0.0399)	-7.08	61.48 (< 0.0001)
B / Temperatura ulaznog vazduha	-0.42	0.31 (0.5806)	-0.081	1.44 (0.2498)	/	/	+5.57	38.04 (< 0.0001)
C / Koncentracija rastvora	-1.61	4.76 (0.0444)	-0.098	2.07 (0.1714)	+1.03	37.11 (< 0.0001)	+0.58	0.41 (0.5303)
BC / Interakcija između faktora B i C	/		-0.21	5.78 (0.0306)	/		/	
C ² / Kvadratni efekat faktora C	/		-0.13	4.05 (0.0636)	/		/	
Lack of fit (neusklađenost)		1.38 (0.379)		6.55 (0.020)		0.98 (0.547)		1.86 (0.253)
	R ²	0.842		0.550		0.712		0.862

R² – koeficijent korelacije

3.3.3. Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona

Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona (MLP) je odabrana u cilju razvoja modela MLP1 korišćenjem podataka iz svih 20 eksperimenata CCD dizajna za unos vrednosti ulaza i izlaza (Tabela 3.3.2-1).

Podešavanje parametara neuronske mreže je podrazumevalo definisanje broja skrivenih slojeva i neurona, tipa aktivacione funkcije, brzine učenja, momentuma, i broja kombinacija. U aktivaciji neurona korišćena je hiperbolična tangens sigmoidna transfer funkcija. Za krosvalidaciju mreže korišćeno je 15% podataka, i dodatni set podataka je korišćen za testiranje mreže.

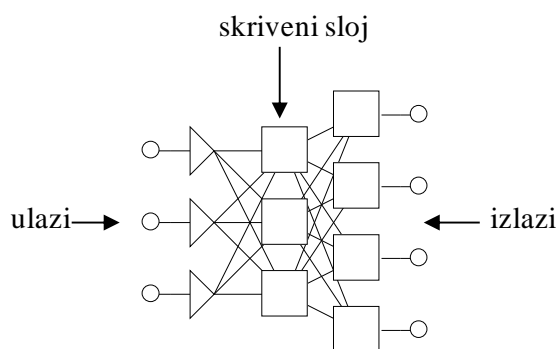
Period učenja je bio završen kada je dostignuta najmanja RMSE:

$$RMSE = [\sum (y_{ip} - y_{im})^2 / n]^{1/2} \quad (3.3.3-1)$$

gde je RMSE koren srednje vrednosti kvadrata greške, y_p je predviđeni odgovor, y_m je odgovor dobijen u eksperimentu, i n je broj eksperimenata, podataka za treniranje MLP (Bishop, 1995).

Kada je proces treniranja završen, MLP mreža je testirana sa test podacima. Test uzorak je pripremljen kako bi se proverila sposobnost mreže za predviđanje, koristeći brzinu pumpe 6 %, temperaturu ulaznog vazduha 175°C, koncentraciju rastvora 15 %.

Odabrana struktura MLP (Slika 3.3.2-1) je imala tri sloja: prvi sloj sa tri ulazne jedinice, drugi sloj sa tri skrivene jedinice, i treći sloj sa 4 izlazne jedinice. Struktura i optimalne vrednosti za treniranje MLP mreže su bili sledeći: brzina učenja 0.6, momentum 0.3, RMSE treniranja 0.15, RMSE krosvalidacije 0.24, broj epoha 10,000.



Slika 3.3.3-1. Struktura mreže tipa višeslojnog perceptrona (MLP).

Performanse modela veštačke neuronske mreže procenjene su preko RMSE i koeficijenta korelacije R^2 između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti.

Poređenje sposobnosti predviđanja odgovora korišćenjem modela RSM1 (modeli dobijeni metodologijom površine odgovora) i MLP1 (model dobijen primenom veštačke neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona) predstavljeno je u Tabeli 3.3.3-1. i na korelacionim graficima (eksperimentalno dobijene naspram predviđenih vrednosti; Slika 3.3.3-2). Na osnovu prikazanih rezultata MLP1 ima bolju sposobnost predviđanja odgovora u poređenju sa RSM1 modelima. Površine odgovora, kreirane korišćenjem MLP1, predstavljene su na Slici 3.3.3-3. One pomažu u vizuelizaciji modela.

Brzina pumpe je imala najveći uticaj na proizvodni prinos (Slika 3.3.3-3a). Veća vrednost brzine pumpe imala je negativan uticaj na prinos, zato što je uzrokovala smanjenje temperature izlaznog vazduha, i toplotna energija obezbeđena kroz temperaturu ulaznog vazduha nije bila dovoljna za potpuno sušenje. Zbog lepljenja u komori za sušenje, prinos je bio snižen i sadržaj vlage je bio povišen. Slično je primećeno i u nekim drugim studijama (Billon i autori, 2000; Tajber i autori, 2009).

Za sadržaj vlage, interakcija između brzine pumpe i koncentracije rastvora se pokazala kao značajna. Koncentrovaniji rastvori sa većom temperaturom ulaznog vazduha rezultovali su uzorcima sa nižim sadržajem vlage. Slično je primećeno od strane autora Goula i Adamopoulos (2004) koji su to objasnili kao posledicu uticaja povećanja sadržaja čvrstih supstanci na formiranje suve površine. Rezultati za sadržaj vlage su prikazani u Tabelama 3.3.2-1 i 3.3.3-1 i izraženi su kao srednje vrednosti najmanje dva merenja, sa standardnom devijacijom u opsegu 0.01–0.18% (u proseku 0.07%).

Efekat temperature ulaznog vazduha nije bio značajan za proizvodni prinos, što se podudara sa zaključcima autora Tajber i autora (2009). Koncentracija rastvora je imala negativan uticaj na proizvodni prinos. Mnogi autori su pronašli da koncentracija medijuma za raspršivanje ima pre svega pozitivan uticaj na prinos u procesu sušenja raspršivanjem (Billon i autori, 2000; Chawla i autori, 1994; Prinn i autori, 2002). Pri višim temperaturama i većim koncentracijama medijuma, potpunije sušenje sprečava lepljenje proizvoda i dešava se bolja ciklonska separacija (Billon i autori, 2000). Takođe, koncentrovaniji rastvori obezbeđuju krupnije čestice koje se bolje odvajaju u ciklonskom separatoru (Prinn i autori, 2002).

Tabela 3.3.3-1. Poređenje sposobnosti predviđanja RSM1 i MLP1 za modelovane odgovore

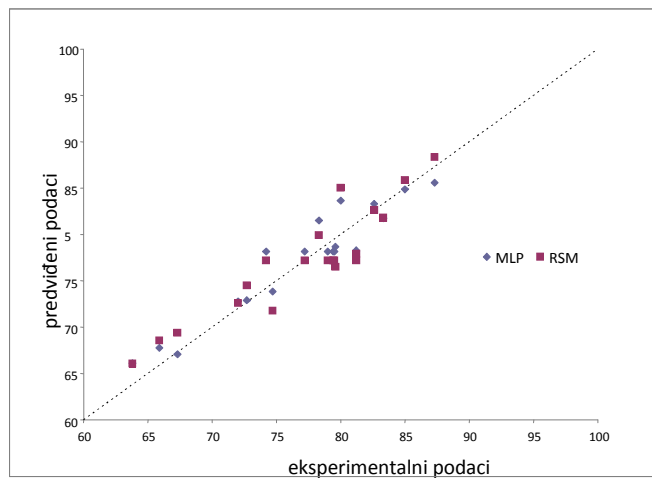
Parametri	Prinos (%)		Sadržaj vlage (%)		Srednja veličina čestica (μm)		Temperatura izlaznog vazduha ($^{\circ}\text{C}$)	
	RSM1	MLP1	RSM1	MLP1	RSM1	MLP1	RSM1	MLP1
RSME	2.44	1.98	0.347	0.190	0.573	0.528	2.98	2.13
R^2	0.842	0.898	0.550	0.642	0.712	0.779	0.862	0.933
Test uzorak	84.21	85.43	2.64	2.74	4.43	4.76	101	103.2
Predviđene vrednosti								
Test uzorak	Eksperimentalno dobijena vrednost	86.7	Eksperimentalno dobijena vrednost	2.88	Eksperimentalno dobijena vrednost	4.98	Eksperimentalno dobijena vrednost	104

RSME - koren kvadrata srednje vrednosti greške

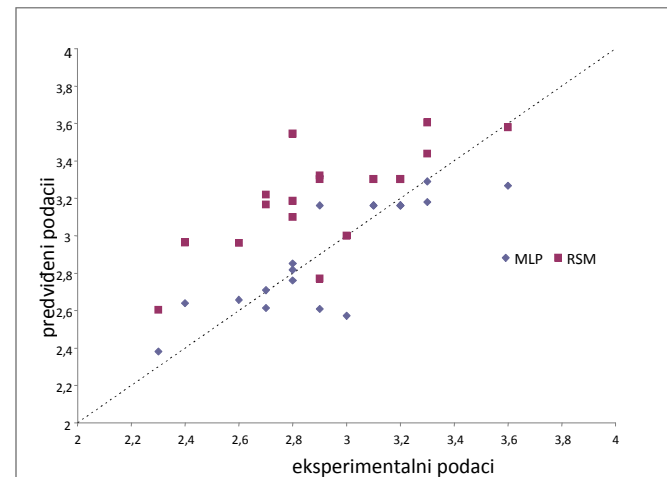
R^2 - koeficijent korelacije

RSM1 – Modeli dobijeni primenom metodologije površine odgovora (RSM)

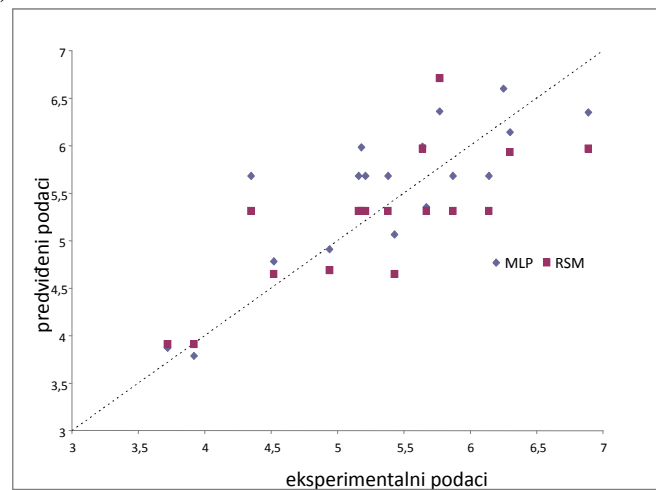
MLP1– Modeli dobijeni primenom neuronske mreža tipa višeslojnog perceptrona (MLP)



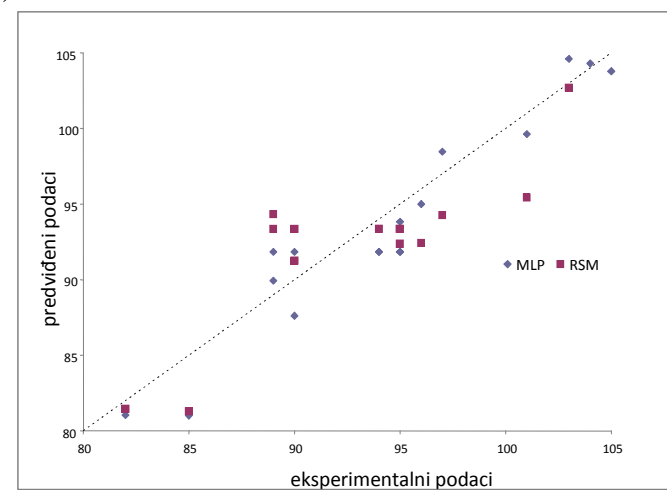
(a)



(b)

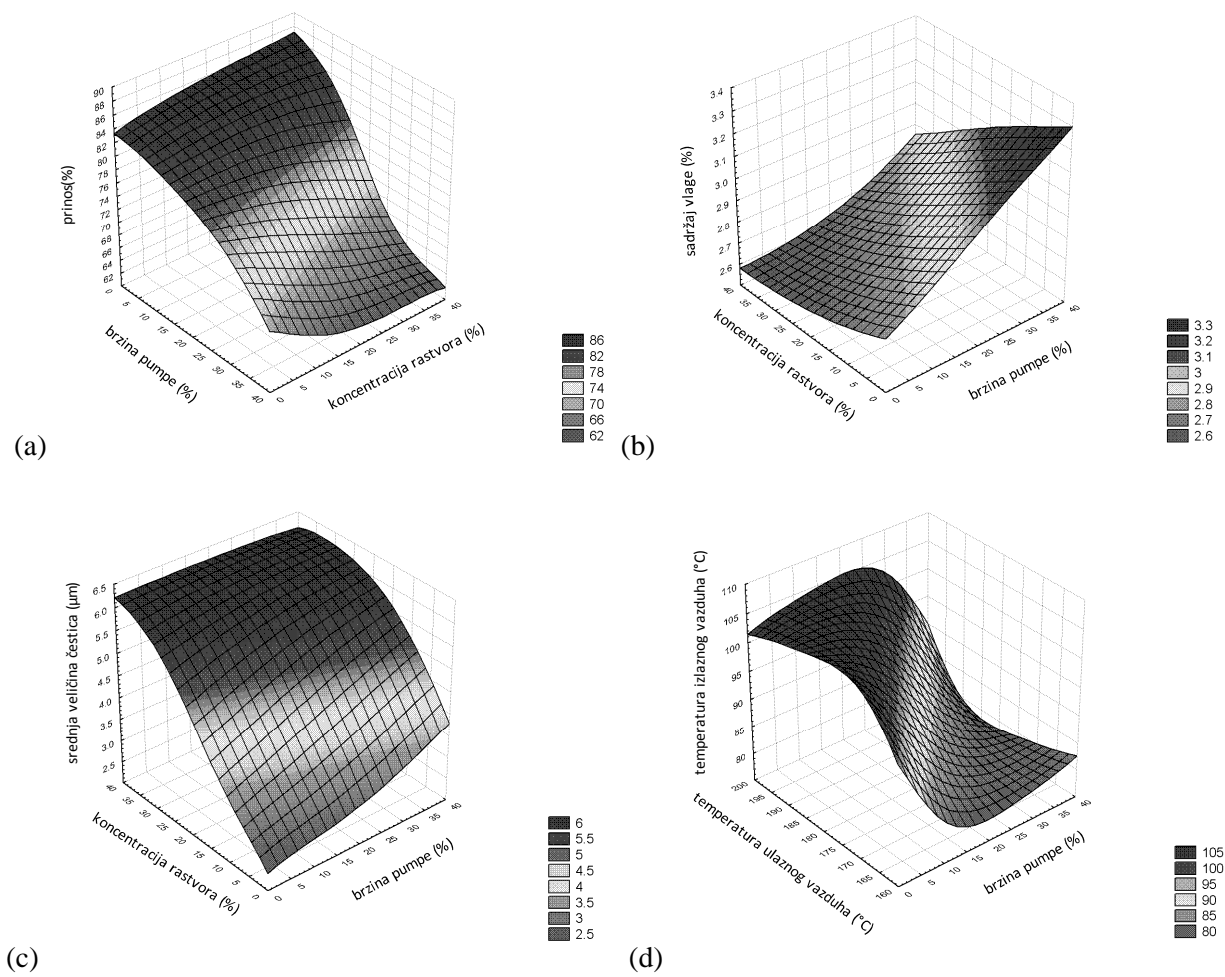


(c)



(d)

Slika 3.3.3-2. Poređenje eksperimentalnih i predviđenih podataka pomoću MLP1 i RSM1 modela za sledeće odgovore: prinos (a), sadržaj vlage (b), srednja veličina čestica (c) i temperatura izlaznog vazduha (d).



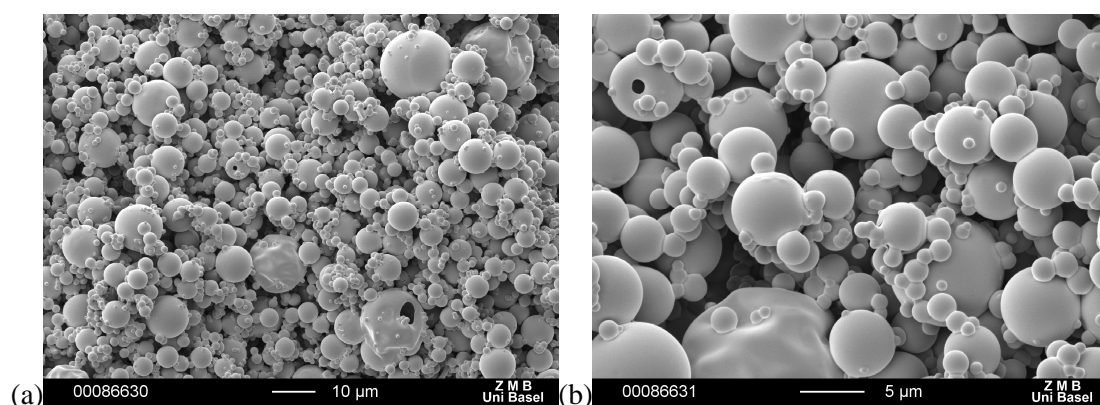
Slika 3.3.3-3. Grafici površine odgovora koji pokazuju efekte dva glavna parametra od najvećeg uticaja na dati odgovor. Ostali parametri su na nivoima koji obezbeđuju maksimalni odgovor: prinos (a), sadržaj vlage (b), srednja veličina čestica (c) i temperatura izlaznog vazduha (d).

Sa druge strane, Elversson i autori (2003) su uočili niže prinose pri većim koncentracijama medijuma što se može objasniti time da povećan sadržaj čvrstih supstanci u medijumu može da poveća sklonost kapi da koalesciraju po sudaru jedna sa drugom ili sa zidom, zbog veće sile udara. Goula i Adamopoulos (2004) su uočili da veće koncentracije suvih supstanci uzrokuju smanjenje čvrste mase koja se kreće zajedno sa izlaznim vazduhom zbog uticaja na veličinu čestica. Veća koncentracija uzrokuje i nešto veće viskozitet, povećava veličinu kapi a time i veličinu čestica.

Temperatura izlaznog vazduha je najviše pod uticajem podešavanja pumpe, kao što je i očekivano. Što je veća brzina pumpe, više tečnosti se dovodi do komore za sušenje i stvara se veća količina pare rastvarača, što dovodi do pada izlazne temperature (Slika 3.3.3-3d). Ovi zaključci su u skladu i sa radom Tajber i drugih autora (2009).

Veličina čestica je dodatno praćena kako bi se proverilo koji se opseg veličine čestica može dobiti na korišćenom uređaju za sušenje raspršivanjem. Dobijene vrednosti za veličinu čestica prikazane su u Tabelama 3.3.2-1. i 3.3.3-1. i izražene su kao srednje vrednosti najmanje dva merenja, sa prosečnom standardnom devijacijom 0.13 μm . Osim brzine atomizacije koja je održavana konstantnom, koncentracija rastvora i brzina pumpe bili su parametri sa najvećim potencijalom za uticaj na veličinu čestica. Pronađeno je da najrazblaženiji rastvori rezultuju najsitnijim česticama, i da brzina pumpe negativno utiče na veličinu čestica (Slika 3.3.3-3c). Kao što je opisano u nekim drugim studijama, kada je koncentracija medijuma niska, formiraju se sitne čestice zato što je količina čvrstih supstanci po kapi koja izlazi iz raspršivača smanjena, tako da po isparavanju vode iz kapi, ostaje sitna čestica (Chawla i autori 1994; Corrigan i autori, 2006; Gonnissen i autori, 2008; Elversson i autori, 2003; Prinn i autori, 2002; Tajber i autori, 2009). Takođe, veličina kapi obično raste sa porastom koncentracije medijuma ili viskoziteta, i energija dostupna za atomizaciju opada. Na taj način, efekat koncentracije medijuma na veličinu osušene čestice potiče od efekta na veličinu kapi (Goula i Adamopoulos, 2004). Sa druge strane, pri konstantnoj atomizaciji, prilikom povećanja brzine pumpe, nema dovoljno energije za atomizaciju rastvora povećanog protoka i formiraju se krupnije kapi, što rezultuje krupnijim česticama. Ovo je primećeno kako u ovoj tako i u nekim drugim studijama (Chegini i Ghobadian, 2005; Tajber i autori, 2009; Gonnissen i autori, 2008).

Vizuelizacija čestica je vršena pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Fotomikrografije čestica osušenih raspršivanjem su predstavljene na Slici 3.3.3-4. Primećuje se da su dobijene čestice sfernog oblika i glatke površine. Ovo je uobičajeno za sušenje raspršivanjem rastvora gde su sve komponente dobro rastvorljive i povlače se kontinuirano kako se kap suši, rezultujući glatkim, sfernim česticama. Primećeno je i prisustvo šupljih čestica. Šuplja unutrašnjost može nastati zbog širenja gasa u kapima sa formirajućim filmom (ljuskom) koji teško propušta paru, ili zbog vazduha zarobljenog u tečnosti. Filmovi koji nastaju na površini kapi tokom sušenja i formiranja čestica sačinjeni od hidrofilnih materijala kao što je laktoza, imaju sposobnost propuštanja vode, pa je moguće da se tokom isparavanja vode formira negativan pritisak.

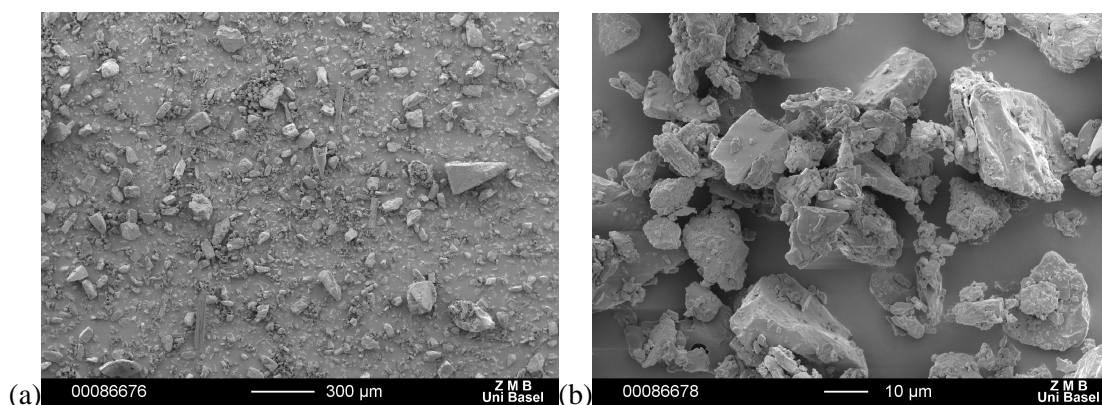


Slika 3.3.3-4. Sferne čestice osušene raspršivanjem rastvora naratriptan hidrohlorida, laktoze i maltodekstrina pri uvećanju 1000 puta (a) i 3000 puta (b).

Zapaža se i da su neke čestice smežurane. Pošto je kinetika formiranja čestica kontrolisana brzinom isparavanja i u vezi sa porastom viskoziteta kapi, tokom sušenja su kapi/čestice izložene stresnijim uslovima koji utiču na formiranje površine i kontrolišu morfologiju dobijenih čestica. Smatra se da su čestice nastale pri većim brzinama sušenja smežuranije usled kolapsa koji im se dešava, dok su čestice nastale pri manjim brzinama sušenja sfernijeg oblika. Proces transformacije kap-čestica vrlo je složen i zavisi od međusobne povezanosti procesnih promenljivih i fizičko-hemijskih osobina formulacije (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008). Uslovi sušenja kojima su izložene pojedinačne kapi može značajno da varira, tako da se može desiti da su

prisutne čestice koje su smežurane i šuplje, nastale usled izloženosti većim brzinama sušenja.

Fotomikrografija skenirajuće elektronske mikroskopije smeše praškova korišćene za pripremu rastvora za sušenje raspršivanjem (Slika 3.3.3-5a), pokazuje nasumični raspored igličastih kristala naratriptan hidrohlorida u smeši u kojoj dominiraju čestice laktoze i maltodekstrina, i ukazuju da postoji potencijal za lošu homogenost neprocesiranog praška.



Slika 3.3.3-5. Smeša praškova naratriptan hidrohlorida, laktoze i maltodekstrina pre rastvaranja i sušenja raspršivanjem pri uvećanju 1000 puta (a) i 5000 puta (b).

3.3.4. Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža (MLP) i metodologije površine odgovora (RSM)

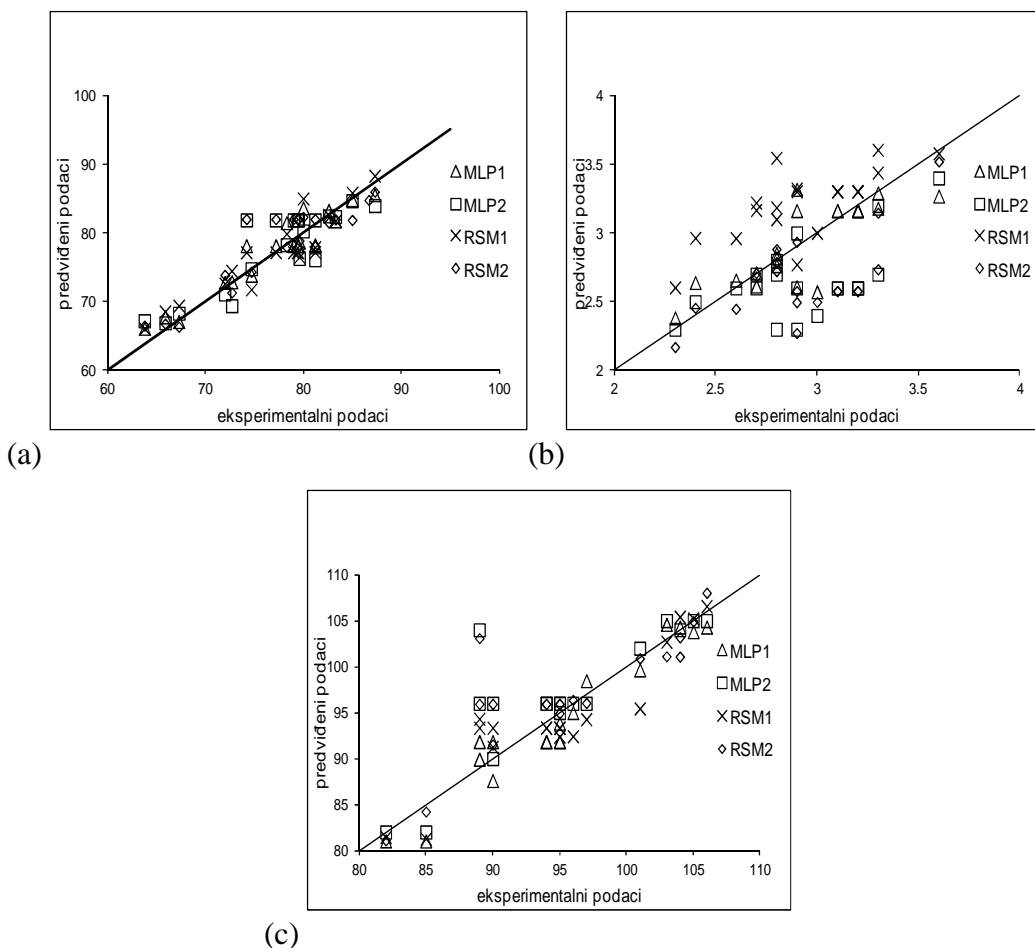
3.3.4.1. Primena MLP u dopunjavanju podataka u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM

Upotreba MLP mreže (MLP2 model) u dopunjavanju jednog dela podataka u sklopu seta definisanog eksperimentalnim dizajnom dala je zadovoljavajuće rezultate za neke odgovore (prinos, temperatura izlaznog vazduha), uzimajući u obzir broj eksperimentalnih podataka koji su korišćeni za modelovanje (Tabela 3.3.4-1, Slika 3.3.4-1). Ova ideja može biti korisna u karakterizaciji sušenja raspršivanjem i modelovanju, jer može da omogući smanjenje broja izvedenih eksperimenata. Međutim, mreža koja se koristi u ove svrhe morala bi da bude dovoljno robusna. Ipak, model sa

najboljom sposobnošću predviđanja bio je MLP1 model, dobijen iz veće grupe podataka (Tabela 3.3.4-1).

Tabela 3.3.4-1. Koeficijenti korelacije (R^2) za eksperimentalne i predviđene podatke za različite modele

Izlaz	RSM1	MLP1	MLP2	RSM2
Prinos	0.842	0.898	0.790	0.828
Sadržaj vlage	0.550	0.642	0.328	0.368
Temperatura izlaznog vazduha	0.862	0.933	0.776	0.786



Slika 3.3.4-1. Poređenje eksperimentalnih i predviđenih podataka dobijenih pomoću različitih modela, za odgovore: prinos (a), sadržaj vlage (b), temperaturu izlaznog vazduha (c)

3.3.4.2. Primena RSM u dobijanju matematičkih modela korišćenjem predviđanja MLP mreže u cilju boljeg razumevanja procesa

Predviđeni rezultati MLP1 modela (najbolji R^2) obrađeni su primenom RSM i dobijene matematičke jednačine su analizirane (RSM3 modeli) kako bi se videle sličnosti i razlike sa jednačinama RSM1 modela (Tabela 3.3.4-2).

Primećeno je da modeli RSM3 koji su dobijeni na osnovu predviđanja MLP1 imaju veće vrednosti R^2 u poređenju sa modelima RSM1 (Tabele 3.3.4-1 i 3.3.4-2.). Modeli predstavljeni u Tabeli 3.3.4-2 pokazuju da su veze između faktora i odgovora mnogo složenije nego što pokazuju modeli RSM1, što bi moglo biti razlog za bolju sposobnost predviđanja modela MLP1.

Slično kao kod modela RSM1, generisane su kvadratna i linearna jednačina za sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha, redom. Takođe, izračunati koeficijenti parametara bili su vrlo slični (Tabela 3.3.2-2. i 3.3.4-2).

Tabela 3.3.4-2. Regresioni koeficijenti koje povezuju parametre sušenja raspršivanjem sa odgovorima – RSM3 modeli dobijeni korišćenjem samo predviđenih vrednosti

Ulaz	R_1 (p)	R_2 (p)	R_3 (p)
A	-6.21 (<0.05)	+0.20 (<0.05)	-7.35 (<0.05)
B	-	-0.12 (<0.05)	+5.17 (<0.05)
C	-2.18 (<0.05)	-0.12 (<0.05)	+0.14 (0.834)
AB	+0.56 (<0.05)	-	-
BC	-	-0.12 (<0.05)	-
AC	-1.04 (<0.05)	-0.06 (<0.05)	-
A^2	-0.87 (<0.05)	-0.11 (<0.05)	-
B^2	-	-0.07 (<0.05)	-
C^2	-0.39 (<0.05)	-0.17 (<0.05)	-
R^2	0.994	0.961	0.916

A – brzina pumpe; B – temperatura ulaznog vazduha; C – koncentracija rastvora; R_1 – prinos; R_2 – sadržaj vlage; R_3 – temperatura izlaznog vazduha, R^2 – koeficijent korelacije.

Opšti zaključak bi bio da se bolja predviđanja obično dobijaju primenom MLP modela. Iako matematički modeli (u ovoj studiji dobijeni primenom RSM) ne daju podjednako dobro predviđanje vrednosti, analizom matematičkih jednačina mogu se dobiti korisne informacije o načinu i značaju uticaja ispitivanih faktora koje mogu pomoći u

poboljšanju razumevanja sušenja raspršivanjem. Kombinovanom primenom objedinjuju se prednosti obe metodologije.

3.3.5. Optimizacija sušenja raspršivanjem

Nakon izvršene analize pomoću softvera *Design-Expert*® 7.0.0 (Stat-Ease Inc, SAD) primenom pristupa poželjnosti (engl. *Desirability approach*) (Nekkanti i autori, 2009) izvršena je numerička optimizacija procesnih parametara za rastvor koncentracije 25 %, sa zahtevima za postizanje što većeg prinosa i što manjeg sadržaja vlage u prašku. Korišćeni su modeli RSM1 i modeli RSM3 dobijeni obradom vrednosti predviđenih pomoću MLP1, i dobijene su slične vrednosti optimalnih parametara. Izveden je eksperiment pod definisanim procesnim parametrima, i dobijeni su rezultati slični predviđenim vrednostima (Tabela 3.3.5-1).

Tabela 3.3.5-1. Optimizacija procesnih parametara

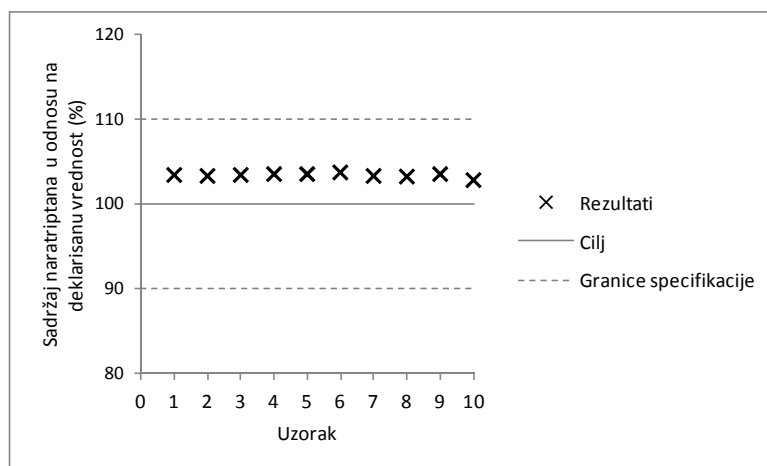
Zahtevi za parametar	Cilj	Rešenja		Eksperiment
		RSM1	RSM3 (MLP1)	
Brzina pumpe	U opsegu	10 %	10 %	10 %
Temperatura ulaznog vazduha	U opsegu	190°C	188°C	190°C
Koncentracija rastvora	25 %	25 %	25 %	25 %
Prinos	Maksimalni	82.62 %	82.41 %	85.76 %
Gubitak sušenjem	Minimalni	2.57%	2.65%	2.50 %
Temperatura izlaznog vazduha	U opsegu	104.6 °C	104.6 °C	102°C
	Poželjnost	0.860	0.844	

3.3.6. Karakterizacija dobijenih praškova

Nakon izvršene optimizacije sušenja raspršivanjem odabrane formulacije izvršena je karakterizacija dobijenog praška.

3.3.6.1. Ujednačenost sadržaja naratriptan hidrohlorida

Rezultati analize ujednačenosti sadržaja naratriptan hidrohlorida pokazuju da je dobijen prašak vrlo ujednačenog sastava ($RSD=0.23\% \ll 5\%$), u skladu sa očekivanjima (Slika 3.3.6-1.).

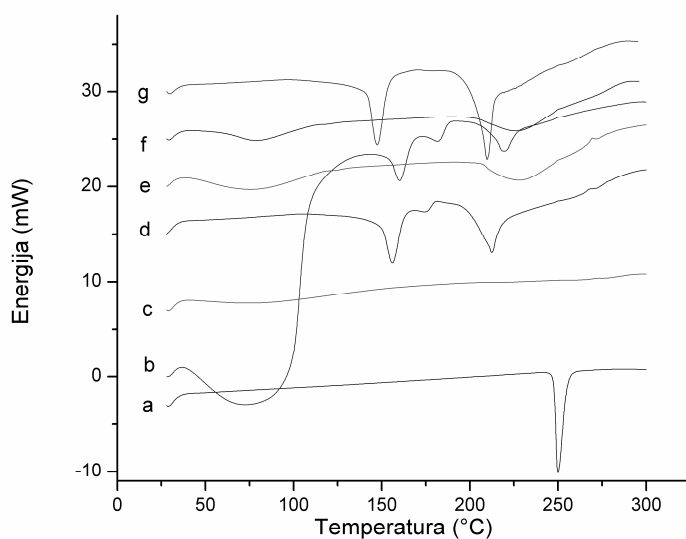


Slika 3.3.6-1. Rezultati analize ujednačenosti sadržaja naratriptan hidrohlorida u prašku dobijenom sušenjem raspršivanjem

3.3.6.2. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

Primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije izvršena je termička karakterizacija uzoraka dobijenih sušenjem raspršivanjem u poređenju sa polaznim materijalima i njihovim fizičkim smešama (Slika 3.3.6-2.).

Termogrami uzoraka osušenih raspršivanjem, zbog odsustva pikova karakterističnih za sastojke formulacije, ukazuju da je tokom procesa formirana amorfna struktura uzorka. Iz termograma izostaje očekivana rekristalizacija amorfne laktoze, verovatno usled stabilizujućeg efekta maltodekstrina koji se molekularno dispergovao u amorfnoj laktozi tokom procesa sušenja raspršivanjem, tako da je stupio u interakciju sa molekulima laktoze gradeći međumolekulske vodonične veze (Takeuchi i autori, 1998). Istog izgleda je i termogram dobijen analizom uzorka dobijenog sušenjem raspršivanjem skladištenog u staklenoj bočici na sobnoj temperaturi 12 meseci, što može ukazivati na dobru fizičku stabilnost formulacije.

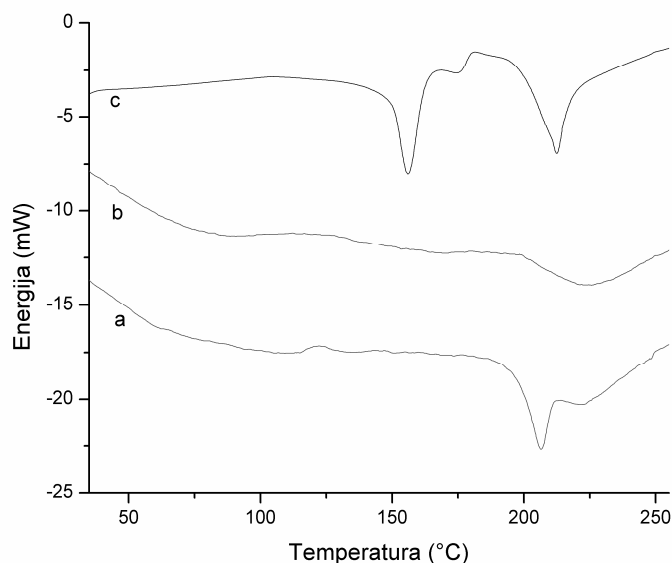


Slika 3.3.6-2. Reprezentativni DSC termogrami uzoraka: naratriptan hidrohlorid (a), laktoza monohidrat (b), maltodekstrin (c), fizička smeša naratriptan hidrohlorida, laktoze monohidrat i maltodekstrina dobijena mešanjem u kesi (d), uzorak dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora, inicijalno (e), uzorak dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora, nakon godinu dana stajanja (f) i fizička smeša naratriptan hidrohlorida, laktoze monohidrat i maltodekstrina dobijena mešanjem pomoću tarionika i pistila (g).

Na termogramu fizičke smeše sastojaka formulacije, jasno se uočavaju pikovi karakteristični za α -laktozu monohidrat, gde prvi endotermni pik na temperaturi oko 150°C odgovara procesu dehidratacije (gubitak vezane, kristalne vode), a drugi endotermni pik oko 210°C odgovara topljenju uz raspadanje. Treći pik koji se javlja na temperaturi oko 175°C, mogao bi se pripisati anomerizaciji α -laktoze u β -laktozu, koja se dešava ukoliko je u uzorku preostala dovoljna količina vode posle dehidratacije na 150°C (Listiohadi i autori, 2009). Slični pikovi se uočavaju na termogramu same laktoze monohidrat, gde se do temperature 130°C posebno uočava i gubitak slobodne, površinske vode (Listiohadi i autori, 2009). Smeša dobijena mešanjem pistilom u tarioniku takođe pokazuje dva karakteristična pika laktoze monohidrat na oko 150°C i 210°C. Međutim, treći pik koji se vidi u fizičkoj smeši dobijenoj prostim mešanjem u kesi ovde je vrlo slabo uočljiv, što znači da je verovatno mešanjem pistilom uzrokovana neka vrsta promene kristalne strukture laktoze i dinamike gubitka hidratizane vode. Karakteristični pik naratriptan hidrohlorida se ne uočava u fizičkoj smeši verovatno zbog toga što je prisutan u niskoj koncentraciji i zbog teškoće da se uniformno umeša

uzorak, tako da se lek nađe u dovoljnoj količini u uzorku od 2-5 mg smeše da bi bio detektovan DSC metodom.

Tokom sušenja raspršivanjem veće količine rastvora, u kolektoru koji je odmah ispod komore za sušenje, primećeno je izdvajanje male količina praška. Nakon analize DSC termograma ovog uzorka (Slika 3.3.6-3), prepoznato je prisustvo anhidrovane α -laktoze zahvaljujući odsustvu pika koji odgovara dehidraciji na oko 150°C i prisustvu pika koji odgovara topljenju na oko 210°C (Listiohadi i autori, 2009).



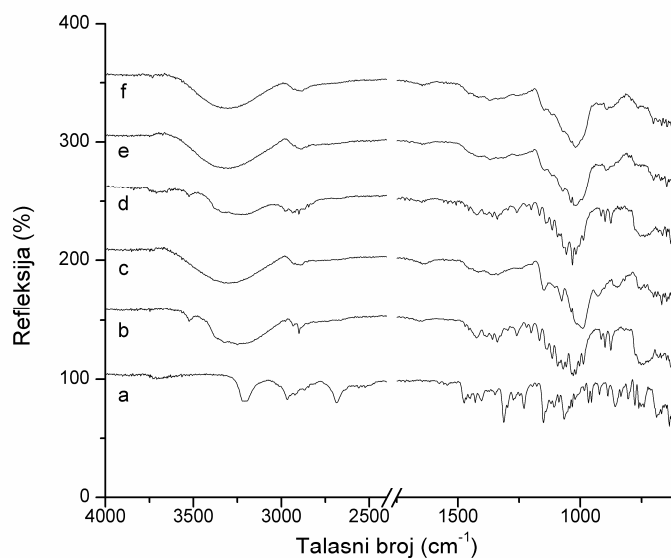
Slika 3.3.6-3. Reprezentativni DSC termogrami uzoraka: uzorak dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora iz kolektora ispod komore za sušenje (a), uzorak dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora iz kolektora ispod ciklonskog separatora (b), fizička smeša naratriptan hidrohlorida, laktoze monohidrat i maltodekstrina dobijena mešanjem u kesi (c).

Može se reći da se u ovom slučaju struktura praška prikupljenog u kolektoru ispod komore za sušenje razlikuje od strukture u prašku izdvojenom u kolektoru ispod ciklonskog separatora (gde nije uočeno prisustvo pikova i pretpostavljena je amorfna priroda uzorka), i odlučeno je da se ova manja količina praška ne pripoji prašku iz ciklonskog separatora. Moguć razlog ovoj pojavi mogla bi biti razlika u putanjama kretanja i dužini zadržavanja tokom sušenja određene frakcije kapi/čestica tako da je proces sušenja trajao nešto duže i da je umesto stvaranja amorfne strukture makar delimično došlo do stvaranja kristalne bezvodne α -laktoze, odnosno u toj meri da se

može detektovati DSC metodom. Tome doprinosi i kompleksnost ponašanja laktoze u smislu broja faznih promena kroz koje može proći tokom procesiranja, o čemu svedoče brojni radovi (Chidavaenzi i autori, 1997; Kirk i autori, 2007; Listiohadi i autori, 2009; Takeuchi i autori, 1998).

3.3.6.3. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

FTIR spektri dobijeni analizom različitih uzoraka prikazani su na Slici 3.3.6-4. Karakteristični pikovi FTIR spektra naratriptan hidrohlorida potiču od vibracije istezanja N-H veze na oko 3220cm^{-1} , zatim vibracije istezanja alifatične C-H veze na oko 2964cm^{-1} , vibracije istezanja $\text{N}^+\text{-H}$ veze na oko 2685cm^{-1} , vibracije savijanja alifatične C-H veze na oko 1474cm^{-1} , vibracije istezanja C-N veze na oko 1314cm^{-1} , vibracije istezanja S=O veze na oko 1152cm^{-1} , vibracije savijanja aromatične C-H veze na oko 856cm^{-1} i vibracije istezanja C-S veze na oko 637cm^{-1} . Međutim, pikovi naratriptana su teško uočljivi u spektru fizičke smeše, možda zbog problema sa uniformnošću uzorka ili su maskirani pikovima laktoze koja dominira u formulaciji. FTIR spektri laktoze i maltodekstrina su slični u oblasti oko $3000\text{-}3500\text{cm}^{-1}$, jer poseduju široku traku koja potiče od vibracije istezanja O-H veze, i u oblasti oko 1000cm^{-1} , zbog postojanja vibracije istezanja C-O veze (Cilurzo i autori, 2008). U spektru laktoze monohidrat, i u fizičkoj smeši, primetne su trake na oko 3524cm^{-1} koja potiče od slobodnih O-H vibracija slobodnih molekula vode. Široka vibracija koja se dešava oko 3300cm^{-1} odgovara intramolekulskom istezanju O-H veza. Regija ispod 1500cm^{-1} je regija otiska prsta i trake iz ovog dela spektra je teško pripisivati, ali su karakteristične za uzorak. U oblasti nižih talasnih brojeva ($915\text{-}976\text{cm}^{-1}$) nalazi se relativno dobra dijagnostička regija po pitanju prisustva tipa polimornih oblika laktoze jer različito izgleda u zavisnosti od polimorfa (Kirk i autori, 2007). Ova regija se vezuje uglavnom za istezanje i uvrtnje C-H veza koje su van prstena. Kod laktoze monohidrat kakva postoji i u fizičkoj smeši, karakterističan pik se nalazi na oko 915cm^{-1} , ali on izostaje kod amorfne laktoze, što potvrđuje da je u uzorku dobijenom sušenjem raspršivanjem laktoza prisutna u amorfnom obliku jer ovog pika nema.



Slika 3.3.6-4. Reprezentativni ATR-FTIR spektri uzoraka: naratriptan hidrohlorid (a), laktoza monohidrat (b), maltodekstrin (c), fizička smeša naratriptan hidrohlorida, laktoze monohidrat i maltodekstrina dobijena mešanjem u kesi (d), uzorak dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora, inicijalno (e) i uzorak dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora, nakon godinu dana stajanja (f).

U spektrima uzoraka dobijenih sušenjem raspršivanjem, zapaža se pomeranje pika koji se pripisuje C-O vezi ka višim talasnim brojevima, što može ukazivati na formiranje vodoničnih veza između C-O grupa i O-H grupa u koprocesiranom prašku (Cilurzo i autori, 2008). Takođe, ovi spektri potvrđuju prisustvo isključivo amornog materijala jer se razlikuje od spektra sa kristalnim materijalom po broju pikova i po tome što su pikovi slabije definisani (Listiohadi i autori, 2009). Spektri ostaju nepromenjeni i kod uzoraka skladištenih 12 meseci na sobnoj temperaturi ukazujući na potencijalno dobru fizičku stabilnost formulacije.

3.3.6.4. Nasipna i tapkana gustina praškova

Zbog male veličine čestica (srednja veličina čestica 5-6 μm), koja je karakteristična za uzorke dobijene sušenjem raspršivanjem rastvora na laboratorijskom uređaju (koji ima malu komoru za sušenje i kapi moraju biti sitne kako bi se obezbedilo dobro sušenje i izdvajanje proizvoda), dobijeni prašak je vrlo kohezivan i voluminozan. Dobijene

vrednosti za nasipnu gustinu su bile 0.29 g/ml, a za tapkanu gustinu 0.63 g/ml. Izračunavanjem odnosa tapkane i nasipne gustine dobijena je vrednost za Hausnerov odnos $2.17 > 1.60$ što svrstava dobijeni prašak u vrlo, vrlo loše protočne praškove, što je očekivano s obzirom na veličinu čestica praška (<1174> Powder Flow in *USP 29–NF 24*).

3.3.6.5. Protočnost praškova

Zbog izražene voluminoznosti i kohezivnosti praška a samim tim i loše protočnosti dobijenih praškova, određivanje protočnosti merenjem protoka kroz otvor, moralo je biti vršeno sa najvećim promerom otvora na levku (12.5 mm), i uz korišćenje vibracije kako bi se podstakao protok praška. Protočnost je bila izražena kao vreme potrebno da određena količina praška (10 g) protekne kroz levak i dobijena je vrednost od 8.3 sec (standardna devijacija tri merenja 0.9 sec). Uređaj pruža mogućnost određivanja i nasipnog ugla α kao mere protočnosti i dobijena je vrednost od 50° (standardna devijacija tri merenja 1.7°). Vrednosti $46-55^\circ$ svrstavaju prašak u grupu slabo protočnih praškova (<1174> Powder Flow in *USP 29–NF 24*) kojima je potrebna agitacija, vibracija kako bi se održavao protok, što se u industriji obično smatra neprihvatljivim. Međutim, treba napomenuti da se na laboratorijskom uređaju za raspršivanje prilikom sušenja rastvora uvek dobijaju vrlo sitne čestice, koje se inače karakterišu lošom protočnošću, dok se u pilot i industrijskim uređajima zbog veće komore za sušenje i mogućnosti da se ostvari dobro sušenje krupnijih kapi dobijaju krupnije sferne čestice tj. može se očekivati da bi se dobili znatno protočniji praškovi.

4. DRUGI DEO ISTRAŽIVANJA

4.1. UVOD

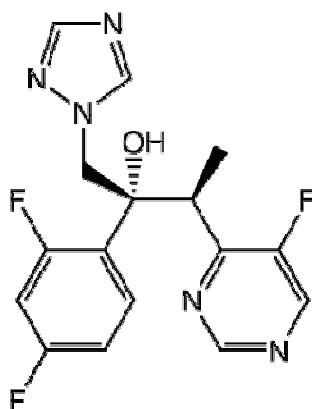
U skladu sa principima dizajniranja kvaliteta u farmaceutskom razvoju proizvoda (QbD), na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika odabranih model lekovitih supstanci i karakteristika čvrstih farmaceutskih oblika sa trenutnim oslobađanjem leka, najpre je definisan ciljani profil kvaliteta praška kao međuproizvoda koji se može u daljim fazama razvoja koristiti u proizvodnji čvrstih doziranih oblika.

Na osnovu ciljanog profila kvaliteta praška definisani su kritični atributi kvaliteta praška, i izvršena je analiza rizika u cilju definisanja potencijalno kritičnih formulacijskih i procesnih promenljivih za sušenje raspršivanjem vodenih rastvora kompleksa lekovite supstance i ciklodekstrina.

4.1.1. Fizičko-hemijske karakteristike vorikonazola

Vorikonazol je antifungalni lek novije generacije iz grupe triazola i koristi se u terapiji gljivičnih infekcija.

Hemijska struktura leka prikazana je na Slici 4.1.1-1.



Slika 4.1.1-1. Vorikonazol ((2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoro-4-pirimidinil)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-2-butanol, molekulska formula $C_{16}H_{14}F_3N_5O$, Mr 349.3).

Vorikonazol je beo do skoro beo kristalan prašak. Slaba je organska baza sa dve pKa vrednosti 4.98 i 12.0. Ima dva hiralna centra i farmakološki aktivan je 2R, 3S izomer

(Buchanan i autori, 2007). Napolarna je lekovita supstanca sa logP vrednošću 2.561 (Spriet i autori, 2009).

Vorikonazol ispoljava polimorfizam, a u ovom istraživanju koristi se vorikonazol kristalne forme I (Benito i autori, 2009). Bez obzira na polimorfni oblik, vorikonazol se smatra u vodi vrlo teško rastvornom supstancom. Lako je rastvoran u acetonu i metilen hloridu (*Voriconazole monograph 2576, European pharmacopoeia 7.3*).

Jedna od važnijih karakteristika lekovite supstance je rastvorljivost u vodenim medijumima, jer ona može biti ograničavajući faktor u pripremi rastvora za raspršivanje, kao i faktor važan za oslobađanje iz lekovitog oblika. Rezultati rastvorljivosti vorikonazola u vodenim medijumima različitih pH vrednosti, dobijeni primenom standardne *shake-flask* (engl.) metode, prikazani su u Tabeli 4.1.1-1 (*in-house* metoda, Hemofarm a.d., Srbija). Na osnovu dobijenih rezultata vorikonazol se svrstava u grupu teško do vrlo teško rastvorljivih supstanci, prema definicijama rastvorljivosti iz Evropske farmakopeje.

Tabela 4.1.1-1. Rastvorljivost vorikonazola u različitim vodenim medijumima

Medijum	Rastvorljivost (mg/ml)	
	na 25°C	na 37°C
Prečišćena voda	0.57	0.78
0.1M hlorovodonična kiselina pH 1.2	2.87	3.35
Acetatni pufer pH 4.5	0.40	0.52
Fosfatni pufer pH 6.8	0.44	0.65

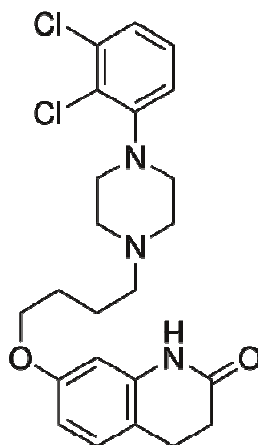
U kliničkim studijama sa vorikonazolom, ova lekovita supstanca se svrstava u BCS klasu 2, zbog niske rastvorljivosti i visoke permeabilnosti (*FDA accessdata, Vfend*).

Studije forsirane degradacije ukazuju da je u pitanju relativno stabilna lekovita supstanca, termostabilna i fotostabilna, a kao put degradacije izdvaja se oksidacija (*Voriconazole Drug Master File, Medichem Manufacturing Limited, Malta*).

4.1.2. Fizičko-hemijske karakteristike aripiprazola

Aripiprazol je relativno nova lekovita supstanca koja pripada trećoj generaciji atipičnih antipsihotika i koristi se u terapiji šizofrenije.

Hemijska struktura leka prikazana je na Slici 4.1.2-1.



Slika 4.1.2-1. Aripiprazol (7-[4-[4-(2, 3-dihlorofenil)-1-piperazinil] butoksi]-3, 4-dihidrokarbostiril, molekulska formula $C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$, Mr 448.39).

Aripiprazol je beo do skoro beo kristalan prašak. Slaba je organska baza sa pKa vrednošću 7.6 (20% etanol, na 25°C). Particioni koeficijent ($P_{(u/v)}$) kreće se od 3.4 pri pH 2.0 do >1000 pri pH 6.0 (*Product information, Abilify tablets, Otsuka Pharmaceutical Co*).

Aripiprazol ispoljava polimorfizam, a u ovom istraživanju koristi se aripiprazol kristalne forme III (Braun i autori, 2009). Bez obzira na polimorfni oblik, aripiprazol se smatra u vodi gotovo nerastvornom supstancom.

Rastvorljivost u vodenim medijumima je jedna od važnijih karakteristika lekovite supstance, jer ona može biti ograničavajući faktor u pripremi rastvora za raspršivanje, kao i faktor važan za oslobađanje iz lekovitog oblika. Rezultati rastvorljivosti aripiprazola u vodenim medijumima različitih pH vrednosti, dobijeni primenom standardne *shake-flask* (engl.) metode, prikazani su u Tabeli 4.1.2-1. (*in-house* metoda, Hemofarm a.d., Srbija).

Tabela 4.1.2-1. Rastvorljivost aripiprazola u različitim vodenim medijumima

Medijum	Rastvorljivost (mg/ml)	
	na 25°C	na 37°C
Prečišćena voda	0.001	0.001
0.1M hlorovodonična kiselina pH 1.2	0.14	0.20
Acetatni pufer pH 4.5	0.10	0.13
Fosfatni pufer pH 6.8	0.001	0.001
Fosfatni pufer pH 3.0-	0.86	0.98
Citratni pufer pH 3.0	0.22	0.38
Acetatni pufer pH 4.1	0.23	0.29

Na osnovu dobijenih rezultata aripiprazol se definiše kao vrlo teško rastvorljiva odnosno gotovo nerastvorljiva supstanca, prema definicijama rastvorljivosti iz Evropske farmakopeje.

Prema studiji u kojoj je vršena procena rezultata rastvorljivosti, brzine rastvaranja i permeabilnosti, aripiprazol se svrstava u BCS klasu 4, zbog niske rastvorljivosti i permeabilnosti (*FDA accessdata, Abilify*).

Studije forsirane degradacije ukazuju da je u pitanju relativno stabilna lekovita supstanca, termostabilna i fotostabilna, a kao put degradacije izdvaja se oksidacija (*Aripiprazole Drug Master File, Neuland Laboratories, Indija*).

4.1.3. Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (CPK)

Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda (praška) sa odabranim model supstancama prikazan je u Tabeli 4.1.3-1.

Tabela 4.1.3-1. Ciljani profil kvaliteta međuproizvoda

Elementi kvaliteta	Cilj	
Međuproizvod	Prašak	
Put primene	Oralni	
Profil oslobađanja leka	Trenutno oslobađanje leka	
Koncentracija leka	5% ¹	
Atributi kvaliteta	Izgled	
	Identifikacija	
	Sadržaj	
	Ujednačenost sadržaja	Specifikacije u skladu sa oficinalnim ili
	Brzina rastvaranja	drugim standardima kvaliteta koje potvrđuju
	Hemijska stabilnost	bezbednost i efikasnost tokom roka trajanja
	Fizička stabilnost	leka
	Rezidualni rastvarači	
Sadržaj vlage		
Mikrobiološka čistoća		

¹Terapijska oralna doza aripiprazola kreće se od 2 mg do 30 mg, a za vorikonazol je 50 mg ili 200 mg; za potrebe istraživanja kao ciljna koncentracija leka u prašku kao međuproizvodu, formulisanom sa ciklodekstrinom, definisana je koncentracija 5%.

4.1.4. Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda (KAK)

Kada su u pitanju teško rastvorljive lekovite supstance kao što su vorikonazol i aripiprazol, postizanje trenutnog oslobađanja leka iz lekovitog oblika moglo bi biti poseban izazov. Imajući to u vidu, kao i karakteristike odabranih model supstanci, kao potencijalno pogodan proces izrade praška odabrana je tehnologija sušenja raspršivanjem vodenog rastvora kompleksa lekovite supstance i ciklodekstrina. U odnosu na tu polaznu osnovu, kao i uzimajući u obzir ciljani profil definisani su kritični atributi kvaliteta međuproizvoda (praška dobijenog sušenjem raspršivanjem) (Tabela 4.1.4-1).

Kao kritični atribut kvaliteta međuproizvoda posebno se izdvaja brzina rastvaranja lekovite supstance. Kritični atributi kvaliteta svakako bi bili i odgovarajuća hemijska stabilnost i ujednačenost sadržaja. Pošto je odabrana tehnologija sušenja raspršivanjem rastvora koja se smatra pogodnom za dobijanje praškova homogenog sastava, fokus se trenutno ne usmerava na ovaj atribut. S druge strane, pošto bi se u fazi proizvodnje praškova sušenjem raspršivanjem, podešavanjem procesnih parametara moglo uticati na sadržaj vlage u praškovima i sa tog aspekta potencijalno na stabilnost, kao kritični atribut kvaliteta proizvoda izdvaja se i sadržaj vlage u dobijenim praškovima.

4.1.5. Definisanje potencijalno kritičnih atributa kvaliteta polaznih materijala i procesnih parametara

4.1.5.1. Analiza rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance

Na osnovu fizičko-hemijskih i bioloških osobina lekovitih supstanci, i u odnosu na odabranu tehnologiju izrade (sušenje raspršivanjem rastvora kompleksa lek:ciklodekstrin), izvršena je analiza rizika atributa lekovite supstance po kritične attribute kvaliteta međuproizvoda.

U analizi rizika korišćena je tehnika Preliminarne analize opasnosti (engl. *Preliminary Hazard Analysis – PHA*) (Rausand, 2005; Sakura tablet case study, NIHS, 2008).

Tabela 4.1.4-1. Kritični atributi kvaliteta međuproizvoda (KAK)

Atributi kvaliteta	Cilj	Kritičnost	Opravdanost
Izgled	Homogeni izgled	Ne	Izgled nije direktno povezan sa bezbednošću i efikasnošću.
Identifikacija	Pozitivna na lekovitu supstancu	Da ¹	Iako je identifikacija kritična za bezbednost i efikasnost, ovaj atribut se može efikasno kontrolisati i pratio bi se tokom puštanja leka u promet.
Sadržaj	95-105% od deklarisanе vrednosti	Da	Varijabilnost sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Ujednačenost sadržaja	90-110%, RSD ≤5%	Da	Varijabilnost u ujednačenosti sadržaja utiče na bezbednost i efikasnost. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Brzina rastvaranja	Ne manje od 80% od deklarisanе vrednosti za 45 minuta	Da	Neusaglašenost sa specifikacijom za brzinu rastvaranja može da utiče na bioraspoloživost. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Hemijska stabilnost	Profil nečistoća u skladu sa oficinalnim zahtevima/ICH smernicama i u skladu sa profilom nečistoća referentnog proizvoda.	Da	Degradacioni proizvodi mogu da utiču na bezbednost i efikasnost i moraju biti kontrolisani. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Fizička stabilnost	Što manja promena tokom vremena	Da	Fizička stabilnost može uticati na kvalitet i mora biti kontrolisana. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Rezidualni rastvarači	Profil rezidualnih rastvarača u skladu sa oficinalnim zahtevima/ICH smernicama	Da ¹	Rezidualni rastvarači mogu uticati na bezbednost. U proizvodnji se ne bi koristili organski rastvarači.
Sadržaj vlage	Pratiti	Da	Sadržaj vlage može uticati na degradaciju i mikrobiološki rast u lekovitom proizvodu. Formulacijske i procesne promenljive mogu uticati na ovaj atribut.
Mikrobiološka čistoća	U skladu sa EP 2.6.12 i 2.6.13	Da ¹	Neusaglašenost sa specifikacijom utiče na bezbednost pacijenta. Generalno, rizik od mikrobiološkog rasta je mali kod čvrstih doziranih oblika.

¹Formulacijske i procesne promenljive ne utiču na ove kritične atribute kvaliteta, tako da se izostavljaju iz daljeg razmatranja iako su važni elementi kvaliteta.

Najpre su iz ciljanog profila izdvojeni sledeći parametri kvaliteta: sadržaj, ujednačenost sadržaja, brzina rastvaranja, hemijska i fizička stabilnost i sadržaj vlage. Zatim su izdvojene osobine lekovite supstance kao rizici koji mogu da utiču na parametre kvaliteta: oblik čvrstog stanja (amorfno ili kristalno), veličina čestica, hemijska stabilnost, protočnost. Za svaku od tih osobina procenjen je nivo rizika uticaja korišćenjem PHA na osnovu težine (ozbiljnosti) rizika i verovatnoće dešavanja.

Rezultati ocene i rangiranja rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance prikazani su u Tabeli 4.1.5-1.

Tabela 4.1.5-1. Analiza rizika za attribute kvaliteta lekovite supstance

Rizik	Događaj	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Oblik čvrstog stanja	Sadržaj	1	1	L
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	2	1	L
	Hemijska stabilnost	2	1	L
	Fizička stabilnost	2	1	L
	Sadržaj vlage	2	1	L
Veličina čestica	Sadržaj	3	1	L
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Brzina rastvaranja	3	1	L
	Hemijska stabilnost	1	1	L
	Fizička stabilnost	1	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L
Hemijska stabilnost	Sadržaj	2	3	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	3	3	M
	Fizička stabilnost	2	2	L
	Sadržaj vlage	1	1	L
Protočnost	Sadržaj	2	1	L
	Ujednačenost sadržaja	3	1	L
	Brzina rastvaranja	2	1	L
	Hemijska stabilnost	1	1	L
	Fizička stabilnost	2	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L

L – nizak nivo rizika; M – srednji nivo rizika.

Proizvodni postupak podrazumeva rastvaranje (kompleksiranje) lekovite supstance pomoću ciklodekstrina i sušenje rastvora raspršivanjem. Na taj način je rizik svih navedenih polaznih atributa kvaliteta lekovite supstance, osim hemijske stabilnosti, mali

za sve atribute kvaliteta međuproizvoda. Hemijska stabilnost lekovite supstance kritična je za atribute kvaliteta kao što su sadržaj i degradacioni proizvodi. Njena inicijalna hemijska čistoća bi se pratila prilikom ulazne kontrole kvaliteta. Iako se zahvaljujući relativno dobroj stabilnosti lekovite supstance i primeni ciklodekstrina odabrana tehnologija može smatrati pogodnom jer može rezultovati praškom homogenog sastava i dobre rastvorljivosti, zbog očekivanog prelaska u amorfni oblik stabilnost može biti smanjena što bi se ispitalo u daljim fazama razvoja.

4.1.5.2. Odabir ekscipijenasa

Prilikom odabira ekscipijenasa pogodnih za proizvodnju praška sušenjem raspršivanjem, uzeto je u obzir prethodno znanje u vezi sa odabranim model supstancama i formulacijama sa teško rastvorljivim lekovitim supstancama i ciklodekstrinima (CD). Kada su teško rastvorljive supstance u pitanju, formulacija doziranih oblika sa ciklodekstrinima deluje kao dobro rešenje problema niske bioraspoloživosti. Dodatno, tehnologija sušenjem raspršivanjem se smatra pogodnom za efikasno prevođenje rastvora kompleksa lek:ciklodekstrin u prašak ujednačenog sastava i veličine čestica.

Potencijal aripiprazola i vorikonazola da budu dobri kandidati za kompleksaciju sa ciklodekstrinima je već prepoznat, i na tržištu postoji proizvod sa kompleksom aripiprazola i derivata beta-ciklodekstrina u obliku intramuskularnog rastvora za injekciju, i sa kompleksom vorikonazola i derivata beta-ciklodekstrina u obliku praška za rastvor za intravensku injekciju.

Dva nejonska derivata beta-ciklodekstrina odabrana su za istraživanje: (2-hidroksi)propil-beta-ciklodekstrin (HPBCD), poznat po svojoj dobroj rastvorljivosti u vodi i niskoj toksičnosti, i 2-O-metil beta-ciklodekstrin (2-O-MBCD), noviji metilovani derivat dobre rastvorljivosti, efikasan solubilizator i sa potencijalom da se koristi i za parenteralnu primenu.

Razvoj formulacije sa vorikonazolom obuhvatao je odabir ciklodekstrina i uslova pogodnih za kompleksaciju i pripremu vodenog rastvora kompleksa, sa ciljem da se ostvari kompleksacija leka do koncentracije 5% u rezultujućem prašku osušenom raspršivanjem rastvora.

S druge strane, zbog svoje veće molekulske mase, kompleksacija aripirazola i ciklodekstrina bila je nešto izazovniji zadatak. Stoga je pored odabira odgovarajućeg derivata ciklodekstrina razmatrana mogućnost dodatnog povećanja efikasnosti kompleksiranja manipulacijom faktora koji utiču na interakciju lek:ciklodekstrin, kao što su pH medijuma (vrsta pufera) i dodatak hidrosolubilnog polimera. Za ispitivanje su odabrani sledeći medijumi: voda, citratni pufer (pH 3.0), fosfatni pufer (pH 3.0) i hidrosolubilni polimer polivinilpirolidon (PVP). Dakle, razvoj formulacije sa aripirazolom obuhvatao je nešto složeniju analizu i odabir ekscipijenasa i uslova pogodnih za kompleksaciju i pripremu vodenog rastvora kompleksa, sa ciljem da se takođe ostvari kompleksacija leka do koncentracije 5% u rezultujućem prašku osušenom raspršivanjem rastvora.

4.1.5.3. Analiza rizika za pripremu rastvora kompleksa lek:ciklodekstrin

Izvršena je analiza rizika za pripremu rastvora lek:ciklodekstrin. U preliminarnoj analizi rizika korišćena je tehnika Preliminarne analize opasnosti (engl. *Preliminary Hazard Analysis* – PHA) (Rausand, 2005; *Sakura tablet case study*, 2008). Najpre su iz ciljnog profila izdvojeni sledeći parametri kvaliteta međuproizvoda: sadržaj, ujednačenost sadržaja, brzina rastvaranja, hemijska i fizička stabilnost i sadržaj vlage. Zatim su izdvojeni potencijalno rizični faktori koji mogu da utiču na parametre kvaliteta međuproizvoda: tip ciklodekstrina (CD), koncentracija CD, pH medijuma, vrsta pufera, prisustvo hidrosolubilnog polimera, vreme mešanja. Za svaku od tih osobina procenjen je nivo rizika korišćenjem PHA na osnovu težine (ozbiljnosti) rizika i verovatnoće dešavanja.

Rezultati ocene i rangiranja rizika za pripremu rastvora lek:CD prikazani su u Tabeli 4.1.5-2.

Odabran je opseg koncentracija CD koji obuhvata rastvorljivost CD u vodi na sobnoj temperaturi. Prilikom izvođenja uporednih studija u okviru istog seta eksperimenata korišćeno je isto vreme mešanja.

U slučaju vorikonazola ispitivan je uticaj tipa ciklodekstrina (HPBCD i 2-O-MBCD) na efikasnost kompleksiranja i osnovne karakteristike dobijenih kompleksa.

U slučaju aripiprazola, najpre je sa HPBCD izvršeno detaljnije ispitivanje uticaja faktora kao što su vrsta medijuma i prisustvo hidrosolubilnog polimera na efikasnost kompleksiranja. Zatim je pod odabranim optimalnim uslovima ispitivan uticaj tipa ciklodekstrina (HPBCD i 2-O-MBCD) na efikasnost kompleksiranja.

Na odabranoj formulaciji izvršena je optimizacija procesa sušenja raspršivanjem.

4.1.5.4. Analiza rizika za procesne parametre sušenja raspršivanjem

Iako se smatra složenim tehnološkim procesom, sušenje raspršivanjem omogućava da se podešavanjem brojnih procesnih parametara u skladu sa postavljenim ciljem definiše širok prostor za dizajn. Kao ciljna osobina koprocesiranog praška definisana je što manja vrednost za sadržaj vlage, a što se tiče kvaliteta procesa kao cilj je definisano postizanje što većeg proizvodnog prinosa.

Za definisane ciljeve, izvršena je inicijalna analiza rizika sledećih procesnih parametara: temperature ulaznog vazduha (temperature vazduha za sušenje na ulazu u komoru), brzine pumpe (brzine kojom se rastvor dovodi do raspršivača), brzine aspiratora (brzine protoka vazduha za sušenje podešavanjem rada aspiratora tj. brzine kojom se vazduh za sušenje izvlači kroz uređaj), koncentracije rastvora (medijuma koji se raspršuje), vlažnosti ulaznog vazduha, i atomizacije (količine energije koja se troši za raspršivanje) (Tabela 4.1.5-3.). Analiza rizika izvedena je primenom FMEA analize (engl. *Failure Mode Effects Analysis*). Rizik je procenjen na osnovu tri kriterijuma: težine, verovatnoće javljanja i detektabilnosti (vremena detekcije), tako što je broj prioritarnog rizika dobijen množenjem ove tri vrednosti korišćen u rangiranju rizika (*Sakura tablet case study*, 2008; *RMWG-07 case study*, 2008).

Za ispitivanje uticaja i optimizaciju odabrana su tri potencijalno kritična procesna parametra: temperatura ulaznog vazduha, brzina pumpe i koncentracija rastvora. Temperatura ulaznog vazduha obezbeđuje dovod toplotne energije, brzina pumpe i koncentracija rastvora utiču na količinu tečnosti koja se dovodi za isparavanje i samim tim na ishod prenosa mase i energije i formiranje čestica. Uticaj parametara koji nisu uključeni u optimizaciju smanjen je održavanjem u uskim granicama ili održavanjem konstantnih vrednosti (vlažnost ulaznog vazduha, atomizacija).

Tabela 4.1.5-2. Analiza rizika za pripremu rastvora kompleksa lek:CD

Rizik	Događaj	Težina	Verovatnoća	Ocena rizika
Tip CD	Sadržaj	4	5	H
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	4	4	H
	Hemijska stabilnost	3	4	H
	Fizička stabilnost	3	3	M
	Sadržaj vlage	2	3	M
Koncentracija CD	Sadržaj	4	5	H
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	4	4	H
	Hemijska stabilnost	3	4	H
	Fizička stabilnost	3	3	M
	Sadržaj vlage	2	2	L
pH medijuma	Sadržaj	3	3	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	2	2	L
	Hemijska stabilnost	3	4	H
	Fizička stabilnost	2	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L
Vrsta pufera	Sadržaj	3	3	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	2	2	L
	Hemijska stabilnost	3	4	H
	Fizička stabilnost	2	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L
Prisustvo hidrosolubilnog polimera	Sadržaj	3	3	M
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	2	2	L
	Hemijska stabilnost	3	3	M
	Fizička stabilnost	3	3	M
	Sadržaj vlage	2	3	M
Vreme mešanja	Sadržaj	3	5	H
	Ujednačenost sadržaja	1	1	L
	Brzina rastvaranja	1	1	L
	Hemijska stabilnost	2	3	M
	Fizička stabilnost	1	1	L
	Sadržaj vlage	1	1	L

L – nizak nivo rizika; M – srednji nivo rizika; H – visok nivo rizika.

Tabela 4.1.5-3. Analiza rizika za procesne parametre sušenja raspršivanjem

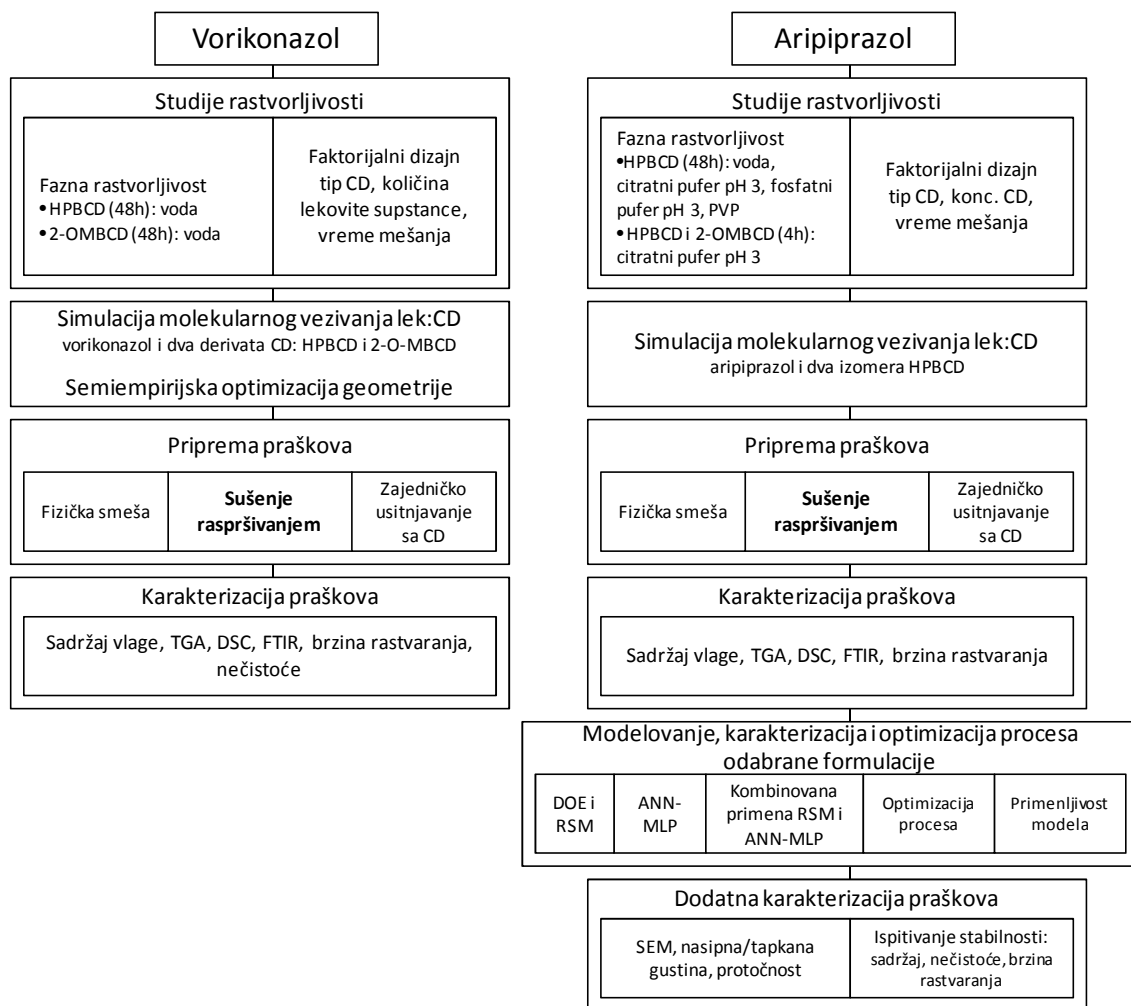
Ciljni profil proizvoda/svojstva kvaliteta	Potencijalni modalitet ispada	Efekat	Težina	Verovatnoća javljanja	Detektabilnost	Broj prioritarnog rizika ¹
Sadržaj vlage	Temperatura ulaznog vazduha	Na nižim temperaturama zbog veće relativne vlažnosti vazduha kojim se vrši sušenje i manje efikasnosti sušenja, može doći do povećanja sadržaja rezidualne vlage u prašku.	2	5	3	30
Sadržaj vlage	Brzina pumpe	Veća brzina može da dovede do povećanja sadržaja vlage zbog toga što treba da ispari veća količina vode.	3	5	3	45
Sadržaj vlage	Brzina aspiratora	Veća brzina može da dovede do povećanja sadržaja vlage u prašku zbog skraćenog zadržavanja u komori.	1	4	3	12
Sadržaj vlage	Koncentracija rastvora	Niža koncentracija može da dovede do povećanja sadržaja vlage jer ima više vode za isparavanje.	4	5	1	20
Sadržaj vlage	Vlažnost vazduha	Veća vlažnost vazduha može da dovede do povećanja sadržaja vlage jer je smanjen kapacitet sušenja ali rad uređaja u klimatizovanom prostoru smanjuje rizik.	3	2	1	6
Sadržaj vlage	Atomizacija	Nema direktnog uticaja na sadržaj vlage u prašku.	-	-	-	-
Proizvodni prinos	Temperatura ulaznog vazduha	Viša temperatura ulaznog vazduha može da dovede do povećanja prinosa zbog toga što je suvlji proizvod manje lepljiv.	3	4	4	36
Proizvodni prinos	Brzina pumpe	Veća brzina može da dovede do smanjenja prinosa ako se dobija vlažniji proizvod pa je više lepljiv.	3	5	4	60
Proizvodni prinos	Brzina aspiratora	Veća brzina može da dovede do povećanja prinosa zbog boljeg odvajanja u ciklonu.	1	4	4	16
Proizvodni prinos	Koncentracija rastvora	Veća koncentracija može da dovede do povećanja prinosa zbog toga što se krupnije čestice bolje odvajaju u ciklonu.	4	5	1	20
Proizvodni prinos	Vlažnost vazduha	Veća vlažnost vazduha može da dovede do smanjenja prinosa jer može da poveća se lepljivost proizvoda, ali rad uređaja u klimatizovanom prostoru smanjuje rizik.	3	2	1	6
Proizvodni prinos	Atomizacija	Nema direktnog uticaja na prinos.	-	-	-	-

¹Kada je broj prioritarnog rizika: < 20, postoji nizak rizik; ≥ 20 i < 40, postoji srednji rizik; ≥ 40, postoji visok rizik.

Izlazni parametar koji je odabran da se dodatno prati bez unapred definisane specifikacije je temperatura izlaznog vazduha, i za nju nije izvršena formalna analiza rizika.

4.2. MATERIJALI I METODE

Materijali i metode koji su korišćeni kod izabranih model supstanci vorikonazola i aripiprazola šematski su prikazani na Slici 4.2-1.



Slika 4.2-1. Šematski prikaz korišćenih materijala i metoda za model supstance vorikonazol (levo) i aripiprazol (desno).

4.2.1. Materijali

U istraživanju su korišćeni su sledeći materijali: **vorikonazol** (*Medichem Manufacturing Limited*, Malta); **aripiprazol** (*Neuland Laboratories*, Indija); (2-hidroksi)propil-beta-ciklodekstrin, stepen molarne supstitucije MS~0.99 (*Kleptose HP, Roquette*, Francuska); 2-O-metil beta-ciklodekstrin, MS~0.57 (*Kleptose Crysmeb, Roquette*, Francuska); polivinilpirolidon MW 50,000 (*BASF*, Nemačka). Svi drugi sastojci su bili analitičkog kvaliteta (p.a., *pro analysi*, lat.).

4.2.2. Studije rastvorljivosti

4.2.2.1. Studije fazne rastvorljivosti (*phase-solubility*, engl.)

Poboljšanje rastvorljivosti lekovite supstance stvaranjem kompleksa lek:CD ispitivan je u sklopu studija fazne rastvorljivosti (*phase-solubility*, engl). U vodene rastvore rastućih koncentracija ciklodekstrina, 2-O-MBCD (0–160 mM) ili HPBCD (0–320 mM), dodavana je lekovita supstanca u višku. Nakon 48h mešanja (osim kod uporednog ispitivanja uticaja tipa CD na rastvorljivost aripiprazola gde je mešanje trajalo 4h), magnetnom mešalicom na sobnoj temperaturi, izvršeno je odvajanje bistrog rastvora iz suspenzije filtriranjem kroz 0.45µm membranski filter, iz koga je nakon odgovarajućeg razblaženja merenjem na odgovarajućoj talasnoj dužini (255 nm za **vorikonazol**, 217.5 nm za **aripiprazol**), spektrofotometrijski određivana dobijena rastvorljivost lekovite supstance (*Camspec M330 UV spectrophotometer (Camspec Inc., Velika Britanija); 8453 UV-visible spectrophotometer (Agilent, SAD)*).

U slučaju **vorikonazola** korišćena je voda, a u slučaju **aripiprazola** su pored vode korišćena i dva različita pufera pH vrednosti 3.0, citratni (Ph. Eur. 4008000) i fosfatni pufer (Ph. Eur. 4010000).

Na osnovu dobijenih rezultata, konstruisan je fazni dijagram u vidu zavisnosti molarne koncentracije rastvorene supstance (y-osa) od molarne koncentracije ciklodekstrina (x-osa). Analizom oblika dobijenih dijagrama rastvorljivosti izvršena je klasifikacija po tipu dijagrama. Primenom regresione analize izvršeno je uklapanje krive sa linearnim, kvadratnim ili kubnim modelom (*Microsoft Office Excel 97-2003, Microsoft*

Corporation, SAD), i na osnovu koeficijenata korelacije za dobijene modele izvedena je pretpostavka o tome koji kompleksi lek:CD su najverovatniji: 1:1, 1:2 ili 1:3:

$$y = ax + b, \text{ za kompleks 1:1} \quad (4.2.2-1)$$

$$y = ax^2 + bx + c, \text{ za kompleks 1:2} \quad (4.2.2-2)$$

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d, \text{ za kompleks 1:3} \quad (4.2.2-3)$$

gde je x molarna koncentracija ciklodekstrina, y molarna koncentracija rastvorene supstance, a $a-d$ su konstante.

4.2.2.2. Primena faktorijalnog dizajna

Faktorijalni dizajn 2^3 koji je primenjen za **vorikonazol**, podrazumevao je ispitivanje statističkog značaja uticaja tipa CD (HPBCD, 2-O-MBCD), količine lekovite supstance (500 mg i 1000 mg) i vremena mešanja (30 i 60 minuta mešanja), na solubilizaciju vorikonazola. U svim eksperimentima korišćeni su 5 % vodeni rastvori CD. Nakon dodatka lekovite supstance u višku, dobijene disperzije su mešane određeno vreme magnetnom mešalicom na sobnoj temperaturi, posle čega su centrifugirane i dobijeni supernatanti su na odgovarajući način razblaženi i analizirani spektrofotometrijski na talasnoj dužini 255 nm (*8453 UV-visible spectrophotometer, Agilent, SAD*).

Faktorijalni dizajn 2^3 koji je primenjen za **aripiprazol**, podrazumevao je ispitivanje statističkog značaja uticaja tipa CD (HPBCD, 2-O-MBCD), koncentracije CD (12.5% i 25%) i vremena mešanja (60 i 120 minuta mešanja), na solubilizaciju aripiprazola. U svim eksperimentima dodato je 1000 mg aripiprazola. Disperzije su mešane magnetnom mešalicom na sobnoj temperaturi, posle čega su centrifugirane i dobijeni supernatanti su na odgovarajući način razblaženi i analizirani spektrofotometrijski na talasnoj dužini 250nm (*8453 UV-visible spectrophotometer, Agilent, SAD*).

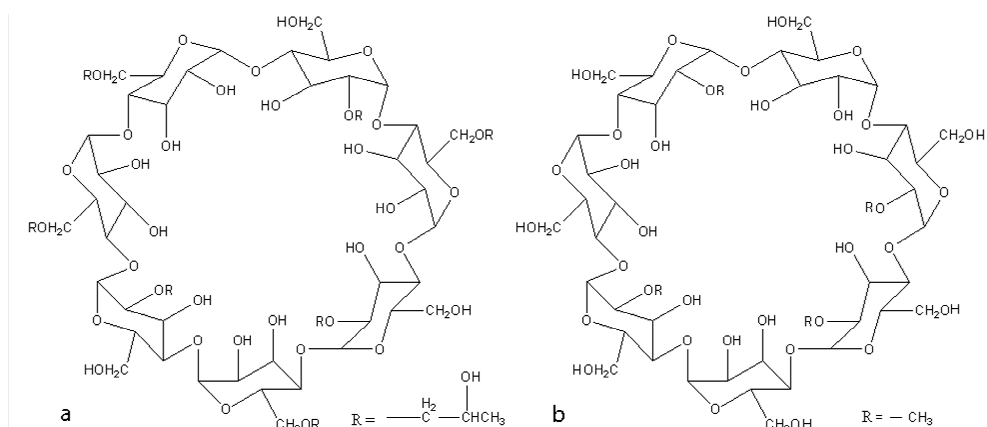
Dobijeni rezultati za rastvorljivost statistički su analizirani kao odgovori na različite kombinacije ispitivanih faktora, uz pomoć programa *Design-Expert 7.0 software (Stat-Ease Inc, SAD)*.

4.2.3. Simulacija molekularnog vezivanja lek:ciklodekstrin (*molecular docking simulation, engl.*)

U cilju boljeg razumevanja dobijenih rezultata studija rastvorljivosti simulacija molekularnog vezivanja lek:CD izvršena pomoću je programa *Auto-Dock Vina* koji primenjuje računarsku proceduru u predviđanju najverovatnije konformacije molekula u vezanom stanju i slobodne energije vezivanja.

U slučaju **vorikonazola** simulirano je molekularno vezivanje leka sa dva tipa CD: HPBCD i 2-O-MBCD. Početne koordinate koje odgovaraju kristalnoj strukturi vorikonazola preuzete su iz baze podataka *Cambridge Structural Database (CSD)* (Ravikumar i autori, 2007; *CSD Ref CEXMAU*).

Pošto je praktično nemoguće da se simuliraju svi mogući izomeri supstituisanih ciklodekstrina, jedan reprezentativni izomer HPBCD je izabran za simulaciju na osnovu deklarisanе molekularne supstitucije (M.S.) komercijalnog proizvoda (Kleptose HP, sa M.S.0.99), sa ukupno sedam (2-hidroksi)propil supstituenta: sa četiri supstituenta pozicionirana na O6 atomima kiseonika kao najreaktivnijem mestu, i tri na sledećem najreaktivnijem mestu, O2 atomima kiseonika (Gramera i Caimi, 1969) (Slika 4.2.3-1a).



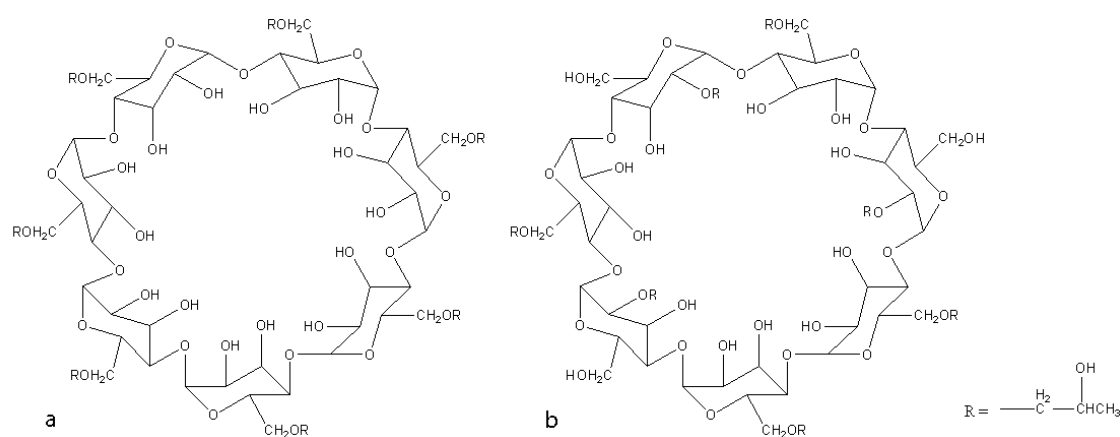
Slika 4.2.3-1. Izomeri (2-hidroksi)propil-beta-ciklodekstrina (a), i 2-O metil-beta-ciklodekstrina (b) korišćene u simulaciji.

Za 2-O-MBCD (Slika 4.2.3-1b), početne koordinate su uzete iz kristalne strukture objavljene u bazi podataka *Cambridge Structural Database (CSD Ref code IQOZIX)*, prilagođene deklarisanom molekularnoj supstituciji M.S. 0.57 pozicioniranjem četiri metil grupe na O2 atomima kiseonika. Inicijalna geometrija svih struktura optimizovana

je pre simulacije vezivanja, korišćenjem parametara polja sile (*AMMP force field* program implementiran u softver *VegaZZ molecular modeling software* (Pedretti i autori, 2002)). Zatim su spojeni nepolarni atomi vodonika, dodeljena su *Kollman united-atom* naelektrisanja i solvatacioni parametri (*AutoDockTools* program, Morris i autori, 1998).

U slučaju **aripirazola**, simulirano je molekularno vezivanje leka sa dva izomera HPBCD. Početne koordinate koje odgovaraju kristalnoj strukturi aripirazola preuzete su iz baze podataka *Cambridge Structural Database* (CSD Ref No 285534), definisani su parametri polja sile (*CHARMm* program, Momany i Rone, 1992), dodeljena su *Gasteiger* naelektrisanja atomima liganda (*VEGA ZZ molecular modeling software* program, Pedretti i autori, 2002), i izvršena je minimizacija energije (*NAMD molecular dynamics* program, Phillips i autori, 2005). Zatim su spojeni nepolarni atomi vodonika, i definisane su veze koje mogu da rotiraju.

Pošto je praktično nemoguće da se simuliraju svi mogući izomeri supstituisanih ciklodekstrina, za simulaciju su izabrana dva reprezentativna izomera (2-hidroksi)propil-beta-ciklodekstrina na osnovu deklarisanе molekularne supstitucije (M.S.) korišćenog CD (Kleptose HP, M.S.0.99) (Slika 4.2.3-2).



Slika 4.2.3-2. Izomeri (2-hidroksi)propil-beta-ciklodekstrina korišćeni u simulacijama: *izomer a*, sa supstitucijom na O6 poziciji (a), i *izomer b*, sa supstituentima na O6 i O2 pozicijama (b).

Izomer a ima sedam (2-hidroksi)propil supstituenata pozicioniranih na O6 atomima kiseonika kao najreaktivnijim mestima (Gramera i Caimi, 1969), a nasumično supstituisani *izomer b* ima četiri (2-hidroksi)propil supstituenta pozicionirana na O6

atomima kiseonika, i tri na sledećem najreaktivnijem mestu, O2 atomima kiseonika (Gramera i Caimi, 1969). Zatim su spojeni nepolarni atomi vodonika, dodeljena su *Kollman united-atom* naelektrisanja i solvatacioni parametri (*AutoDockTools* program, Morris i autori, 1998).

4.2.3.1. Dodatna semiempirijska optimizacija geometrije kompleksa vorikonazol:CD

U slučaju **vorikonazola** je nakon simulacije molekularnog vezivanja izvršena semiempirijska optimizacija geometrije kompleksa. Kombinovana primena simulacije vezivanja sa semiempirijskom optimizacijom geometrije doprinosi boljoj tačnosti simulacije vezivanja (Stigliani i autori, 2012).

Izvršena je optimizacija onih pozicija leka i CD u kompleksu koje su imale najveću vrednost *scoring* funkcije, korišćenjem *AMMP force field* programa. Za komplekse sa najnižom energijom izvršena je puna optimizacija geometrije na semiempirijskom nivou teorije, korišćenjem funkcije *PM6 Hamiltonian* sa lokalizovanom molekularnom orbitalnom metodom, i simulacijom efekata solvatacije pomoću kontinuum modela *COSMO* sa dielektričnom konstantom 78.4 (Klamt i Schumann, 1993). Izvršena je dalja obrada strukture uzimanjem u obzir efekata nekovalentnih interakcija (disperziono i vodonično vezivanje), primenom PM6-DH2 metode (*Single point energy run*) (Korth i autori, 2010). Energije vezivanja, ΔE , računane su na osnovu razlike u toploti formiranja, $\Delta_f H$, individualnih komponenti ($\Delta_f H(lek)$, $\Delta_f H(CD)$) i njihovih kompleksa ($\Delta_f H(lek:CD kompleks)$), prema jednačini (4.2.3-1):

$$\Delta E = \Delta_f H(lek:CD kompleks) - \Delta_f H(lek) - \Delta_f H(CD) \quad (4.2.3-1)$$

Svi proračuni su vršeni korišćenjem programa MOPAC (evaluacija rezultata korišćenjem *WinMostar (TENCUBE Institute, Ltd.)* grafičkog korisničkog interfejsa).

4.2.4. Priprema praškova

4.2.4.1. Praškovi dobijeni sušenjem raspršivanjem

Inicijalno, čvrsti sistemi lek:ciklodekstrin pripremljeni su sušenjem raspršivanjem bistrih rastvora dobijenih nakon filtracije suspenzija dobijenih tokom studija rastvorljivosti, na laboratorijskom uređaju za sušenje raspršivanjem *Büchi B-191-Mini Spray Dryer* (*Büchi Laboratories-Technik AG*, Švajcarska) (Slika 4.2.4-1a). Korišćeni su sledeći procesni parametri: temperatura ulaznog vazduha 120°C, temperatura izlaznog vazduha 70°C, brzina pumpe 15%, rad aspiratora 100%, atomizacija 550l/h.

Temperatura izlaznog vazduha je merena kao odgovor pomoću temperaturnog senzora koji se nalazi u delu uređaja za sušenje raspršivanjem odmah posle cilindra u kome se vrši raspršivanje (koji je ujedno i komora za sušenje), tako da je omogućeno merenje temperature vazduha koji nosi čvrste čestice pre njihovog ulaska u ciklonski separator. Stoga je merena temperatura označena kao temperatura izlaznog vazduha.

Proizvodni prinos je računat tako što je masa praška prikupljena posle svakog eksperimenta sušenja raspršivanjem izražena kao procenat početne količine praškova od kojih je pripremljen rastvor, umanjen za dobijeni sadržaj vlage.

U fazi modelovanja i optimizacije sušenja raspršivanjem odabrane formulacije sa **aripiprazolom**, korišćen je uređaj *Büchi 290-Mini Spray Dryer* (*Büchi Laboratories-Technik AG*, Švajcarska) opremljen sa standardnim mlaznim raspršivačem sa dva fluida (Slika 4.2.4-1b). U svim eksperimentima količina rastvora je bila 10 g osim ako nije drugačije navedeno, brzina aspiratora je bila podešena na 100% (što odgovara maksimalnom protoku vazduha za sušenje od 40 m³/h) i brzina vazduha za raspršivanje na 600L/h. Odabrane su ove vrednosti parametara jer se uobičajeno koriste kod sušenja raspršivanjem na pomenutom uređaju (Goula i autori, 2004). Preostali procesni parametri su bili podešeni prema zahtevima pojedinačnih eksperimenata određenih eksperimentalnim dizajnom.



Slika 4.2.4-1. Laboratorijski uređaji za sušenje raspršivanjem: *Büchi B-191-Mini Spray Dryer* (a); *Büchi 290-Mini Spray Dryer* (b).

4.2.4.2. Praškovi dobijeni drugim metodama pripreme

Praškasti uzorci su pripremljeni i tehnikom zajedničkog usitnjavanja u prisustvu male količine rastvarača. U slučaju **vorikonazola** korišćen je odnos CD:lek 1:1, a u slučaju **aripiprazola**, korišćen je odnos CD:lek 16:1 sa HPBCD, i 40:1 sa 2-O-MBCD (prema studiji rastvorljivosti u čistoj vodi sa najvećom ispitivanom koncentracijom CD). Ciklodekstrin je okvašen pomoću nekoliko kapi metanola u keramičkom tarioniku. Postepeno je dodavana definisana količina lekovite supstance i praškovi su mešani pomoću keramičkog pistila oko 15 minuta. Tokom ovog procesa, dodavan je metanol u kapima kako bi se održala pogodna konzistencija smeše. Finalni proizvod je sušen u komornoj sušnici na temperaturi 40°C oko 2h i zatim ostavljen da se uravnoteži na sobnoj temperaturi oko 24h.

Fizičke smeše lekovite supstance i ciklodekstrina pripremljene su mešanjem praškova u polietilenskoj vreći simulirajući mešanje u kontejnerskom mešaču i korišćene su za poređenje tokom analiza.

4.2.5. Karakterizacija praškova

4.2.5.1. Određivanje sadržaja vode

Poznato je da ciklodekstrini formiraju hidrate, i u zavisnosti od stanja hidratacije sadrže određenu količinu vode, tako da je za pripremu vodenih rastvora definisane molarne koncentracije potrebno i to uzeti u obzir kako bi se izmerila odgovarajuća količina ciklodekstrina. Za inicijalnu karakterizaciju ciklodekstrina i analizu određenih kondicioniranih praškova osušenih raspršivanjem, izvršeno je semi-mikro određivanje vode *Karl Fischer* titrimetrijom, koja se zasniva na kvantitativnoj reakciji vode sa sumpor dioksidom i jodom u pogodnom bezvodnom medijumu u prisustvu baze dovoljnog puferskog kapaciteta (Ph.Eur. 2.5.12 Metod A), na uređaju *Karl Fischer titrator (835 Titrand)*, Švajcarska).

4.2.5.2. Sadržaj vlage

Sadržaj vlage (gubitak sušenjem) određivan je termogravimetrijski na aparatu *Mettler-Toledo HR 83 Halogen moisture analyzer (Mettler-Toledo, Švajcarska)* na temperaturi 105°C i u trajanju testa do postizanja pada mase manjeg od 1 mg na 50 sekundi, na veličini uzorka od 0.5 g. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje dva merenja.

4.2.5.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

TGA merenja na praškovima izvršena su pomoću uređaja *Shimadzu TGA50 Thermogravimetric Analyzer (Shimadzu Corporation, Japan)*. Gubitak mase je praćen tokom zagrevanja uzoraka (2-5 mg) u aluminijumskoj posudici, pri temperaturi 30°C do 120°C, pri brzini 10°C/min, u inertnoj atmosferi azota (protok 25cm³/min).

4.2.5.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)

DSC merenja na praškovima izvršena su na uređaju *Shimadzu DSC50 Differential Scanning Calorimeter* (*Shimadzu Corporation*, Japan). Termalno ponašanje je izučavano zagrevanjem uzoraka (2-5 mg) u presom zatvorenoj aluminijumskoj posudici, pri temperaturi 30°C do 300°C, pri brzini 10°C/min, u inertoj atmosferi azota (protok 25cm³/min). Prazna aluminijumska posudica je korišćena kao slepa proba.

4.2.5.5 Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

ATR-FTIR spektroskopija primenjena je za snimanje FTIR spektara direktno iz praškova, u oblasti od 500 do 4000 cm⁻¹, pri rezoluciji 4 cm⁻¹, sa 64 skeniranja za svaki spektar. Korišćen je uređaj *Shimadzu IR Prestige 21 spectrometer* (*Shimadzu Europa GmbH*, Nemačka), kuplovan sa horizontalnim sistemom za smanjenje totalne refleksije *Golden Gate MKII single-reflection ATR system* (*Specac*, Velika Britanija) opremljenim sa sočivom od cink-selenida, kojim se omogućava direktno snimanje uzoraka.

4.2.5.6. Ispitivanje brzine rastvaranja

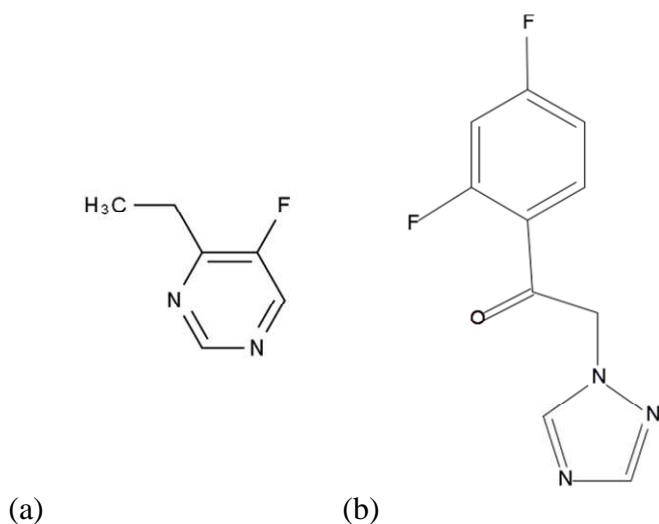
Ispitivanje brzine rastvaranja izvršeno je u uređaju *Dissolution Tester DT800* (*Erweka*, Nemačka), 37±0.5 °C, u 900 ml medijuma. Korišćeni su sledećimedijumi: 0.1M hlorovodonična kiselina (pH 1.2), acetatni pufer (pH 4.5) i fosfatni pufer (pH 6.8). Korišćena je aparatura sa rotirajućom lopaticom sa brzinom mešanja 50 rpm. Samo su u slučaju aripiprazola kod ispitivanja u 0.1M hlorovodoničnoj kiselini korišćene dve brzine mešanja: (a) 60 rpm kako je navedeno u bazi podataka za metode za ispitivanje brzine rastvaranja (www.fda.gov), i (b) 50 rpm (standardna brzina mešanja, diskriminatorniji uslov).

Čvrste formulacije (čista lekovita supstanca, kompleksi leka i CD dobijeni sušenjem raspršivanjem i fizička smeša leka i CD) punjene su u tvrde želatinske kapsule (veličine 0), sa masom punjenja koja odgovara oko 10-11 mg leka. U definisanim vremenskim tačkama izvršeno je uzorkovanje medijuma koji je profiltriran kroz 0.45µm membranski filter, iz koga je spektrofotometrijski određivan sadržaj leka merenjem na odgovarajućoj

talasnoj dužini, poređenjem sa kalibracionom krivom koja je konstruisana korišćenjem referentnog standarda vorikonazola (korišćena je talasna dužina 255 nm za **vorikonazol**, 250 nm za **aripiprazol**) (8453 UV-visible spectrophotometer, Agilent, SAD). Test je ponovljen tri puta, i izračunate su srednje vrednosti i relativna standardna devijacija.

4.2.5.7. Određivanje nečistoća vorikonazola

U kompleksima **vorikonazola** dobijenim sušenjem raspršivanjem praćeno je nekoliko nečistoća: Nečistoća 1 (4-etil-5-fluoropirimidin) i Nečistoća 2 (1-(2,4-difluorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanon) koje su degradacioni proizvodi (Slika 4.2.5-1), i Nečistoća 3, epi-vorikonazol, koja je 2S, 3R izomer of vorikonazola.



Slika 4.2.5-1. Nečistoća 1 (4-etil-5-fluoropirimidin) (a); Nečistoća 2 (1-(2,4-difluoro fenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanon) (b).

Nečistoće su određivane odgovarajućom HPLC metodom. Analiza Nečistoće 1 i Nečistoće 2 je vršena na uređaju *Agilent HPLC system, 1200 Series* (Agilent, Santa Clara, SAD). Hromatografska procedura je izvršena korišćenjem kolone tipa C-18, dimenzija 100 x 4.0 mm napunjena sa silika česticama (3 μ m) (*Hypersil*, Thermo, Thermo Fisher Scientific Inc, SAD). Korišćena je mobilna faza sa 0.0125 M rastvorom natrijum-dihidrogen-fosfat-dihidrata (pufer pH 4.0) i acetonitrilom u odnosu 90:10. Korišćen je protok 1.0 ml/min, injekciona zapremina 50 μ l, temperatura kolone 35°C i UV detektor podešen za rad na 254 nm. Pripremljeni su standradni rastvori koristeći

vorikonazol, i referentne standarde Nečistoće 1 i Nečistoće 2 proizvođača, acetonitrila i diluenta, koncentracije 2 µg/ml vorikonazola i Nečistoće 1 i 2.

Nečistoća 3 je analizirana na uređaju *Agilent HPLC system, 1200 Series* (Agilent, Santa Clara, SAD). Hromatografska procedura je izvršena korišćenjem kolone tipa C-18, dimenzija 150 x 4.6 mm napunjena sa silika česticama (5µm) (*Zorbax Eclipse*, Agilent, Santa Clara, SAD). Korišćena je mobilna faza sa 0.01M rastvorom amonijum acetata i 0.02 g/ml HPBCD (pufer pH 5.0) i acetonitriлом u odnosu 78:22. Korišćen je protok 2.0ml/min, injekciona zapremina 50µl, temperatura kolone 25°C i UV detektor podešen za rad na 254 nm. Pripremljeni su standardni rastvori koristeći vorikonazol, i referentni standard Nečistoće 3 proizvođača, acetonitrila i diluenta, koncentracije 5µg/ml vorikonazola i Nečistoće 3.

U analizi uzorka prašak je odmeren prenet u normalni sud i nakon odgovarajućeg razblaženja dobijeni test rastvor je injektovan u HPLC sistem. Odgovori (površina pika) glavnih pikova su izmereni i izvršen je preračun korišćenjem formule $C_s \times (A_u/A_s)$, gde je A_u površina pika u test rastvoru, A_s je površina pika u standardnom rastvoru i C_s je koncentracija ispitivanih supstanci u standardnom rastvoru.

4.2.6. Modelovanje, karakterizacija i optimizacija sušenja raspršivanjem za odabranu formulaciju sa aripiprazolom

Odabrana je formulacija aripirazola sa HPBCD čiji se kompleks priprema u citratnom puferu pH 3.0, a zatim prevodi u prašak sušenjem raspršivanjem sa koncentracijom leka u prašku od 5%.

4.2.6.1. Eksperimentalni dizajn i metodologija površine odgovora

Tri procesna parametra, faktora (koncentracija rastvora (A), brzina pumpe (B), temperatura ulaznog vazduha (C)), izabrana su za modelovanje procesa primenom centralnog kompozitnog dizajna (engl. *Central composite design, CCD*) sačinjenog od 20 eksperimenata. Analiza varijanse (ANOVA) je izvršena kako bi se odredio značaj svakog faktora, pri nivou značajnosti od 5%. Polinomne jednačine su kreirane kako bi se ustanovile veze među faktorima i odgovorima. Praćeni odgovori su bili prinos (R_1);

sadržaj vlage (R_2) i temperatura izlaznog vazduha (R_3). Realne i kodirane vrednosti evaluiranih promenljivih, praćenih odgovora i eksperimentalni matriks prikazani su u Tabeli 4.2.6-1.

Tabela 4.2.6-1. Nezavisne procesne promenljive u centralnom kompozitnom dizajnu (realne i kodirane vrednosti) i praćeni odgovori

Eksp br.	A, Konc. rastvora (%)		B, Brzina pumpe (%)		C, Temperatura ulaz. vazd. (°C)		Odgovori
	kodirano	realno	kodirano	realno	kodirano	realno	
1	0	20	-1.68	3.18	0	170	
2	-1	10	+1	30	-1	160	
3	+1	30	+1	30	-1	160	
4	0	20	0	20	-1.68	153.18	
5	0	20	0	20	0	170	
6	+1	30	+1	30	+1	180	
7	-1.68	3.18	0	20	0	170	
8	0	20	0	20	0	170	$R_1 =$ Prinos (%)
9	-1	10	-1	10	-1	160	
10	+1.68	36.82	0	20	0	170	$R_2 =$ Sadržaj vlage (%)
11	0	20	0	20	0	170	
12	0	20	0	20	0	170	
13	0	20	0	20	0	170	$R_3 =$ Temperatura izlaznog vezduha (°C)
14	-1	10	+1	30	+1	180	
15	+1	30	-1	10	+1	180	
16	+1	30	-1	10	-1	160	
17	0	20	+1.68	36.82	0	170	
18	0	20	0	20	0	170	
19	-1	10	-1	10	+1	180	
20	0	20	0	20	+1.68	186.82	

Vrednosti brzine pumpe 3.18%, 10%, 20%, 30%, i 36.82% predstavljaju brzinu koja odgovara protoku oko 1ml/min, 3ml/min, 6ml/min, 9ml/min i 11ml/min, respektivno.

Opsezi ispitivanih parametara su birani tako da se dobije najbolji proizvodni prinos uz minimalni sadržaj vlage u praškovima. Opseg za temperaturu ulaznog vazduha je odabran na osnovu nekoliko preliminarnih eksperimenata tako da se postigne temperatura izlaznog vazduha oko 70-80°C, koja je korišćena u nekim prethodnim studijama o sušenju raspršivanjem formulacija sa ciklodekstrinima (Ribeiro i autori, 2008; Fini i autori, 2008). Koncentracija rastvora je odabrana da bude 10% i 30% (što odgovara vrednostima -1 i +1 u CCD, respektivno), jer je sličan opseg ispitivan u nekim prethodnim studijama sušenja raspršivanjem (Fini i autori, 2008; Goula i Adamopoulos, 2004). Opseg za brzinu pumpe koji odgovara vrednostima -1 i +1 CCD, 10% i 30%, odabran je kao optimalan u skladu sa preporukom proizvođača uređaja.

Odabrana formulacija sastojala se od aripiprazola solubilizovanog u rastvoru HPBCD u citratnom puferu pH 3, budući da je izdvojena kao najpogodnija sa aspekta postignutog povećanja rastvorljivosti. Sva ispitivanja koja se zasnivaju na eksperimentalnom dizajnu bila su podržana primenom softverskog paketa *Design-Expert*® 7.0.0 (Stat-Ease Inc, Minneapolis, SAD).

4.2.6.2. Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona

U modelovanju procesa sušenja raspršivanjem korišćena je veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona (engl. *Multilayer perceptron, MLP*). Pre treniranja mreže i razvoja modela, definisana je specifikacija za broj skrivenih slojeva i broj jedinica u ovim slojevima. Za aktivaciju neurona odabrana je sigmoidna transfer funkcija. Za treniranje mreže odabran je BP algoritam (engl. *back-propagation, BP*) i podešavani su parametri kao što su broj epoha, brzina učenja, momentum, broj kombinacija. MLP je primenjen korišćenjem komercijalno dostupnog softvera *Statistica Neural Network software* (StatSoft, SAD).

4.2.6.3. Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža i metodologije površine odgovora

Razmotreno je nekoliko pristupa modelovanju procesa. Šema eksperimenata koji su korišćeni u razvoju i testiranju modela predstavljena je na Slici 4.2.6-1. Sposobnost predviđanja modela izražavana je izračunavanjem koeficijenta korelacije (R^2) između eksperimentalno dobijenih i predviđenih rezultata.

Najpre su razvijeni **modeli RSM1 i MLP1** pomoću eksperimentalnih podataka CCD dizajna (Tabela 4.2.6-1, Slika 4.2.6-1), primenom metodologije površine odgovora (RSM) i neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona (MLP), respektivno. Rezultati dodatno izvedenih 9 eksperimenata sa nasumično dizajniranim ulaznim parametrima, korišćeni su za testiranje predviđanja dobijenih modela (Tabela 4.2.6-2, Slika 4.2.6-1).

Eksp. br.	RSM1	RSM2a	RSM2b	RSM3	MLP1	MLP2a	MLP2b
1	Red	Green (MLP2a)	Red	Green (MLP1)	Red	Grey	Red
2	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
3	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
4	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
5	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
6	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
7	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
8	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
9	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
10	Red	Green (MLP2a)	Red	Green (MLP1)	Red	Grey	Red
11	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
12	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
13	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
14	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
15	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
16	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
17	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
18	Red	Green (MLP2a)	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Grey	Grey
19	Red	Red	Green (MLP2b)	Green (MLP1)	Red	Red	Grey
20	Red	Green (MLP2a)	Red	Green (MLP1)	Red	Grey	Red
21	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Red
22	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Red
23	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Red
24	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Red
25	Blue	Grey	Grey	Blue	Blue	Blue	Red
26	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
27	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
28	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
29	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

■	Eksperimentalni podaci korišćeni za razvoj modela
■	Predviđeni podaci korišćeni za razvoj modela
■	Eksperimentalni podaci korišćeni za testiranje modela
■	Eksperimenti koji nisu uključeni u analizu

Slika 4.2.6-1. Šema eksperimenata koji su korišćeni u razvoju i testiranju modela

Zatim, kako bi se ispitao potencijal MLP za upotpunjavanje liste podataka (koja odgovara određenom eksperimentalnom dizajnu) iz koje je moguće izvršiti matematičko modelovanje (RSM), trenirane su dve različite neuronske mreže za popunjavanje nedostajućih podataka u okviru CCD dizajna. U prvom slučaju, korišćeni su podaci koji odgovaraju 2^3 faktorijalnom dizajnu u okviru CCD (Tabela 4.2.6-1, Slika 4.2.6-1) i koji predstavljaju sistematično osmišljene, dizajnirane eksperimente, tako da je dobijen **MLP2a model**. U drugom slučaju, korišćeni su podaci dobijeni iz 8 eksperimenata sa nasumično dizajniranim ulaznim parametrima (Tabela 4.2.6-1, eksperiment br. 1, 10 i 20; Tabela 4.2.6-2, eksperiment br. 21-25; Slika 4.2.6-1), koji predstavljaju podatke koji

se obično dobijaju prilikom takozvanih pokušaj-greška eksperimenata što znači da nisu sistematično osmišljeni i izvedeni, tako da je dobijen **MLP2b model**.

Tabela 4.2.6-2. Nezavisne procesne promenljive nasumično dizajniranih eksperimenata i praćeni odgovori

Eksp. br.	A, Konc. rastvora (%)	B, Brzina pumpe (%)	C, Temperatura ulaz. vazd. (°C)	Odgovori
21	20	10	160	
22	10	20	165	
23	20	15	170	
24	22	13	180	R ₁ , Prinos (%)
25	15	15	180	R ₂ , Sadržaj vlage (%)
26	22	15	160	R ₃ , Temp izlaz.vazduha (°C)
27	10	10	170	
28	15	10	165	

Vrednosti brzine pumpe 10%, 13%, 15% i 20% predstavljaju brzinu koja odgovara protoku oko 3ml/min, 3.9ml/min, 4.5ml/min i 6ml/min, respektivno.

Modeli dobijeni na ovaj način su zatim korišćeni u predviđanju rezultata i upotunjavanju grupe podataka koji po dizajnu odgovaraju CCD, što u slučaju modela MLP2a znači predviđanje za preostalih 12 eksperimenata, a u slučaju MLP2b modela preostalih 17 eksperimenata (Slika 4.2.6-1). Na ovaj način omogućeno je matematičko modelovanje (primena RSM) dobijene grupe podataka koja se sastoji od kombinacije eksperimentalnih i predviđenih rezultata, i dobijeni su **modeli RSM2a i RSM2b modeli** (Slika 4.2.6-1). Za testiranje ovih modela korišćeni su rezultati dobijeni izvođenjem eksperimenata br. 26-28 (Tabela 4.2.6-2, Slika 4.2.6-1), u cilju poređenja sposobnosti predviđanja modela sa predviđanjima dobijenim od strane RSM1 i MLP1 modela koji su dobijeni korišćenjem samo eksperimentalnih rezultata. Takođe, razmatrano je da li se mogu dobiti korisne informacije iz nasumično dizajniranih eksperimenata (koji predstavljaju istorijski tip podataka koji se dobijaju primenom metode pokušaj-greška), korišćenjem MLP u modelovanju, a ne samo iz onih eksperimenata koji pripadaju specifičnom eksperimentalnom dizajnu i za koje se smatra da pružaju rezultate boljeg kvaliteta.

U cilju ispitivanja potencijala modelovanja zasnovanog na eksperimentalnom dizajnu u dešifrovanju takozvane prirode “crne kutije” predviđanja veštačkih neuronskih mreža, korišćeni su samo predviđeni rezultati za sve eksperimente koji pripadaju CCD, i to oni dobijeni predviđanjem MLP modela sa najboljom korelacijom između predviđenih i

stvarno dobijenih rezultata. Primenom RSM na taj način dobijeni su **RSM3 modeli** za svaki odgovor kako bi bili definisani značaj i veze među faktorima (Slika 4.2.6-1). Dobijene matematičke jednačine su RSM1 i RSM3 modela su analizirane kako bi se na osnovu sličnosti i razlika unapredilo razumevanje procesa i objasnilo zašto jedan model ima bolju moć predviđanja od drugog.

4.2.6.4. Optimizacija sušenja raspršivanjem

Nakon izvršene analize procesa, pomoću softvera *Design-Expert*® 7.0.0 (Stat-Ease Inc, SAD) primenom pristupa poželjnosti (engl. *Desirability approach*) (Nekkanti i autori, 2009), izvršena je numerička optimizacija procesnih parametara za rastvor koncentracije 25% (određena kao najpogodnija za kompleksaciju). Izvršena je optimizacija sa zahtevima za postizanje najvećeg prinosa i najmanjeg sadržaja vlage. Zatim je izvršena fizičko-hemijska karakterizacija dobijenog praška.

4.2.6.5. Primenljivost dobijenih modela na različite formulacije

Koristeći optimalne uslove dobijene za odabranu formulaciju aripiprazol-HPBCD-citratni pufer, izvršeno je sušenje raspršivanjem nekoliko različitih formulacija: aripiprazol-HPBCD-PVP-citratni pufer (0.1% w/w PVP u rastvoru), aripiprazol-2-O-MBCD-citratni pufer, vorikonazol-HPBCD-voda. U svim formulacijama je koncentracija leka u prašku bila 5%. Zatim je izvršeno poređenje dobijenih rezultata sa predviđanjima modela u cilju procene primenljivosti na različite formulacije sa ciklodekstrinima.

4.2.6.6. Dodatna karakterizacija dobijenih praškova nakon optimizacije

4.2.6.6.1. Vizuelizacija čestica praška

Vizuelizacija praškova sa ciljem opisivanja oblika, morfologije i karakteristika površine čestica, izvršena je pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa *Phenom G2 Pro*

(*Phenom-World*, Holandija). Uzorci su fiksirani pomoću karbonskog adheziva na aluminijumski držač, postavljeni u vakuumsku komoru i fotografisani pri naponu 5 kV. Posmatrani su pod uvećanjem od 1600 do 11500 puta.

4.2.6.6.2. Nasipna i tapkana gustina praškova

Nasipna i tapkana gustina praškova je određivana pomoću graduisane menzure i aparata za merenje tapkane zapremine *Erweka SVM* (*Erweka*, Nemačka). Nasipna gustina je određivana tako što je prethodno prositan prašak (sito 1 mm) pažljivo sipan u graduisanu menzuru od 100 ml (sa podeocima očitavanja do 1 ml), do zapremine od 100ml i nakon očitane mase m izvršen je preračun nasipne gustine $\rho_N(g/ml)=m/100$. Zatim je menzura fiksirana na aparaturu, na kojoj je vršeno tapkanje praška do postizanja smanjenja nivoa praška u menzuri ≤ 2 ml, između dva sukcesivna seta tapkanja. Pomoću vrednosti m i očitane tapkane zapremine V_f izvršen je preračun tapkane gustine $\rho_T(g/ml) = m/V_f$. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje tri merenja.

4.2.6.6.3. Protočnost praškova

Protočnost praškova je određivana na aparatu *Erweka GWF* (*Erweka*, Nemačka), merenjem vremena potrebnog za proticanje određene količine praška iz levka kroz kružni otvor promera 12.5 mm, sa uključenom vibracijom. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrednosti od najmanje tri merenja.

4.2.6.6.4. Kondicioniranje odabranih uzoraka sa aripiprazolom u komorama za studije stabilnosti

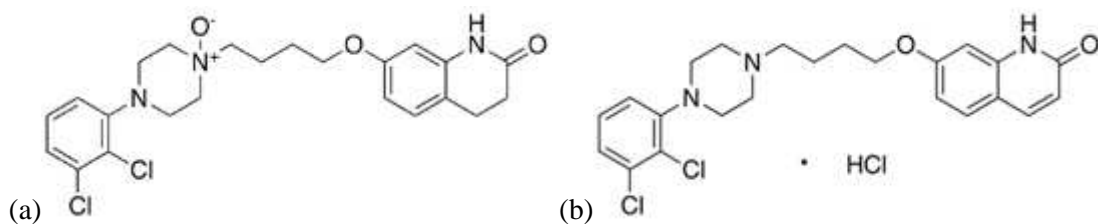
Odabrani uzorci su upakovani u tamne staklene bočice koje su u zavisnosti bile ili otvorene ili zatvorene zatvaračem punjenim silika gelom kao desikantom i kondicionirane u komorama pod uslovima dugotrajnog starenja (25°C/60% RH) i ubrzanog starenja (40°C/75% RH) u periodu od 90 dana (komore *Pharma 2000* i

Pharma 600, Weiss Technik, Nemačka). Praćeni su sadržaj, nečistoće i profil brzine rastvaranja aripiprazola i sadržaj vlage u praškovima.

Sadržaj aripiprazola u kondicioniranim praškovima određivan je odgovarajućom HPLC metodom. Analiza je izvršena na uređaju *Agilent HPLC system, 1200 Series (Agilent, SAD)*. Hromatografsko razdvajanje je postignuto korišćenjem C-18 kolone ,150 x 4.6 mm, 5µm (*Zorbax Eclipse XDB, Agilent, SAD*). Mobilna faza je uvedena u aparat iz dva odvojena kanala u odnosu 50:50; mobilna faza u jednom kanalu se sastojala od fosfatnog pufera pH 3.0 (dobijenog rastvaranjem 3.00 g natrijum dihidrogen fosfata u 1000 ml vode, uz dodatak 5.0 ml trietilamina i uz korekciju do pH 3.0 pomoću ortofosforne kiseline), a u drugom kanalu od smeše metanol:acetonitril (1:1). Protok mobilne faze je bio 1.0 ml/min, zapremina injektovanja 10 µl, temperatura kolone 25°C i korišćen je UV detektor na 255 nm.

U kompleksima dobijenim sušenjem raspršivanjem praćene su dve poznate nečistoće aripiprazola: N-oksid nečistoća (7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)-piperazin-1-il]butoksi]-3,4-dihidrohinolin-2(1H)-on) i dehidro nečistoća (7-[4-[4-(2,3-dihlorofenil)-1-piperazinil]butoksi]-2(1H)-hinolinon) koje su degradacioni proizvodi kako se navodi u DMF-u proizvođača sirovine (*Aripiprazole Drug Master File, Neuland Laboratories, Indija*) (Slika 4.2.5-1). Nečistoće su određivane odgovarajućom HPLC metodom. Analiza je izvršena na uređaju *Agilent HPLC system, 1200 Series (Agilent, SAD)*. Hromatografsko razdvajanje je postignuto korišćenjem C-18 kolone, 250 x 4.6 mm, 5µm (*Luna, Phenomenex, SAD*). Mobilna faza se sastojala od fosfatnog pufera pH 3.0 (dobijenog rastvaranjem 1.11 g kalijum dihidrogen fosfata i 1.2 g natrijum pentan-sulfonata u 1000 ml vode, uz korekciju do pH 3.0 pomoću ortofosforne kiseline) u kombinaciji sa acetonitrilom. Korišćena metoda je tipa gradijenta, protok mobilne faze je bio 1.0 ml/min, zapremina injektovanja 20 µl, temperatura kolone 25°C i korišćen je UV detektor sa analizom na 215 nm.

Metode za određivanje ostalih praćenih parametara opisane su u poglavlju 4.2.5.



Slika 4.2.6-2. Degradacione nečistoće aripiprazola: N-oksid (a) i dehidro nečistoća (b).

4.3. REZULTATI I DISKUSIJA

4.3.1. Studije rastvorljivosti sa vorikonazolom

4.3.1.1 Određivanje sadržaja vode u ciklodekstrinima

Analiza inicijalnog sadržaja vode u ciklodekstrinima je pokazala da se slični rezultati dobijaju *Karl Fischer* metodom i gravimetrijskom metodom halogenog analizatora vlage (Tabela 4.3.1-1, rezultati izraženi kao srednje vrednosti tri određivanja). Rezultati dobijeni na uređaju za TGA analizu su se nešto više razlikovali, sa većom standardnom devijacijom. Rezultati dobijeni *Karl Fischer* metodom su korišćeni u preračunu odgovarajućih količina HPBCD i 2-O-MBCD, u pripremi vodenih rastvora definisane koncentracije potrebnih za studije rastvorljivosti.

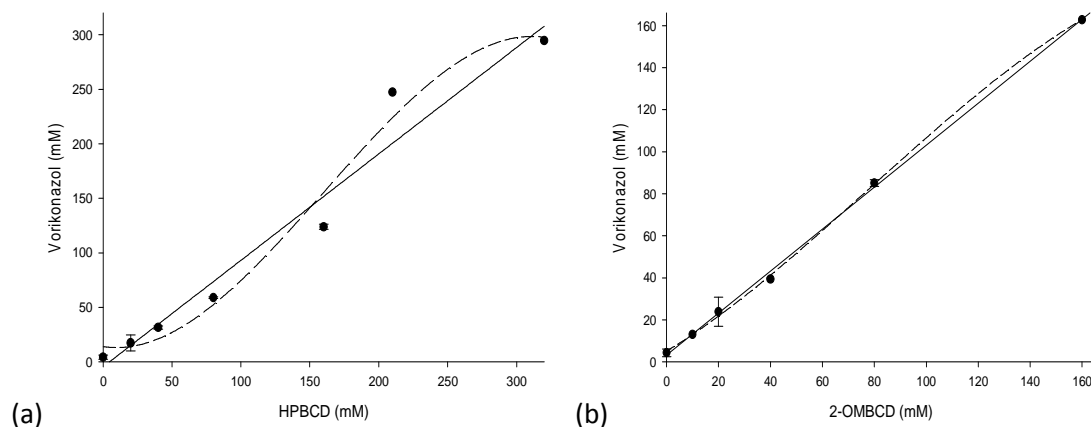
Tabela 4.3.1-1. Rezultati određivanja sadržaja vode u CD različitim metodama.

Metoda		tip CD	
		HPBCD	2-O-MBCD
Gravimetrijska metoda	TGA analizator	6.12 % (1.2%)	5.09 % (0.8 %)
	Halogeni analizator vlage	4.27 % (0.14%)	4.16 % (0.13 %)
<i>Karl Fischer</i> metoda		4.38 % (0.15%)	3.96 % (0.06%)

Standardna devijacija je predstavljena u zagradama

4.3.1.2. Studije fazne rastvorljivosti (*phase-solubility*, engl.)

Slika 4.3.1-1 objedinjuje rezultate studija fazne rastvorljivosti.



Slika 4.3.1-1. Dijagrami fazne rastvorljivosti vorikonazola u vodenim rastvorima HPBCD (a) i 2-O-MBCD (b). Uklapanje sa linearnom funkcijom - puna linija, uklapanje sa kubnom funkcijom - isprekidana linija.

Za oba ciklodekstrina, 2-O-MBCD i HPBCD, rastvorljivost vorikonazola linearno raste sa porastom koncentracije CD do koncentracije 160 mM, što odgovara takozvanom A_L tipu dijagrama (Brewster i Loftsson, 2007). Sa HPBCD posle 160mM koncentracija leka dolazi do postizanja platoa što je indikacija A_N tipa dijagrama (Brewster i Loftsson, 2007). Za rastvore vorikonazola i HPBCD, Buchanan i autori (2007) prepoznali su postojanje A_L tip dijagrama u nižem opsegu koncentracija HPBCD, kao i postojanje A_N tipa dijagrama pri višim koncentracijama. Profili A_N su objašnjeni *bulk* promenama rastvarača uzrokovanih solubilizatorom (HPBCD) i/ili samoasocijacionom solubilizatora pri većim koncentracijama. Slaganje sa linearnim delom krive rastvorljivosti moglo bi da se koristi u proračunu konstante vezivanja, koja pruža informacije o relativnoj jačini interakcije lek:CD. Međutim, rastvorljivost teško rastvorljive lekovite supstance je obično toliko niska da je teško tačno odrediti je, a ta vrednost značajno utiče na tačnost dobijene vrednosti konstante vezivanja (Brewster i Loftsson, 2007; Miro i autori, 2012). Stoga, kada se porede ciklodekstrini u datom medijumu, posmatranje razlika u postignutoj rastvorljivosti leka pri istim koncentracijama CD može biti pogodnije (Buchanan i autori, 2007). Sa 2-O-MBCD se postiže veća rastvorljivost nego sa HPBCD pri istim molarnim koncentracijama. Pošto je nagib prave dobijen sa 2-O-

MBCD veći nego sa HPBCD, izgleda da je 2-O-MBCD efikasniji solubilizator za vorikonazol. Jednostavnom analizom dijagrama fazne rastvorljivosti teško je odrediti da li se formiraju jednostavni kompleksi (1:1) ili kompleksi višeg reda (Brewster i Loftsson, 2007; Loftsson i autori, 2005).

Stehiometrija sistema se može naslutiti uklapanjem krive sa linearnim, kvadratnim ili kubnim modelom, i u ovom ispitivanju je kriva rastvorljivosti sa HPBCD malo bolje odgovarala kubnoj funkciji ($R^2=0.978$) nego linearnoj i kvadratnoj funkciji ($R^2=0.958$, $R^2=0.958$, respektivno), sugerišući formiranje 1:3 lek:CD kompleksa verovatnije nego 1:1 ili 1:2 kompleksa (Slika 4.3.1-1a). Slična stehiometrija je sugerisana i u patentu za formulaciju vorikonazola sa sulfo-butil-etar-beta-ciklodekstrinom (Harding, 2003).

Što se tiče kompleksacije sa 2-O-MBCD, kriva podjednako dobro odgovara linearnoj, kvadratnoj i kubnoj funkciji ($R^2=0.9990$, 0.9992 i 0.9994 respektivno), stoga ne pružajući informaciju o tome da li se grade kompleksi 1:1 ili kompleksi višeg reda (Slika 4.3.1-1b). Za 2-O-MBCD, beta-ciklodekstrin derivat koji još nije u široj upotrebi, navodi se od strane proizvođača (*Kleptose[®] Crysmeb exp* e-brošura), da bi solubilizacija lekova u vodenim rastvorima 2-O-MBCD trebalo da bude visoka i linearno zavisna od koncentracije CD. Ne bi trebalo da dođe do komplikacija kao što su samoasocijacija ili nelinearno opadanje efikasnosti solubilizacije pri visokim koncentracijama CD, koje su uobičajene za neke derivate CD kao što je i HPBCD (Buchanan i autori, 2007; Loftsson i autori, 2004; Piel i autori, 2006). Ovo se može objasniti veličinom metil supstituenata, koji su mali i ne funkcionišu kao gosti koji teže da se uklope u šupljinu CD, pri višim koncentracijama CD. Takođe, šupljina beta-ciklodekstrina je blago proširena metil supstituentima, koji su podjednako stereorigidni kao i sama šupljina (Mosher i Thompson, 2007). Sve ovo govori u prilog solubilizacionoj moći 2-O-MBCD, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Owens i autori (2000) su izučavali prirodu interakcije između vorikonazola i brojnih derivata CD i zaključili su da veličina toroidne šupljine CD ali i priroda bočnih lanaca značajno utiču na prirodu kompleksacije, i da je važno razmatranje i trodimenzionalnog prostornog rasporeda svakog ispitivanog stereoizomera vorikonazola. Stoga, primena tehnika molekularnog modelovanja može koristiti u razjašnjavanju prirode interakcije leka i CD dajući predloge za stabilne trodimenzionalne modele kompleksa.

4.3.1.3. Primena faktorijalnog dizajna

Rezultati analize faktorskih efekata pokazuju da je najznačajniji faktor ($p < 0.05$) za solubilizaciju vorikonazola tip ciklodekstrina (Tabela 4.3.1-2 i 4.3.1-3).

Tabela 4.3.1-2. Dizajn eksperimenata i odgovori dobijeni za 2^3 faktorijalni dizajn

Uzorak br.	Nezavisno promenljive			Odgovor
	A	B	C	R
1	+ 1	+ 1	+ 1	7.20
2	+ 1	- 1	+ 1	6.95
3	+ 1	+ 1	- 1	4.65
4	+ 1	- 1	- 1	4.55
5	- 1	+ 1	+ 1	4.64
6	- 1	- 1	+ 1	4.28
7	- 1	+ 1	- 1	4.52
8	- 1	- 1	- 1	4.17

Šifre faktora i nivoa faktora: A = tip ciklodekstrina: - 1 odgovara HPBCD, + 1 2-O-MBCD; B = vreme mešanja: - 1 odgovara 30 minuta, + 1 60 minuta; C = količina vorikonazola: - 1 odgovara 500 mg, + 1 1000 mg; R = rastvorljivost vorikonazola (mg/ml).

Tabela 4.3.1-3. Rezultati dobijeni korišćenjem 2^3 faktorijalnog dizajna (ANOVA).

Faktor ili interakcija	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Srednja vrednost kvadrata	F vrednost	p-vrednost prob > F
Model	10.38	6	1.73	785.86	0.0273
A – tip ciklodekstrina	4.11	1	4.11	1867.45	0.0147
B – vreme mešanja	0.14	1	0.14	64.92	0.0786
C – količina vorikonazola	3.33	1	3.33	1512.21	0.0164
AB interakcija	0.017	1	0.017	7.75	0.2195
AC interakcija	2.78	1	2.78	1261.39	0.0179
BC interakcija	3.170×10^{-3}	1	3.170×10^{-3}	1.44	0.4423
Ostatak	2.201×10^{-3}	1	2.201×10^{-3}		
Cor Total	10.38	7			
$R^2: 0.9998$					

Količina leka koji se dodaje u višku je takođe značajna, jer se smatra da se u koncentrovanijim sistemima olakšava interakcija između leka i CD i kompleksi se brže stvaraju (Borghetti i autori, 2009). Jedina značajna interakcija je ona između tipa ciklodekstrina i vremena mešanja. Što je duže vreme mešanja, sa HPBCD se postiže veća rastvorljivost vorikonazola, a sa 2-O-MBCD isti nivo solubilizacije se odigrava za

kraće vreme (Tabele 4.3.1-2 i 4.3.1-3). Primećeno je da se posle dodatka 1000 mg vorikonazola rastvara veća količina vorikonazola u ispitivanom periodu mešanja sa 2-O-MBCD, nego sa HPBCD u rastvoru (Tabela 4.3.1-2). To znači da je solubilizacija leka lakša i brža sa 2-O-MBCD, što je takođe pretpostavljeno na osnovu vizuelnog izgleda disperzija (prisustva vidljivih nerastvorenih čestica) tokom mešanja. Stoga, rezultati primene faktorijalnog dizajna sugerišu da je 2-O-MBCD efikasniji solubilizator nego HPBCD, što je u skladu i sa rezultatima ispitivanja fazne rastvorljivosti.

4.3.2. Simulacija molekularnog vezivanja vorikonazol:ciklodekstrin

Simulacija molekularnog vezivanja i naknadna optimizacija geometrije kompleksa sa najvećom vrednošću *scoring* funkcije, pokazala je da je najstabilniji kompleks između vorikonazola i 2-O-MBCD formiran kada je fluoropirimidinski prsten uključen u šupljinu CD (Tabela 4.3.2-1, Slika 4.3.2-1 (a1); $\Delta E = -14.6$ kcal/mol), dok je manje stabilan kompleks koji ima triazolni i difluorofenilni prsten u šupljini (Tabela 4.3.2-1, Slika 4.3.2-1 (a2 i a3); $\Delta E = -9.1$ i -6.0 kcal/mol, respektivno). Može se reći da su interakcije odgovorne za inkluziju isključivo hidrofobne prirode, jer nema indikacija da postoji sistem vodoničnih veza u optimalnim geometrijama kompleksa.

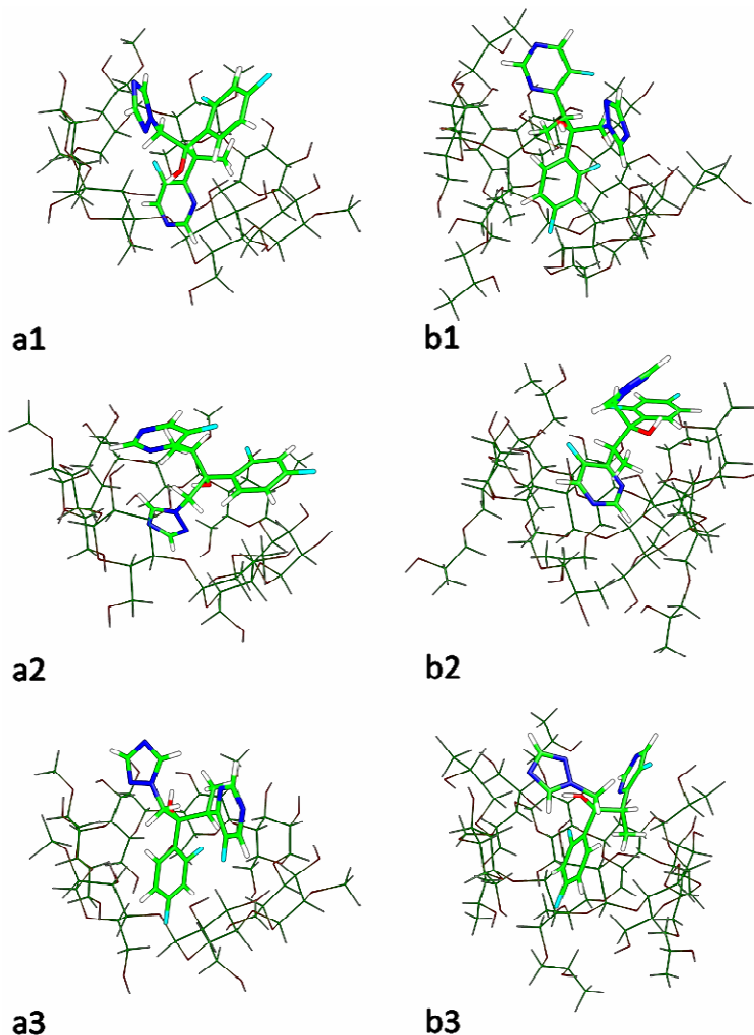
Tabela 4.3.2-1. Semiempirijski nivo energija vezivanja vorikonazol-CD kompleksa, izračunat korišćenjem *PM6-DH2 Hamiltonian* funkcije.

Kompleks broj ¹	PM6-DH2 energija vezivanja, ΔE (kcal/mol)	
	2-O-MBCD	HPBCD
1	-14.6	-88.9
2	-9.1	-84.8
3	-6.0	-57.3

¹oznaka kao na Slici 4.3.2-1.

Sa druge strane, za HPBCD je pokazano da je najverovatniji i najstabilniji kompleks u kome je difluorofenilni prsten u šupljini CD (Tabela 4.3.2-1, Slika 4.3.2-1 (b1 i b3); $\Delta E = -88.9$ i -57.3 kcal/mol, respektivno) ili fluoropirimidinski prsten (Tabela 4.3.2-1, Slika 4.3.2-1 (b2); $\Delta E = -84.8$ kcal/mol). Owens i autori (2000) su opisujući interakciju HPBCD i vorikonazola i njegovih stereoisomera, diskutovali o verovatnoj inkluziji difluorofenilnog prstena u šupljinu CD, i interakciji bočnih lanaca CD i triazolnog i

pirimidinskog prstena vorikonazola. Jake hidrofilne interakcije uključujući vodonične veze između hidroksipropil grupa HPBCD i nekoliko hidrofilnih grupa vorikonazola mogu biti razlog za izračunatu nisku energiju vezivanja unutar kompleksa.



Slika 4.3.2-1. Kompleksi sa najnižom energijom vezivanja: vorikonazol-2-O-MBCD (a1-3), i vorikonazol-HPBCD (b1-3), dobijeni pomoću minimizacije energije primenom PM6-DH2 funkcije.

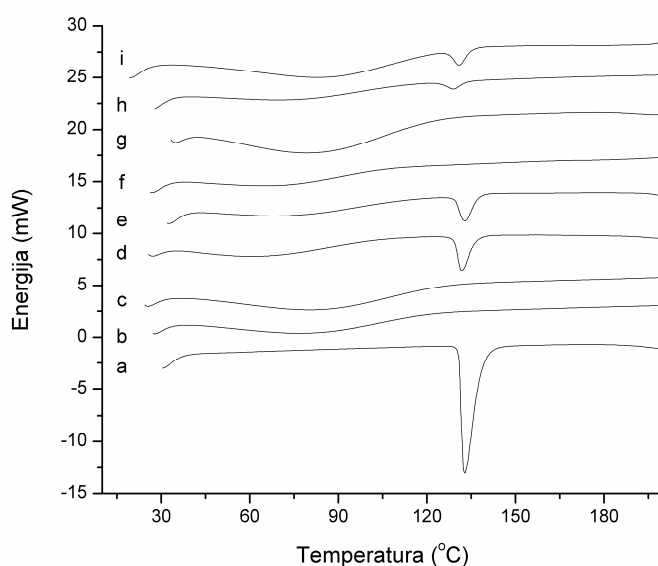
Zanimljivo je da je izračunata energija vezivanja vorikonazol:HPBCD kompleksa mnogo niža nego za komplekse sa 2-O-MBCD, što bi značilo da bi HPBCD trebalo da bude mnogo bolji solubilizator vorikonazola (Tabela 4.3.2-1). Neslaganje između računarskih simulacija i eksperimentalnih rezultata može se objasniti fenomenom samoasocijacije koji je karakterističan za HPBCD i formiranjem složenih kompleksa sa HPBCD, što je u skladu i sa rezultatima studija fazne rastvorljivosti na osnovu kojih je pretpostavljeno da se između HPBCD i vorikonazola dešava složenija kompleksacija

nego što je to formiranje 1:1 kompleksa. Samoasocijacija HPBCD molekula je vrlo verovatna jer su prisutne grupe koje su donori i akceptori vodoničnih veza na obodu šupljine CD. Formiranje HPBCD-HPBCD kompleksa bi moglo da spreči ulaz vorikonazola u šupljinu CD i formiranje stabilnih kompleksa predviđenih simulacijama vezivanja 1:1.

4.3.3. Karakterizacija praškova sa vorikonazolom

4.3.3.1. Termalna analiza

Na DSC termogramima (Slika 4.3.3-1), uočava se topljenje vorikonazola sa maksimumom endoterme topljenja na 133°C, što je u okviru opsega temperature topljenja 128-134°C koji se može naći u literaturi (Herbrecht i autori, 2004), i može se reći da vorikonazol pripada polimorfnom obliku I opisanom u patentu US patent US20090023922 (Benito i autori, 2009).



Slika 4.3.3-1. Reprezentativni DSC termogrami: vorikonazol (a), HPBCD (b), 2-O-MBCD (c), fizička smeša vorikonazola i HPBCD (d), fizička smeša vorikonazola i 2-O-MBCD (e), vorikonazol-HPBCD inkluzioni kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom 160mM CD (f), vorikonazol-2-O-MBCD inkluzioni kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom 160 mM CD (g), prašak dobijen zajedničkim usitnjavanjem vorikonazola i HPBCD u prisustvu rastvarača (h) i prašak dobijen zajedničkim usitnjavanjem vorikonazola i 2-O-MBCD u prisustvu rastvarača (i).

Kod proizvoda sušenja raspršivanjem, endoterma topljenja izostaje, dok u fizičkim smešama i proizvodima zajedničkog usitnjavanja postoji, što govori o prisustvu vorikonazola u kristalnom obliku (pik topljenja na 132°C sa HPBCD i na 133°C sa 2-O-MBCD za fizičke smeše, i za usitnjene proizvode 129°C sa HPBCD, i 131°C sa 2-O-MBCD). Ovo blago smanjenje tačke topljenja može ukazivati na neku vrstu interakcije koja se dešava sa ciklodekstrinima tokom zajedničkog usitnjavanja (Lin i autori, 2012), iako u nekim prethodnim studijama slično smanjenje temperature topljenja vorikonazola u prisustvu polimera nije smatrano značajnim (Beinborn i autori, 2012). Iako metoda zajedničkog usitnjavanja u prisustvu male količine rastvarača može biti privlačna sa aspekta utroška količine rastvarača i energije potrebno je još eksperimentalnog rada kako bi se ispitala mogućnost optimizacije parametara.

Odsustvo endoterme topljenja leka u proizvodima osušenim raspršivanjem ukazuje da je ukupna količina vorikonazola u kompleksiranom obliku i amorfna je (Slika 4.3.3-1 f i g). Još jedna zanimljiva karakteristika termograma je prisustvo široke endoterme u opsegu od sobne temperature do 100°C, sa maksimumom u opsegu 79-80°C što verovatno odgovara gubitku vode jako vezane za ciklodekstrin. Među termogramima dobijenih analizom uzoraka osušenih iz rastvora sa različitim koncentracijama CD, nije bilo razlike što može značiti da je u dobijenim rastvorima koji su osušeni raspršivanjem količina CD bila dovoljna da ostvari inkluziju leka u molekularnom stanju.

Rezultati termogravimetrijske analize praškova dobijenih različitim metodama su predstavljene u Tabeli 4.3.3-1.

Tabela 4.3.3-1. Rezultati termogravimetrijske analize praškova pripremljenih različitim metodama.

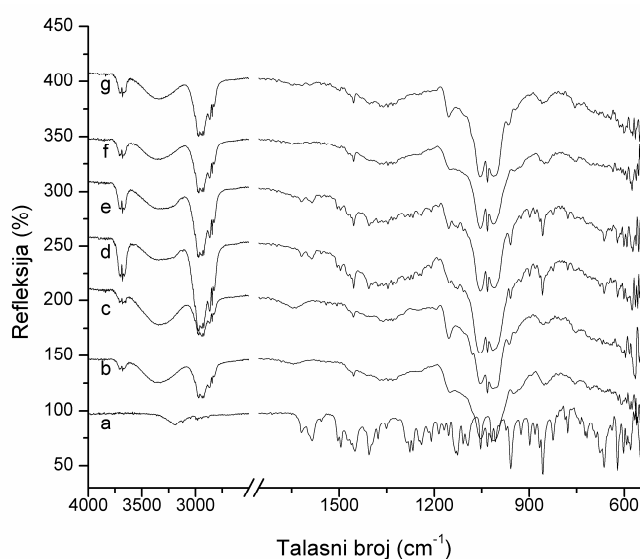
Uzorak	tip CD	HPBCD	2-O-MBCD
Fizička smeša (CD i lek)		6.04 %	4.04 %
Kompleks lek:CD dobijen sušenjem raspršivanjem		2.97 %	7.39 %
Uzorak dobijen zajedničkim usitnjavanjem u prisustvu rastvarača (CD i leka)		4.68 %	6.01 %

Standardna devijacija <1.2%

Rezultati za fizičke smeše i uzorke dobijene usitnjavanjem leka i CD u prisustvu rastvarača, slični su rezultatima dobijenim za čiste ciklodekstrine (Tabela 4.3.1-1). Za uzorke sa dva različita ciklodekstrina, pripremljene sušenjem raspršivanjem pri istim procesnim parametrima, primećuje se da proizvodi sa 2-O-MBCD imaju veći sadržaj vode nego proizvodi sa HPBCD, verovatno zato što postoji razlika u hidrataciji ova dva ciklodekstrina u rastvoru, ili u dehidrataciji tokom sušenja. Formulacija sa 2-O-MBCD je higroskopnije nego sa HPBCD, odnosno teže se suši, što bi moglo da utiče na odnos utroška energije i efektivnosti procesa sušenja raspršivanjem i potencijalno na stepen fizičke i hemijske stabilnosti rezultujućih praškova i budućih čvrstih doziranihoblika, tokom dužeg vremenskog perioda.

4.3.3.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Slika 4.3.3-2 pokazuje ATR-FTIR spektar vorikonazola, ciklodekstrina, proizvoda osušenih raspršivanjem i odgovarajućih fizičkih smeša. Vorikonazol (Slika 4.3.3-2a) pokazuje karakteristične trake polimorfa I (patent US20090023922), što je u skladu sa zabeleženim opsegom topljenja na DSC termograma.



Slika 4.3.3-2. Reprezentativni ATR-FTIR spektri: vorikonazol (a), HPBCD osušen raspršivanjem (b), 2-O-MBCD osušen raspršivanjem (c), fizička smeša vorikonazola i HPBCD (d), fizička smeša vorikonazola i 2-O-MBCD (e), vorikonazol-HPBCD inkluzioni kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom 160mM CD (f), i vorikonazol -2-O-MBCD inkluzioni kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom 160 mM CD (g).

Specifično, CN, CF i CC trake istezanja pojavljuju se na 3190-3046 cm^{-1} , 1495-1451 cm^{-1} i 1585-1451 cm^{-1} respektivno, u skladu sa navodim Xiang-Gen i autora (2011).

FTIR spektri ciklodekstrina osušenih raspršivanjem (Slika 4.3.3-2 b i c) pokazuju široku traku refleksije u 3100-3600 cm^{-1} sa maksimumom oko 3340 cm^{-1} , što se pripisuje vibracijama istezanja OH grupa, i ukazuje na snažnu asocijaciju hidroksilnih grupa u vidu vodoničnih veza. Međutim, postojanje oštih pikova manjeg intenziteta u opsegu 3600-3700 cm^{-1} , ukazuju na prisustvo slobodnih OH grupa koje moguće je da pripadaju adsorbovanoj vodi koja nije uključena u vodonične veze.

Spektri fizičkih smeša CD i vorikonazola (Slika 4.3.3-2 d i e) pokazuju tipične trake CD i vorikonazola, što znači da ne postoji ili je vrlo slaba interakcija između leka i CD. FTIR spektri dobijeni za vorikonazol-CD komplekse osušene raspršivanjem (Slika 4.3.3-2 f i g) pokazuju samo tipične trake CD, a slobodni vorikonazol se ne može detektovati u uzorcima. Moglo bi se reći da je vorikonazol potpuno uključen u šupljine ciklodekstrina, slično kao što su Yang i autori (2010) povezali odsustvo karakterističnih traka iz FTIR spektra i definisanje mesta kompleksacije itrakonazola i HPBCD, i time potvrdili postojanje pravih inkluzionih kompleksa. Ovi podaci zajedno sa rezultatima studije fazne rastvorljivosti i simulacije molekularnog vezivanja mogu doprineti u definisanju mesta vezivanja leka i CD u kompleksima (Peeters i autori, 2002).

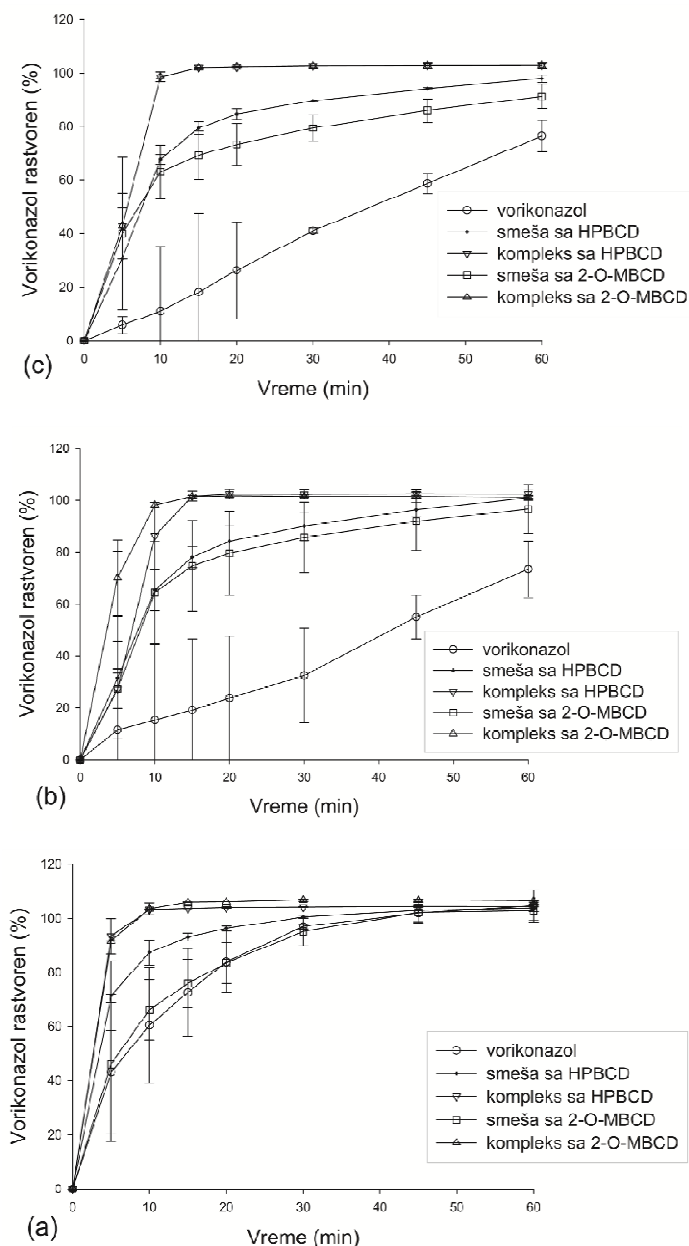
4.3.3.3. Ispitivanje brzine rastvaranja

Brzina rastvaranja je ispitivana u tri različita medijuma u cilju procene poboljšanja brzine rastvaranja vorikonazola Slika 4.3.3-3 pokazuje profile brzine rastvaranja za komplekse vorikonazol:HPBCD i vorikonazol:2-O-MBCD, u poređenju sa odgovarajućim fizičkim smešama i čistim vorikonazolom.

Među pomenutim uzorcima postoji očigledna razlika u brzini rastvaranja. U fizičkim smešama leka i CD, prisustvo CD doprinelo je poboljšanju brzine rastvaranja *in-vitro*. Vorikonazol se brže rastvarao iz fizičke smeše sa HPBCD nego iz fizičke smeše sa 2-O-MBCD ili iz kapsula sa čistim vorikonazolom.

Razlog za razliku u brzini rastvaranja iz smeša sa dva CD mogao bi biti različita rastvorljivost derivata CD i/ili manja veličina čestica 2-O-MBCD i vazduh adsorbovan na njihovoj površini, što nije bio slučaj sa krupnijim česticama HPBCD. Takođe, tokom

pripreme rastvora ciklodekstrina primećeno je da čestice 2-O-MBCD plutaju po površini i bilo je potrebno intenzivnije mešanje kako bi se prašak pokvasio i rastvorio.



Slika 4.3.3-3. Profili brzine rastvaranja vorikonazola iz različitih čvrstih uzoraka – uslovi: aparatura II (lopatice), brzina mešanja 50 rpm, 900 ml medijuma: 0.1M hlorovodonična kiselina (pH 1.2) (a), acetatni pufer (pH 4.5) (b) i fosfatni pufer (pH 6.8) (c)

Iz uzoraka osušenih raspršivanjem više od 80 % vorikonazola je rastvoreno u sva tri medijuma u roku od 10 minuta, bez obzira na tip ciklodekstrina. Ako se uzme u obzir da je rastvorljivost vorikonazola pH zavisna, zanimljivo je da je profil rastvaranja vorikonazola iz kompleksa osušenih raspršivanjem nezavistan od pH sredine medijuma.

Mogućnost promene profila rastvaranja leka putem kompleksacije sa ciklodekstrinima ispitivana je od strane Nacsa i autora (2009) i Buchanan i autora (2007). Poređenjem vrednosti relativne standardne devijacije (predstavljena u vidu tzv. *error bars*, engl., na Slici 4.3.3-3), zaključuje se da je brzina rastvaranja vrlo brza i ujednačena samo iz uzoraka osušenih raspršivanjem, što je takođe važna karakteristika profila brzine rastvaranja.

Na osnovu prikazanih rezultata moglo bi se reći da je kompleksacija vorikonazola sa oba derivata beta-ciklodekstrina dobra formulaciona strategija za poboljšanje rastvorljivosti i brzine rastvaranja. Nije bilo velike razlike između maksimalne rastvorljivosti između kompleksa i smeša leka i CD, verovatno jer su se u slučaju smeša formiranje kompleksa i solubilizacija odigrali u medijumu. Međutim, ova pojava se možda ne bi odigrala u gastrointestinalnom traktu, gde se dešava resorpcija nakon rastvaranja, tako da je očekivano da je prethodno formiranje kompleksa poželjno.

4.3.3.4. Dugoročna stabilnost kompleksa vorikonazol:ciklodekstrin

Nakon 12 meseci stajanja u ambijentalnim uslovima ispitivana je stabilnost kompleksa vorikonazol:ciklodekstrin, primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i termogravimetrijske analize. Na termogramima nisu primećeni znaci kristalizacije vorikonazola (potpuno odsustvo endotermnih pikova koji odgovaraju topljenju vorikonazola). Dodatno, ispitivanje sadržaja vode primenom TGA nije pokazalo značajne promene. Ovi rezultati mogu ukazivati na dobru fizičku stabilnost.

Iako je inicijalno nivo nečistoća vorikonazola u praškovima bio ispod 0.05%, zabeleženi porast nečistoća nakon 12 meseci u uzorcima sa oba ciklodekstrina ukazuje na potencijalne probleme sa hemijskom stabilnošću (Tabela 4.3.3-2).

Što se tiče Nečistoće 3 ili epi-vorikonazola nije zabeležen porast, što znači da postoji mala verovatnoća epimerizacije vorikonazola tokom pripreme kompleksa u rastvoru i tokom sušenja raspršivanjem, i stajanjem tokom vremena. Nečistoća 1 i Nečistoća 2 su degradacioni proizvodi koji su rezultat cepanja molekula vorikonazola na butanolnom lancu (Slika 4.2.5-1). Primećena razlika u nivou nečistoća u kompleksima sa HPBCD i 2-O-MBCD, iako je mala, mogla bi biti u vezi sa razlikama u afinitetu vezivanja i orijentaciji molekula vorikonazola u inkluzionom kompleksu sa različitim derivatima

CD, kao što je primećeno i u studiji fazne rastvorljivosti i simulacijama molekularnog vezivanja. U slučaju 2-O-MBCD, nešto proširena šupljina u odnosu na HPBCD mogla bi dodatno doprineti boljoj stabilnosti leka.

Tabela 4.3.3-2. Rezultati za nečistoće u praškovima dobijenim sušenjem raspršivanjem posle 12 meseci stajanja.

Nečistoća	Kompleks sa HPBCD	Kompleks sa 2-O-MBCD
Nečistoća 1 ¹	0.24%	0.16%
Nečistoća 2 ²	0.46%	0.31%
Nečistoća 3 ³	0.05%	0.06%
Ukupne nečistoće	0.75%	0.53%

¹Nečistoća 1: 4-etil-5-fluoropirimidin

²Nečistoća 2: 1-(2,4-difluorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanon

³Nečistoća 3: (2S,3R)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(5-fluoropirimidin-4-il)-1-(1H-1,2,4-triazol-1-il)butan-2-ol; (epi-vorikonazol)

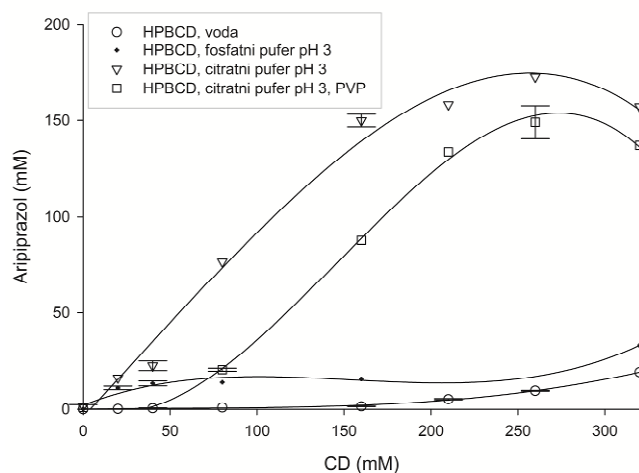
U svakom slučaju, kompleksacija ni sa HBCD ni sa 2-O-MBCD nije sprečila degradaciju vorikonazola koji je u kompleksu bio prisutan u manje stabilnom, amorfnom obliku. Kao što je pokazano i u nekim drugim studijama, veća pokretljivost amorfnog lek:CD kompleksa može biti uzrok hemijske nestabilnosti bez obzira na hemijsku prirodu bočnog lanca ili dimenzija šupljine CD (Hong i autori, 2011). Drugi razlog za nestabilnost bi mogla biti specifičnost vezane konformacija lek:CD kompleksa, koja nije mogla da stabilizuje lek (Mosher i Thompson, 2007). Rezultati molekularnog modelovanja su otkrili da su delovi molekula vorikonazola koji su unutar šupljine ciklodekstrina zapravo samo njegovi prstenovi (difluorofenil, fluoropirimidin, ili triazol). Stoga, sa oba derivata ciklodekstrina čak i u slučaju formiranja višestrukih kompleksa, najosetljiviji deo molekula vorikonazola, butanol lanac, verovatno bi ostao izvan šupljine CD i stoga nezaštićen od degradacije i formiranja Nečistoće 1 i 2. Moguće je da bi u cilju sprečavanja degradacije vorikonazola u kompleksu, bilo neophodno kao kompleksirajući agens koristiti derivat ciklodekstrina sa većim supstituentima kako bi se obezbedila sterna barijera koja bi mogla da stabilizuje lek (Mosher i Thompson, 2007).

4.3.4. Studije rastvorljivosti sa aripiprazolom

4.3.4.1. Studije fazne rastvorljivosti (*phase-solubility*, engl.)

4.3.4.1.1. Uticaj pH i jonskog sastava medijuma, i dodatka polivinilpirolidona (PVP) na kompleksaciju sa HPBCD

Količina ciklodekstrina potrebna da se postigne maksimalna rastvorljivost leka može se odrediti u studijama fazne rastvorljivosti. Aripiprazol je lek baznog karaktera, i pokazuje pH zavisnu rastvorljivost koja je nešto veća u kiselom opsegu pH vrednosti. Procena efekta pH i jonskog sastava medijuma na rastvorljivost aripiprazola u prisustvu CD vršena je sa HPBCD, a kao medijumi su korišćeni: voda, citratni pufer pH 3.0 i fosfatni pufer pH 3.0. Takođe, ispitivan je potencijal za dodatno poboljšanje rastvorljivosti dodatkom male količine PVP pošto je poznato da može imati uticaja na solubilizacioni efekat HPBCD (Mura i autori, 2001). Pored toga, PVP je poznat kao inhibitor nukleacije (Brewster i Loftsson, 2007; Raghavan i autori, 2001), tako da bi mogao da doprinese stabilnosti uzoraka. Rezultati su sumirani na Slici 4.3.4-1 i u Tabelama 4.3.4-1 i 4.3.4-2.



Slika 4.3.4-1. Dijagrami fazne rastvorljivosti za aripiprazol i HPBCD u različitim medijumima.

Vidi se da je rastvorljivost aripiprazola u čisto vodenim rastvorima CD niska, ali da se značajno poboljšanje postiže u citratnom puferu pH 3.0 (Tabela 4.3.4-1). Li i autori (1998) su opisali značaj kombinovanog efekta pH i kompleksiranja na rastvorljivost i

važnost jonizovanih vrsta u doprinosu sveukupnoj kompleksaciji lekova. Često se pretpostavlja da su prvenstveno nejonizovane vrste odgovorne za formiranje kompleksa i posledični porast rastvoljivosti. Međutim, jonizacija leka takođe može da rezultuje poboljšanjem kompleksacije, i rastvorljivost kompleksa sa jonizovanim lekom može ponekad da bude veća od rastvorljivosti kompleksa sa nejonizovanim lekom.

Tabela 4.3.4-1. Uticaj pH i jonskog sastava medijuma na rastvorljivost aripiprazola sa i bez HPBCD

Medijum	Rastvorljivost aripiprazola (mM)
Voda	0.009
Citratni pufer pH 3	1.576
Fosfatni pufer pH 3	2.420
160 mM HPBCD rastvor u vodi	1.508
160 mM HPBCD rastvor u citratnom puferu pH 3	149.884
160 mM HPBCD rastvor u fosfatnom puferu pH 3	15.687

Tabela 4.3.4-2. Uticaj dodatka PVP na rastvorljivost aripiprazola sa i bez HPBCD

Medijum	Rastvorljivost aripiprazola (mM)
Voda	0.009
Citratni pufer pH 3	1.576
Citratni pufer 3, 0.2% w/w PVP	0.934
260 mM HPBCD rastvor u vodi	9.729
260 mM HPBCD rastvor u vodi, PVP/CD 0.005 ¹	10.961
260 mM HPBCD rastvor u vodi, PVP/CD 0.0025 ²	7.788
260 mM HPBCD u citratnom puferu pH 3	172.502
260 mM HPBCD u citratnom puferu pH 3, PVP/CD 0.005 ^a	155.032
260 mM HPBCD u citratnom puferu pH 3, PVP/CD 0.0025 ^b	184.317

¹ PVP koncentracija 0.2% w/w

² PVP koncentracija 0.1% w/w

Može se primetiti da je rastvorljivost aripiprazola zavisna ne samo od pH medijuma nego i od tipa pufera prisutnog u medijumu. Poredeći rastvorljivost leka u fosfatnom

puferu pH 3.0 (neorganska so) i u citratnom puferu pH 3.0 (hidroksikarboksilna kiselina), u odsustvu HPBCD nema velike razlike. Međutim, u prisustvu HPBCD uticaj vrste pufera je značajan za rastvorljivost leka. Ovaj fenomen su takođe opisali Buchanan i autori (2007) kod antimikotika i HPBCD. Posmatranjem *St/So* odnosa (*St* predstavlja rastvorljivost leka u prisustvu HPBCD, *So* rastvorljivost leka u istom medijumu bez HPBCD), izračunate vrednosti za čisto vodeni medijum su 167.6, za fosfatni pufer 6.5, a za citratni pufer 95.1. Jasno je da ciklodekstrin igra važnu ulogu u solubilizaciji aripirazola, zajedno sa jonskim sastavom pufera, više nego sama pH vrednost medijuma. Rastvorljivost odgovarajućih kompleksa može biti mnogo veća nego što bi se moglo očekivati povećanjem ukupne rastvorljivosti leka samo pomoću odgovarajućeg podešavanja pH. To je moguće zbog specifične interakcije hidroksi kiseline sa sistemom vodoničnih veza “domaćina“ i/ili modifikacije mreže vodoničnih veza okolnih molekula vode (Redenti i autori, 2000). Lekovi mogu biti jako vezani unutar CD šupljine iako su u jonizovanom obliku zato što se njihov bazni centar (a samim tim i naelektrisanje) može nalaziti prilično daleko od hidrofobnog dela molekula koji se nalazi u šupljini CD, tako da sposobnost kompleksacije nije značajno ugrožena. Dodatno, hidroksi kiselina može da stupi u interakciju sa spoljnim sistemom vodoničnih veza ciklodekstrina mehanizmom koji uključuje vezivanje hidrofobnog dela leka i istovremeno formiranje jakog jonskog para. Redenti i autori (2000) izdvojili su nekoliko zahteva za iskorišćenje tehnologije višekomponentne kompleksacije, među kojima su rastvorljivost leka manja od 0.1 mg/ml, prisustvo amino grupe sa blago baznim karakterom ($pK_a > 5.0$).

Što se tiče efekta PVP, na Slici 4.3.4-1 vidi se da dodatak PVP (maseni odnos PVP/CD 0.005) dovodi do pada rastvorljivosti, što je u skladu sa nekim prethodnim studijama (Quan i autori, 2009), i može se pripisati kompeticiji polimera i leka za kompleksaciju sa ciklodekstrinom. Međutim, optimizacijom koncentracije PVP moglo bi se izvršiti poboljšanje rastvorljivosti leka što sugerišu rezultati dobijeni u rastvorima ciklodekstrina iste koncentracije, ali sa različitim koncentracijama PVP (različiti maseni odnos PVP/CD; Tabela 4.3.4-2).

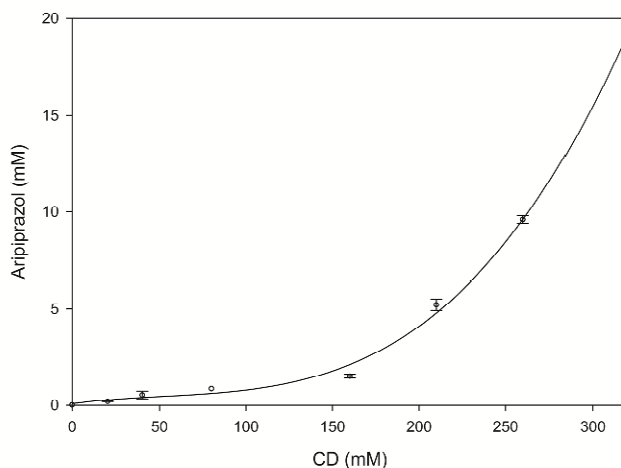
Na osnovu rezultata studija fazne rastvorljivosti sa HPBCD, može se zaključiti da je poboljšanje rastvorljivosti aripirazola najznačajnije u citratnom puferu pH 3.0. U ovom

medijumu, kompleksacija aripiprazola pomoću HPBCD je bila najefikasnija pri koncentraciji 160mM, što se odražava na najmanji maseni odnos CD/rastvoreni lek.

4.3.4.1.2. Analiza dijagrama fazne rastvorljivosti sa HPBCD

Generalno, na osnovu oblika kriva rastvorljivosti, može se identifikovati nekoliko tipova dijagrama tj. profila rastvorljivosti prilikom kompleksacije (Loftsson i autori, 2005). Dobijene krive rastvorljivosti u različitim medijumima (Slika 4.3.4-1), pokazuju da su u solubilizaciju aripiprazola uključeni složeni mehanizmi. Rastvorljivost aripiprazola je ispitivana u širokom opsegu koncentracije ciklodekstrina, i u zavisnosti od posmatranog opsega može se prepoznati nekoliko različitih A tipova dijagrama.

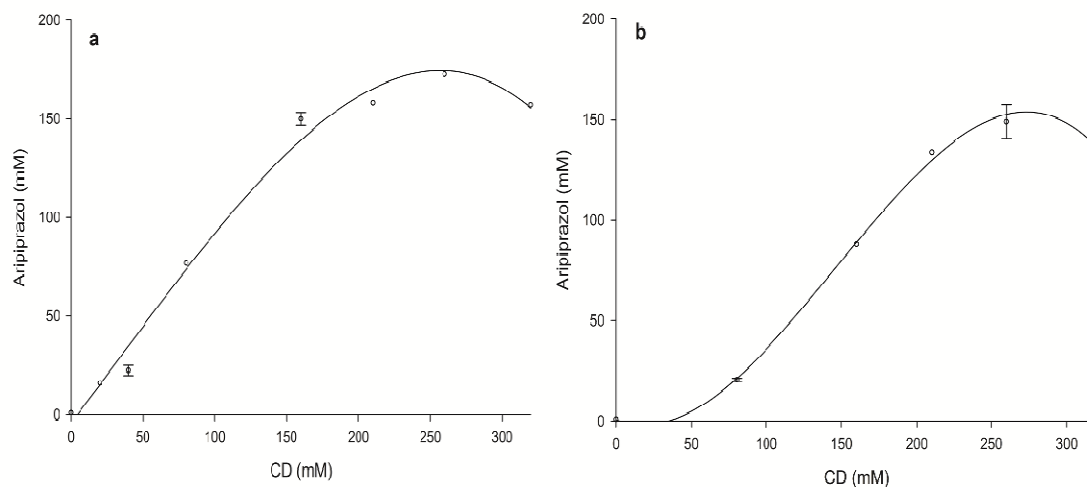
Kod takozvanog A tipa dijagrama, rastvorljivost leka raste u funkciji koncentracije CD. U vodenom medijumu koji se sastoji samo od aripiprazola i HPBCD, uočava se A_P tip dijagrama, sugerišući da se pri višoj koncentraciji CD formiraju kompleksi višeg reda (Slika 4.3.4-2). Pošto se stehiometrija sistema može pretpostaviti uklapanjem dijagrama u linearne, kvadratne ili kubne modele, za ovu krivu kubna funkcija je pokazala najbolje uklapanje ($R^2=0.996$), sugerišući formiranje 1:3 kompleksa ($lek(CD)_3$).



Slika 4.3.4-2. Dijagrami fazne rastvorljivosti aripiprazola u HPBCD rastvoru u vodi.

Krive dobijene u citratnom puferu sa i bez dodatka PVP (Slika 4.3.4-3) pokazuju da dijagrami mogu biti klasifikovani kao A_N tip zato što pri višim koncentracijama CD postoji negativno odstupanje od linearnosti, što znači da je CD manje efektivan pri

višim koncentracijama. Najbolje uklapanje dobijeno je takođe sa kubnom funkcijom ($R^2=0.996$ sa PVP, $R^2=0.987$ bez PVP) sugerišući formiranje 1:3 kompleksa ($\text{lek}(\text{CD})_3$).



Slika 4.3.4-3. Dijagrami fazne rastvorljivosti aripiprazola u medijumima sa najznačajnijim povećanjem rastvorljivosti: citratni pufer pH 3.0 (a) i citratni pufer pH 3.0 sa PVP (b).

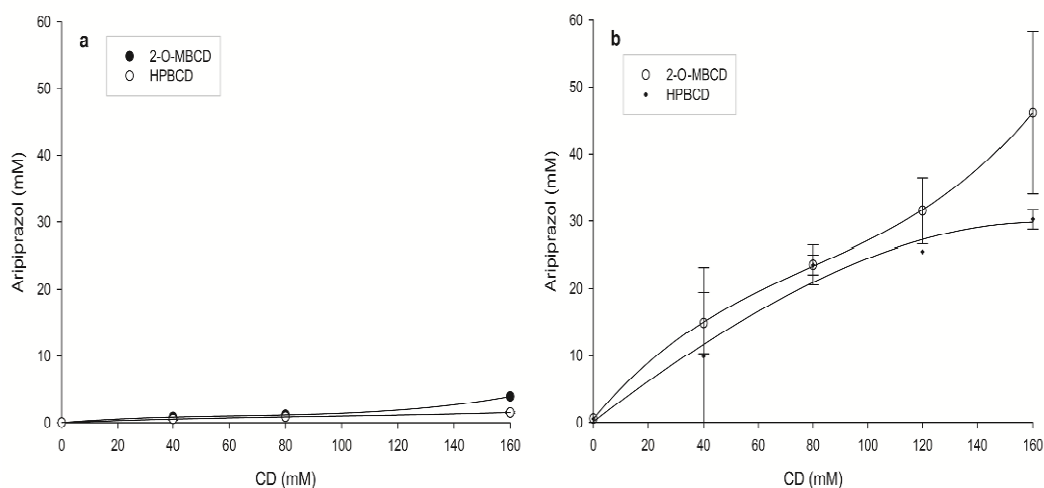
Slični oblici krive dobijeni su u studijama rastvorljivosti autora Buchanan i drugih (2007) za antimikotike i HPBCD u nekim puferima. Dobijeni A_N profili su objašnjeni *bulk* promenama rastvarača uzrokovanih prisustvom solubilizatora pri različitim koncentracijama i/ili samoasocijaciji solubilizatora (HPBCD) pri višim koncentracijama.

Dijagram odnosno profil rastvorljivosti bi takođe mogao biti okarakterisan i kao normalan profil sa negativnom devijacijom pri niskim koncentracijama CD (A_L^-), sa odsečkom na y-osi u negativnom delu ose. Ovo ponašanje su opisali i Loftsson i autori (2005) i objasnili samoasocijacijom teško rastvornih lekova i lek:ciklodekstrin kompleksa, neinkluzionom kompleksacijom i interakcijama među ekscipijensima.

Moguće je da je uočeni porast rastvorljivosti aripiprazola posledica kooperativnog efekta nekoliko različitih solubilizacionih procesa i interakcija. Različite nepravilnosti primećene u dijagramima fazne rastvorljivosti, kao što su značajna devijacija eksperimentalno dobijene rastvorljivosti bez ciklodekstrina od rastvorljivosti koja se očitava na preseku sa y-osom, ili je čak i negativna vrednost, ukazuju na mogućnost formiranja multikomponentnih kompleksa i istovremeno formiranje inkluzionih i neinkluzionih kompleksa, ili fenomen samoasocijacije (Brewster i Loftsson, 2007; Loftsson i autori, 2005; Messner i autori, 2010).

4.3.4.1.3. Uticaj tipa ciklodekstrina na rastvorljivost – dijagrami fazne rastvorljivosti

Kako bi se ispitaio uticaj tipa CD na efikasnost kompleksacije i rastvorljivost aripiprazola, sprovedena je studija fazne rastvorljivosti u rastvorima HPBCD (0-160mM) i 2-O-MBCD (0-160mM) u vodi i citratnom puferu. Sa oba derivata beta-ciklodekstrina dobijene su slične krive rastvorljivosti, i sa najboljim uklapanjem sa kubnom funkcijom (u vodi: $R^2=0.996$ sa HPBCD, $R^2=0.992$ sa 2-O-MBCD; u citratnom puferu: $R^2=0.968$ sa HPBCD, $R^2=0.993$ sa 2-O-MBCD), i verovatnim formiranjem 1:3 kompleksa (lek(CD)₃) (Slika 4.3.4-4). Čini se da se u oba ispitivana medijuma krive malo značajnije razilaze pri koncentraciji CD 160 mM.



Slika 4.3.4-4. Krive rastvorljivosti aripiprazola sa HPBCD i 2-O-MBCD u čisto vodenim rastvorima (a) i citratnom puferu pH 3.0 (b).

Kako bi se dodatno ispitaio uticaj tipa CD na rastvorljivost aripiprazola, primenjen je 2^3 faktorijalni dizajn.

4.3.4.1.4. Uticaj tipa ciklodekstrina na rastvorljivost – primena faktorijalnog dizajna

Faktorijalni dizajn 2^3 primenjen je kako bi se proverio značaj uticaja tipa CD, koncentracije CD i vremena mešanja na solubilizaciju aripiprazola (Tabela 4.3.4-3). Dobijeni rezultati za rastvorljivost aripiprazola su zatim statistički analizirani kao odgovori na različite kombinacije ispitivanih faktora (Tabela 4.3.4-4).

Tabela 4.3.4-3. Dizajn eksperimenata i dobijeni odgovori za 2³faktorijalni dizajn

Eksperiment br.	Nezavisno promenljive			Odgovor R
	A	B	C	
1	+ 1	+ 1	+ 1	18.98
2	+ 1	- 1	+ 1	12.86
3	+ 1	+ 1	- 1	13.33
4	+ 1	- 1	- 1	10.43
5	- 1	+ 1	+ 1	4.79
6	- 1	- 1	+ 1	3.28
7	- 1	+ 1	- 1	3.91
8	- 1	- 1	- 1	2.73

Šifre realnih vrednosti: A = koncentracija CD: - 1 odgovara 12.5%, + 1 25%; B = tip CD: - 1 odgovara HPBCD, + 1 2-O-MBCD; C = vreme mešanja: - 1 odgovara 60 minuta, + 1 120 minuta; R = rastvorljivost aripiprazola (mg/ml).

Tabela 4.3.4-4. Rezultati dobijeni primenom 2³ faktorijalnog dizajna (ANOVA)

Faktor ili interakcija	Suma kvadrata	Stepeni slobode	Srednja vrednost kvadrata	F vrednost	p-vrednost prob > F
Model	237.42	3	79.14	24.12	0.0051
A – koncentracija CD	209.00	1	209.00	63.71	0.0013
B – tip CD	17.19	1	17.16	5.23	0.0841
C – vreme mešanja	11.27	1	11.27	3.43	0.1375
Residual	13.12	4	3.28		
Cor Total	250.55	7			

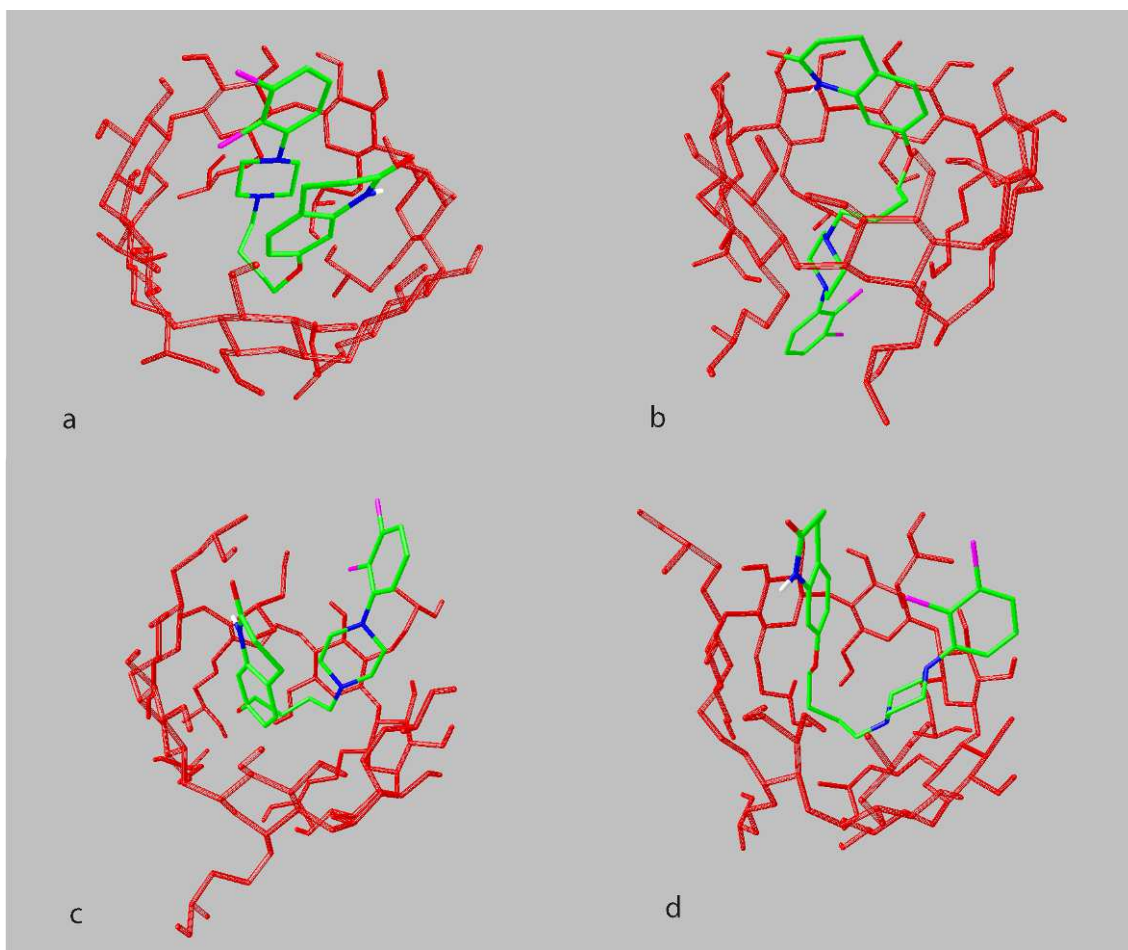
R²: 0.9476

U rastvorima iste koncentracije CD i sa istim vremenima mešanja, dobijena je nešto veća rastvorljivost aripiprazola sa 2-O-MBCD nego sa HPBCD što može da znači da je kompleksacija nešto efikasnija i lakša sa 2-O-MBCD i sa ovom model supstancom (0.05 < p-vrednost < 0.10), kao što je to pokazano u slučaju vorikonazola. Međutim, za ispitivane opsege odabranih parametara i odabrani nivo verovatnoće (p-vrednost < 0.05), nije pronađena statistički značajna razlika, odnosno rezultati pokazuju da je jedini značajan faktor za rastvorljivost koncentracija CD, i da nema značajnih interakcija.

4.3.5. Simulacija molekularnog vezivanja aripiprazol:ciklodekstrin

U cilju boljeg razumevanja dobijenih rezultata studija rastvorljivosti sa HPBCD, izvršena je simulacija njegovog molekularnog vezivanja sa aripiprazolom.

Aripiprazol može da formira stabilne komplekse zauzimajući različite konformacije. Slika 4.3.5-1 a i b ilustruje reprezentativne komplekse aripiprazola sa HPBCD *izomerom a*, a Slika 4.3.5-1 c i d ilustruje reprezentativne komplekse aripiprazola sa HPBCD *izomerom b* (nepolarni atomi vodonika su uklonjeni radi jasnoće). Najstabilniji kompleks se formira kada aripiprazol zauzima savijenu konformaciju (Slika 4.3.5-1a), iako je moguće formiranje kompleksa i kada je u linearnoj konformaciji (Slika 4.3.5-1b).



Slika 4.3.5-1. Reprezentativne konformacije aripiprazola u kompleksu sa različitim izomerima HPBCD: kompleksi aripiprazola sa HPBCD *izomerom a*, (a) i (b); kompleksi aripiprazola sa HPBCD *izomerom b*, (c) i (d).

Najviši procenjeni afinitet vezivanja je -7.6 kcal/mol i odgovara kompleksu sa HPBCD *izomerom a* (Slika 4.3.5-1a). Postojanje vodonične veze između N-H vodonika aripiprazola i susednog O-H kiseonika HPBCD sa visokom energijom -0.54 kcal/mol (računato koristeći *CHARMm* parametre polja sile) ukazuje na značaj interakcija u vidu vodoničnih veza u stabilizaciji kompleksa. Procenjeni afiniteti vezivanja u kompleksima u kojima je aripiprazol u linearnoj konformaciji (Slika 4.3.5-1b) su generalno niži. Lokacija (2-hidroksi)propil supstituenata izgleda da takođe utiču na vezivanje. Najviši izračunati afinitet vezivanja za *izomer b* koji ima neke (2-hidroksi)propil supstituente nasumično raspoređene na mestu O2 primarnih hidroksil grupa (Slika 4.3.5-1c, d) bio je -6.4 kcal/mol, i energija vodonične veze između N-H i susedne hidroksil grupe HPBCD iznosila je -0.36 kcal/mol. Slabije vezivanje aripiprazola i HPBCD *izomera b* može se pripisati sternom efektu i sprečavanju pristupa u hidrofobnu šupljinu. Imajući u vidu da su komercijalni proizvodi obično smeše izomera koji se uglavnom sastoje od O6 supstituisanih HPBCD (*izomer a*), sa izvesnom količinom O2 i O3 supstituisanih HPBCD, različiti afiniteti vezivanja bi mogli dodatno zakomplikovati interpretaciju rezultata studija rastvorljivosti.

Iz oblika krivih dobijenih u različitim medijumima (Slika 4.3.4-1), i uzimajući u obzir raznolikost konformacija koje aripiprazol može da zauzme u kompleksima sa HPBCD različite stabilnosti, može se pretpostaviti da su u solubilizaciju aripiprazola uključeni složeni mehanizmi.

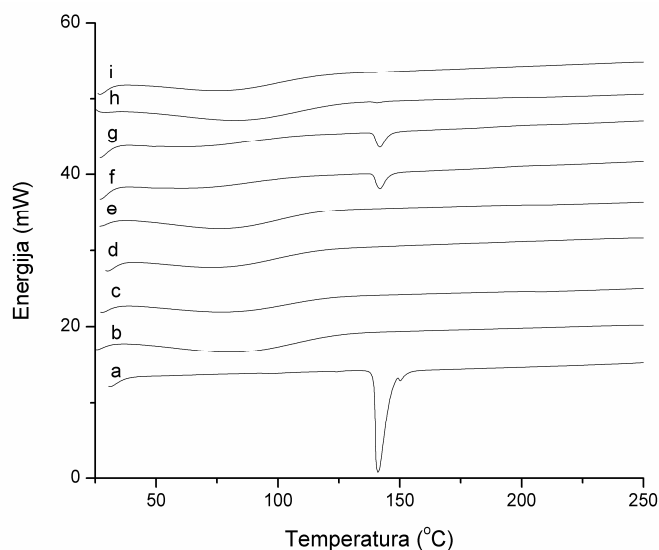
4.3.6. Karakterizacija praškova sa aripiprazolom

4.3.6.1. Termalna analiza

Na termogramima dobijenim diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (Slika 4.3.6-1), vidi se da aripiprazol usled topljenja ima endotermni pik u opsegu $138-150^{\circ}\text{C}$ sa maksimumom na 141°C , što znači da sirovina pripada kristalnoj formi III (13), sa malim sekundarnim endotermnim pikom na 150°C koji se može pripisati prisustvu male količine forme I. Odsustvo endoternog pika usled topljenja leka u proizvodu dobijenom sušenjem raspršivanjem pokazuje da je aripiprazol uključen u šupljinu ciklodekstrina u amorfnom obliku (Slika 4.3.6-1c).

Ostali termogrami koji su dobijeni sa uzorcima sa dva različita CD su vrlo slični. U fizičkoj smeši, međutim (Slika 4.3.6-1d), endotermni pik usled topljenja je prisutan, potvrđujući postojanje kristalnog leka i usled toga nemogućnost da se formira inkluzioni kompleks fizičkim mešanjem. Još jedna zanimljiva odlika termograma je širok endotermni pik koji obuhvata temperaturu od sobne do 100°C, sa maksimumom u opsegu 79-80°C što verovatno odgovara gubitku jako vezane vode sa hidrofilnog dela ciklodekstrina. Na termogramima se ne uočava različit uticaj molarne koncentracije ciklodekstrina u rastvoru za sušenje raspršivanjem, što govori da su količine ciklodekstrina korišćene u ovoj studiji bile odgovarajuće i dovoljne za potpunu inkluziju leka u molekularnom stanju.

Uzorci pripremljeni zajedničkim usitnjavanjem u prisustvu male količine rastvarača aripiprazola sa ciklodekstrinom korišćenim u ovoj studiji (Slika 4.3.6-1e) pokazuje mali endotermni pik na 141°C otkrivajući prisustvo male količine kristalnog aripiprazola koja je odmerena u smeši i koja nije uključena u šupljinu ciklodekstrina. Iako ova metoda predstavlja alternativu sa manjom potrošnjom energije i rastvarača, potrebno je još eksperimentalnog rada kako bi se ispitala mogućnost optimizacije parametara.

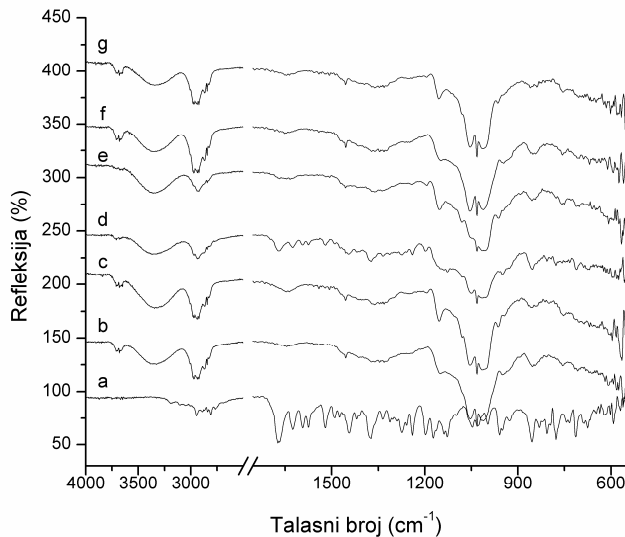


Slika 4.3.6-1. Reprezentativni DSC termogrami uzoraka: aripiprazol (a), HPBCD (b), 2-O-MBCD (c), aripiprazol-HPBCD kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom CD 160 mM (d), aripiprazol-2-O-MBCD kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom CD 160 mM (e), fizička smeša aripiprazola i HPBCD (f), fizička smeša aripiprazola i 2-O-MBCD (g), uzorak dobijen tehnikom zajedničkog usitnjavanja aripiprazola i HPBCD u prisustvu male količine rastvarača (h), uzorak dobijen tehnikom zajedničkog usitnjavanja aripiprazola i 2-O-MBCD u prisustvu male količine rastvarača (i).

Termogravimetrijska analiza uzoraka pokazuje sledeći gubitak mase: 6.0, 5.9 i 5.5% w/w za HPBCD, aripiprazol-HPBCD kompleks osušen raspršivanjem i aripiprazol-HPBCD fizičku smešu, redom (standardna devijacija <1.5%). Gubitak mase se dešava skoro od sobne temperature do oko 90°C što podržava prethodno uočeni gubitak vode u ovom temperaturnom opsegu. Uočeni gubitak mase na termogramima blizak je vrednostima koje su dobijene za sadržaj vode *Karl Fischer* titrimetrijom, a u proizvodima osušenim raspršivanjem postoji blagi porast u sadržaju vode, verovatno kao posledica dalje hidratacije ciklodekstrina u rastvoru. Voda hidratacije je jako vezana i ne može se lako osloboditi uprkos povišenim temperaturama tokom procesa sušenja raspršivanjem.

4.3.6.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR)

Slika 4.3.6-2 ilustruje ATR-FTIR spektre aripiprazola, ciklodekstrina, proizvoda osušenih raspršivanjem, i odgovarajuće fizičke smeše.



Slika 4.3.6-2. Reprezentativni ATR-FTIR spektri: aripiprazol (a), HPBCD osušen raspršivanjem (b), 2-O-MBCD osušen raspršivanjem (c), fizička smeša aripiprazola i HPBCD (d), fizička smeša aripiprazola i 2-O-MBCD (e), aripiprazol-HPBCD kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom CD 160 mM (f), aripiprazol-2-O-MBCD kompleks dobijen sušenjem raspršivanjem rastvora sa koncentracijom CD 160 mM (g).

Aripiprazol (Slika 4.3.6-2a) pokazuje karakteristične trake polimorfa III (13), što je u skladu sa temperaturnim opsegom topljenja zabeleženom na DSC termogramu. Preciznije, NH rastezna vibracija se pojavljuje na $3,190\text{ cm}^{-1}$, CH₂ rastezanje se vidi na $2,945\text{ cm}^{-1}$, karbonil rastezna vibracija je locirana na $1,684\text{ cm}^{-1}$, i O-Ar istežanje veze polazuje višestruke pikove na $1,291$, $1,275$, i $1,239\text{ cm}^{-1}$. FTIR spektar čistog ciklodekstrina osušenog raspršivanjem bez prisustva leka u rastvoru (Slika 4.3.6-2b) pokazuje široku traku u opsegu $3,100\text{--}3,600\text{ cm}^{-1}$ sa maksimumom oko $3,340\text{ cm}^{-1}$, što se može pripisati OH rasteznim vibracijama, koje ukazuju na snažnu asocijaciju hidroksilnih grupa preko vodoničnih veza. Međutim, prisustvo pikova manjeg intenziteta ali veće oštine u opsegu $3,600\text{--}3,700\text{ cm}^{-1}$ ukazuje na prisustvo slobodnih OH grupa koji verovatno pripadaju apsorbovanoj vodi koja nije potupno uključena u mrežu vodoničnih veza.

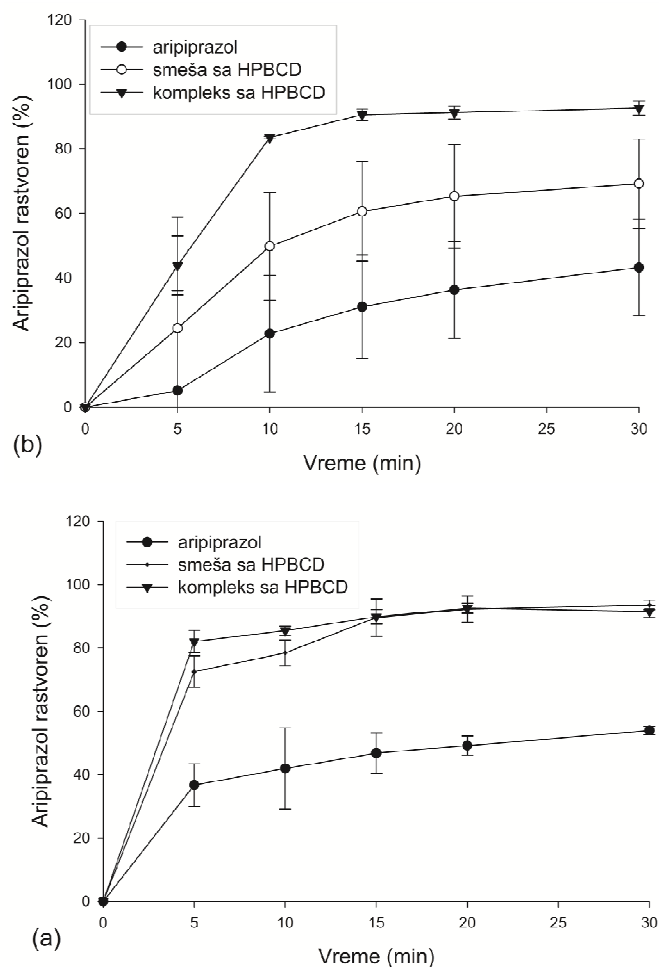
Ostali spektri koji su dobijeni sa uzorcima sa dva različita CD su vrlo slični. Što se tiče inkluzionih kompleksa pripremljenih sušenjem raspršivanjem (Slika 4.3.6-2c), lek se može identifikovati u CH, CO i regiji otiska prsta; međutim intenzitet pikova aripiprazola u inkluzionom kompleksu je niži, u poređenju sa spektrom fizičke smeše (Slika 4.3.6-2d), gde lek jasno pokazuje intenzivnije pikove, ukazujući na to da postoji slaba ili nikakva interakcija između leka i ciklodekstrina u fizičkoj smeši.

4.3.6.3. Ispitivanje brzine rastvaranja

Brzina rastvaranja je ispitivana u tri različita medijuma: 0.1M hlorovodoničnoj kiselini (pH 1.2), acetatnom puferu (pH 4.5) i fosfatnom puferu (pH 6.8), u cilju procene poboljšanja brzine rastvaranja aripiprazola. Na Slici 4.3.6-3 prikazani su profili brzine rastvaranja za aripiprazol-HPBCD kompleks, u poređenju sa odgovarajućom fizičkom smešom i čistim aripiprazolom, pri različitim brzinama mešanja u 0.1M hlorovodoničnoj kiselini.

Iz kompleksa sa HPBCD se rastvorilo više od 80% aripiprazola već posle 10 minuta bez obzira na brzinu mešanja, što nije slučaj sa ostalim uzorcima. Prisustvo ciklodekstrina u fizičkoj smeši sa aripiprazolom takođe je doprinelo poboljšanju brzine rastvaranja in-vitro. Međutim, posmatranjem vrednosti relativne standardne devijacije (predstavljena u

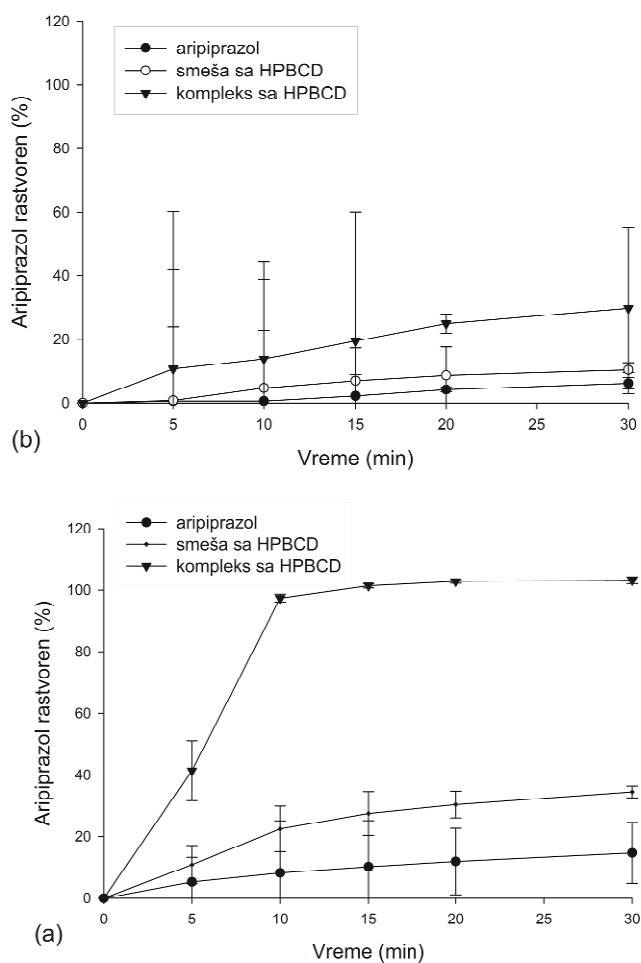
vidu tzv. *error bars*, engl., Slika 4.3.6-3) zaključeno je da samo iz kompleksa dobijenih sušenjem raspršivanjem dolazi do brzog i uniformnog rastvaranja, što je značajna karakteristika profila brzine rastvaranja. Pošto su razlike među profilima više izražene pri manjoj brzini mešanja rotirajućih lopatica u aparaturi, što je i očekivano, brzina od 50 rpm je korišćena za dalja ispitivanja, jer je diskriminativnija.



Slika 4.3.6-3. Brzina rastvaranja aripiprazola iz različitih uzoraka, u 0.1M HCl, brzina mešanja: 60 rpm (a) i 50 rpm (b).

Imajući u vidu pH zavisnu rastvorljivost aripiprazola, brzina rastvaranja aripiprazola iz kompleksa sa HPBCD ispitivana je i u medijumima pH vrednosti 4.5 i 6.8. (Slika 4.3.6-4). U studiji Nacsa i autora (2009) navodi se da postoji mogućnost da rastvorljivost leka može da postane pH nezavisna primenom ciklodekstrina u kompleksaciji leka. U

slučaju čistog aripiprazola i fizičke smeše sa HPBCD, vidi se da je u odnosu na medijum pH 1.2 brzina rastvaranja u acetatnom puferu pH 4.5 smanjena, a naročito u fosfatnom puferu pH 6.8, što je u skladu sa rezultatima dobijenim za rastvorljivost aripiprazola koji je praktično nerastvoran u fosfatnom puferu pH 6.8. Interesantno je da je u acetatnom puferu pH 4.5 brzina rastvaranja aripiprazola iz kompleksa sa HPBCD slična kao i u 0.1M hlorovodoničnoj kiselini, a u fosfatnom puferu pH 6.8 značajno manja.



Slika 4.3.6-4. Brzina rastvaranja aripiprazola iz različitih uzoraka, u acetatnom puferu pH 4.5 (a) i fosfatnom puferu pH 6.8 (b).

Poznato je da se u vodenim rastvorima kompleksi lek-CD kontinuirano formiraju i disociraju, u pH 6.8 gde je aripiprazol praktično nerastvoran smanjena je i njegova raspoloživost za formiranje odnosno održavanje kompleksa i dobre rastvorljivosti, što je jedan od mogućih razloga pada brzine rastvaranja u ovom medijumu. Kako se pretpostavlja da su u kompleksaciji uključeni složeni mehanizmi zahvaljujući prisustvu

hidroksikarboksilne kiseline (priprema kompleksa u citratnom puferu pH 3.0), i da u rastvoru postoje različite vrste kompleksa, možda je jedna frakcija aripiprazola ostala u rastvornom obliku jer se ipak zapaža veća brzina rastvaranja u odnosu na čisti aripiprazol i fizičku smešu sa HPBCD. Dakle, promena profila rastvaranja iz pH-zavisnog u pH-nezavisno nije obavezna za svaku lekovitu supstancu i ciklodekstrin i treba je ispitivati i razmotriti eventualni uticaj na biološku raspoloživost leka.

4.3.7. Modelovanje, karakterizacija i optimizacija sušenja raspršivanjem za odabranu formulaciju sa aripiprazolom

Odabrana je formulacija aripiprazola sa HPBCD čiji se kompleks priprema u citratnom puferu pH 3.0, a zatim prevodi u prašak sušenjem raspršivanjem, sa koncentracijom leka u prašku od 5%.

4.3.7.1. Eksperimentalni dizajn i metodologija površine odgovora

Pomoću eksperimentalnih rezultata koji pripadaju CCD primenom metodologije površine odgovora (RSM) najpre je razvijen **model RSM1** (Tabela 4.3.7-1, Slika 4.2.6-1).

Analiza rezultata nije pokazala postojanje statistički značajnih interakcija među faktorima za odabranu formulaciju, pri nivou značajnosti od 5 %, iako su neki autori zaključili da kod sušenja raspršivanjem mnoge interakcije mogu biti značajne za osobine kao što su veličina čestica i proizvodni prinos (Chawla i autori, 1994; Nekkanti i autori, 2009; Tajber i autori, 2009). Samo kod proizvodnog prinosa su dobijeni polinomi drugog reda koji opisuju postojanje kvadratnog efekta. Svi dobijeni modeli su procenjeni kao značajni i faktori koji su prepoznati kao najvažniji imajući u vidu izračunate p-vrednosti, analizirani su malo detaljnije (Tabela 4.3.7-2).

Tabela 4.3.7-1. Nezavisne procesne promenljive u centralnog kompozitnog dizajna (realne i kodirane vrednosti) i dobijeni odgovori

Eks pbr.	Ulazi						Odgovori – eksperimentalni podaci		
	A, Konc. rastvora (%)		B, Brzina pumpe (%)		C, Temperatura ulaz. vazd. (°C)		R ₁ , Prinosa (%)	R ₂ , Sadržaj vlage (%)	R ₃ , Temp izlaz. vazduha (°C)
	šifra	realno	šifra	realno	šifra	realno			
1	0	20	-1.68	3.18	0	170	90.7	3.0	93
2	-1	10	+1	30	-1	160	91.5	5.0	65
3	+1	30	+1	30	-1	160	79.9	4.9	65
4	0	20	0	20	-1.68	153.18	86.7	4.4	68
5	0	20	0	20	0	170	91.1	3.8	80
6	+1	30	+1	30	+1	180	79.0	4.5	71
7	-1.68	3.18	0	20	0	170	93.6	4.4	69
8	0	20	0	20	0	170	90.8	4.0	79
9	-1	10	-1	10	-1	160	94.4	3.5	84
10	+1.68	36.82	0	20	0	170	82.0	3.6	81
11	0	20	0	20	0	170	90.1	4.1	78
12	0	20	0	20	0	170	88.2	3.9	80
13	0	20	0	20	0	170	88.8	3.9	75
14	-1	10	+1	30	+1	180	90.6	4.4	72
15	+1	30	-1	10	+1	180	84.9	3.3	86
16	+1	30	-1	10	-1	160	87.1	4.0	81
17	0	20	+1.68	36.82	0	170	76.1	4.9	60
18	0	20	0	20	0	170	89.4	3.8	74
19	-1	10	-1	10	+1	180	93.1	3.4	90
20	0	20	0	20	+1.68	186.82	86.2	3.7	83

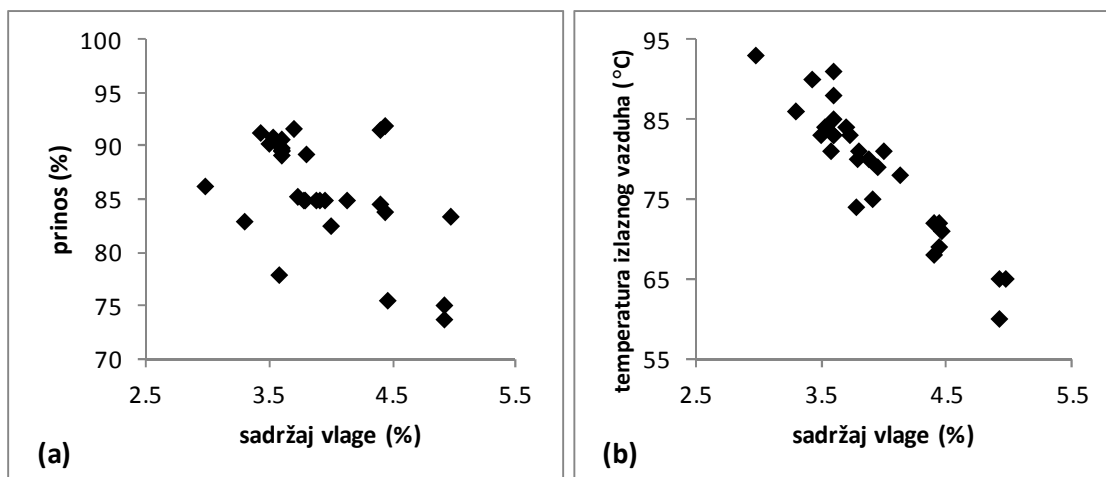
Vrednosti brzine pumpe 3.18%, 10%, 20%, 30%, i 36.82% predstavljaju brzinu koja odgovara protoku oko 1ml/min, 3ml/min, 6ml/min, 9ml/min i 11ml/min, respektivno.

Tabela 4.3.7-2. Regresioni koeficijenti koji povezuju parametre sušenja raspršivanjem (kodirani faktori) sa odgovorima – RSM1 model

Model	R ₁ , Prinosa		R ₂ , Sadržaj vlage		R ₃ , Temperatura izlaznog vazduha	
	F-vrednost (p- vrednost)	38.54 (< 0.0001)	4.03	40.88 (< 0.0001)	76.7	51.53 (< 0.0001)
A, Koncentracija rastvora	-4.25	66.82 (< 0.0001)	-0.08	2.24 (0.1535)	+0.89	1.29 (0.2733)
B, Brzina pumpe	-3.15	36.79 (< 0.0001)	+0.57	105.59 (< 0.0001)	-9.04	132.28 (< 0.0001)
C, Temperatura ulaznog vazduha	/	/	-0.21	14.79 (0.0014)	+3.60	21.02 (0.0003)
B ² , Kvadratni efekat pumpe	-1.74	12.03 (0.0032)	/	/	/	/
Lack of fit (neusklađenost)		3.79 (0.0764)		3.27 (0.1004)		1.39 (0.3784)
R ²		0.878		0.884		0.906

R² – koeficijent korelacije: Podebljane vrednosti označavaju statistički značajne faktore/efekte.

Proizvodni prinos je najviše bio pod uticajem brzine pumpe, koja ispoljava kvadratni efekat. Veća brzina pumpe imala je negativan uticaj na prinos, zato što toplotna energija koja se obezbeđuje u vidu temperature ulaznog vazduha nije bila dovoljna da omogući potpuno sušenje, što je rezultovalo i padom temperature izlaznog vazduha. Pošto je dolazilo do lepljenja u komori za sušenje, prinos je bio snižen, i sadržaj vlage je bio povišen (Slika 4.3.7-1a). Iako su tačke na grafiku rasute može se zapaziti trend.



Slika 4.3.7-1. Korelacioni dijagrami: sadržaja vlage i prinos (a) i sadržaj vlage i temperatura izlaznog vazduha (b).

Veća količina praška bila je prikupljena u kolektoru kada su praškovi sadržali manje rezidualne vlage, a slično je primećeno i u drugim studijama (Billon i autori, 2000; Nekkanti i autori, 2009; Tajber i autori, 2009). Koncentracija rastvora je imala negativan uticaj na proizvodni prinos, slično kao i u drugim istraživanjima (Goula i autori, 2004; Elversson i autori, 2003). Elversson i autori (2003) su objasnili ovu pojavu uticajem veće količine suvih supstanci u rastvoru na povećanu sklonost kapi ka koalescenciji prilikom međusobnih sudara ili udara o zid komore usled veće sile udara. Goula i Adamopoulos (2004) su zapazili da veća koncentracija čvrstih supstanci uzrokuje smanjenje čvrste mase koja je nošena strujom izlaznog vazduha zbog njihovog efekta na povećanje viskoziteta rastvora, povećanje veličine kapi a time i čestica. S druge strane, mnogi autori su zaključili da povećanje koncentracije rastvora ima pozitivan uticaj na prinos tokom sušenja raspršivanjem jer pri višim temperaturama i koncentraciji rastvora, potpunije sušenje sprečava lepljenje proizvoda i omogućava bolje odvajanje čestica. Sa koncentrovanijim rastvorima nastaju krupnije čestice i

trebalo bi da je odvajanje u ciklonu bolje (Billon i autori, 2000; Chawla i autori, 1994; Prinn i autori, 2002). Efekat temperature ulaznog vazduha nije bio od značajnog uticaja na proizvodni prinos, i slično je zaključeno od strane Tajber i autora (Plumb i autori, 2002).

Pored brzine pumpe, značajan uticaj na sadržaj vlage imala je i temperatura ulaznog vazduha. Sa povećanjem temperature ulaznog vazduha, sadržaj vlage se smanjuje, jer što je topliji vazduh, može da zadrži više vlage pre nego što postane zasićen i zaustavi izvlačenje vode sa površine čestica u obliku pare koja se zatim odvodi vazduhom koji protiče kroz uređaj (Goula i Adamopoulos, 2008; Rattes i Oliveira, 2007). Ispitivano je i da li se mogu dovesti u vezu temperatura izlaznog vazduha i sadržaj vlage praškova. Može se reći da postoji veza između ovih parametara u smislu da se pri većim temperaturama izlaznog vazduha, može očekivati niži sadržaj vlage u praškovima (Slika 4.3.7-1b). Ova korelacija je takođe prepoznata od strane Billon i autora (2000) i Tajber i autora (2009). Rezultati sadržaja vlage izraženi su kao srednje vrednosti najmanje dva merenja, sa standardnom devijacijom u opsegu 0.00-0.19%, u proseku 0.11%.

4.3.7.2. Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona (MLP)

Veštačka neuronska mreža tipa višeslojnog perceptrona (MLP) odabrana je u cilju razvoja **modela MLP1**. Podešavanje parametara neuronske mreže obuhvatalo je izbor broja skrivenih slojeva i neurona, tipa transfer funkcije, brzine učenja, momentuma i broj kombinacija. U treniranju mreže korišćeni su poznati ulazi i izlazi dobijeni primenom CCD. Grupe podataka su podeljene na grupu za treniranje (nasumično odabranih 17 eksperimenata), grupu za validaciju (dodatnih 3 eksperimenata iz CCD) i grupu za testiranje (9 eksperimenata, Tabela 4.3.7-3) (Slika 4.2.6-1). U aktivaciji neurona korišćena je sigmoidna transfer funkcija.

Period učenja je bio završen kada je dostignuta najmanja RMSE:

$$RMSE = [\sum (y_{ip} - y_{im})^2 / n]^{1/2} \quad (4.3.7-1)$$

gde je RMSE koren srednje vrednosti kvadrata greške, y_p je predviđeni odgovor, y_m je odgovor dobijen u eksperimentu, i n je broj eksperimenata, podataka za treniranje MLP

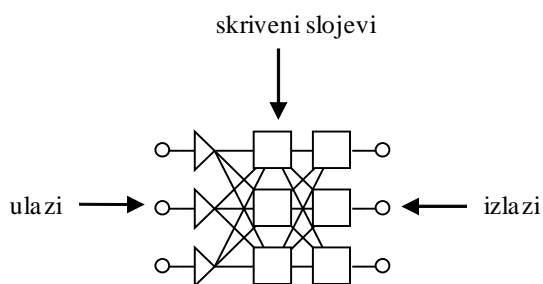
(Bishop, 1995). Podaci za testiranje su predstavljeni mreži nakon završenog procesa treniranja.

Tabela 4.3.7-3. Nezavisne procesne promenljive nasumično dizajniranih eksperimenata i dobijeni odgovori

Eksp. br.	Ulazi			Odgovori – eksperimentalni podaci		
	A, Konc. rastvora (%)	B, Brzina pumpe (%)	C, Temperatura ulaz. vazd. (°C)	R ₁ , Prinos (%)	R ₂ , Sadržaj vlage (%)	R ₃ , Temp izlaz.vazduha (°C)
21	20	10	160	89.8	3.6	85
22	10	20	165	91.5	4.4	72
23	20	15	170	89.1	3.6	83
24	22	13	180	89.6	3.6	91
25	15	15	180	89.5	3.6	88
26	22	15	160	90.6	3.6	83
27	10	10	170	91.6	3.7	84
28	15	10	165	90.2	3.5	83
29	25	10	180	86.2	3.3	90

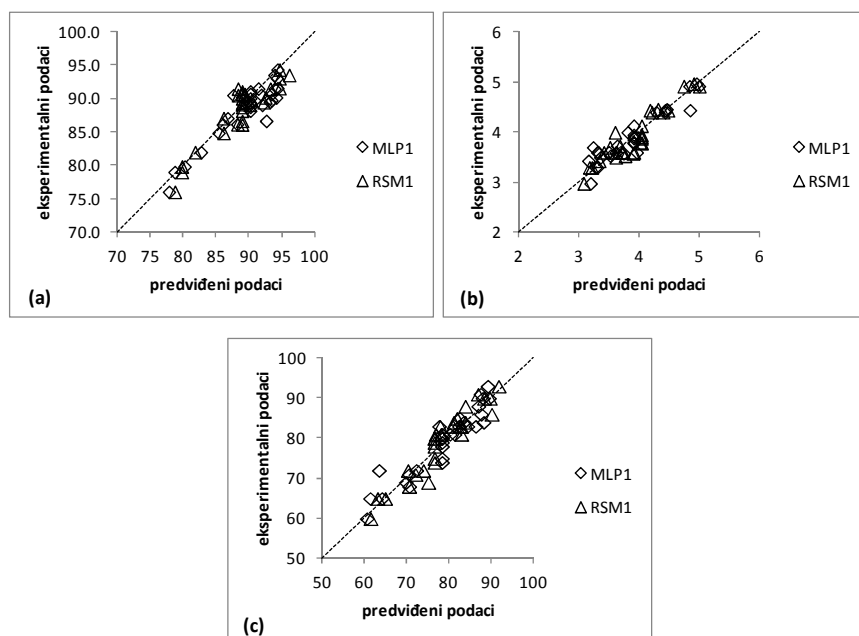
Vrednosti brzine pumpe 10%, 13%, 15% i 20% predstavljaju brzinu koja odgovara protoku oko 3ml/min, 3.9ml/min, 4.5ml/min i 6ml/min, respektivno.

Odabrana mreža imala je tri sloja u strukturi: prvi sloj sa tri ulazne jedinice, drugi sloj sa 3 skrivene jedinice i treći sloj sa 3 izlazne jedinice (Slika 4.3.7-2). Struktura i optimalne vrednosti za treniranje mreže su bili sledeći: 1000 epoha, brzina učenja 0.6, momentum 0.3, RMSE treniranja 0.058, RMSE validacije 0.17 i RMSE testiranja 0.12.



Slika 4.3.7-2. Struktura višeslojnog perceptrona (MLP)

Poređenje sposobnosti predviđanja modela RSM1 i i MLP1 predstavljeno je u vidu korelacionih grafika (eksperimentalne naspram predviđenih vrednosti, Slika 4.3.7-3).



Slika 4.3.7-3. Poređenje eksperimentalnih i predviđenih podataka dobijenih od strane MLP1 i RSM1 modela za izlaze: prinos ($R^2_{MLP1}=0.854$; $R^2_{RSM1}=0.846$) (a), sadržaj vlage ($R^2_{MLP1}=0.886$; $R^2_{RSM1}=0.871$) (b), i temperaturu izlaznog vazduha ($R^2_{MLP1}=0.893$; $R^2_{RSM1}=0.899$) (c).

Na osnovu većih vrednosti koeficijenta korelacije između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti vidi se da MLP1 pokazuje bolju sposobnost predviđanja za izlaze prinos i sadržaj vlage u poređenju sa RSM1, dok za temperaturu izlaznog vazduha oba modela imaju sličnu sposobnost predviđanja.

4.3.7.3. Ispitivanje potencijala novih načina kombinovanja veštačkih neuronskih mreža (MLP) i metodologije površine odgovora (RSM)

4.3.7.3.1. Primena MLP u dopunjavanju podataka u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM

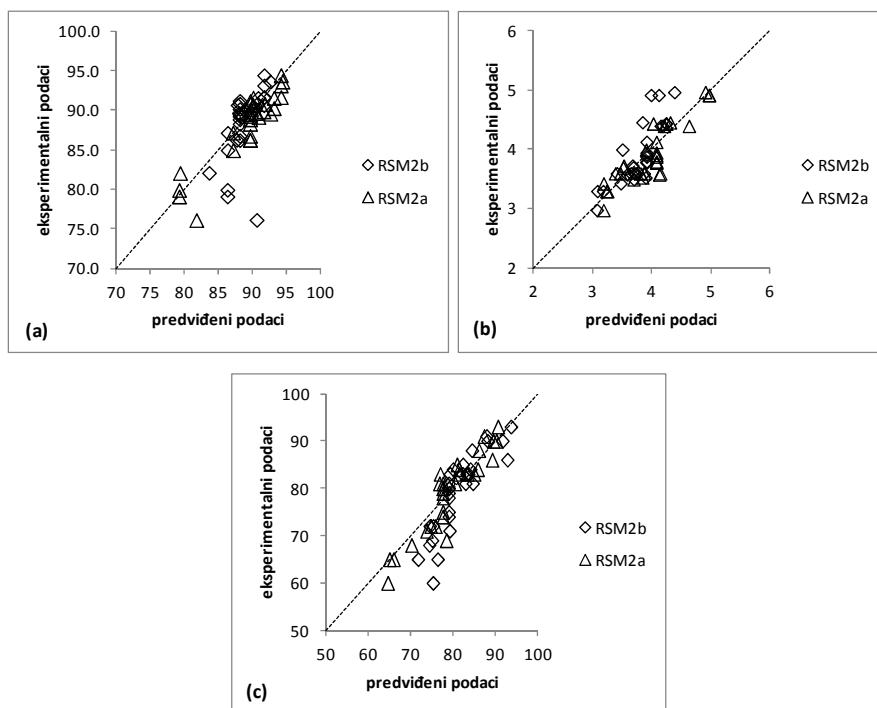
U razvoju **modela MLP2a** i **MLP2b** koji bi se mogli koristiti za predviđanje i dopunu rezultat u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM, primenjena je slična metodologija i struktura MLP kao prilikom razvoja MLP1 modela.

Mreža MLP2a je trenirana pomoću podataka koji pripadaju 2^3 faktorijalnom dizajnu u okviru CCD (Tabela 4.3.7-1), predstavljajući tip podataka koji se dobija izvođenjem sistematično dizajniranih eksperimenata, i 9 eksperimenata je korišćeno za testiranje mreže (Tabela 4.3.7-3, Slika 4.2.6-1). Struktura i optimalne vrednosti za treniranje mreže MLP2a bili su sledeći: 1000 epoha, brzina učenja 0.6, momentum 0.3, RMSE treniranja 0.29, RMSE testiranja 0.15.

Mreža MLP2b trenirana je korišćenjem eksperimentalnih podataka dobijenih iz 8 eksperimenata sa nasumično dizajniranim ulaznim parametrima (Tabela 4.3.7-1, eksperimenti br. 1, 10 i 20; Tabela 4.3.7-3, eksperimenti br. 21-25), i 4 eksperimenata je korišćeno za testiranje mreže (Tabela 4.3.7-3, eksperimenti br. 26-29, Slika 4.2.6-1). Struktura i optimalne vrednosti za treniranje mreže MLP2b bili su sledeći: 1000 epoha, brzina učenja 0.6, momentum 0.3, RMSE treniranja 0.065, RMSE testiranja 0.12.

Performanse razvijenih modela poređene su korišćenjem parametra RMSE i korelacionog koeficijenta R^2 između predviđenih i eksperimentalnih podataka, tj. izlaza korišćenih za modelovanje i za testiranje. RMSE parametri su bili prilično slični za oba modela. R^2 su bili veći kod MLP2a modela: 0.872, 0.918 i 0.873 u poređenju sa R^2 MLP2b modela: 0.777, 0.851 i 0.852 za izlaze prinos, sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha, respektivno. Razlog za to je verovatno kvalitet podataka koji je korišćen za razvoj MLP2a koji su prikupljeni izvođenjem sistematično osmišljenih eksperimenata u cilju smanjenja potrebnog rada neophodnog za dobijanje odgovarajućeg modela, bez ugrožavanja značajnosti i tačnosti. U svakom slučaju, uzimajući u obzir da je mali broj eksperimenata korišćen u modelovanju MLP mreža, dobijeni su relativno dobri parametri performansi za oba modela.

Modeli razvijeni na ovaj način korišćeni su u dopunjavanju grupe podataka koji odgovaraju CCD (Slika 4.2.6-1). Kombinovanjem stvarnih (eksperimentalnih) podataka i podataka predviđenih korišćenjem MLP2a i MLP2b modela, formirane su dve grupe podataka koje odgovaraju CCD dizajnu. Korišćenjem ovih grupa podataka, razvijeni su **RSM2a i RSM2b modeli**. Rezultati dobijeni iz eksperimenata br. 26-29 (Tabela 3.4.7-3) korišćeni su za testiranje RSM2a i RSM2b modela. Poređenje sposobnosti predviđanja dobijenih modela predstavljeno je u vidu korelacionih grafika (eksperimentalne nasuprot predviđenih vrednosti, Slika 3.4.7-4).



Slika 4.3.7-4. Poređenje eksperimentalnih i predviđenih podataka dobijenih od strane RSM2a i RSM2b modela za izlaze: (a) prinos ($R^2_{RSM2a}=0.828$; $R^2_{RSM2b}=0.338$), (b) sadržaj vlage ($R^2_{RSM2a}=0.783$; $R^2_{RSM2b}=0.656$), i (c) temperatura izlaznog vazduha ($R^2_{RSM2a}=0.856$; $R^2_{RSM2b}=0.737$).

Model sa boljom sposobnošću predviđanja je bio RSM2a model, što je očigledno posledica boljih preformansi MLP2a modela koji je korišćen za dopunjavanje grupe podataka u sklopu CCD. Slično je zaključeno primenom slične metodologije u studiji autora Miguélez-Morán (2009). Ova činjenica potvrđuje pretpostavku da se pomoću eksperimentalnog dizajna (DOE) mogu obezbediti podaci boljeg kvaliteta jer iz njih proizilaze modeli koji bolje opisuju sistem i vrše tačnija predviđanja, time doprinoseći boljem razumevanju procesa, u poređenju sa eksperimentima tipa pokušaj-greška koji nisu sistematično osmišljeni. Sa druge strane, ideja korišćena veštačkih neuronskih mreža u dopunjavanju nedostajućih podataka specifičnog eksperimentalnog dizajna i razvoj RSM modela bez praktičnog izvođenja svih dizajnom predviđenih eksperimenata i dalje ostaje privlačna. Verovatno bi se u slučaju korišćenja većeg broja eksperimenata koji pokrivaju veći broj potencijalnih faktora od uticaja, mogli očekivati modeli sa još boljom sposobnošću predviđanja. U istraživanju Miguélez-Morán (2009) gde su analizirane veće grupe podataka, preko trećine eksperimenata potrebnih za odabrani DOE su mogli biti dopunjeni pomoću istorijskih podataka (pokušaj-greška), tako da je

broj eksperimenata koji bilo potrebno praktično izvesti značajno smanjen, i razvijeni su modeli relativno dobre sposobnosti predviđanja.

Izvršeno je poređenje predviđanja sa modelima RSM1 i MLP1 dobijenim korišćenjem samo eksperimentalnih podataka (Slika 4.3.7-3 i 4.3.7-4) i primećuje se da se najbolja predviđanja dobijaju pomoću MLP1 modela, zatim RSM1 modela, koji su razvijeni iz veće grupe podataka. Regresioni koeficijenti jednačina koje povezuju parametre sušenja raspršivanjem sa odgovorima modela RSM1, RSM2a i RSM2b, poređeni su i analizirani u smislu prepoznavanja razlika u sposobnosti predviđanja, i u cilju boljeg razumevanja veza između promenljivih (Tabela 4.3.7-2, 4.3.7-4, i 4.3.7-5).

Predviđanja za prinos su bila najmanje precizna kod RSM2b modela, zato što brzina pumpe nije prepoznata kao dovoljno značajna, za razliku od RSM2a i RSM1 modela.

Osim zaključaka o procesu koji su izvedeni analizom RSM1 modela, RSM2a model je prepoznao značajnim za prinos i kvadratni efekat koncentracije rastvora, kao i interakciju između koncentracije rastvora i brzine pumpe. Za sadržaj vlage, modeli RSM1 i RSM2a nisu prepoznali značajnost interakcija, i dobijeni regresioni koeficijenti su bili slični.

Tabela 4.3.7-4. Koeficijenti polinomalnih jednačina koje povezuju parametre sušenja raspršivanjem (kodirani faktori) sa odgovorima – RSM2a model

	R ₁ , Prinos		R ₂ , Sadržaj vlage		R ₃ , Temperatura izlaznog vazduha	
	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)
Model	89.69	53.69 (<0.0001)	4.06	51.16 (<0.0001)	77.56	70.78 (<0.0001)
A,						
Koncentracija rastvora	-4.49	170.85 (<0.0001)	+0.03	0.38 (0.544)	-0.48	0.63 (0.440)
B, Brzina pumpe	-3.00	76.58 (<0.0001)	+0.53	110.81 (<0.0001)	-7.75	160.00 (<0.0001)
C, Temperatura ulaznog vazduha	/	/	-0.33	42.28 (<0.0001)	+4.41	51.72 (<0.0001)
AB interakcija	-0.97	4.64 (0.049)	/	/	/	/
A ² , Kvadratni efekat	-0.98	8.65 (0.011)	/	/	/	/
B ² , Kvadratni efekat	-1.01	9.19 (0.009)	/	/	/	/
R ²	0.950		0.906		0.930	

R² – koeficijent korelacije

Tabela 4.3.7-5. Koeficijenti polinomalnih jednačina koje povezuju parametre sušenja raspršivanjem (kodirani faktori) sa odgovorima – RSM2b model

Model	R ₁ , Prinos	R ₂ , Sadržaj vlage		R ₃ , Temperatura izlaznog vazduha		
	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	
Model	88.17	19.60 (<0.0001)	3.90	57.02 (<0.0001)	79.00	50.22 (<0.0001)
A, Koncentracija rastvora	-2.68	52.56 (<0.0001)	-0.20	64.45 (<0.0001)	+2.33	28.35 (0.0001)
B, Brzina pumpe	-0.02	0.002 (0.968)	+0.31	160.25 (<0.0001)	-5.48	156.82 (<0.0001)
C, Temperatura ulaznog vazduha	/	/	-0.14	33.40 (<0.0001)	+2.75	39.34 (<0.0001)
AB interakcija	/	/	/	/	/	/
BC interakcija	/	/	+0.07	4.74 (0.047)	-1.35	5.54 (0.034)
A ² , Kvadratni efekat	/	/	/	/	/	/
B ² , Kvadratni efekat	-0.89	6.23 (0.024)	-0.11	22.25 (0.0003)	+1.94	21.07 (0.0004)
R ²	0.786		0.953		0.947	

R² – koeficijent korelacije

Model RSM2b, koji je imao prilično visok R² prilikom razvoja modela za sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha, navodi na ideju da su veze između ulaza i izlaza kompleksnije jer je pronađeno da je više faktora značajno, kao i neke interakcije i kvadratni efekti nekih faktora. Na primer, pronađeno je da koncentracija rastvora može biti značajna za sadržaj vlage jer se rastvori veće koncentracije lakše suše budući da je potrebno otpariti manju količinu vode iz svake kapi (Billon i autori, 2000). Takođe, interakcija između temperature ulaznog vazduha i brzine pumpe je prepoznata kao značajna za sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha, koji su u dobroj korelaciji (Slika. 4.3.7-1b).

4.3.7.3.2. Primena RSM u dobijanju matematičkih modela korišćenjem predviđanja MLP mreže u cilju boljeg razumevanja procesa

Kako bi se ispitao potencijal primene modelovanja zasnovanog na DOE u dešifrovanju “crne kutije” veštačkih neuronskih mreža (definisane značaja i veza među faktorima), predviđanja MLP1 modela (najbolji R²) za sve eksperimente u okviru CCD obrađena su primenom RSM (**model RSM3**).

Tabela 4.3.7-6. Koeficijenti polinomalnih jednačina koje povezuju parametre sušenja raspršivanjem (kodirani faktori) sa odgovorima – RSM3 model

Model	R ₁ , Prinos	R ₂ , Sadržaj vlage		R ₃ , Temperatura izlaznog vazduha		
	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	F-vrednost (p-vrednost)	
Model	89.31	50.51 (<0.0001)	4.02	61.16 (<0.0001)	76.30	60.09 (<0.0001)
A, Koncentracija rastvora	-4.05	98.68 (<0.0001)	-0.09	3.57 (0.077)	+1.77	7.19 (0.017)
B, Brzina pumpe	-3.58	77.12 (<0.0001)	+0.61	162.83 (<0.0001)	-9.51	20.89 (<0.0001)
C, Temperatura ulaznog vazduha	-1.31	10.28 (0.006)	-0.20	17.08 (0.0008)	+3.07	21.56 (0.0003)
AB interakcija	/	/	/	/	+1.88	4.73 (0.046)
BC interakcija	/	/	/	/	/	/
A ² , Kvadratni efekat	/	/	/	/	/	/
B ² , Kvadratni efekat	-1.57	15.95 (0.0012)	/	/	/	/
R ²	0.931		0.920		0.941	

R² – koeficijent korelacije

Od sva tri MLP modela, najbolja predviđanja dao je MLP1 model zato što je razvijen iz najveće grupe podataka, tako da su njegova predviđanja korišćena u modelovanju RSM3 (Slika 4.2.6-1). Dobljene matematičke jednačine su analizirane kako bi se ispitalo koje su sličnosti i razlike među jednačinama RSM1 modela, koji je drugi po kvalitetu predviđanja (Tabele 4.3.7-2 i 4.3.7-6). Primećeno je da RSM3 modeli imaju nešto veće R² nego RSM1 modeli, odnosno da je predviđanje bilo preciznije (Slika 4.3.7-3). Iako su izračunati koeficijenti bili slični za RSM1 i RSM3, glavna razlika kod RSM3 je bila ta da su sva tri procesna parametra prepoznata kao značajna, za praćene odgovore, što bi moglo objasniti zašto su njihova predviđanja najbolja.

4.3.7.3.3. Kratak rezime primenjenih pristupa u modelovanju i tip informacija koje pružaju

Svaka od primenjenih metodologija u modelovanju sušenja raspršivanjem ima prednosti i nedostatke i kada je potrebno izvršiti karakterizaciju i uspostaviti bolje razumevanje procesa najbolje je kombinovati više metoda, o čemu govore i druga straživanja (Tabela 4.3.7-7) (Miguélez-Morán, 2009).

Tabela 4.3.7-7. Kratak rezime prmenjenih pristupa u modelovanju i vrsta informacija koje pružaju

Tip modela	Prednosti primene	Nedostaci primene
RSM1 – eksperimentalni podaci	Pružaju precizne informacije o tome kako svaki faktor utiče na izlaze, što unapređuje razumevanje procesa	Ne može se dopunjavati novim podacima van DOE
MLP1 – eksperimentalni podaci	Bolja sposobnost predviđanja (R^2); Moguće dopunjavanje podataka	Crna kutija predviđanja ne omogućava unapređenje razumevanja procesa; <i>Overtraining</i> , engl.
RSM2a – eksperimentalni + MLP2a predviđeni podaci (MLP2a – 2^3 eksperimentalni podaci)	Smanjivanje broja praktično izvedenih eksperimenata; DOE pruža podatke dobrog kvaliteta	MLP mora biti dovoljno robustan u cilju dobrih predviđanja
RSM2b – eksperimentalni + MLP2b predviđeni podaci (MLP2b – nasumični eksperimentalni podaci)	Smanjivanje broja praktično izvedenih eksperimenata; Upotreba istorijskih podataka (pokušaj-greška)	MLP mora biti dovoljno robustan u cilju dobrih predviđanja; Eksperimenti koji ne pripadaju DOE mogu rezultovati slabijim predviđanjima
RSM3 – svi predviđeni podaci MLP1	Dešifrovanje crne kutije predviđanja	Ne može se dopunjavati novim podacima van DOE

4.3.7.4 Optimizacija sušenja raspršivanjem

U cilju provere mogućnosti optimizacije procesa primenom RSM1 modela kreiranih pomoću rezultata u okviru CCD, izvršeno je predviđanje optimalnih parametara a zatim su praškovi proizvedeni pod definisanim uslovima: brzina pumpe 10 %, temperatura ulaznog vazduha 180°C. Izvedene su tri uzastopne manje probe i proizvedena je još jedna veća šarža. Vrednosti dobijene za prinos, sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha bile su uporedive sa predviđenim vrednostima i prikazane su u Tabeli 4.3.7-8.

Tabela 4.3.7-8. Validacija modela RSM1 - optimizacija

Odgovori	Predviđanje	Proba 1 ¹	Proba 2 ¹	Proba 3 ¹	Proba 4 ²
Prinos (%)	88.2	85.3	86.4	87.0	83.0
Sadržaj vlage (%)	3.2	3.2	3.4	3.3	3.4
Temperatura izlaznog vazduha (°C)	90	90	90	90	89

¹ Veličina šarže 10 g rastvora

² Veličina šarže 300 g rastvora



Slika 4.3.7-5. Kolektor korišćen za manje šarže (Probe 1-3) (a) i za veću šaržu (Proba 4) (b).

Za proizvodni prinos uočena je nešto veća razlika između predviđenih i realno dobijenih vrednosti, što bi se i moglo očekivati ako se uzme u obzir da je parametar *Lack of fit* (mera neusklađenosti) za ovaj model bio nešto veći nego kod modela za druge praćene odgovore.

Kod veće šarže (Proba 4), primećeno je da je prinos nešto manji nego kod manjih proba. Ovo se može objasniti razlikama u dizajnu ciklonskog separatora koji se koristi kod malih i velikih šarži rastvora za sušenje, koji u slučaju većih šarži nije tako efikasan u odvajanju sitnijih čestica kao visoko-efikasan ciklon specijalno dizajniran i uparen sa kolektorom pogodnim za manje šarže (Slika 4.3.7-5) (Maury i autori, 2005).

Sveukupno gledano, rezultati odnosno parametri kvaliteta procesa i proizvoda su u skladu sa teoretskim predviđanjima, potvrđujući dobru sposobnost predviđanja i validnost modela korišćenih u primenjenom eksperimentalnom dizajnu.

4.3.7.5. Primenljivost dobijenih modela na različite formulacije

Koristeći optimalne uslove dobijene za odabranu formulaciju aripiprazol-HPBCD-citratni pufer, izvršeno je sušenje raspršivanjem nekoliko različitih formulacija: aripiprazol-HPBCD-PVP-citratni pufer (0.1% w/w PVP u rastvoru), aripiprazol-2-O-MBCD-citratni pufer, vorikonazol-HPBCD-voda. Poređenjem dobijenih rezultata može se reći da je u formulacijama sa HPBCD dobijeno relativno dobro slaganje sa predviđanjima modela (Tabela 4.3.7-9).

Tabela 4.3.7-9. Rezultati koji se dobijaju za različite formulacije

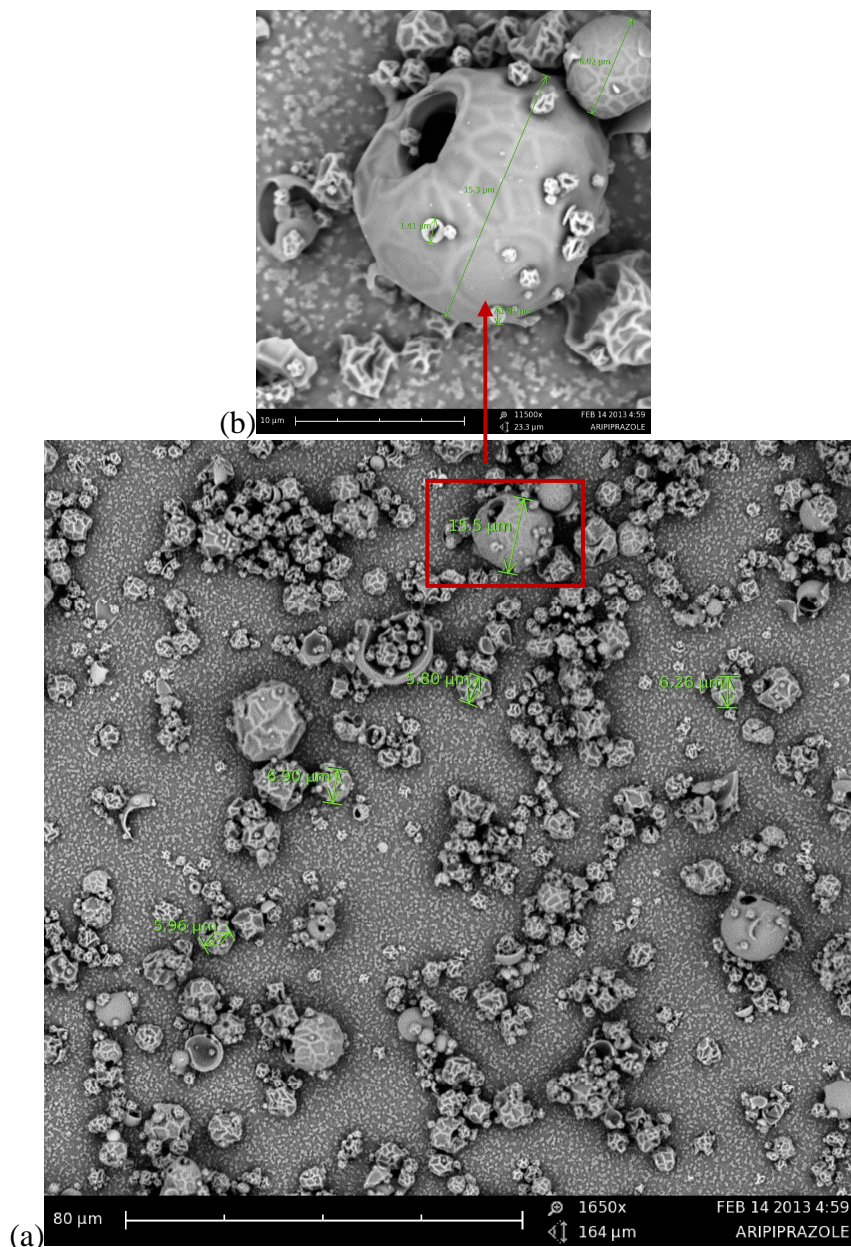
Odgovori	Predviđanje RSM1 modela	Aripiprazol-HPBCD-PVP	Aripiprazol-2-O-MBCD	Vorikonazol-HPBCD
Prinos (%)	88.2	88.1	83.9	87.0
Sadržaj vlage (%)	3.2	3.6	4.0	3.1
Temperatura izlaznog vazduha (°C)	90	91	92	89

Verovatni razlog tome je to što najveći deo formulacije čini ciklodekstrin tako da njegove osobine dominiraju, lek je inkorporiran u vidu kompleksa tako da se ponašanje sistema tokom sušenja ne razlikuje značajno za ispitivane formulacije. Primećeno je da je sadržaj vlage nešto viši u formulaciji sa PVP, što je možda i očekivano jer je PVP higroskopan i može uticati na higroskopnost formulacije. Sa 2-O-MBCD dobijen je nešto manji prinos i veći sadržaj vlage, što je u saglasnosti sa prethodnim zaključcima u vezi sa 2-O-MBCD, odnosno ovaj derivat CD se suši nešto teže nego HPBCD.

4.3.7.6. Dodatna karakterizacija dobijenih praškova nakon optimizacije

4.3.7.6.1. Vizuelizacija čestica praška

Vizuelizacija čestica je vršena pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Fotomikrografije čestica osušenih raspršivanjem su predstavljene na Slici 4.3.7-6.



Slika 4.3.7-6. Morfologija čestica osušenih raspršivanjem rastvora kompleksa aripiprazola i HPBCD pri uvećanju 1650 puta (a) i 11500 puta (b).

Fotomikrografije pokazuju da su dobijene čestice sfernog oblika, glatke do vrlo smežurane površine, a primećeno je i prisustvo šupljih čestica. Šuplja unutrašnjost može nastati zbog širenja gasa u kapima sa formirajućim filmom (ljuskom) koji teško propušta paru, ili zbog vazduha zarobljenog u tečnosti. Pošto je kinetika formiranja čestica kontrolisana brzinom isparavanja i u vezi sa porastom viskoziteta kapi, tokom sušenja su kapi/čestice izložene stresnijim uslovima koji utiču na formiranje površine i kontrolišu morfologiju dobijenih čestica. Smatra se da su čestice nastale pri većim

brzinama sušenja smežuranije usled kolapsa koji im se dešava, dok su čestice nastale pri manjim brzinama sušenja glatkije površine. Proces transformacije kap-čestica vrlo je složen i zavisi od međusobne povezanosti procesnih promenljivih i fizičko-hemijskih osobina formulacije (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

4.3.7.6.2. Nasipna i tapkana gustina praškova

Zbog male veličine čestica (veličina čestica 5-15 μm , Slika 4.3.7-6), koja je karakteristična za uzorke dobijene sušenjem raspršivanjem rastvora na laboratorijskom uređaju (koji ima malu komoru za sušenje i kapi moraju biti sitne kako bi se obezbedilo dobro sušenje i izdvajanje proizvoda), dobijeni prašak je vrlo kohezivan i voluminozan što je i očekivano. Dobijene vrednosti za nasipnu gustinu su 0.21 g/ml a za tapkanu gustinu 0.41 g/ml. Izračunavanjem odnosa tapkane i nasipne gustine dobijena je vrednost za Hausnerov odnos $1.95 > 1.60$ što svrstava dobijeni prašak u vrlo, vrlo loše protočne praškove, što je očekivano s obzirom na veličinu čestica praška ($\langle 1174 \rangle$ Powder Flow in *USP 29-NF 24*).

4.3.7.6.3. Protočnost praškova merenjem protoka kroz otvor

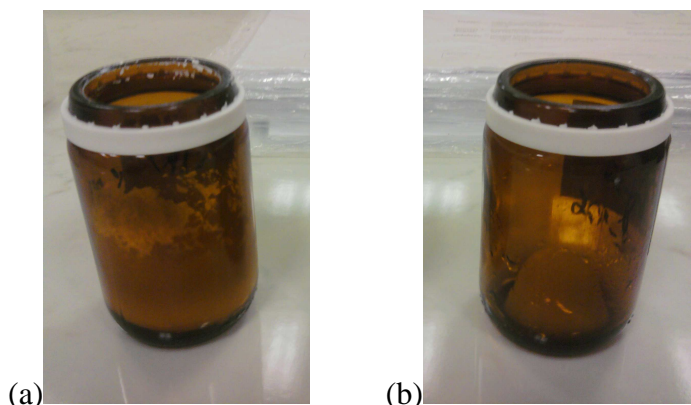
Zbog izražene voluminoznosti i kohezivnosti praška a samim tim i loše protočnosti dobijenih praškova, određivanje protočnosti merenjem protoka kroz otvor, merenje nije moglo biti izvršeno ni sa najvećim promerom otvora na levku (12.5 mm), uz korišćenje vibracije kako bi se podstakao protok praška. Treba napomenuti da se na laboratorijskom uređaju za raspršivanje prilikom sušenja rastvora uvek dobijaju vrlo sitne čestice, koje se inače karakterišu lošom protočnošću, dok se u pilot i industrijskim uređajima zbog veće komore za sušenje i mogućnosti da se ostvari dobro sušenje krupnijih kapi dobijaju krupnije sferne čestice tj. može se očekivati da bi se dobili znatno protočniji praškovi.

4.3.7.6.4. Ispitivanje stabilnosti kompleksa aripiprazol:ciklodekstrin

Dugoročna stabilnost kompleksa je bila ispitivana posle 6 i 12 meseci skladištenja u ambijentalnim uslovima primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i termogravimetrijske analize (rezultati nisu prikazani). Na termogramima nije bilo uočeno prisustvo kristalizacije aripiprazola (potpuno odsustvo endotermnih pikova koji odgovaraju topljenju aripiprazola), što sugeriše da su inkuzioni kompleksi stabilni, i da se tokom dužeg perioda skladištenja u blagim ambijentalnim uslovima ne dešava spontana kristalizacija leka.

Kako bi se ispitala stabilnost praškova u nešto stresnijim uslovima, izvršeno je kondicioniranje praškova pod uslovima dugotrajnog starenja (25°C/60% RH) i ubrzanog starenja (40°C/75% RH) u periodu od 90 dana i praćeni su sadržaj, nečistoće, profil brzine rastvaranja i sadržaj vlage (Tabela 4.3.7.10).

Primećeno je da već nakon nekoliko dana kondicioniranja pod uslovima 40°C/75% RH u otvorenim bočicama započinje promena konzistencije iz praškaste u providnu staklastu masu (Slika 4.3.7-7). U ostalim uzorcima to nije bio slučaj.



Slika 4.3.7-7. Izgled praška pre kondicioniranja (a) i nakon 2 dana kondicioniranja u otvorenim bočicama u uslovima ubrzanog starenja (40°C/75% RH) (b).

Primećen je i porast sadržaja vlage u skladu sa uslovima kondicioniranja, kao i to da postoji određena razlika u rezultatima dobijenim gravimetrijskom ili titrimetrijskom (Karl Fisher) metodom, što govori da pored slobodne vode, u uzorcima postoji i voda koja je u vezanom stanju. Dobijeni su nešto niži rezultati za sadržaj aripiprazola, jer tokom merenja praška za analizu nije uzet u obzir sadržaj vlage, a kada se to uzme u

obzir i dobijeni sadržaj se koriguje, zapaža se da tokom 90 dana nije došlo do pada sadržaja aripiprazola ni u jednom uzorku. U skladu sa tim nakon 90 dana kondicioniranja nisu pronađene degradacione ni druge nepoznate nečistoće, čak ni u uzorcima koji su promenili konzistenciju (90 dana, 40°C/75% RH) što govori o relativno dobroj hemijskoj stabilnosti aripiprazola u kompleksu sa HPBCD.

Tabela 4.3.7.10. Rezultati ispitivanja stabilnosti kompleksa aripiprazol:HPBCD posle 90 dana kondicioniranja

Uslov kondic. Test	Inicijalno	Uslovi dugotrajnog starenja (25°C/60% RH)		Uslovi ubrzanog starenja (40°C/75% RH)	
		Zatvorena bočica	Otvorena bočica	Zatvorena bočica	Otvorena bočica
Sadržaj aripiprazola	94.4%	91.6%	88.8%	91.9%	85.4%
Nečistoće					
N-oksid	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%
Dehidro	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%
Nepoznate	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%
Ukupno	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%	<0.10%
Gubitak sušenjem	3.5%	5.2%	9.0%	4.2%	/
Sadržaj vode	/	7.1%	11.3%	6.2%	14.1%
Korigovani sadržaj aripiprazola	97.9%	98.7%	100.1%	98.1%	99.5%
Profil brzine rastvaranja (masa punjenja kapsule uvećana za sadržaj vode)	Postiže se plato posle 10 minuta na oko 100%	Postiže se plato posle 10 minuta na oko 100%	Postiže se plato posle 10 minuta na oko 100%	Postiže se plato posle 10 minuta na oko 85%	Postiže se plato posle 10 minuta na oko 85%
Izgled praška	Beli prašak	Beli prašak	Beli prašak	Beli prašak	Providna staklasta masa

Međutim, što se tiče profila brzine rastvaranja, plato se postiže već nakon 10 minuta i u uslovima ubrzanog starenja zabeležen je pad od oko 15%, što bi moglo ukazivati na neki vid fizičke nestabilnosti kompleksa u stres uslovima, koja bi mogla dovesti do destabilizacije kompleksa i “izlaska” određene frakcije aripiprazola iz kompleksa i

posledično pada rastvorljivosti. U cilju boljeg razumevanja ove pojave bilo bi neophodno sprovesti dodatna ispitivanja.

Pošto se radi o uzorcima koji su amorfne prirode, očekivano je da postoji veća higroskopnost i određena tendencija ka fizičkim promenama, tako da je svakako neophodno tokom proizvodnje i skladištenja obezbediti uslove niske relativne vlage od najviše 25% RH i temperature oko 25°C, slično uslovima koji se propisuju prilikom proizvodnje efervescentnih formi koje su takođe osetljive na uticaj vlage.

5. ZAKLJUČAK

Prvi deo istraživanja odnosio se na razvoj procesa sušenja raspršivanjem kao tehnologije pogodne za obezbeđivanje homogenosti praškova i, posledično, ujednačenosti doziranja nisko doziranih lekovitih supstanci (model supstanca naratriptan hidrohlorid).

- Efekti ispitivanih procesnih parametara sušenja raspršivanjem (temperatura ulaznog vazduha, brzina pumpe, brzina aspiratora, koncentracija rastvora) na karakteristike kompozitnog praška naratriptan/laktoza/maltodekstrin (sposobnost efikasnog prikupljanja odnosno prinos, sadržaj vlage i srednju veličina čestica) evaluirani su primenom RSM i MLP neuronske mreže.
 - Primena frakcionog faktorijalnog dizajna (2^{4-1}) kao skrining metode omogućila je procenu značajnosti ispitivanih parametara, na osnovu koje je iz daljeg istraživanja isključena brzina aspiratora, što je pojednostavilo dalji razvoj procesa sušenja raspršivanjem.
 - Primena centralnog kompozitnog dizajna, metodologije površine odgovora (RSM) i veštačke neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona (MLP) omogućila je modelovanje i karakterizaciju procesa sušenja raspršivanjem. Razvijeni su značajni modeli (p -vrednost <0.05). Parametar koji je imao najveći uticaj na svaki ispitivani odgovor bila je brzina pumpe, odnosno značajno je uticala na prinos, sadržaj vlage i veličinu čestica. Interakcija između temperature ulaznog vazduha i koncentracije rastvora je bila jedina statistički značajna interakcija, i uticala je na sadržaj vlage. Parametri koncentracija rastvora i brzina pumpe imali su najveći uticaj na veličinu čestica. Sušenjem odabrane formulacije dobijeni su prinosi koji se smatraju relativno dobrim za rad na laboratorijskom uređaju za sušenje raspršivanjem (63.8-87.3%), a sadržaj vlage u dobijenim praškovima kretao se od 2.3% do 3.6%. Zaključeno je da je za postizanje što boljeg proizvodnog prinosa a što manjeg sadržaja vlage u prašku, kao osnovnih parametara kvaliteta procesa i proizvoda, potrebno da se procesni parametri izbalansiraju kako bi se obezbedilo što efikasnije sušenje i separacija

- čestica (kapi optimalne veličine, koncentracije, viskoziteta, dovoljno toplotne energije naspram količine tečnosti koja se dovodi u sistem i koja treba da ispari).
- Poređenjem dve primenjene metodologije, RSM i MLP, može se zaključiti da obe imaju svoje prednosti i nedostatke. Koristeći RSM, moguće je identifikovati efekte nezavisnih promenljivih i njihove interakcije. Lako se koristi u slučaju da postoji jedan ili dva odgovora. Međutim, kod sistema kod kojih postoji veliki broj odgovora kao što je to slučaj sa sušenjem raspršivanjem, primena MLP mreže rezultuje modelom koji može da optimizuje odgovore istovremeno sa boljom korelacijom između predviđenih i zabeleženih rezultata (dobijeni R^2 za odgovore prinos: 0.842 odnosno 0.898; sadržaj vlage: 0.550 odnosno 0.642; srednju veličinu čestica: 0.712 odnosno 0.779 i temperaturu izlaznog vazduha 0.862 odnosno 0.933, za modele RSM1 odnosno MLP1, respektivno). Eksperimentalni dizajn i veštačke neuronske mreže pokazali su se kao korisne QbD alatke u optimizaciji procesa sušenja raspršivanjem, i definisanju prostora za dizajn u kojem se postižu najbolji procesni prinosi, i optimalne karakteristike praška. Kombinovana primena ove dve metodologije može dodatno doprineti poboljšanju razumevanja i kvaliteta razvoja procesa.
 - Ispitivanjem novih načina kombinovanja RSM i MLP prepoznat je potencijal primene MLP u dopunjavanju podataka u setu definisanom eksperimentalnim dizajnom neophodnim za primenu RSM, jer može da omogući smanjenje broja praktično izvedenih eksperimenata (modeli RSM2: dobijeni R^2 za odgovore prinos 0.828; i temperaturu izlaznog vazduha 0.786). Međutim, mreža koja se koristi u ove svrhe morala bi da bude dovoljno robusna. Takođe je prepoznat i potencijal primene RSM u dobijanju matematičkih modela korišćenjem predviđanja MLP u cilju boljeg razumevanja procesa (modeli RSM3: dobijeni R^2 za odgovore prinos 0.994; sadržaj vlage 0.961; temperaturu izlaznog vazduha 0.916). Na taj način je omogućen prikaz veza između faktora i odgovora koje su mnogo složenije nego što pokazuju modeli RSM1, što bi mogao biti razlog za bolju sposobnost predviđanja modela MLP1. Zaključeno je da se kombinovanom primenom objedinjuju prednosti obe metodologije zahvaljujući čemu je poboljšano se razumevanje procesa.

- Nakon izvršene analize, pomoću softvera *Design-Expert*® 7.0.0 (Stat-Ease Inc, SAD) primenom pristupa poželjnosti (engl. *Desirability approach*) izvršena je numerička optimizacija procesnih parametara za rastvor koncentracije 25 %, sa zahtevima za postizanje što većeg prinosa i što manjeg sadržaja vlage u prašku. Korišćenjem modela RSM1 i RSM3, definisani su optimalni procesni parametri: brzina pumpe 10%, temperatura ulaznog vazduha 190°C, sa dobijenim vrednostima parametra poželjnost (koji istovremena balansira sve postavljene ciljeve) 0.860, i 0.844, za modele RSM1, i RSM3 respektivno. Izveden je eksperiment pod definisanim procesnim parametrima, i dobijeni su rezultati slični predviđenim vrednostima (dobijeni rezultati za prinos: 82.62%, 82.41%, 85.76% i gubitak sušenjem: 2.57%, 2.65%, 2.50%, za RSM1 predviđanje, RSM3 predviđanje, eksperimentalni rezultat, respektivno).
- Nakon izvršene optimizacije sušenja raspršivanjem odabrane formulacije izvršena je karakterizacija dobijenog praška.
 - Sušenjem raspršivanjem rastvora ispitivane formulacije dobijen je amorfni prašak (odsustvo karakterističnih pikova kod DSC termograma i FTIR spektara), ujednačenog sastava (RSD 0.23%), relativno dobre fizičke stabilnosti tokom skladištenja na sobnoj temperaturi, a u narednim fazama ispitivanja potrebno bi bilo ispitati i hemijsku stabilnost formulacije.
 - Na laboratorijskom uređaju za raspršivanje prilikom sušenja rastvora u skladu sa očekivanjima, dobijene su vrlo sitne čestice (2.67-7.28 μm), odnosno voluminozni prašak (0.29 g/ml), koji se karakteriše lošom protočnošću, dok se u pilot i industrijskim uređajima zbog veće komore za sušenje i mogućnosti da se ostvari dobro sušenje krupnijih kapi i dobiju krupnije sferne čestice, može očekivati da bi se dobili znatno protočniji praškovi.
 - Vizuelizacija čestica je vršena pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Primećeno je da su dobijene čestice sfernog oblika i glatke površine, što je uobičajeno za sušenje raspršivanjem rastvora lako rastvorljivih komponenti. Zapaženo je i da su neke čestice smežurane, što se pripisuje razlikama u izloženosti kapi tokom prolaska kroz komoru. Čestice nastale pri većim brzinama sušenja smežuranije su usled kolapsa koji im se dešava tokom procesa, dok su čestice nastale pri manjim brzinama sušenja sfernijeg oblika.

Drugi deo istraživanja odnosio se na razvoj procesa sušenja raspršivanjem u postupku proizvodnje praška sa teško rastvorljivim model supstancama, u cilju poboljšanja rastvorljivosti formiranjem kompleksa sa ciklodekstrinima (model supstance vorikonazol i aripiprazol).

- Sa model supstancom **vorikonazolom** sprovedene su studije rastvorljivosti sa HPBCD i 2-OMBCD u vodi, i izvršena je simulacija molekularnog vezivanja sa semiepmirijskom optimizacijom geometrije kompleksa sa HPBCD i 2-O-MBCD. Zatim je izvršena karakterizacija praškova dobijenih sušenjem raspršivanjem rastvora kompleksa lek:CD u poređenju sa smešama lek:CD.
 - Prema izvedenim studijama rastvorljivosti sa vorikonazolom, 2-O-MBCD derivat je efikasniji u kompleksaciji vorikonazola nego HPBCD, što je pokazano većim nagibom dobijene krive rastvorljivosti. To je potvrđeno studijom u vidu faktorijalnog eksperimentalnog dizajna, gde je među ispitivanim faktorima (tip CD, vreme mešanja, količina vorikonazola) za solubilizaciju najznačajniji faktor bio tip CD ($p < 0.05$), i kompleksacija se lakše i brže odigravala sa 2-O-MBCD. Na osnovu studija rastvorljivosti uklapanjem dobijenih kriva u linearne, kvadratne i kubne modele, zaključeno je da je najverovatnija stehiometrija vezivanja lek:HPBCD 1:3 jer je najveći koeficijent korelacije dobijen kod kubnog modela (A_N tip dijagrama, $R^2=0.978$ naspram $R^2=0.958$ i $R^2=0.958$ za linearnu i kvadratnu funkciju, respektivno). Što se tiče kompleksacije sa 2-O-MBCD, kriva podjednako dobro odgovara linearnoj, kvadratnoj i kubnoj funkciji ($R^2=0.9990$, $R^2=0.9992$ i $R^2=0.9994$ respektivno), stoga ne pružajući informaciju o tome da li se grade kompleksi 1:1 ili kompleksi višeg reda.
 - Simulacija molekularnog vezivanja i naknadna optimizacija geometrije kompleksa, pokazala je da je najstabilniji kompleks između vorikonazola i 2-O-MBCD formiran kada je fluoropirimidinski prsten uključen u šupljinu CD ($\Delta E = -14.6$ kcal/mol), dok je manje stabilan kompleks koji ima triazolni i difluorofenilni prsten u šupljini ($\Delta E = -9.1$ i -6.0 kcal/mol, respektivno). Sa druge strane, za HPBCD je pokazano da je najverovatniji i najstabilniji kompleks, u kome je difluorofenilni prsten u šupljini CD ($\Delta E = -88.9$ kcal/mol), ili fluopirimidinski prsten ($\Delta E = -84.8$ kcal/mol). Uočena je izražena razlika u

afinitetu vezivanja lek:CD 1:1, gde je sa HPBCD dobijeno da se formiraju kompleksi mnogo niže energije vezivanja (-14.6 kcal/mol) u odnosu na 2-O-MBCD (-88.9 kcal/mol). Ovo neslaganje između predviđenih i eksperimentalno dobijenih sposobnosti solubilizacije HPBCD sugerise da je verovatnije da između leka i CD postoji višestruko umesto 1:1 vezivanje, što je u skladu sa rezultatima studije fazne rastvorljivosti.

- Sušenjem raspršivanjem rastvora kompleksa sa dva tipa CD pri istim uslovima u slučaju kompleksa sa 2-O-MBCD dobijene su veće vrednosti za sadržaj vlage (7.39%) nego sa HPBCD (2.97%) što može ukazivati na veću higroskopnost formulacije sa 2-O-MBCD, ali ova pojava nije rezultovala izraženijom degradacijom. Sa aspekta pripremanja visoko i lako rastvorljivih inkluzionih kompleksa vorikonazola (brzina rastvaranja više od 80 % leka za 10 minuta), pokazalo se da je sušenje raspršivanjem efikasna tehnika za sa oba ispitivana derivata CD. Proizvodi osušeni raspršivanjem čuvani tokom dužeg vremena u blagim ambijentalnim uslovima su bili bez kristalne lekovite supstance (odsustvo karakterističnih pikova kod DSC termograma i FTIR spektara) i posedovali su veću rastvorljivost i brzinu rastvaranja. Međutim, u kompleksu sa oba ispitivana derivata vorikonazol nije bio dovoljno zaštićen od hemijske degradacije (Nečistoća 1: 0.24%, 0.16%; Nečistoća 2: 0.46%, 0.31% u kompleksu sa HPBCD, odnosno 2-O-MBCD, respektivno). Rezultati molekularnog modelovanja su otkrili da su delovi molekula vorikonazola koji su unutar šupljine ciklodekstrina zapravo samo njegovi prstenovi (difluorofenil, fluoropirimidin, ili triazol). Stoga, sa oba derivata ciklodekstrina čak i u slučaju formiranja višestrukih kompleksa, najosetljiviji deo molekula vorikonazola, butanolni lanac, verovatno bi ostao izvan šupljine CD i stoga nezaštićen od degradacije. Ovaj problem ukazuje na potrebu za dodatnim ispitivanjima i optimizacijom formulacije.
- Kombinovanje primenjenih metoda pomoglo je u unapređenju razumevanja prirode kompleksacije vorikonazola sa dva ispitivana derivata CD i kako ona može uticati na rastvorljivost, brzinu rastvaranja i stabilnost leka.
- Sa model supstancom **aripiprazolom** sprovedene su studije rastvorljivosti sa HPBCD u vodi, fosfatnom puferu pH 3, citratnom puferu pH 3 sa i bez PVP, i sa 2-

O-MBCD u vodi i citratnom puferu 3, i izvršena je simulacija molekularnog vezivanja sa dva izomera HPBCD. Zatim je izvršena karakterizacija praškova dobijenih sušenjem raspršivanjem rastvora kompleksa lek:CD u poređenju sa smešama lek:CD.

- Kapacitet solubilizacije aripirazola sa HPBCD zavisio je od pH i jonskog sastava rastvora pufera više nego od tipa ciklodekstrina, a maksimalna solubilizacija je postignuta u citratnom puferu pH 3.0. U ovom medijumu, kompleksacija aripirazola pomoću HPBCD je bila najefikasnija pri koncentraciji 160mM, što se odražava na najmanji maseni odnos CD/rastvoreni lek. Na osnovu studija rastvorljivosti uklapanjem dobijenih kriva u linearne, kvadratne i kubne modele, zaključeno je da je najverovatnija stehiometrija vezivanja lek:ciklodekstrin 1:3 jer je najveći koeficijent korelacije dobijen kod kubnog modela (u vodi je prepoznato postojanje A_P tipa dijagrama, $R^2=0.996$; u citratnom puferu pH 3, A_N tip dijagrama, $R^2=0.996$ i $R^2=0.987$ sa PVP, odnosno bez PVP, respektivno). Različite nepravilnosti primećene u dijagramima fazne rastvorljivosti, kao što su značajna devijacija eksperimentalno dobijene rastvorljivosti vorikonazola bez ciklodekstrina od rastvorljivosti koja se očitava na preseku sa y-osom, ili čak i negativna vrednost (A_L^- tip dijagrama), ukazuju na mogućnost formiranja multikomponentnih kompleksa i istovremeno formiranje inkluzionih i neinkluzionih kompleksa, ili fenomen samoasocijacije. Na osnovu dobijenih rezultata sa PVP, pretpostavlja se da bi prisustvom PVP u rastvoru za sušenje raspršivanjem moglo značajno da se utiče na kapacitet solubilizacije aripirazola, ali potrebno je izvesti još eksperimenata kako bi se taj efekat u potpunosti razumeo. Uporedne studije rastvorljivosti sa 2-O-MBCD pokazale su da je efikasnost kompleksiranja sa oba tipa CD slična (uklapanje dijagrama rastvorljivosti sa kubnim funkcijama: u vodi $R^2=0.996$ sa HPBCD, $R^2=0.992$ sa 2-O-MBCD; u citratnom puferu $R^2=0.968$ sa HPBCD, $R^2=0.993$ sa 2-O-MBCD).
- Simulacije molekularnog vezivanja su potvrdile sposobnost aripirazola da gradi stabilne inkluzione komplekse sa HPBCD i sugerisale su da su komplikovane interakcije posledica fleksibilnosti butanolnog dela molekula aripirazola, i postojanja različitih izomera HPBCD. Najstabilniji kompleks se formira kada

aripirazol zauzima savijenu konformaciju, iako je moguće formiranje kompleksa i kada je u linearnoj konformaciji. Postojanje vodonične veze između N-H vodonika aripirazola i susednog O-H kiseonika HPBCD sa visokom energijom -0.54 kcal/mol ukazuje na značaj interakcija u vidu vodoničnih veza u stabilizaciji kompleksa.

- Sušenje raspršivanjem rastvora ciklodekstrina pokazalo se kao efikasna tehnika za pripremanje visoko i lako rastvorljivih inkluzionih kompleksa aripirazola sa oba ispitivana derivata CD (brzina rastvaranja više od 80 % leka za 10 minuta). Proizvodi osušeni raspršivanjem čuvani tokom dužeg vremena u blagim ambijentalnim uslovima su bili bez kristalne lekovite supstance (odsustvo karakterističnih pikova kod DSC termograma i FTIR spektara) i posedovali su veću rastvorljivost i brzinu rastvaranja. Tokom kondicioniranja u stres uslovima potvrđena je dobra hemijska stabilnost aripirazola (sve nečistoće manje od 0.05%), ali je primećeno sniženje platoa u profilu brzine rastvaranja (sa oko 100 % na oko 85 %), što može biti posledica fizičke nestabilnosti kompleksa. U cilju razumevanja ove pojave potrebno bi bilo sprovesti dodatna ispitivanja.
- U cilju modelovanja i karakterizacije, kao i optimizacije procesa sušenja raspršivanjem formulacije sa ciklodekstrinom, **na odabranoj formulaciji sa aripirazolom** primenjeni su metodologija površine odgovora (RSM) i veštačke neuronske mreže (ANN). Odabrana je formulacija aripirazola sa HPBCD čiji se kompleks priprema u citratnom puferu pH 3.0, a zatim prevodi u prašak sušenjem raspršivanjem sa koncentracijom leka u prašku od 5 %. Efekti ispitivanih procesnih parametara sušenja raspršivanjem (temperatura ulaznog vazduha, brzina pumpe, koncentracija rastvora) na karakteristike kompozitnog praška lek:CD (sposobnost efikasnog prikupljanja proizvoda odnosno prinos, i sadržaj vlage) evaluirani su primenom RSM i MLP neuronske mreže.
 - Primena centralnog kompozitnog dizajna, metodologije površine odgovora (RSM) i veštačke neuronske mreže tipa višeslojnog perceptrona (MLP) omogućila je modelovanje i karakterizaciju procesa sušenja raspršivanjem. Razvijeni su značajni modeli (p -vrednost <0.05). Analiza rezultata nije pokazala postojanje statistički značajnih interakcija među faktorima za odabranu formulaciju. Samo kod proizvodnog prinosa su dobijeni polinomi drugog reda

koji opisuju postojanje kvadratnog efekta brzine pumpe. Koncentracija rastvora je imala negativan uticaj na proizvodni prinos, slično kao i u drugim istraživanjima. Pored brzine pumpe, značajan uticaj na sadržaj vlage imala je i temperatura ulaznog vazduha. Zaključeno je da je za postizanje što boljeg proizvodnog prinosa a što manjeg sadržaja vlage u prašku, kao osnovnih parametara kvaliteta procesa i proizvoda, potrebno da se procesni parametri izbalansiraju kako bi se obezbedilo što efikasnije sušenje i separacija čestica.

- Bolja predviđanja su dobijena pomoću MLP jer poseduju bolju sposobnost modelovanja nelinearnih, složenih sistema, i jer postojanje složenih interakcija nije moglo biti modelovano primenom RSM (prinos $R^2_{MLP1}=0.854$; $R^2_{RSM1}=0.846$; sadržaj vlage $R^2_{MLP1}=0.886$; $R^2_{RSM1}=0.871$; temperatura izlaznog vazduha $R^2_{MLP1}=0.893$; $R^2_{RSM1}=0.899$).
- U dopunjavanju dela podataka koji pripadaju eksperimentalnom dizajnu korišćene su dve veštačke neuronske mreže razvijene su iz manje količine podataka, sa različitim kvalitetom predviđanja (MLP2a i MLP2b modeli: R^2 je bio veći kod MLP2a modela: $R^2=0.872$, $R^2=0.918$ i $R^2=0.873$, u poređenju sa MLP2b modelom: $R^2=0.777$, $R^2=0.851$ i $R^2=0.852$ za izlaze prinos, sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha, respektivno); dale su relativno dobre rezultate imajući u vidu broj eksperimentalnih podataka korišćenih u modelovanju. Obradom dobijene grupe podataka koja se satojala delom od eksperimentalnih, a delom od predviđenih rezultata, razvijeni su modeli (RSM2a i RSM2b modeli). Model sa boljom sposobnošću predviđanja je bio RSM2a model, što je bila posledica boljih preformansi MLP2a modela koji je korišćen za dopunjavanje grupe podataka u sklopu CCD (prinos: $R^2_{RSM2a}=0.828$; $R^2_{RSM2b}=0.338$; sadržaj vlage: $R^2_{RSM2a}=0.783$; $R^2_{RSM2b}=0.656$, i temperatura izlaznog vazduha: $R^2_{RSM2a}=0.856$; $R^2_{RSM2b}=0.737$). Ova činjenica potvrđuje pretpostavku da se pomoću eksperimentalnog dizajna (DOE) mogu obezbediti podaci boljeg kvaliteta jer iz njih proizilaze modeli koji bolje opisuju sistem i vrše tačnija predviđanja, time doprinoseći boljem razumevanju procesa, u poređenju sa eksperimentima tipa pokušaj-greška koji nisu sistematično osmišljeni. Sa druge strane, ideja korišćenja veštačkih neuronskih mreža u dopunjavanju nedostajućih podataka specifičnog eksperimentalnog dizajna i

razvoj RSM modela bez praktičnog izvođenja svih, dizajnom predviđenih, eksperimenata i dalje ostaje privlačna.

- Ispitan je potencijal primene modelovanja zasnovanog na DOE u dešifrovanju “crne kutije” veštačkih neuronskih mreža (definisane značaja i veza među faktorima), tako što su predviđanja MLP1 modela za sve eksperimente u okviru CCD, obrađena primenom RSM (model RSM3). Najbolja predviđanja (najbolji R^2) u istraživanju dao je MLP1 model zato što je razvijen iz najveće grupe podataka, i zbog toga su njegova predviđanja korišćena u modelovanju RSM3 (prinos: $R^2=0.931$; sadržaj vlage: $R^2=0.920$; temperatura izlaznog vazduha: $R^2=0.941$). Poređenjem sa modelima RSM1 razvijenim pomoću eksperimentalnih vrednosti, iako su izračunati koeficijenti bili slični za RSM1 i RSM3, glavna razlika kod RSM3 je bila ta da su sva tri procesna parametra prepoznata kao značajna za praćene odgovore, što bi moglo objasniti zašto su njihova predviđanja bila najbolja.
- Zaključeno je da svaka od primenjenih metodologija u modelovanju sušenja raspršivanjem ima svoje prednosti i nedostatke, i kada je potrebno izvršiti karakterizaciju i uspostaviti bolje razumevanje procesa najbolje je kombinovati više metoda.
- Primenom pristupa poželjnosti koji uzima u obzir definisane ciljne vrednosti više odgovora istovremeno, za odabranu formulaciju definisani su optimalni procesni parametri sušenja raspršivanjem za rastvor koncentracije 25% (određena kao najpogodnija za kompleksaciju): brzina pumpe 10 %, temperatura ulaznog vazduha 180°C. Izvedene su tri uzastopne manje probe i proizvedena je još jedna veća šarža. Vrednosti dobijene za prinos, sadržaj vlage i temperaturu izlaznog vazduha bile su uporedive sa predviđenim vrednostima. Za proizvodni prinos uočena je nešto veća razlika između predviđenih i realno dobijenih vrednosti, što bi se i moglo očekivati ako se uzme u obzir da je parametar Lack of fit (mera neusklađenosti) za ovaj model bio nešto veći nego kod modela za druge praćene odgovore. Kod veće šarže (Proba 4), primećeno je da je prinos nešto manji nego kod manjih proba. Ovo se može objasniti razlikama u dizajnu ciklonskog separatora koji se koristi kod malih i velikih šarži rastvora za sušenje, koji u slučaju većih šarži nije tako efikasan u odvajanju sitnijih čestica

kao visoko-efikasan ciklon specijalno dizajniran i uparen sa kolektorom pogodnim za manje šarže. Nakon izvršene optimizacije sušenja raspršivanjem odabrane formulacije izvršena je dodatna karakterizacija dobijenog praška. Vizuelizacija čestica je vršena pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije. Fotomikrografije pokazuju da su dobijene čestice sfernog oblika, glatke do vrlo smežurane površine, a primećeno je i prisustvo šupljih čestica. Šuplja unutrašnjost može nastati zbog širenja gasa u kapima sa formirajućim filmom (ljuskom) koji teško propušta paru, ili zbog vazduha zarobljenog u tečnosti. Na laboratorijskom uređaju za raspršivanje prilikom sušenja rastvora u skladu sa očekivanjima, dobijene su vrlo sitne čestice (5-15 μ m), odnosno voluminozni prašak (0.21 g/ml). Dugoročna stabilnost kompleksa je bila ispitivana posle 6 i 12 meseci skladištenja u ambijentalnim uslovima primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije i termogravimetrijske analize. Na termogramima nije bilo uočeno prisustvo kristalizacije aripiprazola (potpuno odsustvo endotermnih pikova koji odgovaraju topljenju aripiprazola), što sugerše da su inkuzioni kompleksi stabilni, i da se tokom dužeg perioda skladištenja u blagim ambijentalnim uslovima ne dešava spontana kristalizacija leka. Ispitana je stabilnost praškova u nešto stresnijim uslovima, kondicioniranjem praškova pod uslovima dugotrajnog starenja (25°C/60% RH) i ubrzanog starenja (40°C/75% RH) u periodu od 90 dana i praćeni su sadržaj, nećistoće, profil brzine rastvaranja i sadržaj vlage. Nakon 90 dana kondicioniranja nisu pronađene degradacione ni druge nepoznate nećistoće, čak ni u uzorcima koji su promenili konzistenciju (90 dana, 40°C/75% RH) što govori o relativno dobroj hemijskoj stabilnosti aripiprazola u kompleksu sa HPBCD. Međutim, što se tiće profila brzine rastvaranja, iako se plato u brzini rastvaranj postiže već nakon 10 minuta, u uslovima ubrzanog starenja zabeležen je pad od oko 15%, što bi moglo ukazivati na neki vid fizičke nestabilnosti kompleksa u stres uslovima, koja bi mogla dovesti do destabilizacije kompleksa i “izlaska” određene frakcije aripiprazola iz kompleksa i posledično pada rastvorljivosti. U cilju boljeg objašnjenja ove pojave potrebno bi bilo sprovesti dodatna ispitivanja. Pošto se radi o uzorcima koji su amorfne prirode, očekivano je da postoji veća higroskopnost i određena tendencija ka fizičkim promenama, tako da je

neophodno tokom proizvodnje i skladištenja obezbediti uslove niske relativne vlage od najviše 25% RH i temperature oko 25°C.

- Ispitana je i primenljivost dobijenih modela na različite formulacije sa ciklodekstrinima i dobijeno je relativno dobro slaganje. Koristeći optimalne uslove dobijene za odabranu formulaciju aripiprazol-HPBCD-citratni pufer, izvršeno je sušenje raspršivanjem nekoliko različitih formulacija: aripiprazol-HPBCD-PVP-citratni pufer (0.1% PVP u rastvoru), aripiprazol-2-O-MBCD-citratni pufer, vorikonazol-HPBCD-voda. Poređenjem dobijenih rezultata može se reći da je u formulacijama sa HPBCD dobijeno relativno dobro slaganje sa predviđanjima modela. Verovatni razlog tome je to što najveći deo formulacije čini ciklodekstrin tako da njegove osobine dominiraju, lek je inkorporiran u vidu kompleksa tako da se ponašanje sistema tokom sušenja ne razlikuje značajno za ispitivane formulacije sa različitim lekovitim supstancama. Primećeno je da je sadržaj vlage nešto viši u formulaciji sa PVP, što je možda i očekivano jer je PVP higroskopian i može uticati na higroskopsnost formulacije. Sa 2-O-MBCD dobijen je nešto manji prinos i veći sadržaj vlage, što je u saglasnosti sa prethodnim zaključcima u vezi sa 2-O-MBCD, odnosno ovaj derivat CD se suši nešto teže nego HPBCD.

Sušenje raspršivanjem pokazalo se kao tehnologija pogodna za dobijanje praškova ujednačenog sastava, i u slučaju teško rastvorljivih supstanci pogodna za dobijanje lako rastvorljivih kompleksa sa ciklodekstrinima.

Primenom koncepta dizajniranja kvaliteta i prikazanih metoda za karakterizaciju formulacije i procesa, postignuto je unapređenje razumevanja procesa sušenja raspršivanjem ispitivanih formulacija sa odabranim model supstancama.

6. LITERATURA

- <1174> Powder Flow in USP 29–NF 24 (US Pharmacopeial Convention, Rockville, MD), p. 3017.
- Adamiec, J.; Modrzejewska, Z. Some structural properties of spray-dried chitosan microgranules. *Drying Technology* 2005, 23, 1601–1611.
- Adhikari, B.; Howes, T.; Bhandari, B.; Truong, V. Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: Experiments and modeling. *Journal of Food Engineering* 2004, 62(1), 53–68.
- Allen, T.T. *Introduction to engineering statistics and six sigma: statistical quality control and design of experiments and systems*. Springer Science+Business Media, NY, USA. 2006.
- Beinborn, N.A.; Lirola, H.L.; Williams, R.O. 3rd. Effect of process variables on morphology and aerodynamic properties of voriconazole formulations produced by thin film freezing. *International Journal of Pharmaceutics* 2012, 429, 46–57.
- Benito, M.; Molins, E.; Contreras, J. Process for preparing voriconazole, new polymorphic form of intermediate thereof, and uses thereof. US Patent application number: 20090023922, 2009.
- Berggren, J.; Alderborn, G. Long-term stabilisation potential of poly(vinylpyrrolidone) for amorphous lactose in spray-dried composites. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 21, 209–215.
- Billon, A.; Bataille, B.; Cassanas, G.; Jacob, M. Development of spray dried acetaminophen microparticles using experimental designs. *International Journal of Pharmaceutics* 2000, 203, 159–68.
- Bishop, C. *Neural Networks for Pattern Recognition*; University Press; Oxford, 1995.
- Borghetti, G.S.; Lula, I.S.; Sinisterra, R.D.; Bassani, V.L. Quercetin/ β -cyclodextrin solid complexes prepared in aqueous solution followed by spray-drying or by physical mixture. *AAPS Pharm Sci Tech* 2009, 10(1), 235–242.
- Braun, D.E.; Gelbrich, T.; Kahlenberg, V.; Tessadri, R.; Wieser, J.; Griesser, U.J. Conformational polymorphism in aripiprazole: preparation, stability and structure of five modifications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009, 98, 2010–26.
- Brewster, M. E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007, 59, 645–666.
- Buchanan C.M.; Buchanan, N.L.; Edgar, K.J.; Ramsey, M.G. Solubility and dissolution studies of antifungal drug:hydroxybutenyl- β -cyclodextrin complexes. *Cellulose*, 2007, 14:35–47.
- Cassidy, O.E.; Carter, P.A.; Rowley, G.; Merrifield, D.R. Triboelectrification of spray-dried lactose prepared from different feedstock concentrations. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2000, 52(1), 13–17.

- Castillo E. Process optimization. A statistical approach. Springer Science+Business Media, LLC, NY, USA. 2007.
- Celik, M.; Wendel, S. Spray drying and pharmaceutical applications. In Handbook of granulation technology. Parikh, D.M. Ed; Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2005, 152-157.
- Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. AAPS Pharm Sci Tech 2005, 6(2), E329–57, Article 43.
- Chawla, A.; Taylor, K.M.G.; Newton, J.M.; Johnson, M.C.R. Production of spray dried salbutamol sulfate for use in dry powder aerosol formulation. International Journal of Pharmaceutics 1994, 108, 233–240.
- Chegini, G.R.; Ghobadian, B. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. Drying Technology 2005, 23, 657–668.
- Chidavaenzi, O.C.; Buckton, G.; Koosha, F.; Pathak, R. The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose. International Journal of Pharmaceutics 1997, 159, 67–74.
- Cilurzo, F.; Cupone, I.E.; Minghetti, P.; Selmin, F.; Montanari, L. Fast dissolving films made of maltodextrins. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008, 70, 895–900.
- Corrigan O.I. Thermal analysis of spray dried products, Thermochemica Acta 248 1995, 245-258.
- Corrigan, D.O.; Corrigan, O.I.; Healy, A.M. Physicochemical and in vitro deposition properties of salbutamol sulphate-ipratropium bromide and salbutamol sulphate-excipient spray dried mixtures for use in dry powder inhalers. International Journal of Pharmaceutics 2006, 322, 22–30.
- Elversson, J.; Millqvist-Fureby, A.; Alderborn, G.; Elofsson, U. Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhalable lactose particles during spray drying. Journal of Pharmaceutical Sciences 2003, 92, 900–910.
- FDA guidance for industry on Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. www.fda.gov.
- FDA. Guidance for Industry, PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. 2004.
- Fini, A.; Ospitali, F.; Zoppetti, G.; Puppini, N. ATR/Raman and fractal characterization of HPBCD/progesterone complex solid particles. Pharmaceutical Research 2008, Vol. 25, No. 9. DOI: 10.1007/s11095-008-9593-4.
- Gonnissen, Y.; Goncalves, S.I.V.; De Geest, B.G.; Remon, J.P.; Vervaet, C. Process design applied to optimise a directly compressible powder produced via a continuous manufacturing process. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008, 68, 760–770.

- Gonnissen, Y.; Remon, J.P.; Vervaet, C. Development of directly compressible powders via co-spray drying. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2007, 67, 220–226.
- Goula, A.M.; Adamopoulos, K.G. Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. Drying kinetics and product recovery. *Drying Technology* 2008, 26, 714–725.
- Goula, A.M.; Adamopoulos, K.G. Spray drying of tomato pulp: Effect of feed concentration. *Drying Technology* 2004, 22, 2309–2330.
- Goula, A.M.; Adamopoulos, K.G.; Kazakis, N.A. Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Drying Technology* 2004, 22, 1129–1151.
- Gramera, R.E.; Caimi, R.J. Cyclodextrin polyethers and their production. US Patent 3,459,731, August 5, 1969.
- Harding, V.D. Pharmaceutical formulations containing voriconazole. US patent 006632803B1, 2003.
- Haykin, S. *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*; Macmillan Publishing; New York, 1994.
- Herbrecht, R. Voriconazole: therapeutic review of a new azole antifungal. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2004, 2, 485–497.
- Hong, J.; Shah, J.C.; McGonagle, M.D. Effect of cyclodextrin derivation and amorphous state of complex on accelerated degradation of ziprasidone. *Journal of pharmaceutical sciences* 2011, 100, 2703–2716.
- Huey, R.; Morris, G.M.; Forli, S. *Using AutoDock 4 and Vina with AutoDockTools: A Tutorial*. Scripps Research Institute, California, USA, 2011.
- Hussain, A. S.; Shivanand, P.; Johnson, R.D.; Application of neural computing in pharmaceutical product development: computer aided formulation design. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1994, 20, 1739-1752.
- Ibrić, S. *Primena matematičke teorije eksperimenata u farmaceutskoj tehnologiji*. Konstisi doo, Beograd, Srbija. 2006.
- Ibric, S.; Jovanovic, M.; Djuric, Z.; Parojcic, J.; Solomun, L. The application of generalized regression neural network in the modeling and optimization of aspirin extended release tablets with Eudragit RS PO as matrix substance. *Journal of Controlled Release* 2002, 82, 213-222.
- Ibric, S.; Jovanovic, M.; Djuric, Z.; Parojcic, J.; Solomun, L.; Lucic, B. Generalized regression neural networks in prediction of drug stability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2007, 59, 745-750.
- ICH Topic Q10. *Guidance for Industry: Pharmaceutical Quality System*. 2007.
- ICH Topic Q8(R2). *Guidance for Industry: Pharmaceutical Development*. 2009.
- ICH Topic Q9. *Guidance for Industry: Quality Risk Management*. 2005.
- Ilić, V. *Neuronske mreže*, http://solair.eunet.rs/~ilicv/neuro.html#Aktivacione_funkcije, datum izrade novembar 1999, pristupljeno 21. oktobra 2012.

- Islam, M.I.U.; Langrish, T.A.G. An investigation into lactose crystallization under high temperature conditions during spray drying. *Food Research International* 2010, 43, 46–56.
- Ivic, B.; Ibric, S.; Cvetkovic, N.; Petrovic, A.; Trajkovic, S.; Djuric, Z. Application of design of experiments and multilayer perceptrons neural network in the optimization of diclofenac sodium extended release tablets with Carbopol® 71G. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)* 2010, 58 (7), 947-949.
- Kasabov, N.K. *Foundations of neural networks, fuzzy systems and knowledge engineering*. A Bradford Book, The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London, England, 1996.
- Kirk, J.H.; Dann S.E.; Blatchford, C.G. Lactose: A definitive guide to polymorph determination. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 334, 103–114.
- Klamt, A.; Schumann, G. COSMO: A new approach to dielectric screening in solvents with explicit expressions for the screening energy and its gradient. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1993, 2, 799–805.
- Kleptose® Crysmeb Exp methyl beta-cyclodextrin from Roquette, e-brochure. Pristupljeno oktobra 2012. <http://www.roquette-pharma.com/brochures/03/visio.html>.
- Korth, M., Pitonak, M., Rezac, J., Hobza, P. A transferable H-bonding correction for semiempirical quantum-chemical methods. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2010, 6, 344–352.
- Krose, B., Van der Smagt, P. *An introduction to neural networks*. University of Amsterdam, 1996. Pristupljeno oktobra 2012. <http://math.uni.lodz.pl/~fulmanp/zajecia/ssn/materialy/neuro-intro.pdf>.
- Lazić, Ž.R. *Design of experiments in chemical engineering. A practical guide*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2004.
- Leane, M.; Cumming, I.; Corrigan O.I. The use of artificial neural networks for the selection of the most appropriate formulation and processing variables in order to predict the in vitro dissolution of sustained release minitables. *AAPS PharmSciTech* 2003, 4 (2), article 26.
- Li, P.; Tabibi, S.E.; Yalkowski, S.H. Combined effect of complexation and pH on solubilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1998, 87(12),1535–1537.
- Lin, H.-L., Lin, S.-Y., Lin, C.-C., Hsu, C.-H., Wu, T.-K., Huang, Y.-T. Mechanical grinding effect on thermodynamics and inclusion efficiency of loratadine-cyclodextrin inclusion complex formation. *Carbohydrate Polymers* 2012, 87, 512– 517.
- Listiohadi, Y.; Hourigan, J.A.; Sleight, R.W.; Steele, R.J. Thermal analysis of amorphous lactose and α -lactose monohydrate. *Dairy Science Technology* 2009, 89, 43–67.

- Loftsson, T.; Hreinsdottir, D.; Masson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2005, 302, 18–28.
- Loftsson, T.; Magnúsdóttir, A.; Másson, M.; Sigurjónsdóttir, J.F. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 91, 2307-2316.
- Loftsson, T.; Másson, M.; Brewster, M.E. Self-Association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004,93, 1091-1099.
- Loftsson, T.; Hreinsdottir, D.; Masson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2005, 302, 18–28.
- Loftsson, T.; Masson, M.; Sigurjonsdottir, J.F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. *Stp Pharma Sciences* 1999, 9 (3), 237–242.
- Masters, K. Current market-driven spray drying development activities. *Drying Technology* 2004, 22(6), 1351-1370.
- MathWorks e-Documentation Center, http://www.mathworks.com/help/stats/response-surface-designs.html#bq_oe60, pristupljeno 21. oktobra 2012.
- Maury, M.; Murphy, K.; Kumar, S.; Shi, L.; Lee, G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005, 59(3), 565-73.
- Messner, M.; Kurkov, S.V.; Jansook, P.; Loftsson, T. Self-assembled cyclodextrin aggregates and nanoparticles, review article. *International Journal of Pharmaceutics* 2010, 387(1–2), 199–208.
- Miguélez-Morán, A-M.. Roller compaction of pharmaceutical ingredients: on the undrestanding of the compaction and the use of knowledge based applications in the formulation of tablets, PhD Dissertation, URL: <http://www.ub.uniheidelberg.de/archiv/10111> (2009).
- Miro, A.; Ungaro, F.; Balzano, F.; Masi, S.; Musto, P.; Manna, P.L.; Uccello-Barretta, G.; Quaglia, F. Triamcinolone solubilization by (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin: A spectroscopic and computational approach. *Carbohydrate Polymers* 2012, 90, 1288–1298.
- Momany, F.A.; Rone, R. Validation of the general purpose QUANTA @3.2/CHARMm® force field. *Journal of Computational Chemistry* 1992, 13, 888–900.
- Morris, G.M.; Goodsell, D.S.; Halliday, R.S.; Huey, R.; Hart, W.E.; Belew, R.K.; Olson, A.J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 1998, 19, 1639–1662.

- Mosen, K.; Backstrom, K.; Thalberg, K.; Shaefer, T.; Axelsson, A.; Kristensen, H.G. The apparent plasticizing effect of polyethylene glycol (PEG) on the crystallinity of spray dried lactose-PEG composites. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006, 64, 206–211
- Mosher, G.; Thompson, D.O. Complexation: cyclodextrins, in *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, third edition, edited by James Swarbrick. Informa Healthcare USA, New York, USA. 2007; 671-696.
- Mura, P.; Faucci, M.T.; Bettinetti, G.P. The influence of polyvinylpyrrolidone on naproxen complexation with hydroxypropyl β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, 13, 187–94.
- Murtoma, M.; Savolainen, M.; Christiansen, L.; Rantanen, J.; Laine, E.; Yliruusi, J. Static electrification of powders during spray drying. *Journal of Electrostatics* 2004, 62, 63–72.
- Nacsa, A., Berkesi, O., Szabo-Revesz, P., Aigner, Z. Achievement of pH-independence of poorly-soluble, ionizable loratadine by inclusion complex formation with dimethyl- β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2009, 64, 249–254.
- Nekkanti, V.; Muniyappan, T.; Karatgi, P.; Hari1, M.S.; Marella, S.; Pillai, R. Spray-drying process optimization for manufacture of drug–cyclodextrin complex powder using design of experiments. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2009, 35(10), 1219–1229.
- NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>, pristupljeno oktobra 2012.
- Owens, P.K.; Fell, A.F.; Coleman, M.W.; Berridge, J.C. Complexation of voriconazole stereoisomers with neutral and anionic derivatised cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2000, 38, 133–151.
- Parojčić, J.; Ibrić, S.; Djurić, Z.; Jovanović, M.; Corrigan, O. I. 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* 2007, 30, 264-272.
- Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA: A versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *Journal of Molecular Graphics* 2002, 21, 47–49.
- Peeters, J.; Neeskens, P.; Tollenaere, J.P.; Van Remoortere, P.; Brewster, M.E. Characterization of the interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin with itraconazole at pH 2, 4 and 7. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 91, 1414–1422.
- Phillips, J.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R.D.; Kale, L.; Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry* 2005, 26, 1781-1802.

- Piel, G.; Piette, M.; Barillaro, V.; Castagne, D.; Evrard, B.; Delattre, L. Betamethasone-in-cyclodextrin-in-liposome: The effect of cyclodextrins on encapsulation efficiency and release kinetics. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 312, 75–82.
- Plumb, A.P.; Rowe, R.C.; York, P.; Doherty, C.; The effect of experimental design on the modelling of a tablet coating formulation using artificial neural networks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 16, 281-288.
- Prinn, K.B.; Costantino, H.R.; Tracy, M. Statistical modeling of protein spray drying at the lab scale. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2002, 3, E4.
- Process improvement. <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/pri.htm>. Pristupljeno oktobra 2012.
- Product information: Abilify tablets. <http://www.medicines.org.au/files/bqpabili.pdf>. Pristupljeno decembra 2012.
- Product information: Naramig tablets. www.gsk.au. Pristupljeno septembra 2012.
- Product Quality Research Institute Publications. Manufacturing Technology Committee – Risk Management Work Group, Case Study RMWG-07 Defining Process Space. December 2008. <http://www.pqri.org/publications/index.asp> Pristupljeno decembra 2012.
- Quan, P.; Liu, D.F.; Li, R.; Zhang, Q.; Qian, Y.; Xu, Q.W. The effects of water-soluble polymers on hydroxypropyl- β -cyclodextrin solubilization of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2009, 63, 181–188.
- Raghavan, S.L.; Trividic, A.; Davis, A.F.; Hadgraft, J. Crystallization of hydrocortisone acetate: influence of polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 212, 213–221.
- Rattes, A.L.R.; Oliveira, W.P. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. *Powder Technology* 2007, 171, 7–14.
- Rausand, M. Preliminary Hazard Analysis. Norwegian University of Science and Technology. 2005. <http://www.ntnu.no/ross/srt/slides/pha.pdf>
- Ravikumar, K., Sridhar, B., Prasad, D.K., Rao, A.K.S.B. Voriconazole, an antifungal drug. *Acta Crystallographica* 2007, E63, 565–567.
- Redenti, E.; Szente, L.; Szejtli, J. Mini-review drug/cyclodextrin/ hydroxy acid multicomponent systems, properties and pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000, 89(1), 1–8.
- Ribeiro, A., Figueiras, A., Santos, D., Veiga, F. Preparation and solid-state characterization of inclusion complexes formed between miconazole and methyl- β -cyclodextrin. 2008. *AAPS Pharm Sci Tech* 2008, 9(4), 1102–1109.
- Sakura Tablet Case Study. National Institute of Health Sciences (NIHS), Japan. 2008, <http://www.nihs.go.jp/drug/PhForum/FileCEnglish.pdf>

- Snyder, H.E.; Lechuga-Ballesteros, D. Spray drying: Theory and pharmaceutical applications. In *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Vol. 1: Unit Operations and Mechanical Properties*; Augsburger, L.L.; Hoag, S.W., Eds.; Informa Healthcare USA: New York, 2008, 227–256.
- Spriet, I.; Annaert, P.; Meersseman, P.; Hermans, G.; Meersseman, W.; Verbesselt, R.; Willems, L. Pharmacokinetics of caspofungin and voriconazole in critically ill patients during extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009, 63(4), 767-770.
- Stewart, J. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 1990, 4, 1–105.
- Stigliani, J.-L.; Bernardes-Genisson, V.; Bernadou, J.; Pratviel, G. Cross-docking study of InhA inhibitors: a combination of Autodock Vina and PM6-DH2 simulations to retrieve bio-active conformations. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2012, 10, 6341–6349.
- Szejtli, J. Molecular encapsulation by cyclodextrins. http://www.touchbriefings.com/pdf/750/outs_041_cyclolab_tech.pdf. Pristupljeno decembra 2012.
- Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry* 2004, 76 (10), 1825–1845.
- Tagne, P.T.M.; Briancon, S.; Fessi, H. Spray-dried microparticles containing polymeric nanocapsules: Formulation aspects, liquid phase interactions and particle characteristics. *International Journal of Pharmaceutics* 2006, 325,63–74.
- Tajber, L.; Corrigan, O.I.; Healy, A.M. Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their composites - II. Statistical factorial design and in vitro deposition properties. *International Journal of Pharmaceutics* 2009, 367, 86-96.
- Takeuchi, H.; Yasuji, T.; Hino, T.; Yamamoto, H.; Kawashima, Y. Spray-dried composite particles of lactose and sodium alginate for direct tableting and controlled releasing. *International Journal of Pharmaceutics* 1998, 174, 91–100.
- Trott, O., Olson, A.J. Software news and update AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry* 2010, 31, 455–461.
- Turkoglu, M.; Aydin, I.; Murray, M.; Sakr, A. Modeling of a roller-compaction process using neural networks and genetic algorithms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 1999, 48, 239-245.
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM),
- User Manual, *Statistica Neural Networks*; StatSoft, Inc.: Tulsa, OK.

- Vaithiyalingam, S.; Khan, M.A. Optimization and characterization of controlled release multi-particulate beads formulated with a customized cellulose acetate butyrate dispersion. *International Journal of Pharmaceutics* 2002, 234, 179–193.
- Vyas, A.; Saraf, S.; Saraf, S. Cyclodextrin based novel drug delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* 2008, 62, 23–42.
- Woodcock, J. The concept of pharmaceutical quality. *American Pharmaceutical Review* 2004, Nov/Dec:1-3.
- www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/21-436_Abilify_biopharmr_P2.pdf. Pristupljeno decembra 2012.
- www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2003/021630s000_Vfend_ClinPharm.pdf. Pristupljeno decembra 2012.
- www.roquette.com
- www.roquette-pharma.com/brochures/03/visio.html
- www.sprayconsultants.com
- Xiang-Gen, W.; Li-Na, Y.; Meng, X.; Hao-Ran, J. Anti-infectious activity of intravitreal injectable voriconazole microspheres on experimental rabbit fungal endophthalmitis caused by *aspergillus fumigatus*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 100(5), 1745–1759.
- Yang, W.; Chow, K.T.; Lang, B.; Wiederhold, N.P.; Johnston, K.P.; Williams, R.O. 3rd. In vitro characterization and pharmacokinetics in mice following pulmonary delivery of itraconazole as cyclodextrin solubilized solution. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010, 39, 336–347.

7. BIOGRAFIJA AUTORA

Tijana Miletić (rođena Mihajlović, 27.02.1982. godine u Vršcu) osnovnu i srednju školu završila je u Vršcu. Farmaceutski fakultet u Beogradu upisala je školske 2000/2001. godine. Diplomirala je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,39 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. U periodu 2003/2006 bila je korisnik stipendije Hemofarm Fondacije i Hemofarm koncerna koja se dodeljuje uspešnim i perspektivnim studentima. Doktorske akademske studije iz farmaceutske tehnologije na Farmaceutskom fakultetu upisala je školske 2007/2008. godine.

Od oktobra 2006. godine radi kao stručni saradnik u Pogonu čvrstih formi, zatim kao stručni saradnik u Službi istraživanja i razvoja u Hemofarmu, a od aprila 2011. godine kao samostalni nosilac projekta u Odeljenju farmaceutskog razvoja u Sektoru istraživanja i razvoja u Hemofarmu.

Tijana Miletić (born Mihajlović, on February 27th 1982 in Vršac) finished elementary and high school in Vršac. She enrolled in the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade in 2000/2001. She graduated in 2006 with average grade 9,39 and her diploma thesis was graded with 10. In 2003/2006 Tijana received a scholarship from Hemofarm foundation and Hemofarm concern which is awarded to successful and perspective students.

She started her PhD studies in the field of pharmaceutical technology at the Faculty of Pharmacy in Belgrade, in 2007/2008.

From October 2006 she was working as associate in Solid dosage forms plant, then as associate in Research and development service, and from April 2011 she has been at the position of expert associate in Pharmaceutical development department in Research and development service in Hemofarm.

Izjava o autorstvu

Potpisana Tijana Miletić

broj upisa 19/07

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Karakterizacija i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika primenom koncepta dizajniranja kvaliteta

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 05.04.2013.



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tijana Miletić

Broj upisa 19/07

Studijski program doktorske akademske studije iz farmaceutске tehnologije

Naslov rada Karakterizacija i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika primenom koncepta dizajniranja kvaliteta

Mentor Dr sci Svetlana Ibrić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 05.04.2013.



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Karakterizacija i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika primenom koncepta dizajniranja kvaliteta

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 05.04.2013.

