


UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU

OPTIMIZACIJA FORMULACIJE I STABILNOST
TABLETA KARVEDILOLA

- Doktorska disertacija -

Mr Predrag Sibinović

Niš, 2011.

	ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ НИШ
	КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	Докторска дисертација
Аутор, АУ:	Предраг С. Сибиновић
Ментор, МН:	Радосав Палић
Наслов рада, НР:	Оптимизација формулације и стабилност таблета карведилола
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	српски и енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2011.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО:	8 поглавља, 107 страна, 70 цитата, 24 слика, 25 табела
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	Карведилол, експериментални дизајн, оптимизација, профил растварања, течна хроматографија високе ефикасности, валидација, стабилност, кинетика, primarno pakovanje
УДК	615.011 : 615.014.2 + 615.453.6 : 615.22
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	

Извод, **ИЗ:**

Применом експерименталног дизајна оптимизована је формулација Карведилол таблета произвођача АД "Здравље" Лесковац. Изабрана су три фактора: концентрација везивног средства, концентрација средства за распадање и чврстина таблета. Коришћен је дизајн са 2 нивоа. Као најзначајнији одговор одређиван је проценат раствореног карведилола након 10 минута при одређивању профила растварања таблета карведилола. Највећи утицај на профил растварања има чврстина таблета. Оптимизована формулација показује задовољавајући фактор сличности у поређењу са таблетама оригинатора у погледу профила ослобађања карведилола.

Валидирана је модификована stability indicating метода за одређивање садржаја Карведилола. Метода је селективна, тачна, осетљива и репродуктивна.

Оптимизована формулација је стабилна 6 месеци под условима убрзаног старења $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}\pm 5\%$. Стабилност таблета карведилола испитана је и након излагања UV/VIS зрачењу у различитим примарним паковањима и оригиналном паковању. Хроматографска анализа је показала да се као производи фотодеградације јављају нечистоће А, Б и Ц и да пластичан непровидни контејнер обезбеђује најбољу заштиту од фотодеградације. Применом модела кинетике фотодеградације нађено је да се фотодеградација препарата Карвилекса, упакован у различитој примарној амбалажи и оригиналном паковању покораву моделу кинетике нултог реда. Кинетика растварања карведилола одговара Корсмајеровој једначини и испитивањима је показано да фотодеградација нема битног утицаја на кинетику растварања.

Датум прихватања теме, **ДП:**

Датум одбране, **ДО:**

Чланови комисије, **КО:**

Председ
ник:

Члан:

Члан,
ментор:

}
{



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Прилог 4/2



Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Predrag S. Sibinović
Mentor, MN :	Radosav Palić
Title, TI :	Formulation optimization and stability of carvedilol tablets
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	Serbian and English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2011
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD :	8 chapters, 107 pages, 70 references, 24 figures, 25 tables
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	Carvedilol, experimental design, optimization, dissolution profile, high performance liquid chromatography, validation, stability, kinetics, primary packaging
UC	615.011 : 615.014.2 + 615.453.6 : 615.22
Holding data, HD :	library
Note, N :	

Abstract, AB :	<p>The formulation of carvedilol tablets, product by AD "Zdravlje" Leskovac, was optimized by means of the experimental design. Three independent variables were chosen: binder concentration–PVP K30, desintegration concentration – crospovidone and tablets hardness. Experimental design with 2 levels was applied. Percent of carvedilol dissolved after 10 minutes was used as the most important dependent variable during the dissolution profile determination of the carvedilol tablets. The tablets hardness had the most significant influence on dissolution profile of carvedilol. Optimized formulation showed satisfied similarity factor for the drug release compared with originator tablets.</p> <p>A modified <i>stability indicating</i> high performance liquid chromatographic method for the assay determination of carvedilol was validated. The method is selective, accurate, sensitive and reproducible.</p> <p>Optimized formulation was stable for 6 months under accelerated stability conditions $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}\pm 5\%$. Stability of the carvedilol tablets was investigated under exposing to UV/VIS radiation in different primary packaging and original packaging. Impurities A, B and C were detected in the exposed samples by RP-HPLC analysis. The most appropriate primary packaging for Karvileks is the opaque plastic container. By using of different kinetics model it was found that photodegradation of carvedilol in Karvileks tablets corresponds to zero order model for different primary packaging and original packaging as well. By data analysis it was shown that <i>Korsmeyer-Peppas</i> model describes in the best way kinetics of the carvedilol dissolution and it was also shown that the photodegradation didn't have significant influence on dissolution kinetics.</p>						
Accepted by the Scientific Board on, ASB :							
Defended on, DE :							
Defended Board, DB :	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="440 1024 581 1077">President:</td> <td data-bbox="581 1024 1550 1077"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 1077 581 1136">Member:</td> <td data-bbox="581 1077 1550 1136"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="440 1136 581 1201">Member, Mentor:</td> <td data-bbox="581 1136 1550 1201"></td> </tr> </table>	President:		Member:		Member, Mentor:	
President:							
Member:							
Member, Mentor:							

Ova doktorska disertacija rađena je na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu i Sektoru kvaliteta farmaceutske industrije ZDRAVLJE-Actavis u Leskovcu.

Izradom rada rukovodio je dr Radoslav Palić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu, koji me je svesrdno i nesebično savetovao u svim fazama izrade rada. Zato mu ovim putem izražavam iskrenu i najtopliju zahvalnost.

Naročitu zahvalnost izražavam dr Valentini Marinković, docentu Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na velikom interesovanju i savetima koje mi je pružila tokom izrade ovog rada.

Posebno se zahvaljujem dr Gordani Stojanović, redovnom profesoru Prirodno matematičkog fakulteta u Nišu i dr Mihajlu Stankoviću, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Leskovcu na pruženoj podršci, korisnim savetima i sugestijama pri izradi ovog rada.

Svoju zahvalnost dugujem i kolegama iz Sektora kontrole kvaliteta farmaceutske industrije ZDRAVLJE-Actavis, pre svega na pomoći u tehničkom izvođenju eksperimentalnog dela rada.

Problematika obrađivana u ovoj tezi deo je istraživanja projekta br.172047 koji finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

Svojoj porodici izražavam neizmernu zahvalnost na bezgraničnom strpljenju, razumevanju i podršci.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. KRVNI PRITISAK	5
2.1.1. Krvni pritisak.....	5
2.1.2. Beta blokatori-antihipertenzivni lekovi.....	5
2.1.3. Karvileks	6
2.2. TABLETE	9
2.2.1. Uloga tableta u terapiji	9
2.2.2. Formulacija tableta.....	11
2.3. STABILNOST	12
2.3.1. Stabilnost farmaceutskih preparata	12
2.3.2. Studije stabilnosti	14
2.3.3. Kinetika reakcije foto degradacije.....	16
2.4. AMBALAŽA (PAKOVNI MATERIJAL)	18
2.5. FARMACEUTSKO – TEHNOLOŠKI POSTUPCI ISPITIVANJA	21
2.5.1. Značaj testa rastvorljivosti	23
2.5.2. Ispitivanje brzine rastvaranja (<i>dissolution test</i>).....	26
2.5.3. Kinetika brzine rastvaranja.....	28
2.6. EKSPERIMENTALNI DIZAJN.....	30
2.6.1. Primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji formulacija	30
2.7. METODE ISPITIVANJA	32
2.7.1. Validacija metode.....	32
2.8. METODE ODREĐIVANJA KARVEDILOLA	37
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	39
3.1. STANDARDNE SUPSTANCE, UZORCI I REAGENSI.....	40
4. REZULTATI I DISKUSIJA	48
4.1. OPTIMIZACIJA FORMULACIJE KARVILEKS TABLETA	49
4.2. STUDIJE STABILNOSTI	63
4.2.1. Studije stabilnosti Kavileks tableta pod uslovima ubrzanog starenja	63
4.2.2. Studije fotostabilnosti (Ispitivanje fotostabilnosti Karvileks tableta i uticaja pakovanja)	64
4.2.3. Uticaj tipa pakovanja na kinetiku brzine rastvaranja karvedilola iz Karvileksa	76
4.2.5. Primena ED u studijama fotostabilnosti Karvileksa	81
5. IZVOD.....	89

6. ABSTRACT	94
7. LITERATURA	99
8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....	105

Spisak oznaka

HPLC	Visoko efikasna tečna hromatografija
UV	Ultraljubičast
VIS	Vidljiv
RH	Relativna vlažnost vazduha
Eu Ph	Evropska farmakopeja
Ph Jug	Jugoslovenska farmakopeja
BP	Britanska farmakopeja
USP	Američka farmakopeja
JP	Japanska farmakopeja
GMP	Dobra proizvođačka praksa
PVP	Polivinil pirolidon
PVC	Polivinil hlorid
Al	Aluminijum
SD	Standardna devijacija
RSD	Relativna standardna devijacija
LD	Limit detekcije
LQ	Limit kvantifikacije
ED	Eksperimentalni dizajn
ICH	Internacionalna Konferencija o Harmonizaciji
EMA	Evropska agencija za ocenu medicinskih proizvoda
Tbl	Tablete
BCS	Biofarmaceutski sistem klasifikacije
IVIVK	In vitro - in vivo korelacija
n/a	Nije primenljiv

1. UVOD

Osobine lekovitih preparata određene su odnosom i vrstom aktivne i pomoćnih komponenti, kao i uslovima proizvodnje. Primenom eksperimentalnog dizajna kao metode optimizacije moguće je, za kratko vreme, sa malim brojem izrađenih formulacija doći do ciljne formulacije.

Količina i odnos vezivnog sredstva i sredstva za raspadanje kao pomoćnih komponenti, kao i čvrstina tableta su jedni od ključnih parametara formulacije u fazi proizvodnje u cilju dobijanja zahtevane kinetike rastvaranja aktivne supstance. Rastvaranje aktivne supstance u tabletama mora da zadovolji određeni profil brzine rastvaranja u odnosu na referentni preparat na tržištu.

U toku optimizacije formulacije preparata neophodno je, pored razmatranja vezanih za samu aktivnu komponentu (njene fizičko-hemijske i farmaceutsko-tehnološke karakteristike u toku i neposredno nakon proizvodnje) obezbediti i stabilnost preparata. Izbor primarnog pakovnog materijala direktno utiče na stabilnost tableta koja se najčešće ogleda kroz sadržaj aktivne supstance, degradacione proizvode, raspadljivost tableta i procenat oslobođenog sadržaja aktivne supstance kao kritičnih parametara specifikacije. Analitičke metode za praćenje stabilnosti moraju biti validne i dovoljno osetljive da bi se kvalitativno i kvantitativno odredili degradacioni proizvodi. Stabilnost preparata obezbeđuje se time da su svi navedeni fizičko-hemijski parametri u toku predviđenog roka trajanja u granicama specifikacije. Najuočljiviji rezultat degradacije aktivne supstance je gubitak farmakološke aktivnosti, odnosno stvaranje niza neželjenih reakcija u humanom organizmu.

Za cilj ove doktorske disertacije predviđena je optimizacija formulacije u pogledu profila brzine rastvaranja karvedilola primenom eksperimentalnog dizajna, monitoring stabilnosti tableta u pogledu sadržaja aktivne supstance, identifikacije i određivanja degradacionih proizvoda i kinetika procesa rastvaranja karvedilola. Za ispitivanje odabrane su Karvileks tablete 12.5 mg proizvođača AD Zdravlje-Aktavis, Leskovac.

Za ostvarivanje predviđenog cilja korišćene su sledeće metode:

- Razvijena i validirana *stability-indicated* HPLC metoda za određivanje sadržaja aktivne supstance, identifikaciju i prisustvo degradacionih proizvoda,
- Dissolution UV/VIS spektrofotometrijska metoda za određivanje profila brzine rastvaranja aktivne supstance,
- Eksperimentalni dizajn (2^3 puni faktorijski dizajn) upotrebljen je za optimizaciju formulacije. Pri tom praćen je uticaj 3 nezavisno promenljivih faktora (koncentracija

vezivnog sredstva, koncentracija sredstva za raspadanje i čvrstina tableta) na proces rastvaranja karvedilola iz proizvoda Karvileks (Zdravlje-Aktavis, Leskovac). Za eksperimentalni dizajn i statističku obradu podataka korišćen je Design-Expert softwer (verzija 7.1.6, Stat-Ease Inc.)

- Stabilnost tableta ispitana je na uslovima ubrzanog starenja $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ RH} \pm 5\%$ i nakon izlaganja dnevnoj svetlosti i UV/VIS zračenju.

- Kinetika procesa rastvaranja analizirana je upotrebom testa rastvaranja uz upotrebu matematičkih modela: model nultog reda, model prvog reda itd.

2. OPŠTI DEO

2.1. KRVNI PRITISAK

2.1.1. Krvni pritisak

Krvni pritisak je pritisak kojim krv deluje na zidove krvnih sudova u svakom delu tela. Krv teče kroz krvne sudove upravo zato što se nalazi pod pritiskom [1]. Pritisak se stvara radom srca, kao pumpe. Pri svakom izbacivanju krvi iz srca (sistola) pritisak se povećava, a kod ulivanja krvi u srce (dijastola) pritisak se snižava. Stoga se mere dve vrednosti krvnog pritiska: gornji (sistolni) i donji (dijastolni). Krvni pritisak je promenljiv, menja se tokom dana i noći i podložan je mnogim unutrašnjim i spoljašnjim uticajima. Normalna vrednost krvnog pritiska je 120/80 mm Hg.

Dijagnoza povišenog krvnog pritiska (hipertenzije), odraz je pojačanog rada srca, ukoliko se kod određene osobe izmeri više od tri puta pritisak veći od 140/90 mm Hg. Povećani krvni pritisak u skoro svim slučajevima je poremećaj ravnoteže brojnih mehanizama (od emocionalnih reakcija, fizičkog napora do autonomnog živčanog sastava i endokrinih žlezda koje izlučuju hormone noradrenelin, adrenalin i angiotenzin).

2.1.2. Beta blokatori-antihipertenzivni lekovi

Beta blokatori ili beta adrenergički blokatori se koriste za lečenje različitih kardiovaskularnih bolesti [2]. Blokiraju učinak adrenalina i noradrenalina na beta adrenergičke receptore u telu (prvenstveno u srcu, perifernim krvnim sudovima, bronhijama, gušterači i jetri). Koriste se kod velikog broja bolesti-aritmije, angine pektoris, hipertenzije, u prevenciji infakta srca. Osim toga koriste se za lečenje glaukoma, napetosti, alkoholizma, za prevenciju migrene i zbog toga se smatraju jednom od najznačajnijih grupa lekova.

Postoje tri tipa beta adrenergičkih receptora: beta-1 receptori koji se nalaze uglavnom u srcu, beta-2 receptori koji su smešteni po celom telu, ali uglavnom u plućima, mišićima i arterijama i beta-3 receptori, koji su manje istraženi, ali se zna da učestvuju u metabolizmu masti.

Aktivacija beta-1 receptora adrenalinom pojačava brzinu rada srca i krvni pritisak pa srce troši više kiseonika. Lekovi koji blokiraju ove receptore, stoga, imaju suprotno dejstvo-oni usporavaju brzinu rada srca i snižavaju krvni pritisak.

Beta-2 receptori se nalaze u krvnim žilama prugastih mišića. Aktivacijom tih receptora dolazi do širenja krvnih žila u skeletnim mišićima, širenja bronhija, opuštanja probavnih organa, razgradnje glikogena u jetri i otpuštanja glukoze u krv iz jetre. S druge strane blokiranjem ovih receptora dolazi do suprotnih učinaka u spomenutim organima.

Beta blokatore razlikujemo po tome blokiraju li beta-1 ili beta-2 receptore. Ukoliko blokiraju i jedne i druge tada ih nazivamo neselektivni beta blokatorima. Selektivni beta blokatori blokiraju samo beta-1 receptore, time se deluje samo na srce, ali ukoliko se uzimaju u većim dozama blokiraju i druge beta receptore.

Posebna grupa beta blokatora su blokatori koji su u isto vreme i alfa blokatori. To su labetalol i karvedilol. Oni su vrlo prikladni za brzo postizanje kontrole krvnog pritiska jer dodatna blokada alfa receptora sprečava karakteristični početni porast krvnog pritiska koji nastupa ukoliko se blokiraju samo beta 1-blokatori.

U praktičnoj primeni danas, komercijalno je prisutan veći broj preparata [3], a registrovani lekovi na tržištu iz ove grupe su:

- KARVILEKS – Zdravlje – Actavis, Srbija,
- KARVEDILOL – Habit Pharm, Srbija,
- MILENOL – Hemofarm, Srbija,
- CORYOL – Krka, Slovenija,
- DILATREND – F. Hoffmann – La Roche, Švajcarska.

2.1.3. Karvileks

Karvileks su tablete koje u svom sastavu sadrže karvedilol, kao aktivnu supstancu. Karvedilol je kristalni prah bele ili skoro bele boje. Praktično je nerastvoran u vodi i razblaženim kiselinama, slabo je rastvoran u alkoholu [4]. Hemijski naziv ove supstance prema IUPAC nomenklaturi je (\pm) -[3-(9*H*-carbazol-4-yloxy)-2-hydroxypropyl][2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amin. Zastupljen je kao racemska smeša R (+) i S (-) enantiomera [5].

Karvedilol je uz labetalol jedini posebni beta blokator koji ujedno ima svojstva vazodilatatora [6], veže se za alfa-1 receptore i blokira ih, što uzrokuje širenje krvnih žila. Osim toga karvedilol je moćan antioksidant [7,8], tj. neutralizator reaktivnih slobodnih radikala i antiproliferativni agens.

U Eu Ph VI propisane su tri nečistoće karvedilola i to: nečistoće A, B i C. Hemijski nazivi ovih supstanci prema IUPAC nomenklaturi su:

nečistoća A:

1-[[9-[2-hydroxy-3-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]propyl]-9*H*-carbazol-4-yl]oxy]-3-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]propan-2-ol,

nečistoća B:

1,1'-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]nitrilo]bis[3-(9*H*-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol],

nečistoća C:

(2*RS*)-1-[benzyl[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]-3-(9*H*-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol.

Strukturna formula karvedilola i njegovih nečistoća prikazana je na Slici 1.

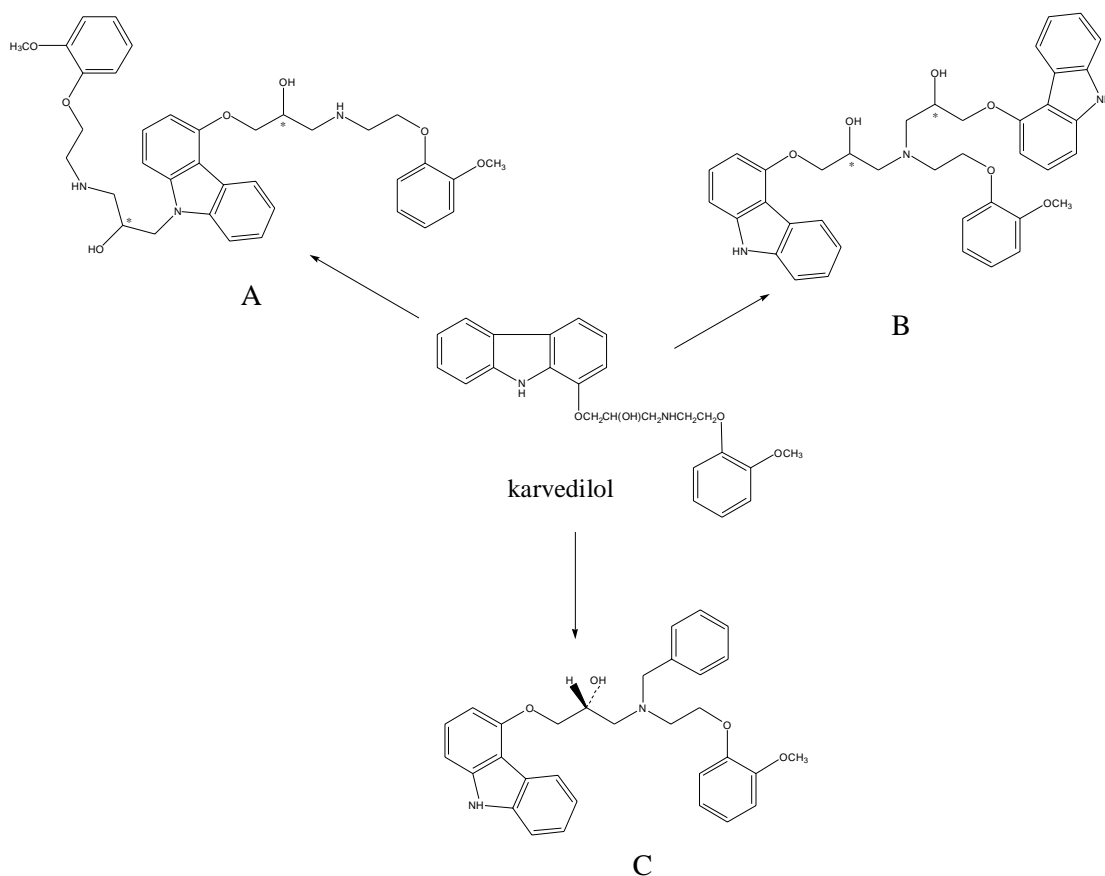
Tok sinteze karvedilola prikazan je na Slici 2. U sintezi, kao jedna od polaznih supstanci koristi se 4-hidroksikarbazol, za koju je tokom ispitivanja stabilnosti karvedilola nađeno da predstavlja nečistoću koja potiče iz procesa sinteze [9].

Delovanje: Karvedilol smanjuje periferni vaskularni otpor putem vazodilatacije i blokade renin-angiotenzin-aldosteronskog sastava [10]. On je neselektivni beta blokator [11,12] bez parcijalnih agonističkih svojstava, ali ima svojstva stabilizacije membrane. Optički je aktivana supstanca sa dva enantiomera (R i S), a javlja se kao smeša tj. racemat. Za beta blokadu je uglavnom odgovoran S(-) enantiomer.

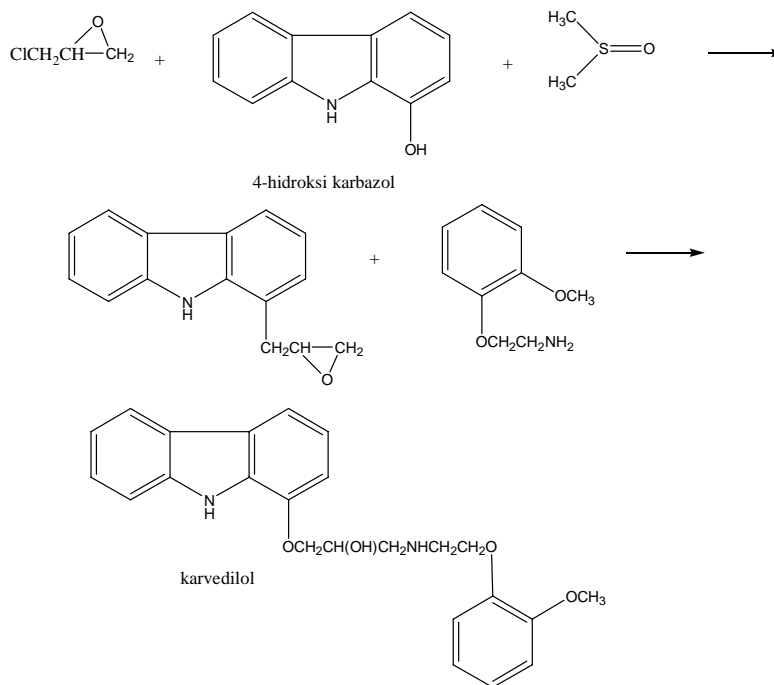
Primena: Kod pacijenata sa povišenim krvnim pritiskom smanjuje krvni pritisak, a brzina rada srca je lagano smanjena. Protok krvi kroz bubrege i bubrežna funkcija je očuvana. S obzirom da je očuvan i protok krvi kroz ekstremitete, pojava hladnih ekstremiteta koja se često viđa kod upotrebe drugih blokatora kod upotrebe karvedilola se retko viđa. Kod pacijenata sa stabilnom anginom pektoris karvedilol je pokazao antiishemijska i antianginalna svojstva, a kod pacijenata sa pogoršanom funkcijom levog ventrikula i kongestivnim zatajenjem srca karvedilol je pokazao dobre učinke. Stoga se karvedilol koristi za lečenje hipertenzije sam ili u

kombinaciji sa drugim antihipertenzivnim lekovima, posebno diureticima tiazidskog tipa, u lečenju hronične stabilne angine pektoris, nemoj ishemiji srčanog mišića, nestabilnoj angini. Može se koristiti kao dodatak standardnoj terapiji, ali i kod bolesnika koji ne podnose ACE inhibitor, odnosno kod bolesnika koji nisu na terapiji digitalisom, hidralazinom ili nitratom.

Nuspojave: Ne smeju ga koristiti bolesnici sa dekonpenziranom zatajenjem srca IV stupnja, AV blokom drugog ili trećeg stupnja, u slučajevima teške bradikardije, sindroma bolesnog sinusnog čvora, kardiogenog šoka, teške hipotenzije, astmatičara, pacijenata s KOBP i oštećene jetre. Posebno oprezni bi trebali biti pacijenti s kongestivnim zatajenjem srca, dijabetes melitusom, hroničnom opstruktivnom plućnom bolesti, perifernim vaskularnim bolestima, kod osoba sklonih alergijama, u bolesnika s psorijazom. Moguće nuspojave su poremećaj vida, glavobolja, zamor, bradikardija, posturalna hipotenzija, hipotenzija, edem, mučnina, proliv, povraćanje, trombocitopenija, hiperglikemija, povećanje telasne težine i hiperholesterolemija, astma i dispneja kod bolesnika sa predispozicijom, bol u ekstremitetima, smanjena lakrimacija.



Slika 1. Strukturna formula karvedilola i njegovih nečistoća



Slika 2. Tok sinteze karvedilola

Doziranje:

Hipertenzija: 12,5 mg početno zatim 25 mg dnevno, maksimalno 50 mg dnevno.

Angina pectoris: 12,5 mg početno, zatim 2x25 mg, maksimalno 100 mg dnevno podeljeno u 2 doze.

Hronična srčana isuficijencija: 2x3, 125 mg (dve nedelje) zatim 2x6,25 mg (dve nedelje) nastaviti sa 2x12,5 mg, maksimalno 2x25-50 mg.

2.2. TABLETE

2.2.1. Uloga tableta u terapiji

Peroralni način davanja leka je najvažniji za postizanje sistemskog efekta. Parenteralni način terapije pogodan je za urgentna stanja i za održavanje terapije lekovima kod hospitalizovanih pacijenata. Smatra se da približno 90% svih lekova koji treba da proizvedu sistemski efekat se daje



peroralnim načinom aplikacije. Od lekova koji se primenjuju peroralno najpoželjniji su čvrsti oblici (tablete i kapsule) iz više razloga.

Tablete i kapsule predstavljaju takve lekovite oblike u kojima je aktivna komponenta tačno dozirana i zadatak pacijenta je da samo uzme propisanu količinu u cilju terapije [13]. Tečni oblici za peroralnu primenu, kao sirupi, suspenzije, emulzije, rastvori i eliksiri, daju se u ukupnoj količini namenjenoj za lečenje pacijenta u određenom periodu; zadatak je pacijenta da od te količine odmeri potrebnu dozu koristeći supenu ili kafenu kašičicu, kapaljku i sl., pri čemu uvek dolazi do greške u doziranju. Tečni oblici doziranja imaju i druge nedostatke u odnosu na tablete; teže su za transport, staklene bočice podložne su lomljenju, neprijatan ukus leka je teže maskirati, tečni oblici su u principu manje stabilni od čvrstih, pa je i rok upotrebe obično kraći; postoji mogućnost razvoja mikroorganizama pri stajanju itd.

Peroralni tečni oblici (rastvori i suspenzije) imaju, svakako, prednosti u određenim slučajevima, npr. ako je lek efikasniji u toj formi (adsorbensi, antacidi) ili je namenjen deci ili starijim ljudima koji imaju teškoće sa gutanjem tablete.

Prednosti tableta su:

1. Kao pojedinačni oblici doziranja pružaju najveću preciznost u doziranju i najmanje variranje u sadržaju leka,
2. Od svih peroralnih oblika doziranja, najlakše su i najkompaktnije,
3. Cena je najniža u poređenju sa drugim peroralnim oblicima,
4. Transportovanje i pakovanje tableta je u principu najjednostavnije i najjeftinije,
5. Identifikacija proizvoda je najjednostavnija i najjeftinija ukoliko postoji monogram,
6. Lako se gutaju, osim u izuzetnim slučajevima,
7. Mesto ili dužina delovanja leka u tableti može biti programirano (enterosolubilne ili tablete produženog delovanja),
8. Pogodnije su za proizvodnju na veliko od drugih peroralnih oblika,
9. U tabletama se postiže najbolja hemijska, fizička i mikrobiološka stabilnost leka.

Nedostaci tableta su:

1. Postoje supstance koje je vrlo teško komprimovati tako da budu kompaktne, zbog toga što su amorfne prirode ili su voluminozne, male gustine,
2. Lekove koji se slabo kvase, sporo rastvaraju, doze su im prilično visoke ili se resorbuju visoko u GI traktu, je dosta teško formulisati, u obliku tableta a da se postigne adekvatna ili potpuna raspoloživost leka.
3. Postoje lekovi koji imaju izrazito gorak ukus, neprijatan miris, osetljivi su na oksidaciju ili vlagu u većem stepenu, pa stoga zahtevaju prethodnu ili naknadnu-obradu enkapsulaciju lekovite supstance ili oblaganje tablete. Iz ovog razloga, postoje teškoće u formulaciji tehnološki postupak poskupljenje, pa je u takvim slučajevima kapsula pogodniji i jeftiniji oblik za proizvodnju.

2.2.2. Formulacija tableta

Komprimovane tablete (ili samo tablete), namenjene su za peroralnu primenu i predstavljaju čvrste, dozirane oblike, izrađene sabijanjem smeše leka i pomoćnih materija.

Tri su osnovna procesa za izradu komprimovanih tableta: direktna kompresija, i komprimovanje granulata dobijenog putem vlažne ili suve granulacije.

Većini lekovitih aktivnih supstanci potrebno je dodati pomoćne materije (različite eksipijense) da bi se napravile komprimovane tablete.

Ako je predviđeno da aktivna komponenta bude u velikoj dozi po tableti, tj. ako ona zauzima veći deo mase tablete, dodatak eksipijenasa je minimalan. Pri nižim dozama leka, dodaje se više pomoćnih materija, a pre svega inertni nosač (punilac, sredstvo za dopunjavanje), da bi se dobila tableta pogodne veličine i mase. U sastav smeše za tabletiranje obično osim lekovite supstance ulaze i sledeće pomoćne materije i to:

- punilac,
- vezivno sredstvo,
- sredstvo za raspadanje,
- lubrikans,
- sredstvo za klizanje i antiadheziju.

Neke pomoćne materije se koriste u specifičnim slučajevima (npr. antioksidansi, materijali za usporavanje brzine rastvaranja, konzervansi, sredstva za kvašenje, sredstva za bojenje).

Naravno, nije obavezno da sve ove komponente budu obuhvaćene formulacijom, jer neka od pomoćnih materija može vršiti više funkcija istovremeno.

Izbor punioca i ostalih ekscipijenasa zavisi od hemijskih i fizičkih osobina aktivne komponente, od ponašanja smeše pri kompresiji i od željenih osobina finalne tablete. Izbor najbolje metode za tabletiranje vrši se na osnovu osobina leka, njegove doze i ekonomičnosti izrade. U principu, pri proceni prihvatljivosti metode izrade, obično se uzimaju najpre u obzir vlažna granulacija i direktna kompresija, pa se između njih bira postupak koji će najbolje odgovarati, a na poslednje mesto dolazi suva granulacija.

2.3. STABILNOST

2.3.1. Stabilnost farmaceutskih preparata

Stabilnost se definiše kao stepen u kome dozirni oblik zadržava u navedenim granicama, kroz ceo period čuvanja i upotrebe, iste osobine koje je posedovao u vreme izrade [14].

Stabilnost preparata ukazuje na otpornost prema različitim hemijskim, fizičkim i mikrobiološkim reakcijama koje bi mogle da promene njegove početne osobine, i to za vreme transporta, čuvanja i upotrebe. Važan kriterijum za stabilnost je procena tih efekata na pogodnost upotrebe lekovitog preparata u terapiji.

Cilj ispitivanja stabilnosti lekovitih preparata je da se odredi vremenski period u kome je lek stabilan, odnosno za koje vreme izgubi najviše 10% dejstva aktivnog principa, skladišten pod normalnim uslovima. Iako se procena stabilnosti odnosi na hemijsku stabilnost, odnosno na sadržaj aktivne supstance, ispitivanja su obično sveobuhvatnija i uključuju fizičku, kao i mikrobiološku stabilnost.

Stabilnost se često kvantitativno izražava kao *rok trajanja (shelf-life)*, odnosno kao vreme za koje je predviđeno da preparat ostane prikladan za upotrebu pod uslovom da se čuva pod određenim uslovima.

Smatra se da je preparat stabilan, ukoliko je obim promene aktivne supstance manji od 5%, a da nije došlo do stvaranja toksičnih proizvoda.

U toku roka trajanja lek je izložen brojnim spoljašnjim faktorima rizika, kao što su vlaga, temperatura, svetlost, kiseonik, mikroorganizmi itd.

Faktori koji utiču na stabilnost i promene na lekovitim oblicima

Na stabilnost lekovitog preparata utiče broj, vrsta, brzina i obim promena koje se odigravaju u leku, pod uticajem spoljašnjih i unutrašnjih faktora. Poznavanje mogućih reakcija degradacije lekovite supstance, kao i faktora koji utiču na brzinu reakcije, neophodno je u svim fazama razvoja farmaceutskog preparata. U fazi preformulacije, mora se dobro poznavati hemijska struktura polaznih supstanci, odnosno, mora se znati da li u sebi sadrže funkcionalne grupe osetljive na hemijske degradacione reakcije. Potrebno je imati podatke i o fizičkim osobinama. Predviđaju se moguće degradacione reakcije kao i to da li produkti dobijeni degradacijom imaju farmakološko dejstvo ili ne, da li su toksični, što može imati negativne posledice po zdravlje pacijenata.

Najznačajniji faktori koji utiču na hemijsku stabilnost lekovite supstance u preparatu, vezani za formulaciju, način izrade i čuvanje su: pH vrednost, priroda rastvarača, prisustvo kiseonika, prisustvo peroksida, joni teških metala, vlaga, svetlost i temperatura. Degradaciju mogu da prouzrokuju različite hemijske reakcije, ali su najčešće oksidacija i fotodegradacija.

Uticaj svetlosti na stabilnost lekova

Sunčeva svetlost povećava temperaturu, a sadrži i UV zrake koji su posebno štetni za lekovite supstance. Mnoge lekovite supstance su fotosenzibilne, što znači da se degradiraju pod uticajem svetlosti. UV deo svetlosti obično započinje lančanu reakciju autooksidacije. U formulacijama preparata sa fotosenzibilnim lekovitim supstancama predviđa se prisustvo antioksidanasa ako svetlost dovodi do oksidacije. U formulacijama može da se uključi i UV apsorber koji mora biti kompatibilan sa aktivnim i ostalim pomoćnim materijama. Uz to, preparat treba da bude zaštićen od svetlosti odgovarajućim pakovanjem. Zaštita od svetlosti može da se postigne i odgovarajućom formulacijom, najčešće oblaganjem tableta ili kapsula neprovidnim filmom napunjenim i hermetički zatvorenim bočicama.

Iako se mnogi lekovi razgrađuju pod uticajem svetlosti, u praksi posledice ne moraju biti iste za sve sastojke (neki lekovi se razgrađuju u veoma malom procentu nakon izloženosti od nekoliko nedelja, dok drugi imaju fotohemijski poluživot od svega nekoliko minuta)

Osnovni podaci o fotoreaktivnosti supstanci potrebni su kako bi se obezbedila informacija o rukovanju, pakovanju, merenju i upotrebi leka kao supstanci ili leka kao proizvoda.

Hemijsku promenu prouzrokuje samo zračenje koje sistem (formulacija, lekovita supstanca) apsorbuje. Veliki broj različitih reakcija može biti pokrenut fotohemijski (redukcija, hidroliza, oksidacija, izomerizacija, polimerizacija i sl.)

Podatke o stabilnosti supstance i formulacije potrebno je dobiti što ranije i započeti ispitivanje pod stresnim uslovima (T, pH, svetlost).

2.3.2. Studije stabilnosti

Stabilnost farmaceutskih preparata se obavezno prati u sledećim slučajevima:

- za novi proizvod,
- pri uvođenju novog doziranog oblika.

Stabilnost se takođe obavezno prati u slučajevima ako se promeni:

- mesto proizvodnje,
- mesto pakovanja,
- formulacija,
- tehnološki proces ili oprema za proizvodnju,
- veličina serije,
- primarno pakovanje,
- proizvođač aktivne supstance.

Pod studijom stabilnosti podrazumeva se serija informacija testova o stabilnosti farmaceutskog proizvoda u cilju definisanja njegovog roka trajanja i perioda korišćenja pod specifičnim uslovima pakovanja i čuvanja. Za procenu stabilnosti lekovite supstance i preparata primenjuju se: studije u roku trajanja, studije ubrzanog starenja i „stresne“ studije stabilnosti.

Ispitivanje u roku trajanja podrazumeva da se preparat koji se ispituje čuva pod normalnim uslovima skladištenja, na sobnoj temperaturi od $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i pri relativnoj vlažnosti vazduha od $60\% \text{ RH} \pm 5\%$. U određenim vremenskim intervalima se uzimaju uzorci za ispitivanje na određene fizičko-hemijske i mikrobiološke parametre [15]. Ispitivanje u uslovima skladištenja u predviđenom roku trajanja predstavlja dug proces.

Da bi se u kratkom vremenu došlo do podataka o stabilnosti i odredio rok trajanja, koriste se **studije ubrzanog starenja**. Kod ubrzanog testa starenja, faktor vreme, zamenjuje se faktorom povišena temperatura. Preparat se pored temperaturnih promena izlaže i uslovima povećane vlažnosti, a ako je potrebno i jakom izvoru svetlosti. Pri tome se za ispitivanje koriste tzv. **“komore za stabilnost”** u kojima postoji mogućnost regulisanja i održavanja određene temperature i vlage, a u nekim modelima, i svetlosnog zračenja.

Ispitivanja se kod studije ubrzanog starenja izvode u periodu od 6 meseci na temperaturi od $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i pri relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \text{ RH} \pm 5\%$.

„**Stresne studije**“ ispitivanja hemijske, fizičke ili mikrobiološke stabilnosti lekovite supstance, pomoćnih materija ili lekovitog preparata obuhvataju primenu određenih stresnih uslova u nekom periodu vremena i određivanje efekta tog stresa na određene hemijske, fizičke i mikrobiološke osobine ispitivanog uzorka, u određenim vremenskim intervalima. Primeri uobičajeno korišćenih stresnih faktora su temperatura, svetlost, relativna vlažnost, gravitacija i mikroorganizmi. Izbor uslova kojima se uzorak podvrgava zavisi od fizičko-hemijske prirode supstance ili preparata i od uslova kojima će preparat verovatno biti podvrgnut za vreme transporta, čuvanja i upotrebe. Plan uslova kojima se podvrgava preparat, broj i učestalost uzimanja uzorka za ispitivanje se određuju na osnovu protokola za ispitivanje stabilnosti. Neki efekti mogu da se uoče direktnom posmatranjem: boja, miris, ukus, bistrina, stepen flokulacije, disperzibilnost ili vidljiv rast mikroorganizma. Međutim, gde je to god moguće, zahteva se da se promene određuju kvantitativno. Primeri određivanja koja se izračunavaju na kvantitativan način su: sadržaj lekovite supstance; određivanje količine degradacionog proizvoda; brzina rastvaranja lekovite supstance iz tableta.

Testovi pod stresnim uslovima čuvanja izvode se na povišenim temperaturama 50°C , $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i pri relativnoj vlažnosti vazduha od $75\% \text{ RH} \pm 5\%$, u periodu od 3 meseca. Testovi stabilnosti pod stresnim uslovima čuvanja uključuju fotostabilnost.

Fotostabilnost (CPMP/ICH/279/95)

O važnosti ispitivanja stabilnosti govore i regulative propisane od strane EMEA i ICH, prema kojima uz zahtev za registraciju proizvoda, neophodno je dostaviti podatke o izvršenim ispitivanjima stabilnosti proizvoda. Podaci dobijeni kroz testove ubrzanog starenja moraju na kraju odgovarati podacima ispitivanja iz roka trajanja, odnosno dugotrajnog ispitivanja [16].

Granica od 10%, koja se odnosi na istek roka trajanja, više se ne prihvata automatski već može biti zahtevano da bude niža.

Ispitivanja moraju biti izvršena u finalnoj ambalaži koja će se koristiti za proizvod koji se stavlja u promet. Dodatna ispitivanja na zaštićenom leku mogu biti koristan prilog ubzanom ispitivanju i proceni ambalaže, kao što su dodatna ispitivanja koja se izvode na drugim odgovarajućim materijalima za pakovanje, tokom postupka izbora definitivnog materijala za ambalažu.

EMEA je za praćenje foto stabilnosti aktivne supstance i preparata predložila dva načina. Prema prvom, uzorak može biti izložen dejstvu D65/ID65 svetlosti, odnosno veštačkoj fluorescentnoj lampi, kombinovanoj sa VIS i UV lampom. D65 je internacionalni priznati standard za svetlost koja deluje po spoljašnjoj površini uzorka definisan ISO 10977 (1993), dok je ID65 definisan kao standard za delovanje svetlosti u unutrašnjosti uzorka. Talasna dužina izvora zračenja je 320 nm.

Drugi način izlaganja uzorka je primenom bele i UV fluorescentne lampe. Bela fluorescentna lampa deluje po površini uzorka slično kao i svetlost koja je definisana ISO 10977. UV fluorescentna lampa ima spektralnu distribuciju od 320 do 400 nm, sa maksimumom emisije energije od 350 do 370 nm.

Prema EMEA, bez obzira na to na koji način se uzorak zrači, u toku praćenja foto stabilnosti, iluminacija ne treba biti manja od 1,2 milion lux sati, a integracija UV zračenjem ne manja od 200 Wh m^{-2} .

2.3.3. Kinetika reakcije foto degradacije

Za procenu stabilnosti leka neophodno je poznavati brzinu i red hemijske reakcije [17]. Sve promene u preparatima odvijaju se određenom brzinom reakcije. Hemijske reakcije degradacije lekovite i pomoćnih supstanci mogu se odvijati različitim kinetikama.

Primena teorije hemijske kinetike omogućava da se izračuna brzina kojom se degradira lekovita supstanca ili neki pomoćni sastojak na osnovu rezultata eksperimentalnog ispitivanja stabilnosti pod određenim uslovima. Takođe se mogu dobiti korisne informacije o međuproizvodima u reakciji degradacije, kao i o uticaju faktora kao što su koncentracija reaktanata, temperatura, pH vrednost i prisustvo površinski aktivnih materija. Hemijska kinetika primenjuje se ne samo na supstance u obliku rastvora, već i na supstance u suspenzijama, emulzijama, čvrstim i polučvrstim preparatima. Sve promene u preparatima odvijaju se određenom brzinom reakcije. Neke promene se odvijaju veoma sporo, tako da je njihov uticaj na brzinu reakcije veoma mali. Ukoliko se promene odvijaju brzo, stabilnost preparata je ugrožena.

Najčešće primenjivani matematički modeli, koji se koriste za opisivanje kinetike reakcije foto degradacije, su modeli kinetike nultog i prvog reda. Predloženi modeli prikazani su u obliku sledećih matematičkih izraza:

Kinetika nultog reda:

$$C = C_0 - k_0 t \quad (1)$$

Kinetika prvog reda:

$$\ln C = \ln C_0 - k_1 t \quad (2)$$

gde je:

C_0 – količina supstance na početku procesa fotodegradacije ($t = 0$)

C – količina supstance nakon vremena t

k_0, k_1 – konstante brzine reakcije fotodegradacije

Neophodno je poznavati kog je reda hemijska reakcija, da bi se izračunalo vreme poluživota i rok trajanja.

Za reakciju nultog reda, vreme poluživota ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) izračunavaju se pomoću sledećih matematičkih izraza:

$$t_{1/2} = \frac{0.5C_0}{k_0}$$

$$t_{90} = \frac{0.1C_0}{k_0}$$
(3)

Za reakciju prvog reda, vreme poluživota ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) izračunavaju se pomoću sledećih matematičkih izraza:

$$t_{1/2} = \frac{0.693C_0}{k_1}$$

$$t_{90} = \frac{0.105}{k_1}$$
(4)

2.4. AMBALAŽA (PAKOVNI MATERIJAL)

Pakovanje i označavanje je izuzetno značajna operacija [15]. U prometu se nalaze zapakovani i označeni polazni materijali (lekovite supstance, pomoćne materije, kontejneri) i gotovi proizvodi. Svi lekoviti preparati se po izradi pakuju u odgovarajuće kontejnere (ambalažu) i tako distribuiraju. Lekoviti preparat ne može da postoji, niti da ima odgovarajući rok upotrebe, bez ambalaže, koja je na propisan način obeležena. Danas se posebna pažnja poklanja izboru pakovnog materijala. Pakovanje se može definisati kao postupak koji će obezbediti zaštitu i isporuku leka, omogućiti njegovu bezbednu i pravilnu upotrebu, pružiti informacije o identitetu, načinu upotrebe i drugim značajnim karakteristikama, za sve vreme upotrebe proizvoda.

U praksi se ambalaža deli na: primarnu, sekundarnu i tercijarnu.

- Primarna ambalaža dolazi u direktni kontakt sa lekom i predstavlja najbitniju komponentu sistema pakovanja, jer od nje zavisi zaštita lekovitog proizvoda. U skladu sa tehnološkim napretkom, finansijskim mogućnostima, ekološkim standardima, u okviru farmaceutske industrije postoje određeni zahtevi za primarnu ambalažu: da lekovitim preparatu obezbedi odgovarajuću zaštitu od spoljašnjih uticaja, odmah po izradi, u toku transporta i čuvanja (vlaga, svetlost, temperatura,



kiseonik, mehanička delovanja); da omogući identifikaciju lekovitog oblika; da je lako prenosiva; da omogućava korisniku bezbednu i pravilnu upotrebu leka; da je prikladna za upotrebu u bolnicama i ambulancama; da određene preparate štiti od domašaja dece; i ono što je bitno za proizvođače: da su joj dimenzije standardizovane; da je primenjiva za mašinsko pakovanje; da isporučio budu pouzdani, kvalitetni i poznati; da je cena povoljna.

- Sekundarna ambalaža ne dolazi u direktan kontakt sa lekom već ima funkciju da objedini željeni broj primarnih pakovanja sa ciljem da obezbedi dodatnu zaštitu, pruži informacije o proizvodu i olakša dalju manipulaciju sa proizvodom.



- Tercijarna ambalaža služi da objedini više sekundarno zapakovanih proizvoda da bi se olakšalo skladištenje i transport.

S obzirom na funkcije pakovanja neophodno je dobro poznavati nekoliko aspekata:

Materijali za farmaceutske kontejnere (ambalažu). Materijali koji se koriste za izradu kontejnera (ambalaže) za pakovanje lekovitih preparata su: staklo, plastika, guma, metal, papir, silikonske mase. Ph.Jug.V u okviru monografija - *Materijali koji se koriste za izradu ambalaže i kontejneri*, propisuje zahteve i ispitivanja, daje sledeće materijale: materijali na bazi plastificiranog polivinilhlorida za ambalažu za ljudsku krv i derivate krvi i za vodene rastvore za intravensku infuziju, materijali na bazi plastificiranog polivinilhlorida za cevčice koje se koriste u kompletima za transfuziju krvi i derivata krvi, poliolefini, polietileni niske gustine za ambalažu za preparate za parenteralnu primenu i oftamološke preparate, polietilen visoke gustine za ambalažu za preparate za parenteralnu primenu, polipropilen, etilenvinilacetat kopolimer za izradu kontejnera i cevčica za preparate za totalnu parenteralnu ishranu, silikonsko ulje koje se koristi kao lubrikans, silikonski elastomer za izradu zatvarača i cevi.

Faktori koji utiču na izbor ambalaže

1. Osobine proizvoda: fizička, hemijska i mikrobiološka svojstva.
2. Osetljivost proizvoda: fizički ili mehanički faktori, hemijski faktori, faktori okoline, biološki faktori.
3. Tržišni zahtevi za ambalažu: funkcionalni zahtevi, zakonski zahtevi, potrošački zahtevi, sprečavanje zloupotreba.
4. Zdravstveni i bezbedonosni aspekti ambalaže: stanovište pakovanja, stanovište prodaje, stanovište upotrebe.

Vrste kontejnera i zatvarača. Kontejner je predmet za farmaceutsku upotrebu (kontaktna, primarna ambalaža), sadrži ili je namenjen za čuvanje preparata, i koji je ili može biti u direktnom kontaktu sa proizvodom. Zatvarac je deo kontejnera. Kontejner obezbeđuje različite stepene zaštite, zavisno od prirode proizvoda i opasnosti po okolinu, odnosno minimizira gubitak komponentata proizvoda. Kontejner ne sme fizički ili hemijski da reaguje sa sadržajem na takav način da dovede do promena karakterisika preparata koje su odobrene od strane regulatornih vlasti. Jednodozni kontejner sadrži količinu preparata koja se mora upotrebiti odjednom. Višedozni kontejner sadrži količinu preparata koja se može primeniti dva ili više puta. Dobro zatvoreni kontejner štiti sadržaj od kontaminacije čvrstim i tečnim supstancama i sprečava gubitak sadržaja pod uobičajenim uslovima korišćenja, čuvanja i transporta. Hermetički zatvoren kontejner je nepropustan za čvrste, tečne i gasovite supstance pod uobičajenim uslovima korišćenja, čuvanja i transporta. Zataljen kontejner je kontejner koji se posle punjenja zatvara fuzijom materijala od koga je kontejner proizveden. Tamper-proof kontejner je zatvoren kontejner koji omogućava evidenciju prvog otvaranja. Farmakopeja ne navodi kao posebne kontejnere koji pružaju zaštitu od svetlosti, specifičnim svojstvom materijala od koga se sastoje. Farmakopeja daje detaljne podatke za jedan broj kontejnera koji na prvom mestu podrazumevaju njihov kvalitet i metode ispitivanja, a to su monografije za sledeće kontejnere (špriceve i zatvarače): stakleni kontejneri za farmaceutsku upotrebu, plastični kontejneri i zatvarači, sterilni plastični kontejneri za humanu krv i krvne derivate, prazni sterilni kontejneri od plastifikovanog polivinilhlorida za humanu krv i krvne derivate, kompleti (sistemi) za transfuziju krvi i krvnih derivata, plastični kontejneri za vodene derivate za intravensku infuziju, sterilni špricevi za jednokratnu upotrebu, gumeni zatvarači za kontejnere za vodene preparate za parenteralnu primenu.

Izbor pakovnog materijala za različite lekovite oblike. Zahtevi za primarnu ambalažu za lekovite preparate: dihtovanje, permeabilnost, zaštita od svetlosti, mehanička čvrstoća, stabilnost, dizajn, čistoća. Izbor primarne ambalaže za tečne lekovite oblike mora se voditi računa o uzajamnom odnosu lekoviti preparat



spoljna sredina primarna ambalaža. Pregled kontejnera za pakovanje tehničnih lekovitih oblika: materijal-staklo (za parenteralne preparate, za ostale tečne preparate) vrste kontejnera su: ampule, špricevi, bočice, boce za infudibilije, boce širokog grla, kapaljke. Plastika (za parenteralne preparate, za ostale tečne preparate) vrste kontejnera su: ampule za injekcione preparate, ampule za jednodozna pakovanja, kapi za oči, bočice za injekcione rastvore, bočice za oftamološke preparate, boce za infuzione rastvore, kese za infuzione rastvore, setovi za primenu parenteralnih preparata, bočice sa kapaljkom. Materijal/plastika: aerosol boce, zatvarači, bočice, folije za izradu kesica za jednodozna pakovanja. Guma: zatvarači, dihtunzi, delovi kapaljki. Izbor primarne ambalaže za masti, kreme, gelove i paste. Ukoliko se pakuju količine namenjene krajnjem korisniku, kao primarna ambalaža koja ispunjava propisane zahteve, koriste se: aluminijumske tube sa unutrašnjim zaštitnim lakom na bazi epoksidne smole, laminat tube sa oblogom od PE/AL/PE, tube i kutijce od plastike, staklene teglice sa dobrodihtujućim poklopcem, kesice kao jednodozna pakovanja. Zahtevi za primarnu ambalažu za čvrste lekovite oblike su uglavnom isti kao i za ostale. Posebno je značajna nepropustljivost za vodenu paru (često pakovanje sadrži i absorbere vlage) i zaštita od oštećenja preparata (npr. lomljenja tableta). Kontejneri za čvrste oblike zavise od vrste preparata (prašak, granulat, tableta, kapsule, supozitorije, vagitorije), ali i od količine (jednodozna pakovanja) i specifičnosti preparata (efervescentni oblici, osetljivi na svetlost ili temperaturu).

2.5. FARMACEUTSKO – TEHNOLOŠKI POSTUPCI ISPITIVANJA

Raspadljivost tableta

Ispitivanjem raspadljivosti određuje se da li se tablete raspadaju u propisanom vremenu, kada se pod određenim eksperimentalnim uslovima, stave u odgovarajući medijum.

Pod raspadanjem, odnosno dezintegracijom tableta podrazumeva se da:

1. nema ostataka na žičanom situ aparature,
2. ukoliko ima ostataka, oni se sastoje od mekane mase koja može da prođe kroz sito blagim pritiskom staklenim štapićem,

3. ukoliko na situ zaostaju samo delovi obloga tableta ili delovi koji su ostali zalepljeni na donjoj površini diska, ako je korišćen disk.

Postupak ispitivanja. Ispitivanje se izvodi sa šest uzoraka. U svaku od šest cevi se stavlja po jedna tableta. U svaku cev se dodaje disk. Uređaj se zakači za posudu koja sadrži propisan medijum za ispitivanje raspadljivosti. Uređaj radi u toku vremena propisanog za raspadanje, zatim se zaustavi i proverava stanje tableta u odnosu na kriterijume za raspadanje. Tablete zadovoljavaju zahteve ukoliko su se sve raspale za propisano vreme.

Variranje mase jednodoznih preparata

Pojedinačno se odmeri dvadeset slučajno odabranih doznih jedinica, ili ako je svaki preparat odvojeno pakovan uzima se preparat iz 20 pakovanja i izračuna prosečna masa. Samo dve prosečne mase smeju odstupati više od dozvoljenog procenta odstupanja.

Ujednačenost sadržaja lekovite supstance u jednodoznim preparatima

Ispitivanje ujednačenosti sadržaja jednodoznih preparata zasniva se na pojedinačnom određivanju sadržaja lekovite supstance u određenom broju uzoraka, da se ustanovi da li je pojedinačni sadržaj unutar postavljenih granica u odnosu na prosečni sadržaj uzoraka.

Postupak ispitivanja. Pogodnim analitičkim postupkom pojedinačno se određuje sadržaj aktivne supstance u 10 dozirnih jedinica i izračuna prosečan sadržaj. Dobijeni rezultati moraju da budu u skladu sa granicama navedenim u testu A ili B, u zavisnosti od oblika koji se ispituje.

Preparat u obliku tablete zadovoljava zahteve ispitivanja ako je svaki pojedinačni sadržaj između 85% i 115% od prosečnog sadržaja.

Friabilnost neobloženih tableta

Ispitivanje friabilnosti treba da pokaže da li se, pod određenim uslovima ispitivanja, kada se neobložena tableta izloži mehaničkom stresu ili trenju, njena površina oštećuje i pokazuje znake habanja.

Postupak. Za ispitivanje se uzima dvadeset tableta ako je masa pojedinačne tablete do 0,65 g. Pre stavljanja u bubanj, tablete se pažljivo otpraše i zajedno izmere. Bubanj se pusti da rotira 100 puta i tablete izvade posle 4 min rotacije, ponovo otpraše i mere.



Izračunavanje rezultata. Friabilnost se izražava kao razlika u masi, pre i posle obrtanja, izražena u procentima u odnosu na početnu masu.

Otpornost tablete na lomljenje (čvrstina tableta)

Ispitivanje ima za cilj da se, pod određenim uslovima, ustanovi otpornost tablete na lomljenje, tako što se meri sila koja je potrebna da slomi tabletu.

Postupak. Merenje sile koja je potrebna da slomi tabletu se vrši na deset tableta. Tableta se stavlja u ležište između dva metalna dela. Na pokretni metalni deo putem odgovarajućeg uređaja primenjuje se pritisak koji u jednom trenutku slomi tabletu. Na skali se očitava vrednost.

Rezultati merenja se izražavaju kao srednja vrednost svih izmerenih sila potrebnih za lomljenje tableta, a navodi se i minimalna i maksimalna vrednost izmerenih sila. Svi rezultati se izražavaju u njutnima (*N*).

2.5.1. Značaj testa rastvorljivosti

Za samu formulaciju leka, neophodno je, pored razmatranja vezanih za:

- izbor same aktivne komponente (njene fizikohemijske i farmaceutsko-tehnološke karakteristike),
- izbor odgovarajućih pomoćnih materija,
- izbor postupka izrade,
- obezbeđenje stabilnosti preparata,

razmotriti i njegova biofarmaceutska svojstva. Pri ovome se pre svega misli na kinetiku procesa oslobađanja lekovite supstance iz lekovitog oblika s obzirom da je to faktor koji određuje profil koncentracije leka u organizmu.

Biofarmaceutska karakterizacija preparata podrazumeva:

- identifikaciju mehanizma oslobađanja aktivne komponente iz lekovitog oblika,
- izbor eksperimentalnih uslova za ispitivanje brzine rastvaranja *in vitro* koji su u korelaciji sa *in vivo* podacima,
- određivanje profila oslobađanje lekovite supstance *in vivo* i njene biološke raspoloživosti,
- identifikaciju faktora koji utiču na oslobađanje lekovite supstance *in vitro* i *in vivo*.

In vitro – in vivo korelacija

Farmaceutska industrija je krajem prošlog i početkom ovog veka razvila veliki broj preparata. Često se na tržištu nalazi jedan lek različitih proizvođača sa istom lekovitom supstancom ali sa različitim eksipijensima i/ili tehnološkim postupkom dobijanja. Da bi razni oblici bili međusobno zamenljivi moraju biti ispunjeni određeni uslovi, pri čemu je krajnji cilj terapijska ekvivalentnost preparata. Ona podrazumeva da dva ista lekovita oblika po definiciji, ali poreklom od različitih proizvođača, daju isti klinički ishod [18].

Terapijsku ekvivalenciju je ponekad teško izmeriti i dokazati u kliničkim uslovima. Zato pribegavamo definisanju biološke ekvivalencije preparata.

Bioekvivalenciju definišemo kao odsustvo značajne razlike u brzini i stepenu, u kome aktivna supstanca iz farmaceutskih ekvivalenata ili alternativa dospeva na mesto delovanja, kada se ekvivalenti ili alternative primene u istoj dozi i pod istim uslovima u okviru odgovarajuće dizajnirane studije [19].

Ideja da se ispitivanjem brzine rastvaranja lekovite supstance *in vitro* može predvideti ponašanje iste supstance *in vivo* i kasnije uspostavljanje *in vivo - in vitro* korelacije (IVIVK) doveli su do osetnijeg razvoja testa rastvaranja (*Dissolution test*).

In vitro – in vivo korelacija se definiše kao uspostavljanje odnosa između nekog biološkog svojstva, ili parametra izvedenog na osnovu biološkog efekta izazvanog dejstvom lekovitog oblika, i fizičko-hemijskih karakteristika datog lekovitog oblika [20]. Najčešće se ovaj pojam odnosi na uspostavljanje kvantitativnog odnosa između profila brzine rastvaranja *in vitro* i farmakokinetičkih parametara koji karakterišu vremenski tok oslobađanja ili apsorpcije leka u organizmu. Definisana su tri nivoa korelacije označene kao korelacije nivoa A, B i C. Najveći značaj se pridaje korelacijama nivoa A koje pokazuju odnos između celokupnog vremenskog toka, tj. profila procesa rastvaranja *in vitro* i *in vivo*. Kako proces rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog oblika u organizmu nije direktno dostupan merenju, do njega se dolazi matematičkim putem, primenom operacije numeričke dekonvolucije, na osnovu eksperimentalnih rezultata dobijenih ispitivanjima *in vivo*.

Cilj uspostavljanja IVIVK je da se smanji broj ponovljenih *in vivo* ispitivanja u ljudi koja su skupa, komplikovana i dugo traju i time smanji vreme i troškovi potrebni za razvoj formulacije, kao i njenu registraciju i postregistracione promene. Mogućnost da se *in vivo* ponašanje lekovitog oblika predvidi na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem brzine rastvaranja *in vitro*, omogućava farmaceutu da u mnogo kraćem vremenu i uz manje troškova

razvije optimalnu formulaciju, s obzirom na to da se *in vitro* ispitivanja, uz kompjutersku simulaciju, mogu izvesti mnogo brže u odnosu na ispitivanja *in vivo*.

Rad na uspostavljanju *in vitro* – *in vivo* korelacije podrazumeva da se izradi nekoliko formulacija koje se značajno razlikuju po kinetici oslobađanja lekovite supstance i zatim ove formulacije okarakterišu izvođenjem odgovarajućih *in vitro* i *in vivo* ispitivanja. *In vitro* ispitivanja podrazumevaju opsežan rad na izboru eksperimentalnih uslova koji daju najbolju korelaciju sa *in vivo* rezultatima.

Uspostavljanje IVIVK predstavlja veoma značajan korak u razvoju formulacije. Kada se uspostavi kvantitativna korelacija između brzine rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog oblika *in vitro* i *in vivo*, dovoljno je *in vitro* ispitivanje preparata da bi se procenila i predvidela biološka raspoloživost i/ili pokazala biološka ekvivalencija gotovih proizvoda.

S ciljem da se napravi izvesna sistematizacija i olakša rad na razvoju formulacija i uspostavljanju IVIVK, predložen je novi, takozvani, Biofarmaceutski sistem klasifikacije lekova (*Biopharmaceutics Classification System, BCS*) zasnovan na rastvorljivosti lekovite supstance, njenoj permeabilnosti i brzini rastvaranja iz lekovitog oblika *in vitro*. Značajno je naglasiti da se predložena klasifikacija zasniva ne na fizičko-hemijskoj rastvorljivosti date supstance definisane kao maksimalna količina supstance koja se može rastvoriti u određenoj zapremini rastvarača, već na, nazovimo je tako, farmakološkoj ili fiziološkoj ili gastrointestinalnoj rastvorljivosti koja zavisi od terapijske doze primenjenog leka. Podrazumevajući da se rastvorljivost, kao i permeabilnost lekovitih supstanci mogu kvalitativno opisati kao “visoka” ili “niska”, formirane su u okviru predloženog sistema klasifikacije četiri grupe [21]:

I grupu predstavljaju supstance koje pokazuju visoku rastvorljivost i visoku permeabilnost (VR/VP). Kod ovih supstanci može se očekivati uspostavljanje IVIVK u slučajevima kada je brzina rastvaranja manja od brzine pražnjenja želuca. Ako se radi o dobro rastvornoj, visoko permeabilnoj supstanci koja se brzo rastvara iz lekovitog oblika, kao što je slučaj kod konvencionalnih preparata sa trenutnim oslobađanjem, ne treba očekivati uspostavljanje korelacije. Lekovite supstance iz ove grupe koje pokazuju brzo rastvaranje iz lekovitog oblika, veće od 85% za manje od 15 min, obezbeđuju dovoljnu biološku raspoloživost i bioekvivalenciju.

II grupu čine supstance koje se slabo rastvaraju (niska rastvorljivost), ali pokazuju visoku permeabilnost (NR/VP). Ova klasa je najinteresantnija, jer se u nju svrstava najveći broj

lekovitih supstanci. Kod ove grupe je brzina rastvaranja ograničavajući faktor za biološku raspoloživost. Kao posledica toga, prisutna je velika verovatnoća da se može uspostaviti značajna korelacija između *in vitro* i *in vivo* podataka.

III grupu čine supstance koje pokazuju dobru (visoku) rastvorljivost, ali nisku permeabilnost (VR/NP). U ovom slučaju je permeabilnost ograničavajući faktor za apsorpciju leka, tako da se ne očekuje uspostavljanje IVIVK.

IV grupu čine supstance koje pokazuju lošu (nisku) rastvorljivost i nisku permeabilnost (NR/NP). Praktično je mali broj ovakvih supstanci koje su namenjene za peroralnu primenu.

2.5.2. Ispitivanje brzine rastvaranja (*dissolution test*)

Kako je preduslov da lek stupi u proces apsorpcije, odnosno prolazak kroz biološke membrane, da bude u rastvorenom stanju, testovi rastvaranja imaju naročit značaj.

Prilikom ispitivanja brzine rastvaranja aktivne supstance iz čvrstog lekovitog oblika, u obzir se mora uzeti sledeće :

- Aparatura koja se upotrebljava. Farmakopeje [20,22,23] propisuju nekoliko aparatura koje se mogu upotrebiti u ovu svrhu. Najčešće su u upotrebi aparatura sa korpicama, aparatura sa lopaticama i aparatura sa protočnim ćelijama.
- Sastav, zapremina i temperatura rastvarača (disolucioni medijum – Tabela 1).
- Brzina mešanja ili protoka rastvarača
- Vreme, metoda i količina za uzorkovanje ispitivanog rastvora ili uslovi za kontinualno merenje
- Kriterijumi prihvatljivosti
- Metod analize

Farmakopeje za veliku većinu lekovitih supstanci propisuju kako uslove za ispitivanje rastvorljivosti, tako i metode analize. Sa druge strane farmaceutske kompanije koje se bave proizvodnjom lekova, imaju dovoljan stepen slobode da same propišu metode ispitivanja rastvorljivosti lekovite supstance kao i metode analize uzoraka nakon testa rastvaranja.

Tabela 1. Primeri disolucionih medijuma

pH	rastvarač
pH 1,0	HCl
pH 1,2	HCl, NaCl
pH 1,5	HCl, NaCl
pH 4,5	fosfatni ili acetatni pufer
pH 5,5 i 5,8	fosfatni ili acetatni pufer
pH 6,8	fosfatni pufer
pH 7,2 i 7,5	fosfatni pufer

Da li su dva oblika sa istom lekovitom supstancom, ili da li su dva leka od različitih proizvođača međusobno zamenljivi može se utvrditi poređenjem disolucionih profila, dobijenih merenjem količine rastvorene supstance tokom vremena pri istim uslovima. U ovu svrhu najčešće se koriste faktor razlike f_1 , i faktor sličnosti f_2 definisanih na sledeći način [21]:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100 \quad (5)$$

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n |R_t - T_t|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad (6)$$

gde je :

n – broj vremenskih tačaka

R_t – količina rastvorene supstance referentnog uzorka u vremenskoj tački t

T_t – količina rastvorene supstance ispitivanog uzorka u vremenskoj tački t

Da bi se odredila ova dva faktora neophodno je prvo odrediti disolucione profile referentnog i ispitivanog produkta (12 jedinica od svakog), u tri do četiri ili više vremenskih tačaka. Generalno, vrednosti za f_1 do 15 (0 – 15) i za f_2 veće od 50 (50 – 100) pokazuju ekvivalentnost između dva profila.

2.5.3. Kinetika brzine rastvaranja

Rastvaranje aktivne lekovite supstance iz čvrstih farmaceutskih oblika opisuje se kinetičkim modelima u kojima je količina rastvorene supstance (Q) u funkciji vremena rastvaranja, $Q = f(t)$. U ovu svrhu koriste se model nultog reda, model prvog reda, Hixon–Crowell–ijev model, Weibull–ov model, Higuchi–jev model itd [24].

Kinetika nultog reda

Rastvaranje supstanci iz čvrstih farmaceutskih oblika koji se ponašaju po ovom modelu može biti prikazano sledećom jednačinom:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (7)$$

gde je Q_t količina rastvorene supstance u vremenu t , Q_0 je inicijalna količina rastvorene supstance a K_0 konstanta rastvaranja nultog reda. U ovom slučaju grafik zavisnosti količine rastvorene supstance od vremena ima linearni oblik.

Kinetika prvog reda

Ovaj model opisan je sličnom jednačinom:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t \quad \text{ili} \quad \log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (8)$$

gde je K_1 konstanta oslobađanja prvog reda. U ovom modelu zavisnosti logaritama rastvorene supstance od vremena takođe je linearna.

Kinetika drugog reda

Model brzine drugog reda opisan je jednačinom

$$\frac{Q_t}{Q_0 (Q_0 - Q_t)} = K_2 t \quad (9)$$

ovde je Q_t količina rastvorene supstance u vremenu t , Q_0 je inicijalna količina supstance u farmaceutskom obliku, a K_2 konstanta rastvaranja drugog reda. Ovaj model daje linearnu zavisnost kada se odnos $Q_t / Q_0 (Q_0 - Q_t)$ predstavi u funkciji vremena. K_2 je u ovom slučaju nagib prave.

Hixon–Crowell–ijev model

Hixon i Crowell su 1931. godine postavili model zavisnosti kubnog korena količine rastvorene supstance od vremena :

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t \quad (10)$$

ovde je Q_0 kao i u prethodnoj jednačini, Q_t je preostala količina nerastvorene supstance, a K_s konstanta rastvaranja koja zavisi od odnosa površina - zapremina farmaceutskog oblika. Grafička zavisnost kubnog korena nerastvorenog dela aktivne supstance od vremena je linearna.

Weibull–ov model

Empirijsku jednačinu opisao je Weibull 1952. godine. Kada se prilagodi procesu rastvaranja može se prikazati na sledeći način:

$$m = 1 - \exp\left[\frac{-(t - T_i)^b}{a}\right] \quad (11)$$

ili kada se preuredi

$$\log[-\ln(1 - m)] = b \log(t - T_i) - \log a \quad (12)$$

gde je m frakcija rastvorene supstance u vremenu t , T_i vreme kašnjenja, b je parametar oblika a a parametar koji karakteriše vremensku skalu procesa. U procesima u kojima rasvaranje prati ovaj model zavisnost logaritma količine rastvorene supstance od logaritma vremena ima linearni oblik.

Higuchi–jev model

Higuchi–jev model kinetike rastvaranja opisan je jednačinom

$$Q_t = K_H t^{1/2} \quad (13)$$

ovde je Q_t količina rastvorene supstance u vremenu t , a K_H Higuchi – jeva konstanta rastvaranja. Grafička zavisnost količine rastvorene supstance od kvadratnog korena vremena je linearna.

Korsmeyer–Peppas–ov model

Ovaj model opisan je sledećom jednačinom

$$Q_t = K_K t^n \quad (14)$$

Q_t je količina rastvorene supstance u vremenu t , a K_K konstanta koja zavisi od strukturnih i geometrijskih karakteristika lekovitog oblika, a n eksponent rastvaranja, koji indicira mehanizam rastvaranja.

Za opisivanje kinetike rastvaranja lekovitih supstanci koriste se i drugi modeli kao što su Baker–Lonsdale–ov model, Hopfenbergov model, Gompertz–ov model, Logistički model itd [24].

2.6. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

Eksperimentalni dizajn (ED) je našao veliku primenu pri formulisanju farmaceutskih proizvoda [25-32], optimizaciji procesnih faza [33,34], razvoju analitičkih tehnika [35], kao i u studijama stabilnosti lekova [36-43]. Upotreba tehnika eksperimentalnog dizajna je dragocena pri ispitivanju i obezbeđivanju robustnosti procesa, kao jednog od bitnih parametara pri validaciji procesa proizvodnje lekova. Softverski paketi omogućili su farmaceutskoj industriji bolje iskorišćavanje brojnih mogućnosti eksperimentalnog dizajna.

2.6.1. Primena eksperimentalnog dizajna u optimizaciji formulacija

Kreiranje eksperimentalnog dizajna obuhvata.

- a) selekciju faktora koji se ispituju i
- b) selekciju nivoa tih faktora.

Nivoi faktora obično se definišu simetrično oko osnovnog nivoa. U većini studija nivoi faktora koji se ispituju definišu se od strane analitičara shodno njegovom ličnom mišljenju [44]. Ekstremni nivoi faktora mogu se definisati i procentualno u odnosu na nominalnu vrednost [45].

Kod eksperimentalnog dizajna efekti jednog faktora izračunavaju se na nekoliko nivoa u kombinaciji sa ostalim faktorima. Odabiranje eksperimentalnog dizajna vrši na osnovu broja faktora i broja nivoa. Ukoliko je broj faktora visok bira se neki od frakcionisanih eksperimentalnih dizajna, Placket-Burman-ov, itd, a ako je broj faktora mali preporučljiv je pun faktorijelni dizajn.

Tradicionalno farmaceutske formulacije se razvijaju promenom jednog faktora u vremenskom pristupu. Metod zahteva veliki utrošak vremena i mnogo pokušaja sklonih maštanju/pretpostavkama. Osim toga, korišćenjem ove klasične tehnike može biti teško razviti formulaciju s obzirom da zajednički efekat faktora nije razmatran. Zbog toga je veoma značajno razumeti kompleksnost farmaceutskih formulacija upravo korišćenjem statističkih oruđa kao što su faktorijelni dizajni.

Broj eksperimenata zahtevanih za ove studije zavisi od broja faktora. Odgovori se mere za svaki eksperiment i zatim se primenom regresione analize i F-statistike generiše prosta linearna ($Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3$) ili interaktivna ($Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3$..) ili kvadratna jednačina ($Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3+b_{11}X_1^2$), gde je Y_1 odziv, b_0 odsečak, b_1 glavni koeficijent, a b_{xy} interakcioni koeficijent u cilju identifikacije značajnih termova.

Redukovana jednačina koja sadrži samo statistički značajne termove koristi se za crtanje dijagrama površine odgovora radi preglednog predstavljanja uticaja faktora. Optimalne tačke na dijagramima se mogu identifikovati i eksperimenti ponoviti radi verifikacije optimalnog odgovora.

Izgradnja modela. Nakon izvođenja eksperimenata i dobijanja odgovora, mogu se izgraditi polinomialni ili faktorijalni modeli koji opisuju povezanost između odgovora i razmatranih faktora. Modeli obično uključuju odsečak, glavne termove, interakcione termove, i kvadratne termove. Neredovno, nisu svi termovi uključeni u model i termovi koji nisu značajni se brišu, koristeći npr. eliminacionu regresionu proceduru unazad.

Procena modela. Nakon izgradnje, model može biti predstavljen grafički i/ili statistički. Grafički, model može biti predstavljen crtanjem 2D konturnih grafika ili 3D grafika sa površinama odgovora. 2D konturni grafik prikazuje linije odgovora kao funkciju nivoa dva

faktora, dok 3D grafik sa površinama odgovora reprezentuje odgovor, na trećoj dimenziji kao funkciju nivoa dva faktora.

2.7. METODE ISPITIVANJA

Analitičke metode koje se koriste u ispitivanju aktivne farmaceutske supstance ili gotovog farmaceutskog proizvoda moraju biti “*stability indicating*” metode. “*Stability indicating*” metoda je validirana, kvantitativna analitička metoda koja nam omogućuje praćenje promena hemijskih, fizičkih ili mikrobioloških parametara aktivne farmaceutske supstance ili gotovog proizvoda, koji određuju kvalitet proizvoda, a koji se tokom vremena mogu menjati. “*Stability indicating*” analitička metoda služi za nedvosmisleno i tačno određivanje aktivne supstance, njenih degradacionih proizvoda i drugih komponenata koji su od interesa, bez interferencija. “*Stability indicating*” metoda je važna u sagledavanju svih faktora koji mogu uticati na stabilnost proizvoda i u skladu sa tim i u odabiru ambalaže koja će uspešno zaštititi proizvod od tih uticaja.

2.7.1. Validacija metode

Validacija analitičke metode podrazumeva proces kojim se procenjuje da li je analitička metoda pogodna za planiranu namenu [44].

Metodu treba validirati ili revalidirati :

- pre njenog uvođenja u rutinsku upotrebu,
- kada dođe do značajne izmene radnih parametara analitičke metode, instrumenta ili obrade podataka,
- kada dođe do značajne izmene softvera, hardvera ili instrumenata,
- kada dođe do značajne hemijske ili fiziko-hemijske izmene razdvajanja ili pripreme uzorka materijala u hromatografskim metodama razdvajanja,
- kada dođe do značajne izmene sastava materijala koji se ispituje (izmene formulacije, različit profil nečistoća itd.).

Parametri koji se razmatraju prilikom validacije analitičke metode su specifičnost / selektivnost, linearnost, tačnost, preciznost, limit detekcije i limit kvantifikacije, stabilnost rastvora i kod hromatografskih analiza pogodnost sistema.

Specifičnost / selektivnost. Specifičnost je sposobnost da se jasno detektuje analit pored komponenti koje mogu biti prisutne u uzorku [44] (produkti degradacije, ekscipijesi, jedinjenja koja mogu nastati reakcijom aktivne supstance i ekscipijensa, ostaci rastvarača, sredstvo za ekstrakciju itd.). Potvrđuje se upoređivanjem rezultata dobijenih za analit, u prisustvu očekivanih komponenti, sa rezultatima dobijenim za uzorak koji sadrži samo analit i rezultatima dobijenim za placebo uzorak [45]. Za razliku od specifičnosti, selektivnost se obično definiše kao sposobnost detekcije grupe sličnih signala u uzorku. Pri tome slični sastojci daju zasebne signale koji međusobno ne utiču na rezultat.

Linearnost analitičke metode je njena sposobnost (u okviru zadate oblasti) dobijanja rezultata koji su direktno proporcionalni koncentraciji (količini) analita u uzorku. Kod linearnosti se obično definiše i oblast metode, koja predstavlja donju i gornju granicu koncentracije analita koji se određuje. Linearnost se statistički određuje za najmanje pet rastvora standardne supstance čija se koncentracija nalazi u opsegu od 80 % do 120 % u odnosu na radnu koncentraciju standardne supstance, kod metoda određivanja sadržaja. Kod testova rastvaranja opseg je obično ± 20 % od specifikacije. Na osnovu odgovora detektora, ovako pripremljenih rastvora, crta se kalibraciona kriva:

$$P = f(c) \quad (15)$$

gde je:

P – odgovor detektora

c – koncentracija pripremljenih rastvora

Primenom linearne regresione analize izračuna se jednačina prave:

$$y = ax + b \quad (16)$$

gde je:

a – nagib prave

b – odsečak na ordinati

x – koncentracija rastvora

y - odgovor detektora

Koeficijent korelacije (r), koji određuje veličinu rasipanja podataka oko regresione linije i predstavlja stepen zavisnosti između promenljivih [46, 47]. Koeficijent korelacije veći od 0,999 pokazuje dobru linearnu zavisnost.

Tačnost predstavlja stepen slaganja dobijenih rezultata sa stvarnom vrednošću odnosno ukazuje na ispravnost merenja [45].

Obično se određuje tako što se smeša placebo komponenti optereti tačnom poznatom količinom određivane komponente. Neophodna su minimum devet određivanja, po tri probe na tri koncentraciona nivoa u definisanom opsegu. Iskazuje se preko preko *recovery* vrednosti koji predstavlja odnos rezultata dobijenih predloženom metodom sa tačnom vrednošću.

$$Recovery = \frac{\text{dobijena vrednost}}{\text{tačna vrednost}} \times 100 \quad (17)$$

Recovery kod metoda određivanja sadržaja treba da bude u okviru 98 – 102%, dok je kod testova rastvaranja *recovery* u okviru 95 – 105%.

Preciznost izražava bliskost slaganja (stepen rasejanosti) između rezultata serije merenja iz istog homogenog uzorka pod propisanim uslovima [44]. Preciznost se može razmatrati u tri nivoa:

- Ponovljivost, kao ponovljivost sistema - ispitivanje odgovora detektora kod uzastopnih analiza jednog rastvora i kao Ponovljivost metode - ispitivanje sadržaja analita na više proba homogenog uzorka od strane jednog analitičara, korišćenjem iste aparature i reagenasa, u jednoj laboratoriji.
- Intermedijerna preciznost podrazumeva unutar-laboratorijske varijacije (različiti analitičari, različiti aparati, različiti dani, itd)
- Reproductivnost – izražava preciznost između laboratorija (kolaborativne studije, obično primenjene za standardizovanje metodologije).

Dobijeni rezultati ispitivanja se statistički procenjuju izračunavanjem srednje vrednosti (X_{sr}), standardne devijacije (S_d) i relativne standardne devijacije (RSD), i intervala poverenja prema sledećim formulama:

$$\text{Srednja vrednost: } X_{sr} = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{n} \quad (18)$$

gde je:

x_i – pojedinačno određivanje (izračunat sadržaj i-te probe)

n – broj pojedinačnih određivanja

$$\text{Standardna devijacija: } SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - x_{sr})^2}{n - 1}} \quad (19)$$

gde je:

x_{sr} – srednja vrednost (srednja vrednost izračunatog sadržaja)

$$\text{Relativna standardna devijacija: } RSD (\%) = \frac{SD}{x_{sr}} \cdot 100 \quad (20)$$

$$95 \% \text{ interval poverenja: } CI_{95\%} = x_{sr} \pm 1,96 \cdot \frac{SD}{\sqrt{N}} \quad (21)$$

Vrednost RSD ukazuje na stepen rasejanosti koji se može očekivati kod ispitivane metode. Prilikom procene preciznosti preporučuju se minimum 6 određivanja pri 100 % test koncentracije ili minimum devet određivanja (po tri probe na tri koncentraciona nivoa u definisanom opsegu).

Analitičke metode određivanja sadržaja treba da imaju RSD manju od 2 %, dok je kod testova rastvaranja dozvoljena RSD do 5 %.

Limit detekcije je najmanja koncentracija analita u uzorku koja može biti detektovana pod datim eksperimentalnim uslovima [44].

Limit kvantifikacije je definisan kao najmanja koncentracija analita koja može biti određena sa prihvatljivom preciznošću i tačnošću pod datim eksperimentalnim uslovima. Kod metoda određivanja, RSD određivanja analita za rastvore u koncentracijama limita kvantifikacije treba da manja od 20 %, dok su Recovery vrednosti obično u opsegu 80 – 120 %.

Kod analitičkih metoda određivanje limita detekcije i limita kvantifikacije može se izvoditi na nekoliko načina:

1. vizuelno, obično za ne-instrumentalne metode
2. određivanjem odnosa signal/šum, poređenjem signala uzoraka niskih koncentracija sa signalom blanko uzoraka (opšte prihvaćen odnos je 3 : 1, za limit detekcije i 10 : 1 za limit kvantifikacije)
3. izračunavanjem standardne devijacije odgovora detektora (SD) i nagiba kalibracione krive (a) iz sledećeg izraza:

$$LD = \frac{3 \cdot SD}{a} \quad (22)$$

$$LQ = \frac{10 \cdot SD}{a} \quad (23)$$

Standardna devijacije se u ovim izrazima može izračunati:

- merenjem signala pogodnog broja blanko uzorka i određivanjem standardne devijacije
- konstruisanjem kalibracione krive upotrebljavajući uzorke koji sadrže analit u oblasti QI; može se upotrebiti rezidualna standardna devijacija ili standardna devijacija y-preseka

Kod metoda određivanja limit detekcije i limit kvantifikacije obično nisu zahtevani parametri, mada je poželjno odrediti ih kod testova rastvorljivosti i disolucionih profila.

Stabilnost rastvora, definiše vreme za koje su rastvori koji se koriste u metodi stabilni. Eksperimentalno se proverava tako što se primenom metode koja se validira uradi analiza

propisanih ispitivanih rastvora. Ispitivani i standardni rastvori se zatim analiziraju istom metodom unapred utvrđenom dinamikom u odnosu na sveže pripremljeni standardni rastvor. Uslovi čuvanja rastvora čija se stabilnost prati moraju biti definisani. Kod metoda određivanja i kod testova rastvaranja, rastvori su stabilni ukoliko procenat promene sadržaja analita u odgovarajućem rastvoru u datom vremenskom intervalu nije veći od 2,0 % ili ukoliko su *recovery* vrednosti u intervalu 98 – 102 %.

Pogodnost sistema definiše se kod hromatografskih metoda i baziran je na konceptu da oprema, elektronika, analitičke operacije i uzorci za analizu čine jedan integralni sistem i kao takav može da se procenjuje. Parametri kojima se ispituje pogodnost hromatografskog sistema mogu biti reproduktivnost, *tailing* faktor, rezolucija, faktor kapaciteta, broj teorijskih podova, faktor simetrije pika itd. Eksperimentalno se proverava tako što se primenom odgovarajuće metode koja se validira, odgovarajući rastvor (standardni ili rastvor za ispitivanje pogodnosti sistema) injektuje a zatim se izračunavaju odgovarajući parametri.

2.8. METODE ODREĐIVANJA KARVEDILOLA

Za određivanje koncentracije karvedilola u biološkim fluidima (krv, plazma i serum) razvijene su nekoliko hromatografskih metoda [48-62]. Veći broj tih metoda fokusiran je na separaciji enantiomera [51-55]. U literaturi se takođe mogu naći podaci o primeni HPLC metoda pri određivanju karvedilola u dozirnim oblicima [63] i pri ispitivanju njegove brzine rastvaranja iz formulacija (dissolution test) [62].

Imran et al. [64] razvili su *stability-indicating* UV spektroskopsku metodu. Galanopoulou et al. [65] razvili su i validirali novu HPLC metodu za istovremeno određivanje karvedilola i njegovih nečistoća, kao i drugih degradacionih proizvoda. U literaturi postoje podaci o praćenju fotohemijske stabilnosti proizvoda Karvileksa (Zdravlje-Aktavis, Leskovac) primenom dugotrajnih metoda [9]. Procenat degradacionih proizvoda meren je svakog 20-og dana u periodu od 100 dana.

M. Rizwan et.al. razvijenu *stability-indicating* LC metodu primenili su za proučavanje kinetike degradacije karvedilola, koja je vršena u skladu sa propisima ICH regulative [66]. Ispitivani proizvod izlagan je dejstvu sunčeve svetlosti (72 h) i UV zraka na talasnoj dužini od

254 nm u periodu od 3h. Dobijeni rezultati pokazali su da je karvedilol relativno foto stabilno jedinjenje.

U skladu sa zahtevima GMP-a, koji imaju za cilj obezbediti pacijentu takav lekoviti preparat koji će osigurati sprovođenje racionalne-efikasne, bezbedne i ekonomične farmakoterapije, u radu vršiće se: optimizacija formulacije u pogledu profila brzine rastvaranja karvedilola primenom eksperimentalnog dizajna, pratiti stabilnost tableta u pogledu sadržaja aktivne supstance pri uslovima ubrzanog starenja ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \text{ RH} \pm 5\%$ i nakon izlaganja dnevnoj svetlosti i UV/VIS zračenju), identifikacija i određivanje degradacionih proizvoda primenom modifikovane *stability-indicating* RP-HPLC metode. Primenom dissolution UV/VIS spektrofotometrijske metod određivaće se profil brzine rastvaranja aktivne supstance, a kinetika procesa rastvaranja karvedilola odrediće se primenom različitih matematičkih modela: model nultog reda, model prvog reda itd. Takođe, ispitiivaće se uticaj različitih materijala primarne ambalaže, kao i doze zračenja na stabilnost tableta Karvileksa (Zdravlje-Actavis, Leskovac). Nakon zračenja, sadržaj aktivne supstance karvedilola u ispitivanim uzorcima biće određivan upotrebom *stability-indicating* RP-HPLC metode.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. STANDARDNE SUPSTANCE, UZORCI I REAGENSI

Standardne supstance. Standardna supstanca karvedilol dobijena je od NOSCH-a Labs Private Limited, Indija. Standard nečistoće C nabavljen je od Merck-a, Darmstadt, Nemačka.

Ispitivani uzorci. Karvileks tablete (ZDRAVLJE-Actavis, Leskovac, Srbija). Tableta kao aktivnu supstancu sadrži karvedilol u količini od 12,5 mg. Od pomoćnih materija prisutni su: laktoza monohidrat, koloidni silicijum dioksid, polivinil pirolidon (PVP K30) (BASF, Germany), krosповidon (ISP Chemical, USA), magnezijum stearat. Kao referentni proizvod korišćene su Dilatrend tablete (F. Hoffmann-La Roche, Švajcarska).

Reagensi

- Acetonitril, HPLC grade, MERCK, Nemačka
- Metanol, HPLC grade, MERCK, Nemačka
- Destilovana voda, Stedim Biotech sistem za vodu, SARTORIUS AG, Nemačka.
- Citratni pufer pH 4,5.
- Fosfatni pufer pH 2.

Korišćeni hemijski reagensi bili su *p.a.* stepena čistoće.

Eksperimentalni dizajn u razvoju i optimizaciji pripreme proizvoda

Primenom ED utvrđeni su faktori formulacije koji imaju značajni uticaj na proces oslobađanja karvedilola iz njih. Za ova ispitivanja primenjen je model eksperimentalnog dizajna sa 2^3 nezavisno promenljivim faktorima: količina sredstva za vezivanje-PVP K-30 (X_1), količina sredstva za raspadanje-krosповidon (X_2) i sila komprimovanja (X_3). U toku ispitivanja pripremljena je jedna serija sa po osam formulacija. Sastav izrađenih formulacija, kao i vrednosti nezavisno promenljivih modela eksperimentalnog dizajna, prikazani su u Tabeli 2 i 3.

Tabela 2. Sastav ispitivanih formulacija karvileks tableta

Komponente (mg)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Karvedilol	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
PVP K-30	6,00	6,25	6,00	6,25	6,00	6,25	6,00	6,25
Krospovidon	3,75	3,75	5,63	5,63	3,75	3,75	5,63	5,63
Laktoza	94,75	94,50	92,88	92,63	94,75	94,50	92,88	92,63
Magnezijum stearat	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Silicijum dioksid	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6

Tabela 3. Izabrani faktori i njihovi nivoi

Faktor	Nivoi	
	Niži (-)	Viši (+)
X ₁ : sadržaj PVP K30 (%)	4,8	5,0
X ₂ : sadržaj Krospovidona (%)	3,0	4,5
X ₃ : čvrstina tableta (N)	50	70

Kombinacije nezavisno promenljivih faktora primenjenog ED prokazane su u Tabeli 4.

Tabela 4. Eksperimentalni dizajn

Redni broj eksperimenta	X ₁	X ₂	X ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Matriks tableta je pripremljen vlažnom granulacijom korišćenjem PVP K30:voda (2:1) kao vezivnog rastvarača, laktoze kao punioca, i smeše silicium-dioksida i magnezium stearata kao sredstva za klizanje i lubrikansa. Krospondon je korišćen kao sredstvo za raspadanje. Količina laktoze kao sredstva za dopunjavanje menjana je u cilju dobijanja standardne specificirane mase tableta.

Sastojci tableta su precizno odmereni i prosejani kroz sito od 0,8 mm radi dobijanja uniformnih po veličini čestica, a zatim mešani geometrijski 5 do 10 min. Granulacija je rađena rastvorom PVP K30 u dovoljno vode. Granule sušene su toplim vazduhom u propisanoj sušnici na 40 °C. Sušenje granula zaustavljeno je nakon postizanja vrednosti LOD - gubitak sušenjem u intervalu od 1 do 3%, merenom nakon sušenja granulata u sušnici na 105 °C. Osušena granule su prosejane kroz sito veličine pora od 1 mm, i kompresovane na mašini za tabletiranje radi dobijanja tableta prečnika $7,0 \pm 0,1$ mm i debljine $2,6 \pm 0,2$ mm.

Procenat rastvorenog karvedilola (Y_1) nakon 10 min, kao zavisno promenljiva, meren je za svaku formulaciju. Dobijeni rezultati mogu se fitovati prema različitim jednačinama kao što su:

- linearna ($Y_1=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3$),
- konverzionna ($Y_1=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3\dots$) i
- kvadratna ($Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3\dots+b_{11}X_1^2$),

gde je: Y_1 odziv, b_0 odsečak, b_1 glavni koeficijent, a b_{xy} interakcioni koeficijent.

Design-Expert softver (verzija 7.1.6, Stat-Ease Inc., USA) korišćen je za statističku obradu podataka.

Farmaceutsko-tehnološki postupci ispitivanja

Raspadljivost tableta

Ispitivanje je izvedeno na aparatu za raspadanje tableta ERWEKA ZT 301 sa 6 uzorka originalno izrađenih tableta u vodi na temperaturi od 37 °C.

Brzina rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog oblika (Dissolution test)

Za izvođenje ovog testa korišćena je aparatura za test rastvorljivosti (tip USP I), Erweka DT700LH, Nemačka. Kao rastvarač upotrebljen je citratni pufer pH 4,5, degaziran 30 min na ultrasoničnom kupatilu (po 1000 cm³ u svim slučajevima). Temperatura rastvarača je podešena na 37,0 ± 0,5°C, a brzina rotiranja je 75 obrtaja / min. Uzorci rastvora (10 cm³) filtrirani su kroz kvantitativni filter papir, plava traka. Nakon filtriranja, na UV VIS spektrofotometru na talasnoj dužini od 285 nm, u sloju od 1 cm, izmere se apsorbance standardnog i ispitivanih rastvora, prema citratnom puferu kao slepoj probi. Profil rastvaranja je konstruisan od uzoraka nakon 10, 20, 30 i 60 min.



Standardni rastvor karvedilola ($c = 0,0125 \text{ mg cm}^{-3}$): Odmeri se 12,5 mg standardne supstance karvedilola (radni standard), prenese se u normalni sud od 100 cm³, doda se 10 cm³ metanola (p.a.), meša se do potpunog rastvaranja (po potrebi tretirati na ultrazvučnom kupatilu 5 min) i dopuni se citratnim puferom do crte. 10 cm³ ovog rastvora prenese se u normalni sud od 100 cm³ i dopuni se citratnim puferom do crte.

Ispitivani rastvor: U svih 6 čaša aparata stavi se 1000 cm³ citratnog pufera i u termostatskom uređaju zagreje se do 37 ± 0,5°C. Kada je postignuta temperatura u svaku čašu stavi se po jedna tableta, urone se lopatice i uključi uređaj za mešanje. Nakon 30 min, iz svake čaše, iz središnje zone, koja se nalazi na polovini između površine medijuma i dna lopatice, plastičnim špricom uzme se 10 cm³ rastvora, profiltrira se kroz filter veličine pora 0,45 μm i odbace se prvi mililitri filtrata. Dobijeni filtrati su ispitivani rastvori.

Na spektrofotometru na talasnoj dužini od 285 nm, u sloju od 1 cm, izmere se apsorbance standardnog rastvora i ispitivanih rastvora, prema citratnom puferu kao prema slepoj probi.

Variranje mase jednodoznih preparata

Pojedinačno se odmere 20 slučajno odabranih tableta, i izračuna prosečna masa, koja ne sme odstupati više od dozvoljenog procenta odstupanja, koji su navedeni u Tabeli 2.9.5-1 Ph. Jug. V.

Ujednačenost sadržaja lekovite supstance u jednodoznim preparatima

Sadržaj karvedilola u 10 dozirnih jedinica izračunat je upotrebom validirane HPLC metode. Nađeni sadržaj aktivnih supstanci, mora biti u skladu sa granicama navedenih u testu A (Ph. Jug. V).

Friabilnost neobloženih tableta

Friabilnost je ispitivana na aparatu za ispitivanje friabilnosti (Erweka TDR 100, Nemačka). Za analizu su korišćene 20 tableta analogno farmakopejskom propisu.

Čvrstina tableta

Ispitivanje čvrstine tableta vršeno je na aparatu Monsanto-Multicheck, Nemačka, koji je prethodno kalibrisan u skladu sa propisom farmakopeje.



HPLC analiza za određivanje sadržaja karvedilola. Hromatografija je izvedena na LiChrosorb Si 60, 7 μm , 250 x 4,6 mm koloni, MERCK, Nemačka. Detektor je podešen na 280 nm, temperatura kolone na 20°C, a binarna pumpa na protok od 2,0 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. Mobilna faza je sastava 0,005 M CH_3COON_a u metanolu, 1,4 dioksana i sirćetne kiseline (88:10:2, v/v). pH mobilne faze je podešen na 4,0 sa sirćetnom kiselinom. Injektira se po 20 μl uzorka putem autosamplera. Za izračunavanja se koristi površina pika karvedilola.

HPLC analiza za praćenje stabilnosti

Praćenje fotostabilnosti preparata Karvileksa, kao i ispitivanje njegovog stepena čistoće, vršeno je prema propisima Ph. Eur. 5.

Aparatura i hromatografski uslovi

Hromatografska analiza vršena je na RP-HPLC sistemu Agilent 1200 Series, Agilent, Waldbronn, Nemačka, sa DAD detektorom modela G 1315D, Agilent, Waldbronn, Nemačka. Injektirana zapremina uzorka je 20 μl . Razdvajanje aktivne supstance od nečistoća vršeno je na temperaturi od 20 °C pomoću octylsilyl silica kolone (4,6 x 100 mm, 5 μm). Mobilna faza dobija se rastvaranjem 1,77 g KH_2PO_4 u 650 cm^3 vode i podesi pH ovog rastvora na 2 sa koncentrovanom orto-fosfornom kiselinom. U ovaj rastvor doda se 350 cm^3 acetonitrila.

Svi rastvarači su prethodno profiltriraju kroz filter sa veličinom pora od 0,45 μm. Protok mobilne faze je 1 cm³ min⁻¹. Talasna dužina na kojoj su detektovani pikovi je 240 nm.

Očekivano retenciono vreme karvedilola je 4,5 min, a retenciona vremena nečistoća su: 0,6 za nečistoću A, 3,5 za nečistoću C i 6,7 za nečistoću B retencionog vremena karvedilola.

Priprema uzorka standarda i preparata za praćenje fotostabilnosti

Standardni rastvor karvedilola. 12,5 mg standardne supstance karvedilola rastvori se u odmernom sudu od 10 cm³ u mobilnoj fazi uz mešanje u ultrazvučnom kupatilu tokom 15 min. Odmerni sud se dopuni mobilnom fazom do crte. 1 cm³ ovog rastvora prenese se u odmerni sud od 10 cm³ i dopuni mobilnom fazom do crte. Rastvor se profiltrira kroz membranski filter promera pora 0,45 μm. 1 cm³ rastvora sadrži 0,125 mg karvedilola.

Rastvori za kalibraciju. Serija pet standardnih rastvora karvedilola, različitih koncentracija, dobijena je razblaživanjem standardnog rastvora karvedilola koncentracije 0,125 mg cm⁻³ mobilnom fazom. Koncentracije dobijenih rastvora su u opsegu od 0,006 do 0,125 mg cm⁻³.

Rastvori standarda za određivanje nečistoća. Odgovarajuća količina standardnih supstanci prenese se u odmerni sud, a potom dopuni do merne oznake mobilnom fazom. Koncentracije dobijenih rastvora su: 0,005 mg cm⁻³ za karvedilol u referentnom rastvoru A, i 0,0001 mg cm⁻³ za nečistoću C u referentnom rastvoru C.

Formule za preračunavanje sadržaja nečistoća:

$$\% \text{ neč. A} = 2 \times A \text{ isp.rra (koji se odnosi na neč.A)} \times 0,5 / 2 \times A_{st} \quad (24)$$

$$\% \text{ neč. C} = A \text{ isp.rra (koji se odnosi na neč.C)} \times 0,05 / 10 \times A_{stc} \quad (25)$$

$$\% \text{ ostale nečistoće} = A \text{ isp} \times 0,5 / A_{st} \quad (26)$$

gde je:

A_{st} - površina pika karvedilola u referentnom rastvoru A

A_{stc} - površina pika nečistoće C u referentnom rastvoru C

Priprema uzorka preparata Karvileksa za određivanje sadržaja. Nakon zračenja fino se sprai 20 tableta i količina dobijenog praha koja odgovara masi jedne tablete prenese se u odmerni sud od 100 cm³. Dobijeni rastvor ubaci se u ultrazvučno kupatilo i sonifikuje 15 min. Nakon toga, dobijeni rastvor se profiltrira kroz kvalitativni filter papir (plava traka), a zatim kroz membranski filter 0,45 µm. 1 cm³ ovog rastvora prenese se u odmerni sud od 10 cm³ i dopuni mobilnom fazom do crte. Kao reper pri praćenju uticaja primarne ambalaže na fotostabilnost Karvileksa, koristi se neozračeni uzorak tableta.

Priprema uzorka preparata Karvileksa za određivanje nečistoća. Nakon zračenja fino se sprai 20 tableta. Tabletni prah koji sadrži 25 mg aktivne supstance karvedilola prenese se u odmerni sud od 25 ml, doda se 20 ml mobilne faze i tretira 15 minuta u ultrasoničnom kupatilu. Odmerni sud se dopuni mobilnom fazom do crte i filtrira kroz filter papir (plava) traka.

Dobijeni filtrirani rastvor je ispitivani rastvor.

Validacija HPLC metode. Metoda za određivanje sadržaja karvedilola je validirana u skladu ICH Q2(R1) uputstvom u cilju određivanja specifičnosti, linearnosti, tačnosti, preciznosti i osetljivosti metode [67].

Primarna ambalaža. U radu su proučavana dva različita tipa primarne ambalaže u kojima su bile upakovane tablete Karvileksa. Prvi tip ambalaže je plastični neprovidni kontejner od PVC-a, a drugi tip su blister pakovanje (crvene i bele boje), koja su izrađena od polivinilhlorida i aluminijske folije (PVC/Al).

Sekundarna ambalaža. U radu je ispitivan i uticaj sekundarne ambalaže-kartonska kutija u kojoj je smešteno primarno originalno pakovanje-blister crvene boje.

Studije fotostabilnosti. U saglasnosti sa CPMP/ICH/279/95 reegulativom, za praćenje fotohemijske stabilnosti preparata Karvileksa, analizirane tablete smeštene su u komoru za stabilnost, (Weiss-Galenkamp PSC062.AHX.C, Nemačka) i izložene dejstvu različitih talasnih dužina (254 i 540 nm), kao i jačini (za UV: 200, 400 i 1000 W sati/m²; za VIS 1,2; 2,4 i 6 milion lux sati) i dužina zračenja (3,5; 7 i 17 dana) na 25 °C (Tabela 5). Kontrolni uzorak, koji je zaštićen od dejstva svetlosti, takođe je stavljen u u komoru za stabilnost. Nakon uklanjanja iz komore, uzorci su za dalju analizu pripremljeni kao što je opisano u deo za pripremu preparata Karvileksa za HPLC analizu.

Tabela 5. Vrednosti primenjene jačine i dužine UV i VIS zračenja

Vrsta doze	Jačina doze	Dužina zračenja (dan)
UV		
I	200 W sati/m ²	3,5
II	400 W sati/m ²	7
III	1000 W sati/m ²	17
VIS		
I	1,2 miliona lux sati	5,4
II	2,4 miliona lux sati	10,7
III	6 miliona lux sati	27

Primena ED u studijama fotostabilnosti. Za proučavanje uticaja primarne ambalaže na fotostabilnost Karvileksa, izvedena su 8 eksperimenata. Vrednosti zavisno i nezavisno promenljivih faktora ED prikazani su u Tabeli 6. Statistička analiza dobijenih podataka vršena je primenom Design-Expert softvera (versija 7.1.6, Stat-Ease Inc., USA).

Tabela 6. Vrednosti zavisno i nezavisno promenljivih faktora

Eksp.	X_1 nm	X_2 dan	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
				Sadržaj karvedilola (%)	Sadržaj nečistoće A (%)	Sadržaj nečistoće B (%)	Sadržaj nečistoće C (%)
1	254	3,5	crveni blister	92,1	0,09	0	0,04
2	540	3,5	crveni blister	94,6	0,08	0	0,04
3	254	17	crveni blister	87,4	0,401	0	0,173
4	540	17	crveni blister	90,3	0,362	0,059	0,183
5	254	3,5	plastičan kontejner	95,8	0,08	0	0,03
6	540	3,5	plastičan kontejner	98,7	0,07	0	0,04
7	254	17	plastičan kontejner	90,2	0,371	0	0,132
8	540	17	plastičan kontejner	95,8	0,309	0,049	0,176

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. OPTIMIZACIJA FORMULACIJE KARVILEKS TABLETA

Pored poznavanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja same aktivne komponente, sa farmaceutsko-tehnološkog i biofarmaceutskog aspekta, poseban značaj ima i brzina rastvaranja lekovite supstance iz farmaceutskih preparata. Ispitivanje brzine rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog oblika predstavlja korisno sredstvo za procenu lekovitih preparata kako u fazi razvoja formulacije, tako i u kontroli kvaliteta. Osim toga što treba da pokaže da li je brzina rastvaranja lekovite supstance iz ispitivanih preparata u skladu sa farmakopejskim zahtevima, kao i da ukaže na promene do kojih je došlo u toku stajanja preparata, ovo ispitivanje je osmišljeno sa ciljem da omogući predviđanje brzine procesa rastvaranja lekovite supstance iz lekovitog preparata u organizmu, nakon njegove primene *in vivo*.

Dobijena vrednost za brzinu rastvaranja karvedilola od 59,24% u 10 min iz proizvoda Karvileks sastava koji odgovara formulaciji F6, ukazuje da ispitivani proizvod nije u skladu sa farmakopejskim zahtevima.

U skladu sa zahtevima GMP-a, koji imaju za cilj obezbediti pacijentu takav lekoviti preparat koji će osigurati sprovođenje racionalne-efikasne, bezbedne i ekonomične farmakoterapije, neophodno je izvršiti optimizaciju formulacije u pogledu profila brzine rastvaranja karvedilola, kod koje će % oslobođenog karvedilola biti veći od 80% nakon 10 min [68].

Radi ispitivanja uticaja faktora formulacije na brzinu rastvaranja karvedilola iz tableta Karvileksa primenjen je eksperimentalni dizajn sa 2^3 nezavisno promenljivim veličinama: količina sredstva za vezivanje - PVP K-30 (X_1), količina sredstva za raspadanje - krospondon (X_2) i sila komprimovanja (X_3), dok je procenat rastvorenog karvedilola (Y_1) nakon 10 min uzet kao zavisno promenljiva.

Za određivanje procenta rastvorenog karvedilola iz Karvileks tableta validirana je nova UV spektrofotometrijske metoda u saglasnosti sa ICH Q2B regulativom.

Parametri validacije za određivanje % rastvorenog karvedilola bazirani su na sledećim kriterijumima prihvatljivosti:

- Specifičnost: Spektar rastvora placeba ne treba da pokazuje interferirajuću apsorpciju na datoj talasnoj dužini od 285 nm.

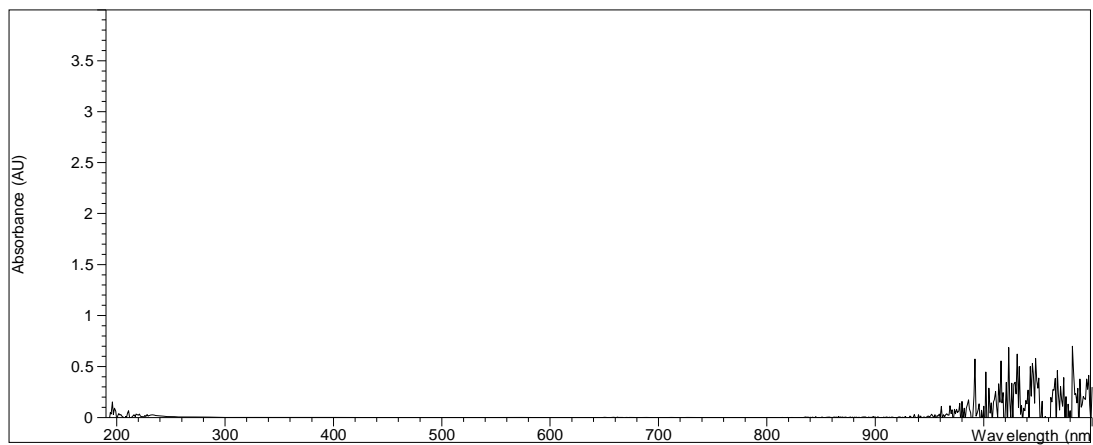
- Linearnost (50–120 % za $n = 6$): koeficijent korelacije (r) je veći od 0,998.
- Preciznost – ponovljivost: RSD dobijen iz 12 rastvora ne prelazi 4,0 %.
- Intermedijerna preciznost: razlika između srednjih vrednosti za različite uslove je manja od 5,0 %.
- Tačnost: Recovery vrednosti za placebo opterećene uzorke (pri 50,75, 100 i 120 % koncentracije), treba da budu u oblasti 95,0 – 105,0 %.
- Stabilnost rastvora: promena sadržaja u ispitivanim rastvorima <1,5 % u odnosu na inicijalni sadržaj.

Specifičnost. Za demonstriranje specifičnosti, pripremljeni su sledeći uzorci u 1000 cm³ rastvarača:

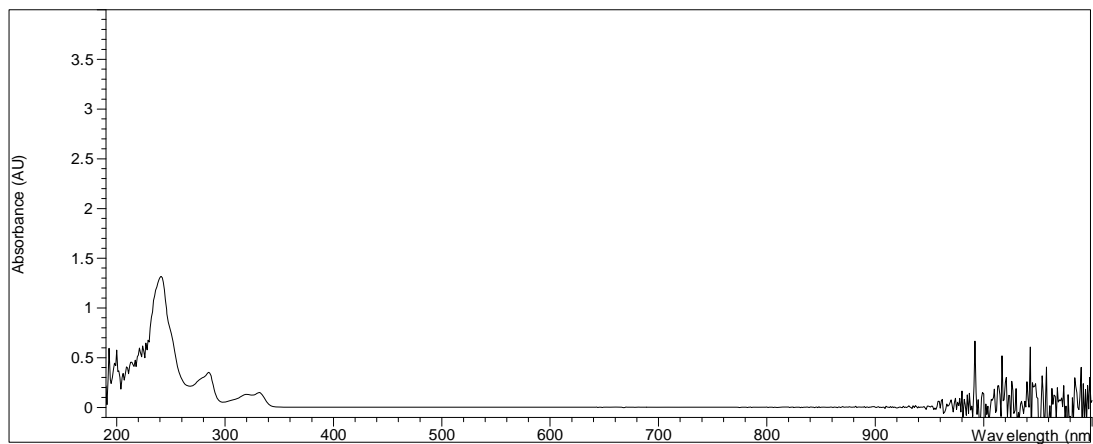
- Rastvor placeba (smeša PVP K30, kros повідona, laktoze, koloidnog, anhidrovanog silicijum dioksida i magnezijum stearata) u količini koja odgovara jednoj tableti ($c=0,1075 \text{ mg cm}^{-3}$).
- Karvedilol radni standard ($c=0,0125 \text{ mg cm}^{-3}$)
- Ispitivani rastvor, za Karvileks tablete ($c = 0,0125 \text{ mg cm}^{-3}$)

Reprezentativni spektri su prikazani na Slici 3.

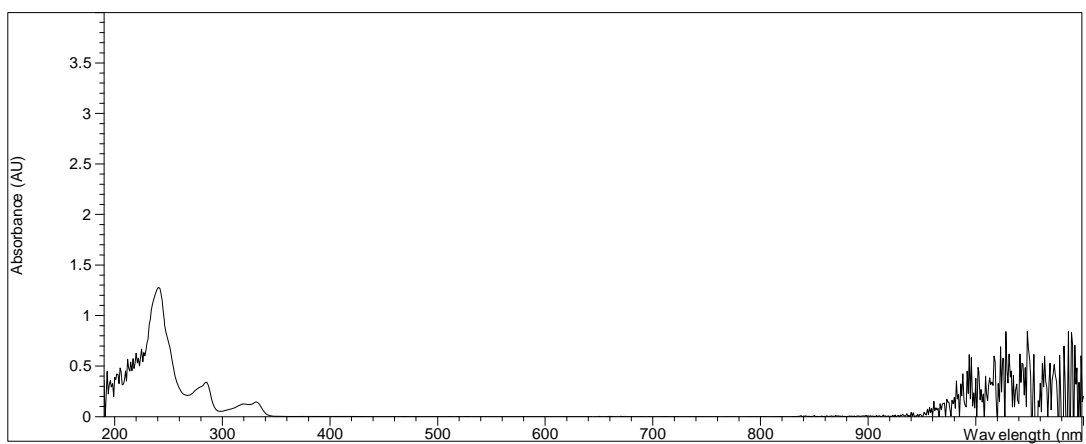
Ispitivani i standardni rastvor pokazuju apsorbciju na 285 nm. Kako spektar rastvora placeba ne pokazuje interferirajuću apsorbciju na datoj talasnoj dužini od 285 nm, metoda je selektivna za određivanje karvedilola u prisustvu ekscipijensa.



(a)



(b)

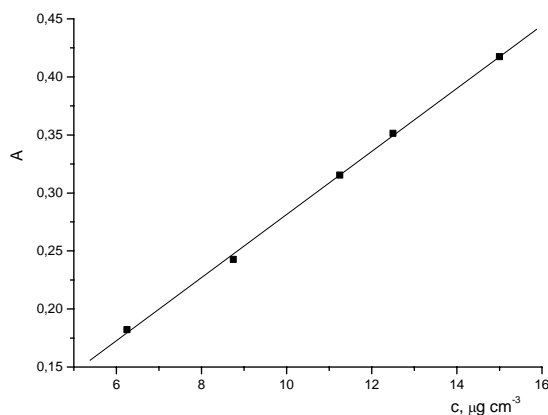


(c)

Slika 3. Spektri placebo rastvora (a), standardnog rastvora (b) i ispitivanog rastvora (c)

Linearnost. Nominalna koncentracija karvedilola nakon testa rastvaranja, uzimajući potpuno rastvaranje, je oko $12,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ (12,5 mg karvedilola po tableti u 1000 cm^3 rastvarača). Zavisnost apsorbance karvedilola od koncentracije standardnih rastvora potvrđena je u oblasti 50-120%, što odgovara koncentracijama karvedilola od $6,25\text{-}15,0 \mu\text{g cm}^{-3}$ (Sl. 4). Standardna kalibraciona kriva pripremljena je od 5 standardnih rastvora i dobijena je sledeća regresiona jednačina

$$y = 0,02719x + 0,00950 \quad (27)$$



Slika 4. Karvedilol – linearnost

Koeficijent korelacije (r) je 0,9995, što indicira funkcionalnu zavisnost između koncentracije i površine pika karvedilola.

Preciznost. Za proveru ponovljivosti test rastvaranja je izveden kako je opisano ranije. Iz svake od dvanaest čaša uzet je uzorak i analiziran. Izračunat je % rastvorenog karvedilola. Za procenu intermedijerne preciznosti drugi test je izveden od drugog analitičara na istoj proizvodnoj seriji Karvileks tableta, drugog dana uz upotrebu drugog UV/VIS spektrofotometra i aparata za test rastvorljivosti (Tabela 7).

Tabela 7. Rezultati testa ponovljivosti i intermedijerne preciznosti

Koncentracija (%)	% rastvorenog karvedilola	
	Analitičar 1	Analitičar 2
	dan 1	dan 2
50	99,68	104,48
50	100,16	100,64
50	99,20	101,92
75	100,88	99,84
75	101,20	97,12
75	100,24	98,48
100	103,12	97,12
100	103,52	93,68
100	102,48	95,68
120	100,88	103,2
120	100,88	102,24
120	100,72	101,52
Srednja vrednost	101,12	99,68
SD	0,17	0,41
RSD, %	1,31	3,28
RSD, %	2,30	
95 % interval poverenja	100,80– 101,36	97,84 – 101,52

Izračunata RSD vrednost za 12 ispitivana rastvora ne prelazi 4,0%, što ukazuje na činjenicu da je validirana UV metoda odgovarajuće preciznosti.

Tačnost. Za proveru tačnosti metode određivane su *recovery* vrednosti karvedilola iz rastvora koji sadrži 50, 75, 100 i 120 % deklarisanog sadržaja karvedilola i 100 % placeba. Placebo (107,5 mg) i odgovarajuće količine karvedilola tj. 6,25, 9,375, 12,50, 15,0 mg, su dodate u čaše aparata za disoluciju, prethodno napunjene sa po 1000 cm³ rastvarača (po tri čaše za svaki koncentracioni nivo). Nakon rastvaranja rastvori su filtrirani i mereni na spektrofotometru. Izračunate *recovery* vrednosti (Tabela 8) za svih 12 uzoraka na 4 koncentraciona nivoa su u granicama dozvoljenog intervala od 95,0 do 105,0 %.

Tabela 8. Test tačnosti

Uzorak	Određ. konc, $\mu\text{g cm}^{-3}$		Recov.		Određ. konc, $\mu\text{g cm}^{-3}$		Recov.		Određ. konc, $\mu\text{g cm}^{-3}$		Recov.	
	n/a	50 % konc. nivo (6,25 $\mu\text{g cm}^{-3}$)		75 % konc. nivo (9,35 $\mu\text{g cm}^{-3}$)		100 % konc. nivo (12,5 $\mu\text{g cm}^{-3}$)		120 % konc. nivo (15,0 $\mu\text{g cm}^{-3}$)				
1	6,23	99,68	9,46	101,18	12,89	103,12	15,13	100,87				
2	6,26	100,16	9,49	101,50	12,94	103,52	15,13	100,87				
3	6,20	99,20	9,40	100,33	12,81	102,48	15,11	100,73				

Stabilnost rastvora. Proverena je stabilnost karvedilola u standardnom i ispitivanom rastvoru u toku perioda od 24 sati. Tri ispitivana rastvora koja predstavljaju 100% rastvorenog karvedilola iz 12,5 mg karvedilol tableta, su upotrebljena za proveru stabilnosti rastvora. Inicijalna koncentracija karvedilola poređena je sa koncentracijom karvedilola u istim rastvorima nakon 24 sati. Ispitivani rastvori i standardni rastvori su čuvani u bočicama za autosampler na ambijentalnoj temperaturi. Koncentracija u čuvanim rastvorima bila je određena prema sveže pripremljenom standardnom rastvoru. Promena sadržaja za ispitivane rastvore 1-3 manja je od 1,5% posle 24h, čime je potvrđeno da su ispitivani rastvori stabilni 24 sati (Tabela 9).

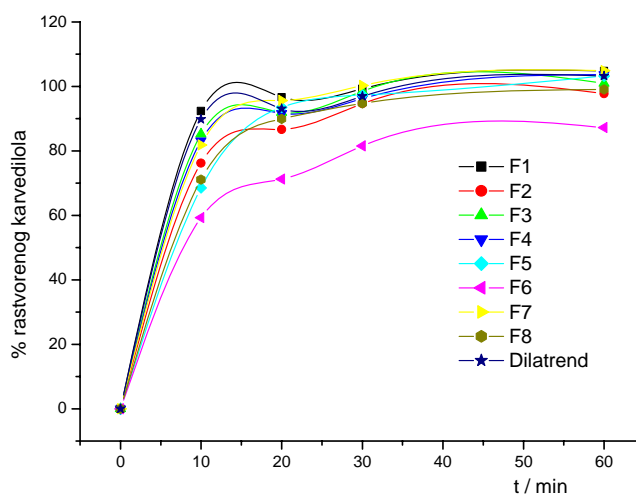
Tabela 9. Stabilnost rastvora karvedilola

Vreme ispitivanja	Uzorak	Konc. rastvora, $\mu\text{g cm}^{-3}$	Razlika u sadržaju, $\mu\text{g cm}^{-3}$	Razlika u sadržaju, %
0 h	standardni	12,50	n/a	n/a
24 h	rastvor	12,50	n/a	n/a
0 h	ispitivani	12,21	n/a	n/a
24 h	rastvor 1	12,14	0,07	0,56
0 h	ispitivani	12,04	n/a	n/a
24 h	rastvor 2	12,06	0,02	0,16
0 h	ispitivani	11,57	n/a	n/a
24 h	rastvor 3	11,72	0,15	1,20

Rezultati primene ED za određivanje profila brzine rastvaranja ispitivanih formulacija i referentnog proizvoda na tržištu prikazani su u Tabeli 10 i Slici 5.

Tabela 10. Profili brzine rastvaranja ispitivanih formulacija F1-F8 i Dilatrend tablete

t, min	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	Dilatrend tablete
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	92,30	76,22	85,20	83,15	68,54	59,24	81,86	71,07	89,78
20	96,61	86,65	91,92	91,57	93,49	71,27	95,64	89,93	93,04
30	99,29	94,66	98,54	96,17	97,28	81,54	100,30	94,77	96,90
60	104,73	97,76	100,94	103,65	103,24	87,21	104,88	99,04	103,20



Slika 5. Dissolution profil karvedilola

Na osnovu dobijenih rezultata, primenom metodologije površine odgovora izračunati su koeficijenti predloženog modela, koji predstavljaju vezu između zavisno i nezavisno promenljivih.

Matematički model prikazan je u obliku jednačine:

$$\% \text{ rastvorenog karvedilola}_{Q_{10}} = 77,20 - 4,78X_1 + 3,12X_2 - 7,02X_3 + 1,57X_1X_2 + 3,16X_2X_3 - 1,94X_1X_2X_3$$

Iz prikazanog matematičkog modela, kao i statističkih podataka dobijenih upotrebom ANOVA testa (Tabela 11), može se zapaziti da su faktori X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 i $X_1X_2X_3$ važni delovi modela ($p < 0,05$), koji imaju značajan uticaj na % rastvorenog karvedilola nakon 10 min u ispitivanim formulacijama.

X_1 , X_2 i X_3 odnose se na % rastvorenog karvedilola nakon 10 min koji se može dobiti promenom samo jednog faktora (zavisno promenljiva), dok X_1X_2 , X_2X_3 i $X_1X_2X_3$ pokazuju promenu sadržaja karvedilola pri promeni dva ili više faktora istovremeno.

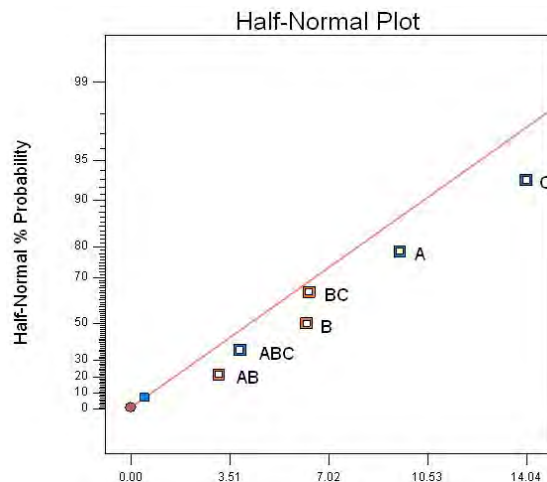
Tabela 11. Rezultati eksperimentalnog dizajna

faktor	df	SS	MS	F vrednost	p vrednost
Model	6	784,74	130,79	272,37	0,0463
X_1	1	182,60	182,60	380,25	0,0326
X_2	1	78,00	78,00	162,43	0,0498
X_3	1	394,24	394,24	821,00	0,0222
$X_1 + X_2$	1	19,66	19,66	40,93	0,0987
$X_2 + X_3$	1	80,14	80,14	166,88	0,0492
$X_1 + X_2 + X_3$	1	30,11	30,11	62,70	0,0800
Residual	1	0,48	0,48		

U slučaju promene samo jedne zavisno promenljive, primenom ANOVA testa (Tabela 11), utvrđeno je da dominantan uticaj na sadržaj karvedilola u preparatu ima čvrstina tableta (X_3)-niži nivo čvrstine tableta daje bolji profil rastvaranja. Faktor sadržaj sredstva za vezivanje (X_1) ima manji uticaj, dok faktor sadržaj sredstva za raspadanje, % (X_2) ima zanemarljiv/nema značajan uticaj u poređenju sa prethodno razmatranim faktorima.

Prilikom istovremene promene dva i tri faktora, najviša vrednost sume kvadrata od 3,16 dobijena je za slučaj X_2X_3 . Ovaj podatak ukazuje na to da je naveća promena % rastvorenog karvedilola u preparatu prilikom istovremene promene sadržaja sredstva za raspadanje i čvrstine tableta.

Grafički metod se sastoji od konstruisanja grafika polunormalne raspodele. U ovom grafiku, neznčajni efekti se nalaze na pravoj liniji i prolaze kroz nulu, dok značajni odstupaju od prave. Interaktivni statistički model prvog reda, kao i grafik, generiše se automatski pri čemu je X_1 -A, X_2 -B i X_3 -C (Sl.6).

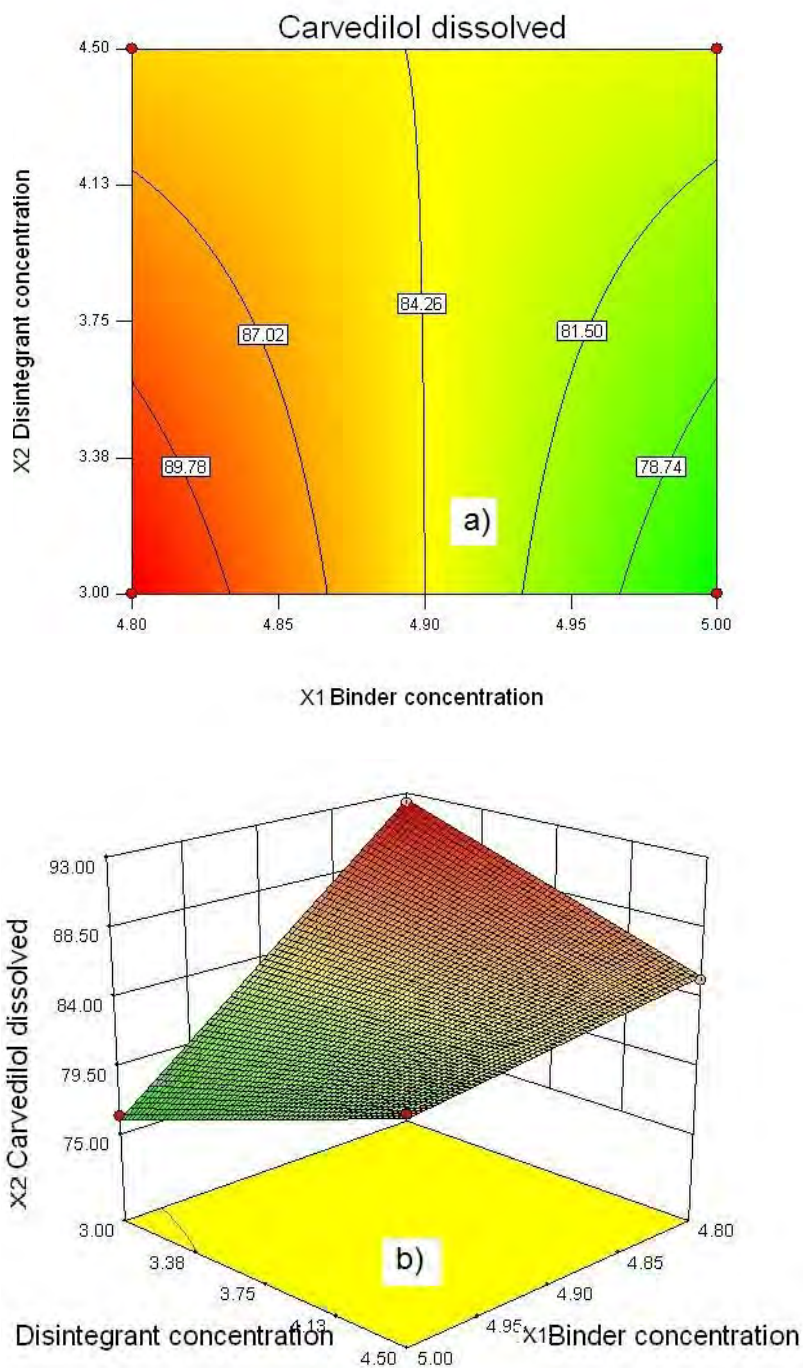


Slika 6. Grafik polunormalne raspodele uticaja sedam efekta na rastvaranje karvedilola

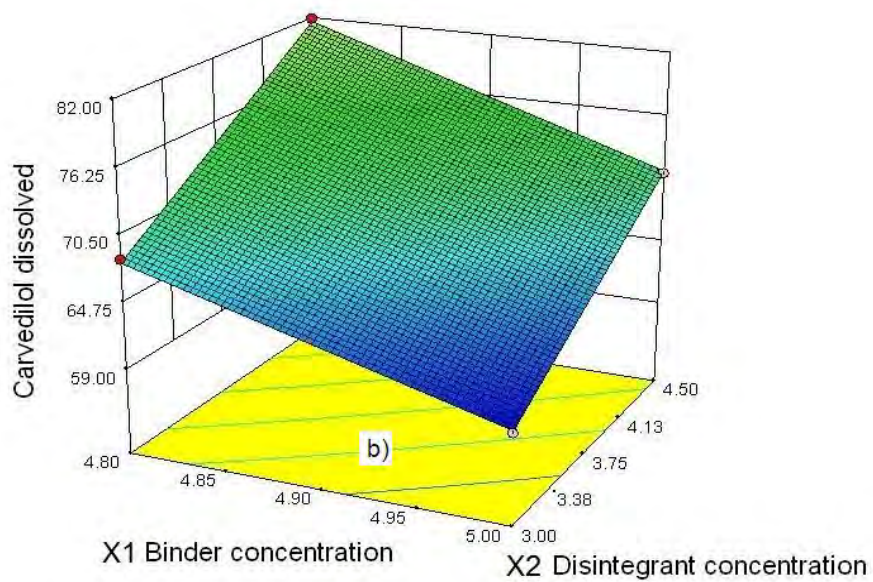
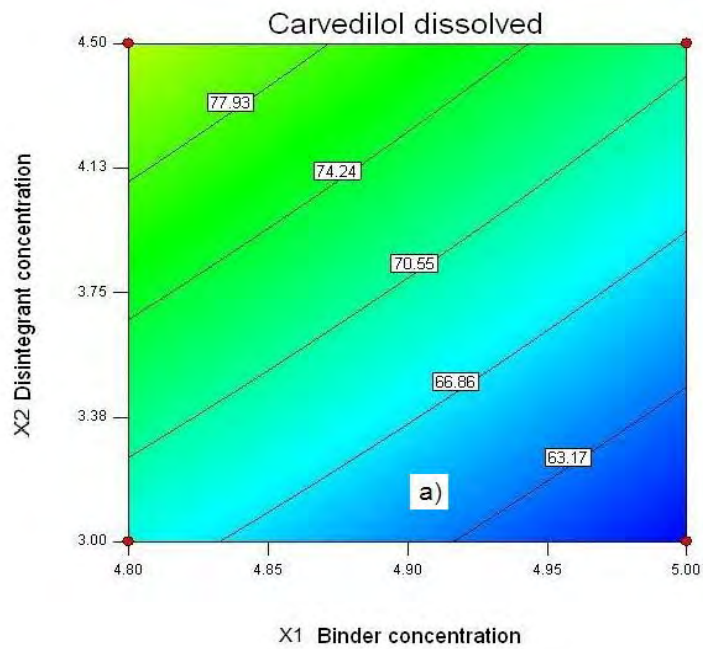
Veza između zavisno i nezavisno promenljivih je prikazana i pomoću 2D i 3D dijagrama (Sl. 7 i 8). Ovi grafici su veoma korisni za ilustraciju uticaja faktora nezavisno promenljivih na promenu sadržaja karvedilola, u ispitivanim formulacijama Karvileksa.

Na dobijenim 2D i 3D dijagramima mogu se uočiti nekoliko zona obojenih različitim bojama. Zone obojene toplijim bojama (od žute ka crvenoj) ukazuju na veći procenat rastvorenog karvedilola nakon 10 min, pri odgovarajućim eksperimentalnim uslovima i dominantnost uticaja nižeg nivoa čvrstine tableta od 50 N.

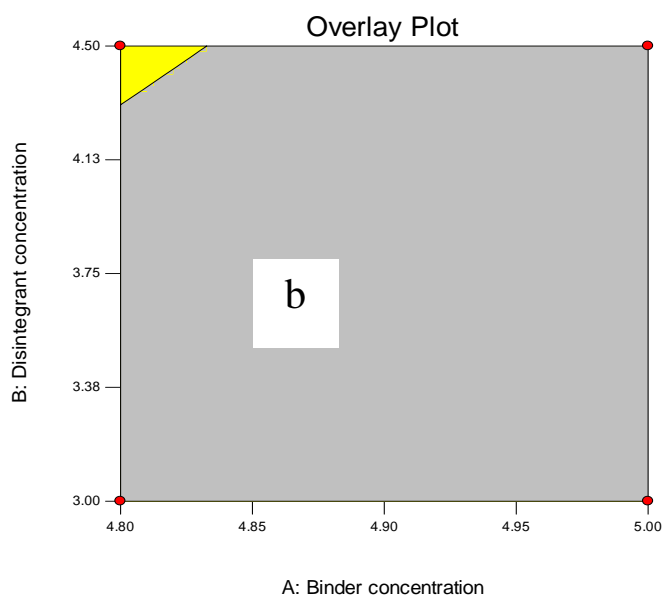
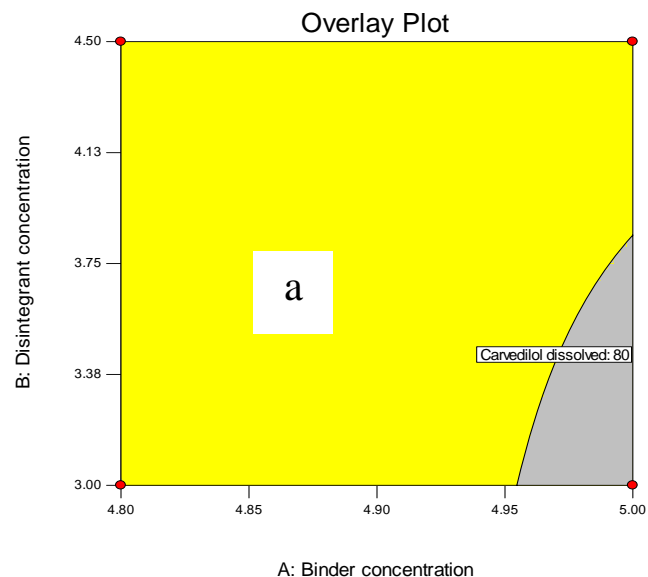
U kontekstu optimizacije primenom Design expert softvera dobijen je dijagram preklapanja u cilju predviđanja optimuma. Dijagram preklapanja pokazuje prihvatljivi region promena nezavisno promenljivih (označen žutom bojom na Slici 9) koji ispunjava zahteve odgovora sistema tj. min. 80% rastvorenog karvedilola nakon 10 min.



Slika 7. Promena rastvorenog karvedilola (%) nakon 10 minuta sa promenom nezavisno promenljivih X_1 i X_2 u slučaju čvrstine tableta od 50 N kao (a) 2D konturnog dijagrama i (b) 3D dijagrama sa površinama odgovora



Slika 8. Promena rastvorenog karvedilola (%) nakon 10 minuta sa promenom nezavisno promenljivih X_1 i X_2 u slučaju čvrstine tableta od 70 N kao (a) 2D konturnog dijagrama i (b) 3D dijagrama sa površinama odgovora



Slika 9. Dijagram preklapanja za min 80 % rastvorenog karvedilola nakon 10 minuta sa promenom nezavisno promenljivih X_1 i X_2 u slučaju čvrstine tableta od 50N (a) i od 70N (b)

Fizičko hemijska karakterizacija ispitivanih formulacija Karvileks tableta

Ispitivane formulacije Karvileks tableta podvrgnute su farmaceutsko-tehnoločkim testovima, koji su vršeni u skaldu sa Ph Jug V. Rezultati fizičko hemijske karakterizacije ispitivanih formulacija prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Fizičko hemijska karakterizacija Karvileks tableta

Formulacija	Ujednačenost mase (mg)	Čvrstina (N)	Friabilnost (%)	Vreme raspadanja (min)	Sadržaj karvedilola (mg)
F1	122,0	50	0,1	3,8	12,71
F2	120,3	50	0,13	4,5	12,48
F3	121,9	50	0,07	3,5	12,53
F4	121,4	50	0,1	3,8	12,58
F5	120,9	70	0,05	7,5	12,68
F6	120,8	70	0,08	9,5	12,39
F7	120,7	70	0,07	7,0	12,42

Masa tableta varirala je od 120,3 mg do 122,0 mg za različite formulacije uz zadovoljavajuću ujednačenost mase tableta. Variranje mase tableta kretalo se u opsegu $\pm 7.5\%$ što je u potpunosti usaglašeno sa zahtevima farmakopeje. Čvrstina tableta različitih formulacija bila je 50 i 70 N u zavisnosti od zahtevane za datu formulaciju. Friabilnost tableta je nađena ispod 1% kod svih formulacija, što ukazuje na dobru mehaničku otpornost tableta.

Sadržaj karvedilola u ispitivanim formulacijama, određen primenom HPLC metode, varirao je u rasponu od 12,39 mg do 12,71 mg ukazujući na dobru ujednačenost sadržaja pripremljenih formulacija. Vreme raspadanja tableta kretalo se u rasponu od 3,7 do 12,5 min za sve formulacije.

Profili brzine rastvaranja karvedilola u formulacijama F1-F4 kod kojih je čvrstina tableta od 50 N pokazali su da je % rastvorenog karvedilola iznosio 92,30; 76,22; 85,20 i 85,15 % nakon 10 min (Tabela 10). Pri razvoju i optimizaciji formulacije, očekivana vrednost brzine rastvaranja treba biti veća od 80% nakon 10 min [68], tako da formulacije F1, F3 i F4 ispunjavaju zadatu vrednost i mogu se smatrati pogodnim formulacija iz ove serije od 4 formulacije.

Profili brzine rastvaranja karvedilola u formulacijama F5-F8 kod kojih je čvrstina tableta od 70 N pokazali su da je % rastvorenog karvedilola iznosio 76,12, 58,42, 86,64 i 79,70 % nakon 10 min (Tabela 10). Formulacije nisu zadovoljile uslov od 80% rastvorenog karvedilola nakon 10 min. Jedino je formmulacija F7 ispunila uslov u pogledu brzine rastvaranja karvedilola i stoga se može smatrati najpogodnijom formulacijom iz ove serije od 4 formulacije.

Razmatrajući rezultate ispitivanja i ostalih parametara tj. friabilnosti, vreme raspadanja i sadržaj karvedilola kao najpogodnija formulacija među svih 8 ispitanih formulacija, izabrana je F3 formulacija.

Kinetika brzine rastvaranja karvedilola iz formulacija

U cilju analize procesa oslobađanja lekovite supstance-karvedilola iz lekovitog oblika (tableta) primenjeni su različiti matematički modeli, kao što su kinetika nultog i prvog reda i *Korsmayer-Peppas-ov* model. Dobijeni podaci takođe mogu ukazati na eventualne uticaje faktora formulacija, procesa proizvodnje ili uslova čuvanja na kinetiku oslobađanja aktivne komponente.

Vrednosti dobijenih podataka u toku ispitivanja količine oslobađanja karvedilola iz formulacija, u ispitivanom medijumu, fitovani su saglasno ovim modelima. Modeli su opisani preko kvadrata koeficijenta korelacije (r^2) i konstante brzine, čije su vrednosti prikazane u Tabeli 12.

Primenom modela kinetike nultog i prvog reda na podatke dobijene za profil oslobađanja lekovite supstance u ispitivanom medijumu, dobijene su vrednosti koeficijenta korelacije ($r^2 < 0,900$), koje su u svim slučajevima odstupale od teorijske vrednosti. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da se profil oslobađanja aktivne supstance ne pokorava modelu kinetike nultog i prvog reda.

Profil oslobađanja leka iz ispitivanih formulacija, našao je najbolje slaganje sa *Korsmayer-Peppas-ovim* modelom, što je potvrđeno vrednostima koeficijenta korelacije čije su vrednosti bile u opsegu od 0,888 do 0,998 za različite formulacije (Tabela 13).

Nakon odabira optimalne formulacije Karvileksa (F3), upoređivan je njen profil rastvaranja sa proizvodom originatorom (Dilatrend, F. Hoffmann-La Roche, Švajcarska). U tom slučaju računat je faktor sličnosti f_2 . Izračunata njegova vrednost od 76,75 koja je veća od teorijske (50), ukazuje da optimalna formulacija Karvileksa F3 ima sličan profil oslobađanja karvedilola, kao i proizvod originator.

Tabela 13. Kinetika procesa oslobađanja karvedilola iz formulacija

Formulacija	Nulti red		Prvi red		Korsmayer model	
	k_0 (mg/min)	r^2	k_1 1/min	r^2	n	r^2
F1	0,235	0,957	0,119	0,968	0,079	0,998

F2	0,387	0,756	0,046	0,935	0,145	0,917
F3	0,289	0,779	0,115	0,928	0,098	0,950
F4	0,379	0,910	0,074	0,998	0,122	0,998
F5	0,457	0,717	0,108	0,986	0,168	0,888
F6	0,525	0,804	0,023	0,903	0,228	0,941
F7	0,326	0,819	0,112	1,000	0,103	0,968
F8	0,341	0,784	0,060	0,997	0,121	0,954

4.2. STUDIJE STABILNOSTI

4.2.1. Studije stabilnosti Kavileks tableta pod uslovima ubrzanog starenja

Cilj ispitivanja stabilnosti farmaceutskog preparata je provera njegovog kvaliteta i određivanje roka trajanja. Priroda pomoćnih materija u tableti može imati uticaja na stabilnost aktivne supstance, zbog hemijske interakcije [69]. Faktori okoline kao što su temperatura, vlažnost i svetlost odgovorni su za neke procese degradacije leka.

U cilju ispitivanja hemijske stabilnosti optimizovana formulacija Karvileks tableta čuvanja je 6 meseci pod uslovima ubrzanog starenja (45°C i 75% RH). Određene vrednosti fizičko hemijskih osobina formulacije F3 prikazane su u Tabeli 14.

Tabela 14. Fizičko hemijske osobine F3 formulacije pod uslovima ubrzanog starenja (45°C i 75 % RH)

Parametri	Vreme (mesec)		
	0	3	6
Čvrstina (N)	48,93 ± 3,17	51,04 ± 4,39	51,32 ± 3,41
Vreme raspadanja (min)	3,50 ± 0,20	4,00 ± 0,10	4,10 ± 0,20

Friabilnost (%)	0,07	0,12	0,14
Sadržaj karvedilola (%)	100,10 ± 1,76	99,80 ± 1,23	99,20 ± 1,65
Nečistoće pojedinačno (%)	0,007	0,03	0,09
Nečistoće ukupno (%)	0,03	0,12	0,37
Q₁₀	85,20 ± 2,84	84,90 ± 1,98	83,02 ± 2,76
Q₆₀	100,94 ± 0,57	97,62 ± 2,43	99,89 ± 1,54

Čvrtina tableta bila je u opsegu $48,93 \pm 3,17$ do $51,32 \pm 3,41$ N, što se može smatrati prihvatljivim za formulaciju tableta. Iako su se nakon izlaganja 6 meseci pod uslovima ubrzanog starenja vrednosti za vreme raspadanja i friabilnost tableta povećavale od $3,50 \pm 0,20$ do $4,10 \pm 0,20$ min, odnosno od 0,07 do 0,14%, tablete su bile u okviru specifikacije kvaliteta zahtevane za ove parametre. Sadržaj karvedilola u tabletama kretao se od $100,10 \pm 1,76$ do $99,20 \pm 1,65\%$, dok je sadržaj nečistoća iznosio maksimalnih 0,09% za pojedinačne i 0,37% za ukupne nečistoće na kraju ubrzane studije stabilnosti.

Rezultati za test rastvaranja za tablete nakon izvedenih eksperimenata u ubrzanju studiji stabilnosti bili su veoma bliski sveže proizvedenim tabletama i više od 80% karvedilola je oslobođeno nakon 10 min (Q_{10}). Blago smanjenje rastvorenog karvedilola nakon 10 min u tačkama ispitivanja 3 i 6 meseci, može se objasniti povećanjem vremena raspadanja tableta. Optimizovana formulacija može se u potpunosti smatrati stabilnom nakon čuvanja pod ubrzanim uslovima starenja tableta.

4.2.2. Studije fotostabilnosti (Ispitivanje fotostabilnosti Karvileks tableta i uticaja pakovanja)

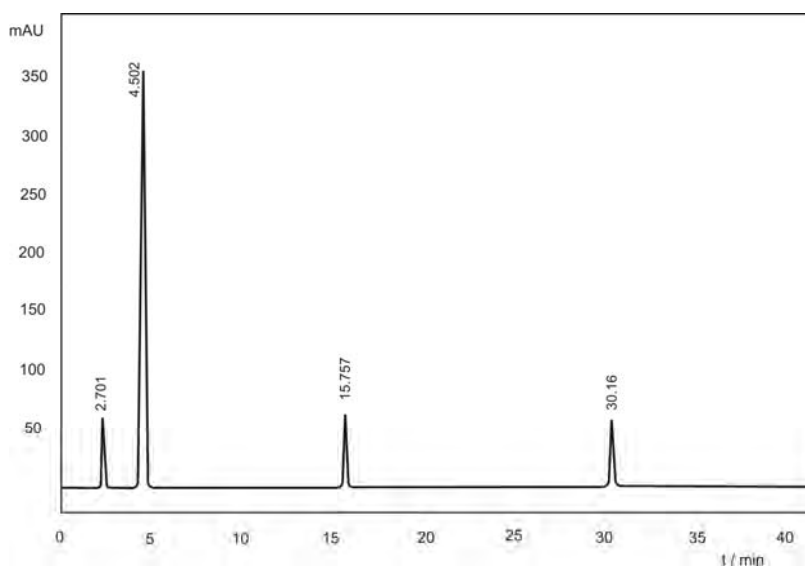
Delovanje svetlosti na lek može imati negativan uticaj na njegov kvalitet, bezbednost i efikasnost farmakoterapije. Iz tih razloga sva istraživanja koja su sprovedena u praci ispitivanja fotodegradacije preparata Karvileksa (Zdravlje Actavis, Leskovac) su opravdana.

U literaturi se mogu naći podaci o praćenju fotohemijske stabilnosti Karvileksa dugotrajnim metodama [69], s obzirom da je preparat čuvan na sobnoj temperaturi, izložen dejstvu prirodne svetlosti. Procenat degradacionih proizvoda meren je svakih 20 do 100 dana. Primenom validirane "nefarmakopejske" RP-HPLC metode identifikovano je prisustvo nečistoće C i "nefarmakopejske" nečistoće 4-hidroksikarbazola, koja potiče još iz procesa sinteze.

Imajući u vidu činjenicu da je karvedilol relativno foto stabilna supstanca, u radu je testiran uticaj različitih materijala primarne ambalaže, kao tip i doze zračenja na stabilnost tableta u skladu sa ICH regulativom.

Radi određivanja sadržaja karvedilola i identifikacije farmakopejskih nečistoća (A, B i C) u ozračenim uzorcima proizvoda Karvileksa, najpre je izvršena validacija modifikovane farmakopejske HPLC metode. Validacija metode sprovedena je u skladu sa ICH regulativom.

Selektivnost. Radi ispitivanja selektivnosti metode, u HPLC sistem injektiran je vodeni rastvor placebo uzorka, koji sadrži samo pomoćne materije. Selektivnost postoji ukoliko na hromatogramu ispitivanog rastvora placebo uzorka nema pikova čija retencionna vremena (t_r) odgovaraju standardima karvedilola i farmakopejskih nečistoća A, B i C. Dobijeni hromatogrami placebo uzorka i smeše standarda karvedilola i njegovih nečistoća prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Hromatogram smeše standarda karvedilola i njegovih nečistoća

Sa dobijenog hromatograma (Sl. 10) na retencionom vremenu od 4,502 min identifikovan je pik karvedilola, dok je na retencionom vremenu od 2,701; 15,757 i 30,16 min identifikovano prisustvo nečistoće A, C i B, respektivno.

Poređenjem retencionih vremena kod dobijenih hromatograma placebo uzorka i ispitivanih standarda, uočeno je da hromatogram placebo uzorka ne sadrži pikove čija retencionna vremena (t_r) padaju u oblast koja odgovaraju smeši standarda. Otuda se može zaključiti da je metoda selektivna za određivanje karvedilola i

njegovih nečistoća u prisustvu ekscipijenasa. Takođe, pogodna za separaciju karvedilola i njenih nečistoća sa faktorom rezolucije većeg od 1,7.

Linearnost. Linearnost metode određena je primenom metode najmanjih kvadrata. Linearna zavisnost između odgovora detektora (površina pika) i koncentracije standarda karvedilola potvrđena je u opsegu od 16 do 24 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Parametri regresione jednačine prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Rezultati validacije HPLC metode

Validacioni parametri		Karvedilol
Linearnost	Nagib (S.E.)	70531 (123,1)
	Y-odsečak (S.E.)	13.708 (54,21 $\times 10^{-3}$)
	<i>r</i>	0,9992
	Student-ov t-test	0,886
Tačnost	Recovery (%)	99,02 \pm 0,35
Preciznost RSD (%)	Ponovljivost	0,681
	dan 1	0,682
	dan 2	0,893
	dan 3	0,991
	Reproduktivnost	1,421
Osetljivost	LOD ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	1,250
	LOQ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	4,125

Tačnost. Tačnost metode procenjena je na osnovu *recovery* vrednosti pri intervalu poverenja od 5% za karvedilol u prisustvu nečistoća A, B i C. Dobijene *recovery* vrednosti u svim ispitivanim slučajevima bile su približne teorijskoj vrednosti (100%), što ukazuje na zadovoljavajuću tačnost metode (Tabela 15).

Preciznost. U skladu sa ICH regulativom, preciznost metode testirana je kroz tri različita nivoa: ponovljivost, srednja preciznost i reproduktivnost. Ponovljivost metode određena je primenom rastvora karvedilola, koncentracije 0.1 $\mu\text{g cm}^{-3}$. Broj ponovljenih merenja bio je 6. Za određivanje srednje preciznosti korišćen je rastvor iste koncentracije, čija je koncentracija određivana u toku 3 dana. Za ispitivanje

reproduktivnosti metode korišćena su dva različita HPLC sistema (Agilent 1200-Series, Agilent, Waldbronn, Nemačka i Agilent 1100-Series, Agilent Technologies, USA). S obzirom da su izračunate RSD (Tabela 15) vrednosti u svim ispitivanim slučajevima manje od teorijske vrednosti (<2%), modifikovana HPLC metoda je odgovarajuće preciznosti.

Izračunate vrednosti LOD i LOQ ukazuju na mikrogramsku osetljivost metode (Tabela 15).

Stabilnost rastvora. Proverena je stabilnost karvedilola u standardnom i ispitivanom rastvoru u toku perioda od 24 sati. Tri ispitivana rastvora koja predstavljaju 100% rastvorenog karvedilola iz 12,5 mg karvedilol tableta, su upotrebljena za proveru stabilnosti rastvora. Inicijalna koncentracija karvedilola poređena je sa koncentracijom karvedilola u istim rastvorima nakon 24 sati. Ispitivani rastvori i standardni rastvori su čuvani u bočicama za autosampler na ambijentalnoj temperaturi. Koncentracija u čuvanim rastvorima bila je određena prema sveže pripremljenom standardnom rastvoru. Promena sadržaja za ispitivane rastvore 1-3 manja je od 1,5% posle 24h, čime je potvrđeno da su ispitivani rastvori stabilni 24 sati (Tabela 16).

U cilju praćenja fotohemijske stabilnosti proizvoda Karvileksa, ispitivane tablete su bile upakovane u plastičnom neprovidnom kontejneru, kao i u blister pakovanjima, crvene i bele boje, koja su izrađena od polivinilhlorida i aluminijumske folije (PVC/Al). Nakon zračenja, sadržaj aktivne supstance karvedilola u ispitivanim uzorcima određivan je upotrebom modifikovane *stability-indicating* RP-HPLC metode.

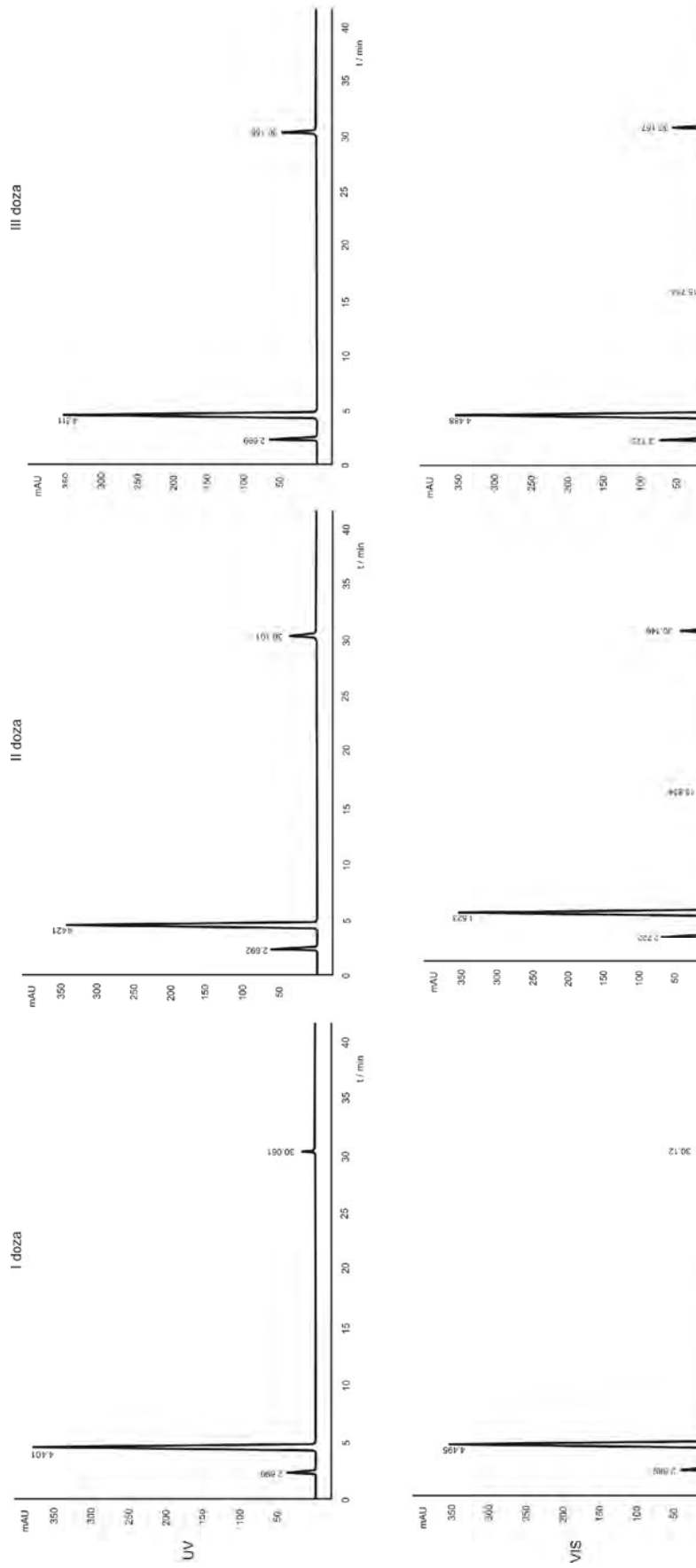
Tabela 16. Stabilnost rastvora karvedilola

Vreme ispitivanja	Uzorak	Konc. rastvora, $\mu\text{g cm}^{-3}$	Razlika u sadržaju, $\mu\text{g cm}^{-3}$	Razlika u sadržaju, %
0 h	standardni	12,50	n/a	n/a
24 h	rastvor	12,46	0,04	0,32
0 h	ispitivani	12,39	n/a	n/a
24 h	rastvor 1	12,43	0,04	0,32
0 h	ispitivani	12,57	n/a	n/a
24 h	rastvor 2	12,49	0,08	0,64
0 h	ispitivani	12,45	n/a	n/a
24 h	rastvor 3	12,51	0,06	0,48

RP-HPLC hromatogrami uzoraka Karvileksa, u crvenom blister pakovanju, dobijenih nakon primene UV i VIS zračenja, različitih doza prikazani su na Slici 11.

Sa hromatograma uzorka preparata Karvileksa identifikovani su pikovi na retencionim vremenima približno ista retencionim vremenima koja odgovaraju standardima karvedilola i nečistoća A, B i C. Prisustvo nečistoća A i C potvrđeno je kod svih uzorka ozračenog preparata, kako UV tako i VIS zracima, različitih dužina zračenja. Pri zračenju preparata UV zracima nije identifikovano prisustvo nečistoće B. Za razliku od UV zračenja, prisustvo nečistoće B, pored nečistoća A i C, potvrđeno je kod uzoraka preparata ozračenih VIS zracima, pri drugoj i trećoj dozi zračenja.

Smanjenje visine pika aktivne supstance (Sl. 11), koja je proporcionalna njenom sadržaju u preparatu, ukazuje na to da se tokom fotodegradacije preparata sadržaj aktivne supstance smanjuje. Za razliku od nje, visine pikova koje potiču od nečistoća se tokom degradacije blago povećavaju, ukazujući da njihov sadržaj u preparatu, u crvenom blister pakovanju, raste.



Slika 11. Hromatogrami ozračenog preparata primenom UV i VIS zračenja, različitim dozama, upakovano u crvenom blisteru

Druga primarna ambalaža u kojoj je upakovan preparat Karvileks i praćena njegova fotostabilnost je blister pakovanje PVC/Al bele boje. Uzorci su podvrgnuti dejstvu UV i VIS zraka, različitih doza, istih kao u prethodnom slučaju. Dobijeni hromatogrami prikazani su na Slici 12. Pojava pikova na retencionim vremenima, čije su vrednosti približno 2,70; 15,76 i 30,16 min ukazuju na prisustvo nečistoće A, C i B, respektivno.

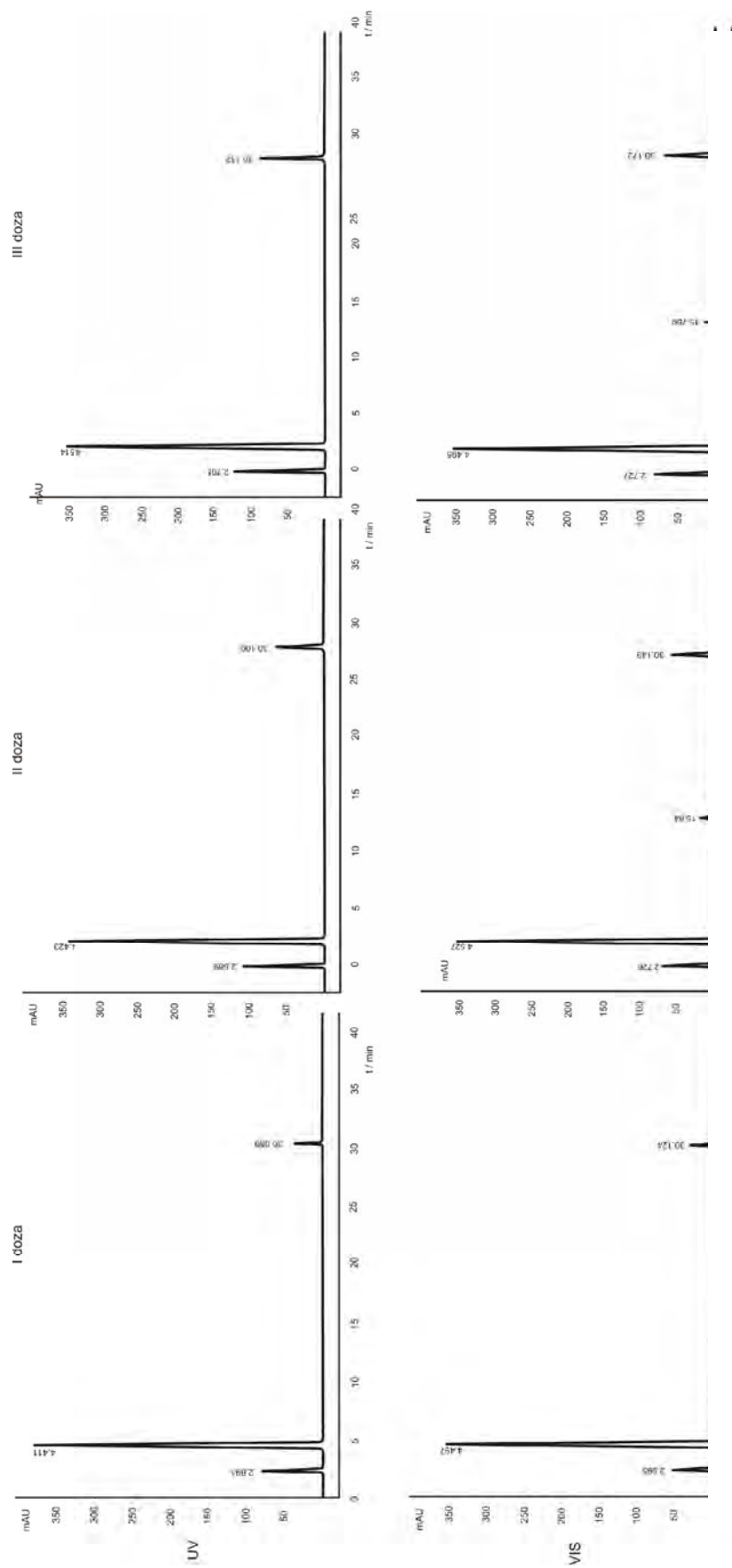
Kao i u slučaju blister pakovanja crvene boje, prisustvo nečistoće B identifikovano je samo ozračivanjem uzorka VIS zracima druge i treće doze. Sa dobijenih hromatograma se uočava da se visina pika aktivne supstance smanjuje tokom degradacije, a visine pikova koje odgovaraju nečistoćama A, B i C, blago povećavaju. To ukazuje da tokom fotodegradacije dolazi do smanjenja sadržaja aktivne supstance, a do povećanja sadržaja nečistoća.

Prisustvo istih degradacionih proizvoda potvrđeno je i kod ozračenih uzoraka Karvileksa upakovanih u plastičnim neprovidnim kontejnerima (Sl.13). Smanjenje visine pika aktivne supstance potvrđeno je i kod ozračenih uzoraka preparata upakovanih u plastičnom neprovidnom kontejneru. Upoređujući dobijene visine pikova, sa visinama pikova ozračenih uzoraka preparata upakovanih u blister pakovanju, može se videti da su veći.

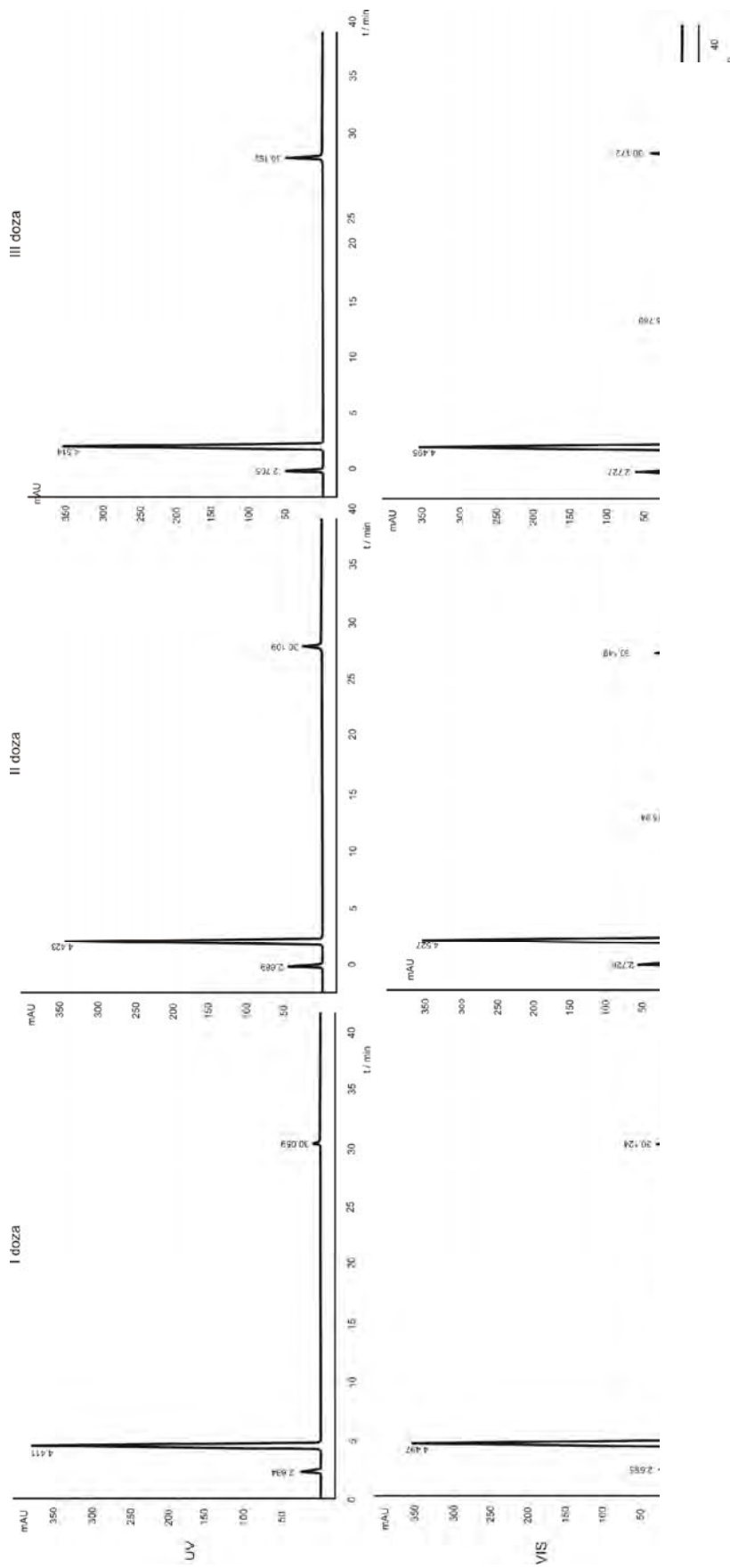
Sadržaj karvedilola (%) nakon zračenja preparata UV i VIS zracima, različitih doza, upakovan u različitoj primarnoj ambalaži, prikazan je u obliku histograma na Slici 14. Promena sadržaja farmakopejskih nečistoća A, B i C tokom fotodegradacije, prikazana je u Tabeli 16.

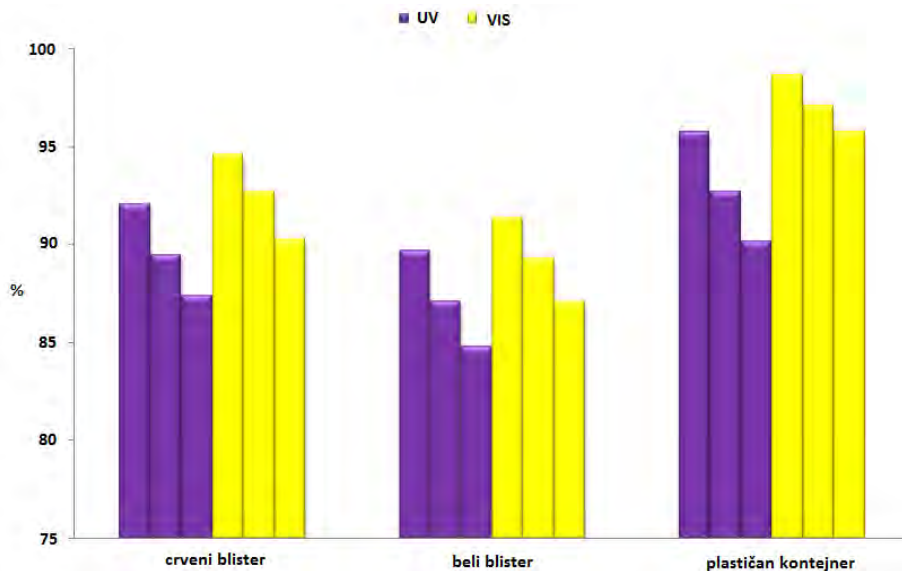
Smanjenje sadržaja karvedilola i povećanje sadržaja nečistoća veće je primenom UV zračenja u odnosu na dejstvo VIS zračenja. To je i očekivano, s obzirom da je UV zračenje veće energije u odnosu na VIS zračenje. Samim tim zbog veće energije UV zraka, veća je i degradacija proizvoda.

Sa histograma se uočava da je najveće smanjenje sadržaja karvedilola najveće u slučaju kada je preparat u belom blisteru i to 15,2% za UV, odnosno 12,9% za VIS zračenje. Smanjenje sadržaja karvedilola je nešto manje primenom crvenog blistera, u poređenju sa belim blisterom. Primenom UV zraka smanjenje sadržaja karvedilola je 12,5% u odnosu na sadržaj iste supstance u neozračenom preparatu, dok je primenom VIS zračenja to smanjenje nešto manje i iznosi 9,7%. Za razliku od blister pakovanja, najmanje smanjenje sadržaja karvedilola potvrđeno je u slučaju primene plastičnog kontejnera i to 9,8% za UV i 4,2% za VIS zračenje.



Slika 12. Hromatogrami ozraćenog preparata primenom UV i VIS zračenja, različitih doza, upakovanog u belom blisteru





Slika 14. Sadržaj karvedilola (%) nakon zračenja preparata u različitoj primarnoj ambalaži

Dobijeni rezultati za sadržaj farmakopejskih nečistoća (Tabela 17) pokazuju da je najveći njihov porast u slučaju kada je preparat u belom blisteru, a nešto manji kod preparata u crvenom blisteru. Najmanje povećanje sadržaja nečistoća je kod preparata u plastičnom neprovidnom kontejneru. U svim ispitivanim uzorcima sadržaj farmakopejskih nečistoća bio je manji od 1%.

Na osnovu dobijenih rezultata može se konstatovati da je najadekvatnija primarna ambalaža, za pakovanje Karvileksa, plastičan neprovidan kontejner. U tom slučaju preparat je relativno fotostabilan, a primenom ovog tipa primarne ambalaže obezbeđuje se odgovarajuća zaštita preparata od dejstva dnevne svetlosti i mogućnosti pojave fotodegradacije.

Tabela 17. Sadržaj nečistoća (%) nakon zračenja preparata u različitoj primarnoj ambalaži

Tip zračenja	Dužina zračenja	PVC/Al crveno pakovanje			PVC/Al belo pakovanje			Plastičan kontejner		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
UV	3,5 dana	0,09	-	0,04	0,102	-	0,045	0,08	-	0,03
	7 dana	0,167	-	0,073	0,198	-	0,079	0,166	-	0,055
	17 dana	0,401	-	0,173	0,501	-	0,184	0,371	-	0,132
VIS	3,5 dana	0,08	-	0,04	0,087	-	-	0,07	-	0,04
	7 dana	0,294	0,05	0,049	0,321	0,058	0,052	0,273	0,041	0,047
	17 dana	0,362	0,059	0,183	0,411	0,061	0,194	0,309	0,049	0,176

Studije fotostabilnosti Karvileksa, primenom UV i VIS zračenja, pokazale su da prilikom ovog tretmana proizvoda, nije došlo formiranja degradacionih proizvoda, koji se mogu detektovati pri datim hromatografskim uslovima [70].

Kinetika fotodegradacije Karvileksa

Za procenu stabilnosti leka neophodno je poznavati brzinu degradacije lekovite supstance, kao i red hemijske reakcije kojom se ta degradacija podvrgava.

U cilju procene stabilnosti preparata Karvileksa, dobijeni rezultati za sadržaj karvedilola u preparatu nakon zračenja, fitovani su saglasno modelima kinetike nultog i prvog reda. Modeli su opisani preko vrednosti koeficijenta korelacije (r) i konstante brzine degradacije, čije su vrednosti prikazane u Tabeli 18.

Tabela 18. Koeficijent korelacije (r), konstanta brzine degradacije (k), poluvreme života ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) Karvileksa

Tip pakovanja	Nulti red				Prvi red			
	k_0 (mg dan ⁻¹)	r	$t_{1/2}$	t_{90}	k_1 (dan ⁻¹)	r	$t_{1/2}$	t_{90}
UV zračenje								
Crveni blister	0,3091	-0,997	161,75	32,35	0,0035	-0,951	19800	30
Beli blister	0,3334	-0,993	149,97	30,00	0,0038	-0,957	18236,84	27,63
Plastičan kontejner	0,2801	-0,991	178,50	35,70	0,0029	-0,952	23896,55	36,20
VIS zračenje								
Crveni blister	0,2964	-0,998	168,69	33,73	0,0032	-0,981	21656,25	32,81
Beli blister	0,3016	-0,997	165,78	33,15	0,0033	-0,969	21000	31,81
Plastičan kontejner	0,1963	-0,995	254,71	50,94	0,0020	-0,940	34650	52,50

Neophodan uslov, da se sadržaj leka nakon zračenja preparata pokorava modelu kinetike nultog reda, je linearna zavisnost između sadržaja leka i vremena. Kod modela kinetike prvog reda, postoji linearna zavisnost prirodnog logaritma sadržaja leka i vremena.

Dobra linearnost podataka potvrđuje se koeficijentom korelacije (r), koji treba da bude približno - 0,999.

Primenom modela kinetike nultog reda na podatke, dobijene nakon zračenja preparata UV i VIS zracima upakovanog u različitoj primarnoj ambalaži, dobijene su vrednosti koeficijenta korelacije (Tabela 18), koje su u svim ispitivanim slučajevima bile približne teorijskoj vrednosti. Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da se fotodegradacija preparata Karvileksa, upakovan u različitoj primarnoj ambalaži, pokorava modelu kinetike nultog reda.

Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije, nakon primene modela kinetike prvog reda, u svim ispitivanim slučajevima, odstupale su od teorijske vrednosti (Tabela 18). Ovo odstupanje eksperimentalnih podataka od teorijske vrednosti, ukazuje na to da se fotodegradacija preparata Karvileksa ne pokorava modelu kinetike prvog reda.

U Tabeli 18 prikazane su vrednosti konstante brzine k_0 i k_1 modela kinetike nultog i prvog reda. Najveće vrednosti za k_0 i k_1 dobijene su u slučaju fotodegradacije Karvileksa upakovanog u belom blister pakovanju. Nešto niže vrednosti ovih konstanta su u slučaju primene crvenog blistera, a njihova najniža vrednost dobijena je primenom plastičnog neprovidnog kontejnera.

Više vrednosti konstante brzine dobijene primenom belog blistera u poređenju sa crvenim blisterom i plastičnim kontejnerom, govore o tome da se reakcija fotodegradacije Karvileksa odvija brže primenom belog blistera. Veća brzina reakcije fotodegradacije Karvileksa, pokazuje veću nestabilnost preparata ukoliko je on upakovanom u belom blisteru.

Kako je najniža vrednost brzine reakcije fotodegradacije preparata dobijena kada je u neprovidnom plastičnom kontejneru, to pokazuje da primenom takve primarne ambalaže stabilnost preparata nije ugrožena.

Primenom modela kinetike nultog i prvog reda izračunate su vrednosti vremena poluživota ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) preparata. Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 18.

Predloženim modelima kinetike nađeno je da najkraće vreme poluživota i rok trajanja pokazuje preparat u belom blister pakovanju. Najduže vreme poluživota i rok trajanja ima preparat u plastičnom neprovidnom kontejneru.

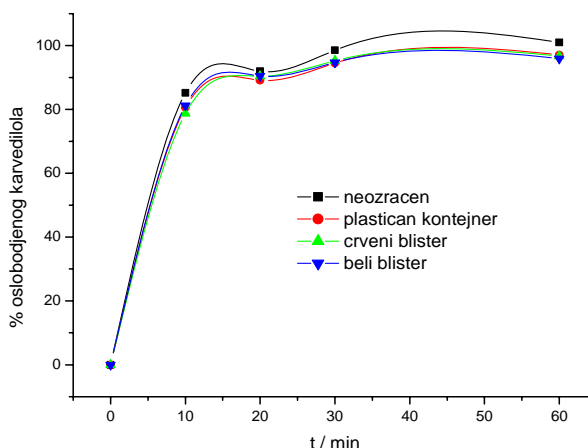
Na osnovu izračunatih vrednosti za $t_{1/2}$ i t_{90} zapaža se da je preparat najosetljiviji na dejstvo zračenja u slučaju primene belog blistera, kao primarne ambalaže. Nesto veće vrednosti za $t_{1/2}$ i t_{90} , dobijenih primenom crvenog blistera, ukazuju na manju foto osetljivost preparata. Visoke vrednosti vremena poluživota i roka trajanja, izračunatih za slučaj primene plastičnog neprovidnog kontejnera, ukazuju na najmanju foto osetljivost Karvileksa.

U poređenju vrednosti $t_{1/2}$ i t_{90} , dobijenih u slučaju kada je preparat zračen UV zracima, sa istim vrednostima dobijenih primenom VIS zračenja, vidi se da su vrednosti nešto niže u slučaju primene UV zračenja. Niže vrednosti dobijene dejstvom UV zraka, ukazuju na to da je preparat osetljiviji na njihovo dejstvo, u poređenju sa VIS zračenjem.

Imajući u vidu napred navedene činjenice, može se zaključiti da je plastičan neprovidan kontejner, najbolja primarna ambalaža za pakovanje Karvileksa. Njenom upotrebom obezbeđuje se najveća zaštita preparata od dejstva svetlosti i sprečava mogućnost nastanka foto degradacionih proizvoda.

4.2.3. Uticaj tipa pakovanja na kinetiku brzine rastvaranja karvedilola iz Karvileksa

U cilju ispitivanja uticaja tipa pakovanja na kinetiku brzine rastvaranja karvedilola iz Karvileksa, tablete su upakovane u crvenom i belom Al/PVC blisteru, kao i u plastičnom neprovidnom kontejneru i izložene dejstvu UV zraka u toku 17 dana. Nakon zračenja, sadržaj oslobođenog karvedilola, primenom dissolution testa, određen je primenom validirane UV metode (Sl. 15). Dobijeni podaci fitovani su u saglasnosti sa različitim matematičkim modelima. Modeli su opisani preko koeficijenta korelacije (r) i konstante brzine, čije su vrednosti prikazane u Tabeli 19.



Slika 15. Profil oslobađanja karvedilola, nakon primene UV zraka III doze

Profil oslobađanja karvedilola iz ozrašenih tableta Karvileksa, našao je najbolje slaganje sa *Korsmayer-Peppas*-ovim modelom, što je potvrđeno vrednostima koeficijenta korelacije čije su vrednosti bile veće od 0,900 u svim ispitivanim slučajevima (Tabela 19).

Tabela 19. Kinetika procesa oslobađanja karvedilola iz ozračenih tableta

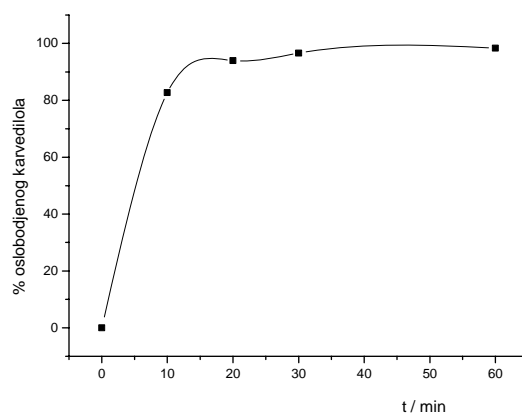
Model	Neozračen		Plastičan neprovidan kontejner		Crveni Al/PVC blister		Beli Al/PVC blister	
	<i>k</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>r</i>	<i>k</i>	<i>r</i>
Nultog reda	$k_0=0,2892$	0,8826	$k_0=0,2926$	0,8670	$k_0=0,3006$	0,7989	$k_0=0,8086$	0,8086
Prvog reda	$k_1=0,1154$	0,9634	$k_1=0,0033$	0,8312	$k_1=0,0035$	0,7985	$k_1=0,0028$	0,7924
Hixon – Crowell	$k_5=0,0036$	0,8733	$k_5=0,0048$	0,8629	$k_5=0,0052$	0,8068	$k_5=0,004$	0,7794
Korsmeyer – Peppas	$k_K=0,0714$ n= 0,0981	0,9745	$k_K=0,1082$ n= 4,1519	0,9495	$k_K=0,1175$ n= 4,1194	0,9306	$k_K=0,0963$ n= 4,1923	0,9271
Higuchi	$k_H=0,6809$	0,8967	$k_H=3,4810$	0,9233	$k_H=3,6552$	0,8691	$k_H=3,0118$	0,8771

Radi ispitivanja uticaja sekundarne ambalaže na profil oslobađanja karvedilola, originalno pakovanje Karvileksa (blister crvene boje) upakovano je u kartonskoj kutijici i izliženo dejstvu pod istim uslovima kao i u slučaju primene primarnog pakovanja. Procenat rastvorenog karvedilola iz ozračenih tableta (Tabela 20), u odgovarajućem medijumu, određen je validiranom UV spektrofotometrijskom metodom.

Tabela 20. % rastvorenog karvedilola iz tableta upakovanih u sekundarnoj ambalaži

t / min	% rastvorenog karvedilola
0	0
10	82,74
20	93,99
30	96,59
60	98,31

Sa dobijenog grafika (Sl.16) može se uočiti da je nakon 10 min došlo do oslobađanja više od 80% aktivne supstance. Dobijena vrednost od 82,74% za sadržaj rastvorenog karvedilola iz tableta, ukazuje da proizvod Karvileks ne menja svoj profil oslobađanja pod dejstvom zračenja ukoliko je upakovan u sekundarnoj ambalaži.



Slika 16. Profil oslobađanja karvedilola iz tableta upakovanih u sekundarnoj ambalaži, nakon primene 17 dana UV zraka

Na osnovu dobijenih podataka za % rastvorenog karvedilola iz ozračenih tableta Karvileksa, upakovane u sekundarnoj ambalaži, ispitana je kinetika brzine rastvaranja karvedilola u skladu sa odgovarajućim matematičkim modelima. Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije (r) i konstante brzine prikazane u Tabeli 21.

Tabela 21. Kinetika procesa oslobađanja karvedilola iz ozračenih tableta upakovane u sekundarnom pakovanju

Model	k	r
Nultog reda	$k_0=0,25329$	0,78087
Prvog reda	$k_1=0,00264$	0,75033
Hixon – Crowell	$k_S=0,00414$	0,76115
Korsmeyer – Peppas	$k_K=4,2355$ $n= 0,09097$	0,89823
Higuchi	$k_H=3,09023$	0,85283

Nakon fitovanja dobijenih podataka po odgovarajućim modelima, najveća vrednost koeficijenta korelacije dobijena je primenom Korsmeyer – Peppas-ovog modela. Ova činjenica ukazuje da profil brzine rastvaranja karvedilola ostaje nepromenjen u slučaju primene sekundarnog pakovanja. Ovo je još jedna potvrda da je komercijalno dostupan Karvileks fotostabilan proizvod.

Sadržaj karvedilola i njegovih nečistoća nakon zračenja tableta Karvileksa upakovane u sekundarnoj ambalaži, određen je modifikovanom RP-HPLC metodom. Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 22 i 23.

Tabela 22. Promena sadržaja karvedilola primenom sekundarnog pakovanja

Dužina zračenja (dan)	UV	VIS
3,5	98,92%	99,60%
7	98,01%	99,30%
17	94,75%	96,34%

Primenom VIS zračenja, nakon 17 dana, smanjenje sadržaja karvedilola iznosilo je 3,66% u odnosu na početni sadržaj (100%), dok je pri istoj dužini UV zračenja smanjenje veće za 1,59%. U oba ispitivana slučajeva smanjenje sadržaja karvedilola manje od 10%, dok je u svim ispitivanim slučajevima povećanje sadržaja nečistoća manje od 0,1% (Tabela 23). Kao i u slučaju ispitivanja uticaja tipa primarnog pakovanja, prisustvo nečistoće B potvrđeno je samo pri dužini zračenja od 7 i 17 dana VIS zracima.

U saglasnosti sa ICH regulativom (smanjenje sadržaja karvedilola manje od 10%, a povećanje sadržaja nečistoća manje od 0,1%) originalan proizvod Karvileks, upakovan u sekundarnoj ambalaži, je relativno fotostabilan.

Radi procene stabilnosti Karvileksa u sekundarnoj ambalaži, dobijeni rezultati za sadržaj karvedilola u proizvodu nakon zračenja, fitovani su saglasno modelima kinetike nultog i prvog reda. Modeli su opisani preko vrednosti koeficijenta korelacije (r) i konstante brzine degradacije, čije su vrednosti prikazane u Tabeli 24.

Tabela 23. Promena sadržaja nečistoća primenom sekundarnog pakovanja

Tip zračenja	Dužina zračenja (dan)	Sekundarno pakovanje		
		A	B	C
UV	3,5	0,010	-	0,011
	7	0,011	-	0,015

	17	0,015	-	0,016
VIS	3,5	0,006	-	0,009
	7	0,015	0,030	0,015
	17	0,017	0,031	0,015

Tabela 24. Koeficijent korelacije (r), konstanta brzine degradacije (k), poluvreme života ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) Karvileksa u sekundarnoj ambalaži

Tip pakovanja	Nulti red				Prvi red			
	k_0 (mg dan ⁻¹)	r	$t_{1/2}$	t_{90}	k_1 (dan ⁻¹)	r	$t_{1/2}$	t_{90}
UV zračenje								
Crveni blister	0,31267	0,9991	159,9	31,98	0,00323	0,9986	21455,1	3250,77
VIS zračenje								
Crveni blister	0,25351	0,9857	197,24	39,44	0,00257	0,9855	26964,9	4085,60

Primenom modela kinetike nultog reda, izračunate su vrednosti koeficijenta korelacije (Tabela 24), koje su u svim ispitivanim slučajevima bile približne teorijskoj vrednosti (0,999). Na osnovu ovih podataka može se zaključiti da se fotodegradacija preparata Karvileksa u sekundarnoj ambalaži, pokorava modelu kinetike nultog reda.

Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije, nakon primene modela kinetike prvog reda, u svim ispitivanim slučajevima, odstupale su od teorijske vrednosti (Tabela 24). Ovo odstupanje eksperimentalnih podataka od teorijske vrednosti, ukazuje na to da se fotodegradacija preparata Karvileksa ne pokorava modelu kinetike prvog reda.

Niže vrednosti konstante brzine k_0 i k_1 dobijene primenom VIS zračenja govore o tome da se reakcija fotodegradacije Karvileksa odvija sporije u poređenju sa dejstvom UV zračenja.

Primenom modela kinetike nultog i prvog reda izračunate su vrednosti vremena poluživota ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) preparata. Dobijene vrednosti prikazane su u Tabeli 24.

Predloženim modelima kinetike nađeno je da najkraće vreme poluživota ($t_{1/2}$) i rok trajanja (t_{90}) ima proizvod ukoliko je izložen dejstvu VIS zraka.

4.2.5. Primena ED u studijama fotostabilnosti Karvileksa

U cilju ispitivanja uticaja različitih materijala primarne ambalaže, kao i doze zračenja na stabilnost tableta Karvileksa, primenjen je model ED sa 2^3 nezavisno promenljivim faktorima: tip pakovanja (X_1), dužina zračenja (X_2) i tip zračenja (UV i VIS) (X_3). Sadržaj karvedilola i njegovih nečistoća A, B i C (%), nakon zračenja proizvoda Karvileksa, uzet je kao zavisno promenljiva veličina (Y_1, Y_2, Y_3 i Y_4).

Na osnovu dobijenih rezultata, primenom metodologije površine odgovora izračunati su koeficijenti predloženog modela, koji predstavljaju vezu između zavisno i nezavisno promenljivih.

Matematički model prikazan je u obliku jednačina:

$$Y_1 = 3.475X_1 - 4.375X_2 + 4.025X_3 + 0.775X_1X_2 + 0.775X_1X_3 + 0.5X_2X_3 + 0.575X_1X_2X_3$$

$$Y_2 = -0.03X_1 + 0.281X_2 - 0.026X_3 - 0.02X_1X_2 - 0.006X_1X_3 - 0.016X_2X_3 - 0.006X_1X_2X_3$$

$$Y_3 = 0.027X_1 + 0.027X_2 - 0.003X_3 + 0.027X_1X_2 - 0.003X_1X_3 - 0.003X_2X_3 - 0.003X_1X_2X_3$$

$$Y_4 = 0.016X_1 + 0.129X_2 - 0.015X_3 + 0.011X_1X_2 + 0.011X_1X_3 - 0.009X_2X_3 + 0.006X_1X_2X_3$$

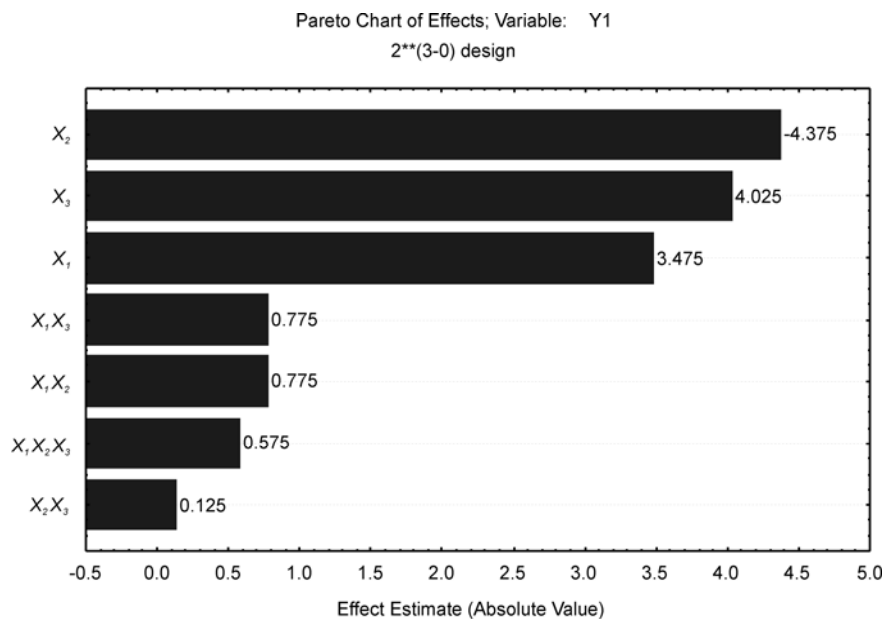
Na osnovu matematičkog modela i statističke analize dobijenih podataka, primenom ANOVA testa (Tabela 25) može se uočiti da su faktori X_1, X_2 i X_3 važni delovi modela ($p < 0,05$), koji imaju značajan uticaj na sadržaj karvedilola i njegovih nečistoća u ispitivanom proizvodu.

Tabela 25. Vrednosti zavisno i nezavisno promenljivih

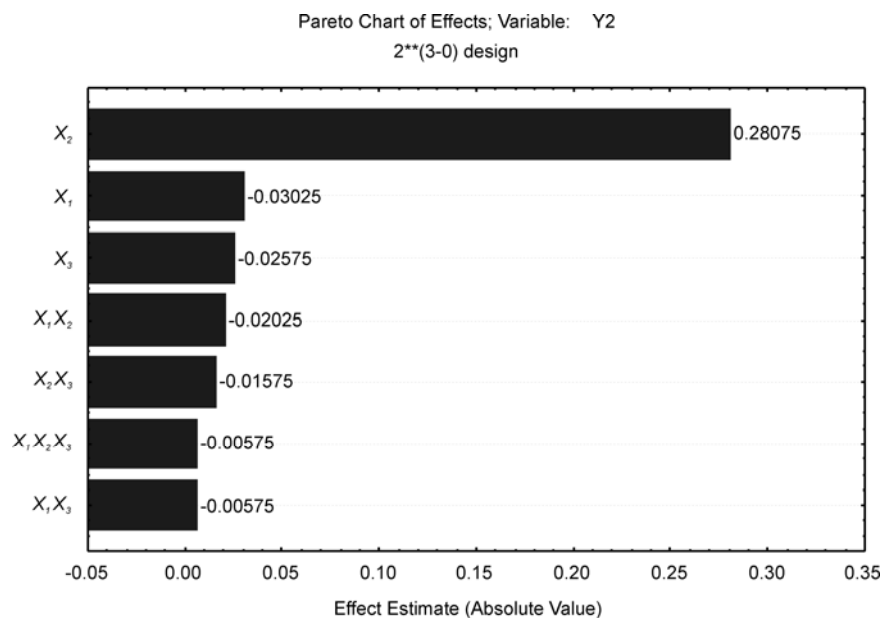
Promenljive	df	SS	MS	F vrednost	p vrednost
Y_1 (sadržaj karvedilola)					
Model	7	97,9	97,9	14,209	0,20
X_1	1	24,2	24,2	36,524	0,10
X_2	1	38,3	38,3	57,892	0,08
X_3	1	32,4	32,4	49,000	0,09
X_1X_2	1	1,2	1,2	1,816	0,41
X_1X_3	1	1,2	1,2	1,816	0,41

X_2X_3	1	0,0	0,0	0,047	0,86
$X_1X_2X_3$	1	0,7	0,7	1	0,50
Greška	1	0,7	0,7	-	-
Y_2 (sadržaj nečistoće A)					
Model	7	0,2	0,2	14,471	0,03
X_1	1	0	0	27,677	0,12
X_2	1	0,2	0,2	23,84	0,01
X_3	1	0	0	20,055	0,14
X_1X_2	1	0	0	12,403	0,18
X_1X_3	1	0	0	1	0,5
X_2X_3	1	0	0	7,503	0,22
$X_1X_2X_3$	1	0	0	1	0,50
Greška	1	0	0	-	-
Y_3 (sadržaj nečistoće B)					
Model	7	0	0	-	0,0001
X_1	1	0	0	116,64	0,06
X_2	1	0	0	116,64	0,06
X_3	1	0	0	1	0,5
X_1X_2	1	0	0	116,64	0,06
X_1X_3	1	0	0	1	0,5
X_2X_3	1	0	0	1	0,5
$X_1X_2X_3$	1	0	0	1	0,5
Greška	1	0	0	1	-
Y_4 (sadržaj nečistoće C)					
Model	7	0	0	0	0,0001
X_1	1	0	0	7,11	0,23
X_2	1	0	0	458,67	0,03
X_3	1	0	0	5,840	0,25
X_1X_2	1	0	0	3,361	0,32
X_1X_3	1	0	0	3,361	0,32
X_2X_3	1	0	0	2,507	0,36
$X_1X_2X_3$	1	0	0	1	0,50
Greška	1	0	0	-	-

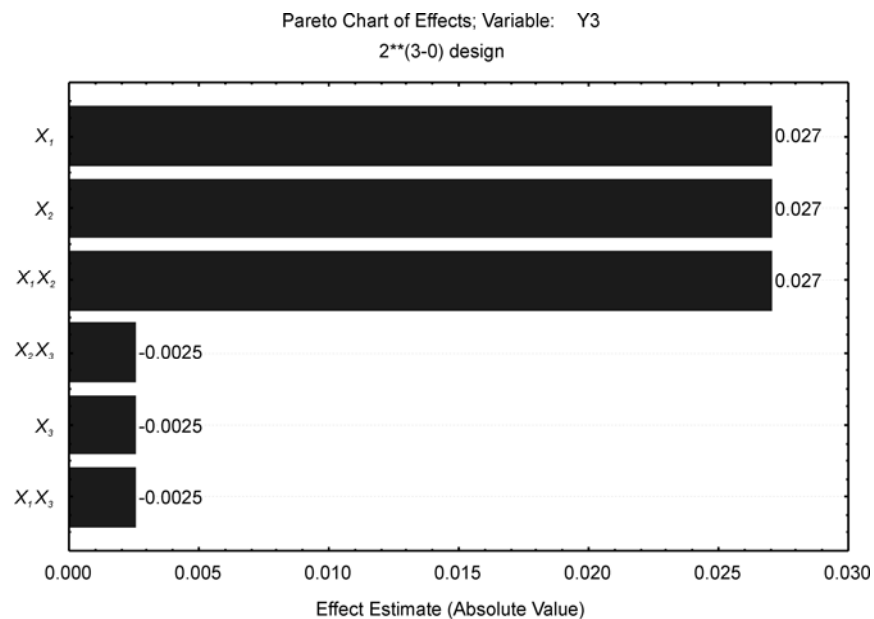
Uticaj faktora (koeficijenti predloženog modela) na sadržaj karvedilola i njegovih nečistoća prikazan je u obliku histograma (Sl. 17-20).



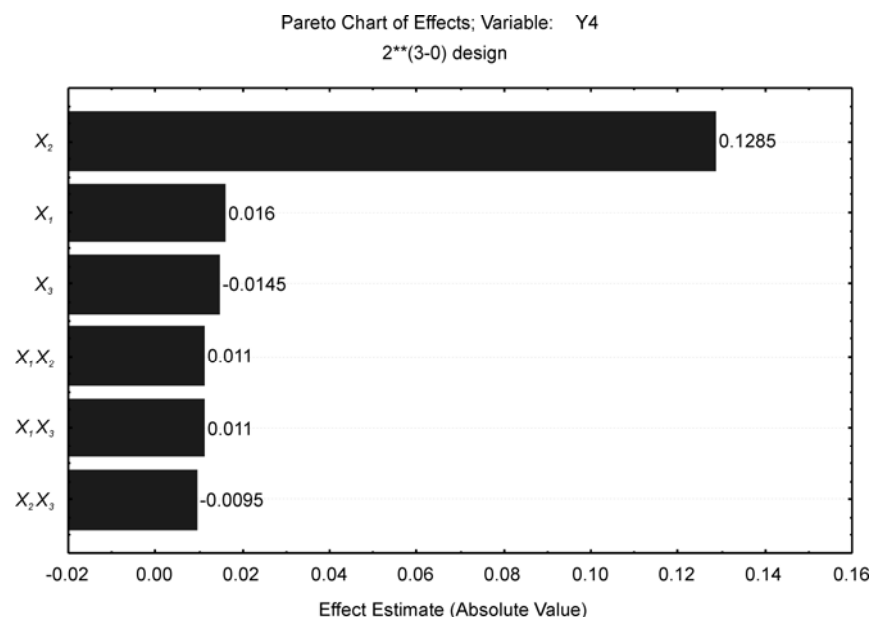
Slika 17. Vrednosti koeficijena zaviso promenljivih za nezavisno promenljivu Y_1



Slika 18. Vrednosti koeficijena zaviso promenljivih za nezavisno promenljivu Y_2



Slika 19. Vrednosti koeficijenata zavisno promenljivih za nezavisno promenljivu Y_3

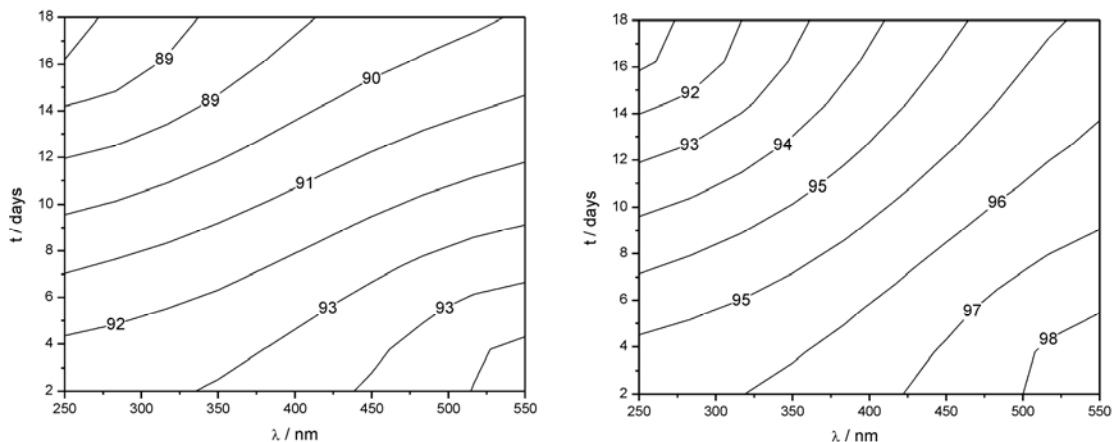


Slika 20. Vrednosti koeficijenata zavisno promenljivih za nezavisno promenljivu Y_4

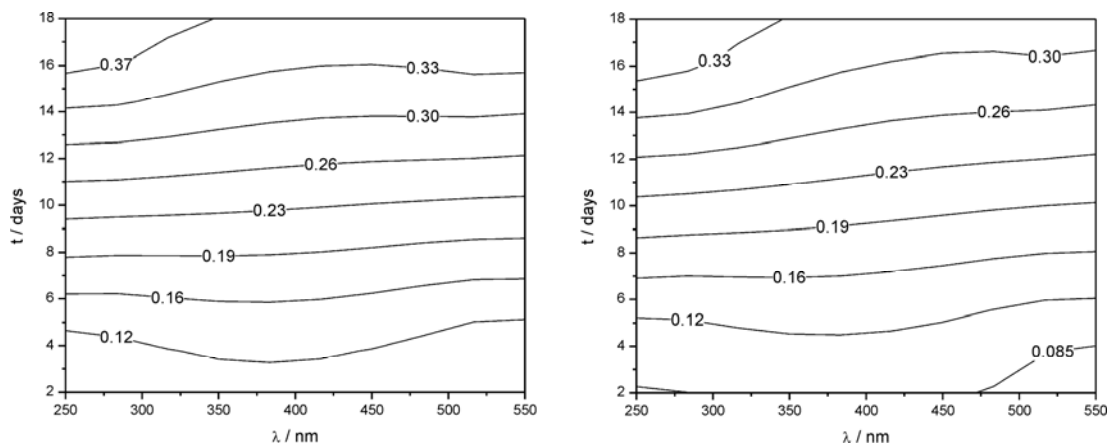
U slučaju promene samo jedne nezavisno promenljive veličine (Sl. 17), zapaža se da faktor dužina zračenja (X_2) ima dominantan uticaj na sadržaj karvedilola. Tip pakovanja (X_3) ima manji uticaj, dok talasna dužina zračenja (X_1) ima zanemarljiv uticaj u poređenju sa prethodnim faktorima. Na promenu sadržaja nečistoća najveći uticaj ima dužina zračenja (X_2), a potom tip pakovanja (X_1).

Najveća promena sadržaja karvedilola i njegovih nečistoća uočena je pri istovremenoj promeni talasne dužine i dužine zračenja (X_1X_2) (Sl. 18-20). Kombinacija faktora $X_1X_2X_3$ nije pokazala uticaj na promenu sadržaja nečistoće B i C (odsustvo kolone na histogramu).

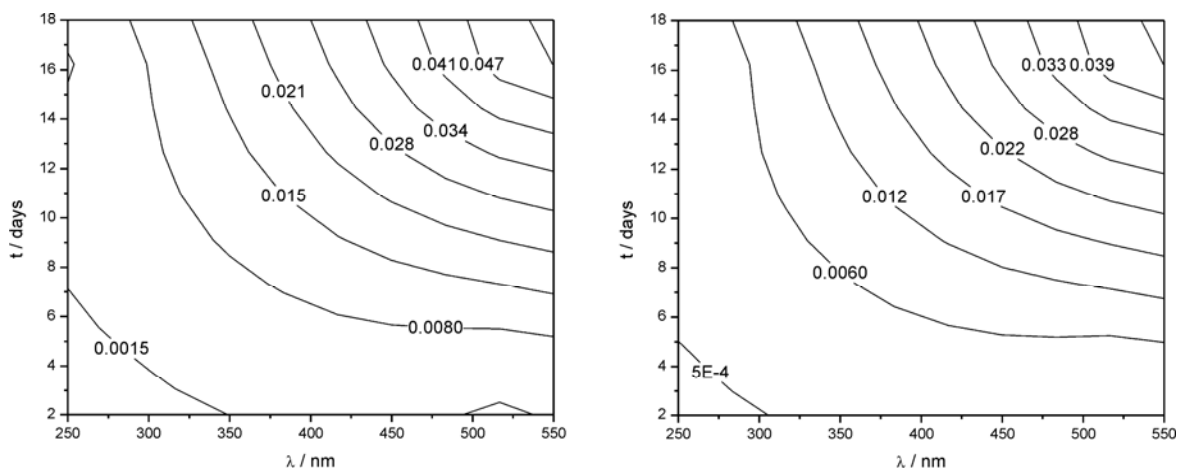
Veza između zavisno i nezavisno promenljivih faktora prikazana je pomoću konturnih dijagrama (Sl. 21-24). Ovi dijagrami su pogodni za ilustraciju uticaja nezavisno promenljivih faktora na promenu sadržaja karvedilola i njegovih nečistoća u ozračenim uzorcima Karvileksa.



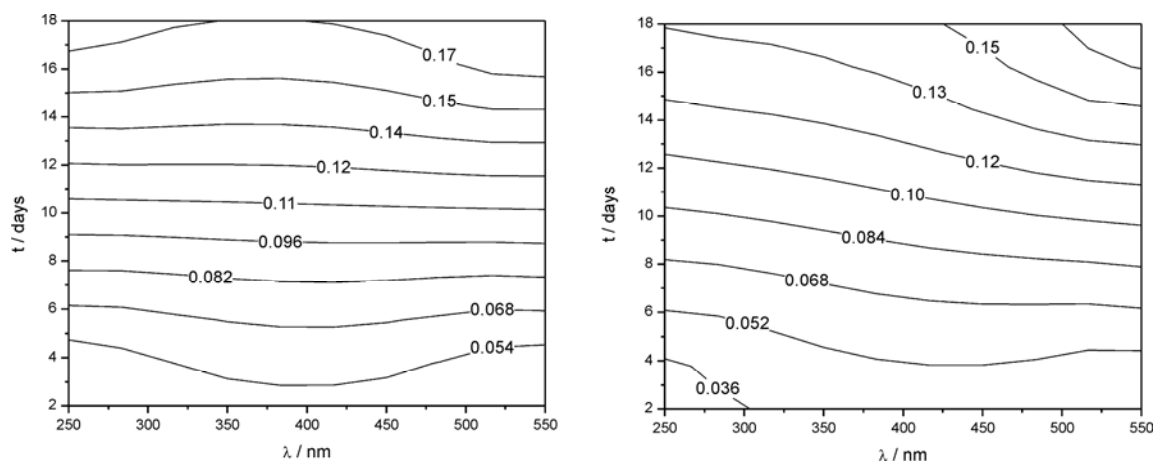
Slika 21. Sadržaj karvedilola u crvenom blisteru (levo) i plastičnom kontejneru (desno)



Slika 22. Sadržaj nečistoće A u crvenom blisteru (levo) i plastičnom kontejneru (desno)



Slika 23. Sadržaj nečistoće B u crvenom blisteru (levo) i plastičnom kontejneru (desno)



Slika 24. Sadržaj nečistoće C u crvenom blisteru (levo) i plastičnom kontejneru (desno)

Primenom oba tipa pakovanja, u opsegu talasnih dužina od 400 do 550 nm (Sl. 21) proizvod Karvileks je relativno fotostabilan, s obzirom da je sadržaj karvedilola u oba ozračena uzorka veći od 90% (u skladu sa ICH regulativom). Za crveni blister sadržaj karvedilola je u opsegu od 92 do 95%, dok je u slučaju primene plastičnog kontejnera, pri istoj vrednosti nezavisno promenljive X_I , sadržaj nešto veći (od 96,56 do 99%).

Pri promeni faktora X_I u opsegu od 250 do 400 nm, sadržaj karvedilola je od 87 do 92% za crveni blister, a nešto veći (od 92,5 do 95,75%) u slučaju primene plastičnog neprovidnog kontejnera.

Dobijeni rezultati pokazuju da Karvileks pokazuje bolju stabilnost u slučaju primene VIS zračenja u poređenju sa UV zračenjem.

Sa konturnih dijagrama se takođe može uočiti da ja proizvod relativno foto stabilan u periodu od 7

dana primenom crvenog blistera ili 13 dana primenom plastičnog kontejnera, u slučaju primene VIS zračenja (400 do 550 nm). Takođe, potvrđeno je da i tip pakovanja ima značajan uticaj na stabilnost Karvileksa.

Sa konturnih dijagrama na kojima je prikazana promena sadržaja nečistoća A, B i C (Sl. 22-24), uočava se da je pri svim ispitivanim slučajevima njihov sadržaj manji od 0,1%. Takođe, kao i u slučaju primene statističke analize (ANOVA test), potvrđeno je da na promenu njihovog sadržaja dužina zračenja, kao i tip pakovanja imaju najveći uticaj.

Nakon 3 dana zračenja uopsegu od 480 do 550 nm, primenom crvenog blistera, sadržaj nečistoće A bio je manji od 0,1%. Dok primenom plastičnog kontejnera, sadržaj nečistoće A ostaje manji od 0,1% u nešto širem opsegu talasnih dužina (od 425 do 550 nm) i pri dužem vremenu zračenja (6 dana).

Primenom crvenog blistera, pri dužini zračenja od 9 dana u opsegu talasnih dužina od 250 do 550 nm, sadržaj nečistoće C je manji od 0,1%, dok u slučaju primene plastičnog kontejnera sadržaj ostaje manji od 0,1% do 9 dana zračenja.

U svim ispitivanim slučajevima sadržaj nečistoće B bio je manji od 0,1%. Dobijene niske vrednosti ukazuju na visoku fotostabilnost ove nečistoće.

5. IZVOD

U doktorskoj disertaciji "**Optimizacija formulacije i stabilnost tableta Karvedilola**" optimizovana je formulacija Karvileks tableta 12,5 mg proizvođača AD Zdravlje-Aktavis, Leskovac u pogledu profila brzine rastvaranja karvedilola primenom eksperimentalnog dizajna. Validirana je modifikovana RP-HPLC metoda i ispitana stabilnost tableta u pogledu sadržaja aktivne supstance, identifikacije i određivanja degradacionih proizvoda i kinetika procesa rastvaranja karvedilola.

Dobijeni su sledeći rezultati:

- Eksperimentalni dizajn je uspešno primenjen u cilju dobijanja željene formulacije u pogledu zahteva za brzinom rastvaranja aktivne supstance kao i u cilju odabira najadekvatnije primarne ambalaže za čuvanje leka.
- Optimizovana je formulacija Karvileksa u pogledu profila brzine rastvaranja karvedilola primenom 2^3 punog faktorijalnog dizajna. Primenjeni eksperimentalni dizajn pokazao je značajan uticaj tri izabrana nezavisna faktora (količina sredstva za vezivanje-PVP K-30, količina sredstva za raspadanje-krospovidon i sila komprimovanja) na zavisno promenljivu veličinu (% oslobođenog karvedilola).
- Efekti ovih uticaja interpretirani su statistički i grafički. Statistička analiza pokazala je uticaj svakog faktora, kao i međusobnog odnosa ovih faktora na odgovore sistema. Ovi uticaji opisani su odgovarajućim matematičkim jednačinama.
- U slučaju promene samo jedne zavisno promenljive, primenom ANOVA testa, utvrđeno je da dominantan uticaj na brzinu rastvaranja karvedilola u preparatu ima čvrstina tableta (X_3)-niži nivo čvrstine tableta daje bolji profil rastvaranja. Faktor sadržaj sredstva za vezivanje (X_1) ima manji uticaj, dok faktor sadržaj sredstva za raspadanje, % (X_2) ima zanemarljiv/nema značajan uticaj u poređenju sa prethodno razmatranim faktorima.
- Primenom validirane UV spektrofotometrijske metode određen je profil rastvaranja karvedilola iz formulacija Karvileksa, različitih sastava (F1-F8).
- Koristeći rezultate testa rastvaranja, i faktore sličnosti, upoređeni su profili optimalne formulacije (F3) i proizvoda originatora (Dilatrend tablete). Pokazana je ekvivalentnost između ovih ispitivanih uzoraka u pogledu profila oslobađanja karvedilola.

- Kinetika testa rastvaranja analizirana je pomoću odgovarajućih matematičkih modela, koji su interpretirani u obliku matematičkih jednačina. Uz primenu odgovarajućih jednačina i statističkom analizom određene su odgovarajuće konstante karakteristične za date modele i koeficijenti korelacije (r^2). Analizom podataka utvrđeno je da *Korsmeyer–Peppas*–ov model najbolje opisuje kinetiku rastvaranja karvedilola iz tableta Karvileksa.
- U cilju ispitivanja hemijske stabilnosti optimizovana formulacija Karvileks tableta čuvana je 6 meseci pod uslovima ubrzanog starenja (45°C i 75% RH). Određene vrednosti fizičko hemijskih osobina formulacije, koje su u granicama propisane farmakopejom, ukazuju da se formulacija može u potpunosti smatrati stabilnom nakon čuvanja pod ubrzanim uslovima starenja tableta.
- U skladu sa ICH Q2B regulativom validirana je modifikovana “*stability indicating*” RP-HPLC metoda za određivanje sadržaja karvedilola u Karvileks tabletama. Predložena RP-HPLC metoda je selektivna, tačna, osetljiva i reproduktivna, pa se može primeniti za istovremenu identifikaciju i kvantifikaciju analizirane komponente u ispitivanim uzorcima preparata Karvileksa, dobijenih primenom različitih doza UV i VIS zračenja. Metoda je pogodna za određivanje koncentracije karvedilola u opsegu koncentracija od 0,006 do 0,125 mg cm⁻³, uz mikrogramsku osetljivost i adekvatnu tačnost i preciznost (RSD < 1%). Takođe, metoda se pokazala uspešnom za praćenje uticaja primarne i sekundarne ambalaže na fotostabilnost Karvileksa.
- Ispitana je fotostabilnost leka u skladu sa ICH smernicom Q1B pri ekstremnim uslovima zračenja u cilju ispitivanja kinetike degradacije. Dobijeni rezultati pokazuju da je u originalnom pakovanju lek stabilan i pri jačini zračenja (za UV 1000 W sati/m²; za VIS 6 miliona lux sati) većoj od propisane ICH smernicom.
- Nakon podvrgavanja uzorka preparata Karvileksa dejstvu UV i VIS zracima, identifikovano je prisustvo farmakopejskih nečistoća A, B i C. U svim ispitivanim slučajevima prisustvo nečistoće B identifikovano je samo ozračivanjem uzorka VIS zracima druge i treće doze.
- Smanjenje sadržaja karvedilola i povećanje sadržaja nečistoća veće je primenom UV zračenja u odnosu na dejstvo VIS zračenja.
- Najmanje smanjenje sadržaja karvedilola i povećanje sadržaja nečistoća, potvrđeno je u slučaju kada je preparat u plastičnom neprovidnom kontejneru.

- Primenom modela kinetike reakcije fotodegradacije, nađeno je da se fotodegradacija preparata Karvileksa, upakovan u različitoj primarnoj ambalaži, pokorava modelu kinetike nultog reda.
- Na osnovu izračunatih vrednosti vremena poluživota ($t_{1/2}$) i roka trajanja (t_{90}) zapaža se da je preparat najosetljiviji na dejstvo zračenja u slučaju primene belog blistera, kao primarne ambalaže. Visoke vrednosti $t_{1/2}$ i t_{90} , izračunatih za slučaj primene plastičnog neprovidnog kontejnera, ukazuju na najmanju foto osetljivost Karvileksa. Navedene činjenice pokazuju da je najadekvatnija primarna ambalaža, za pakovanje Karvileksa, plastičan neprovidan kontejner. U tom slučaju preparat je relativno fotostabilan, a primenom ovog tipa primarne ambalaže obezbeđuje se odgovarajuća zaštita preparata od dejstva sunčeve svetlosti i mogućnosti pojave fotodegradacije.
- Ispitivanjem uticaja tipa primarnog pakovanja na kinetiku brzine rastvaranja karvedilola iz Karvileksa, potvrđeno je da je profil oslobađanja karvedilola iz ozračenih tableta Karvileksa, našao najbolje slaganje sa *Korsmayer-Peppas*-ovim modelom. Isti model profila oslobađanja karvedilola iz tableta potvrđen je i prilikom ispitivanja uticaja sekundarne ambalaže na fotostabilnost Karvileksa. To ukazuje na činjenicu da se profil oslobađanja karvedilola ne menja nakon izlaganja Karvileksa ekstremnim uslovima zračenja.
- Na osnovu izračunatih vrednosti koeficijenta korelacije može se zaključiti da se fotodegradacija preparata Karvileksa u sekundarnoj ambalaži, pokorava modelu kinetike nultog reda.
- Niže vrednosti konstante brzine k_0 i k_1 dobijene primenom VIS zračenja ukazuju da se reakcija fotodegradacije Karvileksa u sekundarnoj ambalaži odvija sporije u poređenju sa dejstvom UV zračenja.
- Primenom ED nađeno je da najveći uticaj na promenu sadržaja karvedilola i njegovih nečistoća ima faktor dužina zračenja. Takođe, statističkom analizom potvrđeno je da je najveća promena sadržaja pri istovremenoj promeni talasne dužine i dužine zračenja (X_1X_2). Metodologijom ED pokazalo se da je plastičan neprovidan kontejner najadekvatnija primarna ambalaža za pakovanje proizvoda Karvileksa.

6. ABSTRACT

In the doctoral dissertation "**Formulation optimization and stability of Carvedilol tablets**", the formulation of Karvileks tablets 12,5 mg, products by AD Zdravlje-Actavis, Leskovac was optimized in terms of carvedilol dissolution profile by means of experimental design. A modified RP-HPLC method was validated and stability of tablets was investigated for assay, identification and determination of degradation products and carvedilol dissolution kinetics as well.

The following results were obtained:

- Experimental design was successfully applied in order to get desirable formulation with appropriate dissolution profile and in order to choose the most adequate primary packaging for drug storage.
- Karvileks drug formulation was optimized in terms of carvedilol dissolution profile by means of 2^3 full factorial design. Used experimental design showed significant influence of three independent variables (binder content – PVP K30, disintegrant content – crospovidone and main compression force) on the percentage of carvedilol dissolved as dependent variable.
- Effects of these influences were interpreted statistically and graphically. Statistic analysis showed the influence of each factors, as well as the interaction of these factors on the system responses. These effects were demonstrated by appropriate mathematical equations.
- In the case of changing only one independent variables by means of ANOVA test, it was shown that the most significant factor for carvedilol dissolution kinetics was tablets hardness (X_3). The lower level of this variable gives better dissolution profile. The content of binder (X_1) has less influence, while the disintegrant content, % (X_2), has no significant impact compared with the previous considered factors.
- By appliance of validated UV spectrophotometric method, carvedilol dissolution profile for different Karvileks formulations (F1-F8) was determined.
- Using dissolution data and similarity factors, dissolution profiles of optimal formulations (F3) and originator product (Dilatrend tablets) were compared. Equivalence regarding to carvedilol dissolution profile between these examined tablets was approved.
- Kinetics of the dissolution tests was analysed by appropriate mathematical models and interpreted in the form of mathematical equations. Adequate dissolution constants correlation coefficients (R^2) were

determined by using appropriate equations and statistical analysis. By data analysis, it was shown that *Korsmeyer–Peppas* model describes in the best way kinetics of the carvedilol dissolution from Karvileks tablets.

- In order to investigate chemical stability, the optimized Karvileks tablets formulation was kept for 6 months under accelerated conditions (45°C and 75% RH). Results for physico chemical properties were in limits defined by Pharmacopeia and shown that optimized formulation are fully considered stable after keeping under accelerated conditions.
- In accordance with ICH Q2B regulations, the modified “*stability indicating*” RP-HPLC method for the assay determination of carvedilol in Karvileks tablets was validated. Suggested method is selective, accuracy, reproducible and can be used for simultaneous identification and qualification of analysed component in tested samples of Karvileks obtained by applying of different doses of UV and VIS radiation. Method is suitable for determination of carvedilol concentration in the range of 0.006 do 0.125 mg cm⁻³ with microgram sensibility and adequate accuracy and precision (RSD < 1%). Method was also successfully applied for assessment of the influence of primary and secondary packaging on Karvileks photostability.
- In accordance with ICH guideline Q1B on the extreme condition of radiation, the photostability of drug was tested in the purpose to investigate kinetics of degradation. The obtained results showed that the drug was stable in the original packaging even if the radiation was higher then it is prescribed by ICH guideline (for UV 1000 W h/m²; for VIS 6 milion lux h).
- After exposing the samples of Karvileks to UV and VIS rays, it was identified the presence of Ph. impurities A, B and C. In all tested cases, the presence of impurity B was identified only by VIS radiation for the second and third rays doses.
- Decreasing of carvedilol assay and increasing of impurities assay is bigger using of UV radiation compared with the effects of VIS radiation.
- The lowest decreasing of carvedilol assay and increasing of impurities was confirmed in the case when the tablets were in the opaque container.
- Using of photodegradation reaction kinetics model, it was confirmed that photodegradation of Karvileks packed in different primary packaging corresponds to zero-order kinetics model.

- Based on calculated values of half shelf-life ($t_{1/2}$) and shelf-life (t_{90}), it was noted that the Karvileks was the most sensitive to the effects of radiation in the case of white blister application, as primary packaging. High values of $t_{1/2}$ and t_{90} obtained for plastic opaque containers, shows the lowest photosensitivity of Karvileks. These considered facts shows that the most appropriate primary packaging for Karvileks is opaque container. Usage of this type of primary packaging provides adequate protection from the effects of sunlight and the possibility of degradation.
- Investigation the impact of primary packaging on the carvedilol dissolution kinetics in Karvileks, it was shown that Korsmeyer–Peppas model describes in the best way carvedilol dissolution profile for the radiated Karvileks tablets. The same carvedilol dissolution profile model was confirmed for the influence of secondary packaging on Karvileks photostability. It indicates on the fact that carvedilol dissolution profile was not changed after exposing to extreme condition of radiation.
- Based on calculated values of correlation coefficients, it can be concluded that photodegradation of Karvileks tablets in the secondary packaging corresponds to zero order kinetics model.
- Lower values for constant rates, k_0 , obtained using of VIS radiation indicate that photodegradation reaction of Karvileks in secondary packaging is slower compared with the effects of UV radiation.
- By means of ED, it was shown that radiation exposed time is the most significant factor on the change of carvedilol and impurities content. Also, the statistical analysis showed that the significant interaction was between wavelength and radiation exposed time on carvedilol content. Usage of ED methodology showed that the most appropriate primary packaging for Karvileks tablets is the opaque plastic container.

7. LITERATURA

[1] [http://sr.wikipedia.org/sr-el/krvni pritisak](http://sr.wikipedia.org/sr-el/krvni_pritisak)

- [2] <http://hr.wikipedia.org/wiki/Beta-blokatori>
- [3] [Press Release, FDA Approves First Generic Versions of Coreg](#), U.S. Food and Drug Administration; 2007.
- [4] European Pharmacopoeia 6th ed., Strasbourg, France, 2008.
- [5] C. Dollery, Therapeutic drugs, 2nd edition, Churchill Livingstone, UK, 1999, pp C75–C80.
- [6] R. Ruffolo, M. Gellai, J.P. Hieble, R.N. Willette, A.J. Nichols, The pharmacology of carvedilol, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 38 (2), **1990**, S82–88.
- [7] T.L. Yue, H.Y. Cheng, P.G. Lysko, P.J. McKenna, R. Feuerstein, J.L. Gu, Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263(1), **1992**, 92–98.
- [8] N. Noguchi, K. Nishino, E. Niki, Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.* 59, **2000**, 1069–1076.
- [9] J. Stojanović, S. Vladimirov, V. Marinković, D. Veličković, P. Sibinović, Monitoring of the photochemical stability of carvedilol and its degradation products by the RP-HPLC method, *J. Serb. Chem. Soc.* 72 (1), **2007**, 37–44.
- [10] <http://hr.wikipedia.org/wiki/karvedilol>
- [11] A.J. Nichols, A.C. Sulpizio, D.J. Ashton, J.P. Hieble, R. Ruffolo, In vitro pharmacologic profile of the novel beta-adrenoceptor antagonist and vasodilator, carvedilol, *Pharmacology* 39(5), **1989**, 327–336.
- [12] C. Smith, M. Teitler, Beta-blocker selectivity at cloned human beta 1- and beta 2-adrenergic receptors, *Cardiovasc Drugs Ther.* 13(2), **1999**, 123–6.
- [13] M. Jovanović, Tablete, Farmaceutski fakultet, Beograd, 1990.
- [14] M. Jovanović, Z. Đurić, Osnovi industrijske informacije, Nijansa, Zemun, 2005.
- [15] Z. Đurić, Farmaceutska tehnologija sa biofarmacijom I deo, Nijansa, Zemun, 2004.
- [16] <http://www.ema.europa.eu/docs>
- [17] K. Connors, G. Amidon, L. Kennon, Chemical stability of pharmaceuticals - a handbook for pharmacists, John Wiley and sons, New York, 1979.
- [18] B. Jakovljević, S.M. Janković, Studije bioekvivalencije, *Acta medica Medianae* 45(4), **2006**, 50-55.
- [19] Guidance for industry: Bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research; 2003. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070124.pdf>, (Accessed 14 April, 2010).
- [20] USP31–NF26 United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville.

- [21] J. Emami, In vitro - In vivo correlation: From Theory to Applications, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 9(2), **2006**, 169-189.
- [22] British Pharmacopoeia 2007, 5th Edition.
- [23] The Japanese Pharmacopoeia, XIV Edition, 2001,
- [24] P. Costa, J. M. S. Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, **2001**, 123–133.
- [25] A.K. Seth, A.N. Misra, Mathematical modeling of preparation of acyclovir liposomes: Reverse phase evaporation method, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, **2002**, 285-291.
- [26] C. Sanchez-Lafuente, S. Furlanetto, M. Fernandez-Arevalo, Didanosine extended-release matrix tablets: optimization of formulation variables using statistical experimental design, *Int. J. Pharm.* 237, **2002**, 107-118.
- [27] J. Guan, R. Xiang, Y. Pan, H. Pan, X. Su, L. Zhou, Y. Cui, W. Pan, [Design and evaluation of a novel formulation prediction system](#), *Int. J. Pharm.* 402(1-2), **2010**, 129-139.
- [28] P. Mura, S. Furlanetto, M. Cirri, F. Maestrelli, A.M. Marras, S. Pinzauti, Optimization of glibenclamide tablet composition through the combined use of differential scanning calorimetry and d-optimal mixture experimental design, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, **2005**, 65-71.
- [29] L.C. [Chang](#), S.C. [Wu](#), J.W. [Tsai](#), T.J. [Yu](#), T.R. [Tsai](#), Optimization of epirubicin nanoparticles using experimental design for enhanced intravesical drug delivery, *Int. J. Pharm.* 6(1-2), **2009**, 195-203.
- [30] Y. El-Malah, S. Nazzal, N.M. Khanfar, D-optimal mixture design: optimization of ternary matrix blends for controlled zero-order drug release from oral dosage forms, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, **2006**, 1207-1218.
- [31] Y. Rhee, S. Chang, W. Park, S. Chi, E. Park, Optimization of ibuprofen gel formulations using experimental design technique for enhanced transdermal penetration, [Int. J. Pharm.](#) 364(1), **2008**, 14-20.
- [32] A. Bodea, S.E. Leucuta, Optimization of hydrophilic matrix tablets using a D-optimal design, *Int. J. Pharm.* 153, **1997**, 247-255.
- [33] M. Bendjaballah, J.P. Canselier, R. Oumeddour, Optimization of Oil-in-Water Emulsion Stability: Experimental Design, Multiple Light Scattering, and Acoustic Attenuation Spectroscopy, *J. Disper. Sci. Technol.* [31](#)(9), **2010**, 1260-1272.
- [34] V. Marinkovic, K. Karljickovic- Rajic, D. Agbaba, M. Nikolic, Experimental design as a quality improvement function, EOQ Conference, 5-7 September, Moscow, Russia (2004).
- [35] P. Ozil, M.H. Rochat, Experimental design, an efficient tool for studying the stability of parenteral nutrition, [Int. J. Pharm.](#) [42](#)(1-3), **1988**, 11-14.
- [36] S. Yoshioka, Y. Aso, M. Uchiyama, Statistical evaluation of non-isothermal prediction of drug stability. II. Experimental design for practical drug products, [Int. J. Pharm.](#) 46, **1988**, 121-132.

- [37] S.T. Horhota, J. Burgio, L. Lonski, C.T. Rhodes, Effect of storage at specified temperature and humidity on properties of three directly compressible tablet formulations, *J. Pharm. Sciences* 65, **1976**, 1746-1749.
- [38] H.M. El-Banna, A.A. Ismail, M.A.F. Gadalla, Factorial experiment for stability studies in the development of a tablet formulation, *Pharmazie* 39, **1984**, 163-165.
- [39] C.F. Dick, R.A. Klassen, G.E. Amidon, Determination of the sensitivity of a tablet formulation to variations in excipient levels and processing conditions using optimization techniques, *Int. J. Pharm.* 38, **1987**, 23-31.
- [40] C.E. Bos, Tropical tablets: the development of tablet formulations for use in tropical countries, Thesis, University of Groningen, 1990.
- [41] C.E. Bos, G.K. Bolhuis, C.F. Lerk, Optimization of tablet formulations based on starch/lactose granulations for use in tropical countries, *Drug Devel. Indus. Pharm.* 17, **1991**, 2373-2389.
- [42] C.E. Bos, G.K. Bolhuis, C.F. Lerk, J.H. De Boer, C.A.A. Duineveld, A.K. Smilde, D.A. Doornbos, The use of a factorial design to evaluate the physical stability of tablets prepared by direct compression; A new approach based on the relative change in tablet parameters, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 37, **1991**, 204-209.
- [43] C.E. Bos, G.K. Bolhuis, C.F. Lerk, J.H. De Boer, C.A.A. Duineveld, A.K. Smilde, D.A. Doornbos, The use of a factorial design to evaluate the physical stability of tablets prepared by direct compression; The selection of excipients suitable for use under tropical storage conditions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 37, **1991**, 210-215.
- [44] Validation of Analytical Procedures, Guidelines prepared within the International Conference on Harmonization, Commission of the European Communities, 1995.
- [45] Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, 1994.
- [46] S. Ebel, Validation of analysis methods, *Fresenius J. Anal. Chem.* 342, **1992**, 769-778.
- [47] Analytical Methods Committee, Uses (proper and improper) of correlation coefficients, *Analyst* 113, 1988, 1469-1471.
- [48] N. Hokama, N. Hobarra, H. Kameya, S. Ohsiro, M. Sakanashi, [Rapid and simple micro-determination of carvedilol in rat plasma by high-performance liquid chromatography](#), *J. Chromatogr. B* 732, 1999, 233-238.
- [49] P. Ptacek, J. Macek, J. Klima, Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma, *J. Chromatogr. B* 789, **2003**, 405-410.

- [50] E.J. Eisenberg, A.M. Patterson, G.C. Kahn, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of the enantiomers of carvedilol and its o-desmethyl metabolite in human plasma after chiral derivatization, *J. Chromatogr. B* 493, **1989**, 105–115.
- [51] F. Behn, S. Laer, H. Scolz, Determination of carvedilol in human cardiac tissue by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. Sci.* 39, **2001**, 121–124.
- [52] E. Yang, S. Wang, J. Kratz, M.J. Cyronak, Stereoselective analysis of carvedilol in human plasma using HPLC/MS/MS after chiral derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, **2004**, 609–615.
- [53] M. Saito, J. Kawana, T. Ohnob, M. Kaneko, K.M.K. Hanada, R. Sugita, N. Okada, S. Osato, M. Nagayama, T. Sumiyoshi, H. Ogata, [Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography](#). *J. Chromatogr. B* 843, **2006**, 73–77.
- [54] G. Larnprecht, L. Gruber, K. Stoschitzky, W. Lindner, Enantioselective analysis of (R)- and (S)-carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Chromatographia* 56, **2002**, S25–S29.
- [55] M. Gergov, J.N. Robson, E. Duchoslav, I. Ojanpera, Automated liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for screening β -blocking drugs in urine, *J. Mass Spectrom.* 35, **2000**, 912–918.
- [56] M. Machida, M. Watanabe, S. Takechi, S. Kakinoki, A. Nomura, Measurement of carvedilol in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B* 798, **2003**, 187–191.
- [57] N.C. Carmo Borges, G.D. Mendesb, D.O. Silva, V.M. Rezende, R.E. Barrientos-Astigarraga, G. Nucci, Quantification of carvedilol in human plasma by highperformance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: application to bioequivalence study, *J. Chromatogr. B* 822, **2005**, 253–262.
- [58] E. Behn, S. Laer, T.S. Mir, H. Scholz, HPLC quantification of carvedilol in small plasma volumes from children, *Chromatographia* 53, **2001**, 641–644.
- [59] R. Rathod, L.P.C. Prasad, S. Rani, M. Nivsarkar, H. Padh, [Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study](#), *J. Chromatogr. B* 857, 2007, 219–223.
- [60] A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati, A. Khoddamc, [Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: Application in pharmacokinetic studies](#), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, **2007**, 250–253.

- [61] M. Zakrzewski-Jakubiak, S. Denus, M. Leblanc, M. White, J. Turgeon, Enantioselective quantification of carvedilol in human plasma by HPLC in heavily medicated heart failure patients, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52, **2010**, 36–641.
- [62] P. Sripalakit, S. Kaewnok, S. Tubtonglang, Development of carvedilol assay in tablet dosage form using HPLC with fluorescence detection, *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 4, **2010**, 8-19.
- [63] F. Buontempo, E. Bernabeu, R.J. Glisoni, E. Quiroga, C. Bregnia, D.A. Chiappetta, Carvedilol stability in paediatric oral liquid formulations, *Farm Hosp.* 34(6), **2010**, 293–297.
- [64] M. Imran, R.S. Singh, S. Chandran, Stability indicating ultraviolet spectroscopic method for the estimation of ezetimibe and carvedilol, *Pharmazie* 61, **2006**, 766–769.
- [65] O. Galanopoulou, S. Rozou, E. Antoniadou-Vyza, HPLC analysis, isolation and identification of a new degradation product in carvedilol tablets, *J Pharmaceut Biomed.* 48, **2008**, 70–77.
- [66] ICH-Q1A (R2) (2003) Stability testing of new drug substances and products. International Conference on Harmonization, Geneva. <http://www.ich.org/cache/compo/363-272-1.htm>, Q1A (R2).
- [67] M. Swartz, I. Krull, Validation of chromatographic methods, *Pharm. Technol.* 22, **1998**, 104-119.
- [68] Z. Đurić, J. Parojčić, Praktikum iz biofarmacije, Nijansa, Zemun, 2004.
- [69] A.T. Serajuddin, A.B. Thakur, R.N. Ghoshal, Selection of solid dosage form composition through drug-excipient compatibility testing, *J. Pharm. Sci.* 88 (7), **1999**, 696-704.
- [70] M. Rizwan, M. Aqil, A. Azeem, Y. Sultana, S. Talegaonkar, A. Ali, Study of the degradation kinetics of carvedilol by use of a validated stability-indicating LC Method, *Chromatographia* 70, **2009**, 1283-1286.

8. BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM

1. Biografija

Predrag S. Sibinović rođen je 06.10.1971. godine u Leskovcu. Osnovnu školu "Josif Kostić" u Leskovcu završio je kao nosilac Vukove diplome 1986. godine. Iste godine upisao je gimnaziju "Stanimir Veljković-Zele" u Leskovcu, koju je završio 1990. godine sa odličnim uspehom i stekao zvanje laboratorijski tehničar za mikrobiologiju.

Filozofski fakultet u Nišu (sada Prirodno-matematički), Odsek za hemiju, upisao je školske 1990/91. godine, gde je i diplomirao decembra 1995. godine, sa prosečnom ocenom 8,59 i ocenom 10 na diplomskom ispitu i stekao zvanje diplomiranog hemičara opšte hemije. Školske 1996/1997. godine upisao se na poslediplomske studije na Filozofskom fakultetu u Nišu, Odsek hemija, smer Organsko-biohemijski. Magistarsku tezu "Ispitivanje stabilnosti ciprofloksacina u gotovim farmaceutskim oblicima" odbranio je decembra 2005. godine i time stekao zvanje magistra hemijskih nauka.

U periodu od 1996 – 1998. godine je istraživač-stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju Republike Srbije, a od marta 1998. godine je stalno zapošljen u Farmaceutsko-hemijskoj industriji "ZDRAVLJE – Actavis" u Leskovcu. Sadašnja pozicija kandidata je menadžer službe kontrole kvaliteta.

2. Bibliografija

Do sada je objavio 5 radova u međunarodnim časopisima (radovi pod rednim brojevima 1, 3 i 5 su iz ove doktorske disertacije), i 3 rada saopštio na domaćim i međunarodnim skupovima.

Rad u međunarodnom časopisu M23

1. J. Stojanović, V. Marinković, S. Vladimirov, D. Veličković, P. Sibinović, Determination of carvedilol and its impurities in pharmaceuticals, *Chromatographia*, (2005), vol. 62 br. 9-10, str. 539-542.

2. P. Sibinović, A. Smelcerović, R. Palić, S. Đorđević, V. Marinković, Ruggedness testing of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin, *Journal of Serbian Chemical Society*, (2005), vol. 70 br. 7, str. 979-986.

3. J. Stojanović, S. Vladimirov, V. Marinković, D. Veličković, P. Sibinović, Monitoring of the photochemical stability of carvedilol and its degradation products, *Journal of Serbian Chemical Society*, (2007), vol. 72 br. 1, str. 37-44.

4. M. Milenković, V. Marinković, P. Sibinović, R. Palić, D. Milenović, An HPLC method for the determination of digoxin in dissolution samples, *Journal of Serbian Chemical Society*, DOI: 10.2298/JSC100106123M, *in press*.

5. I. Savić, V. Marinković, I. Savić, P. Sibinović, Study of influence of primary packaging on photostability of tablets containing Carvedilol, *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, (2011), vol. 45 br. 4, *in press*.

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini M33

1. I. Savić, V. Marinković, I. Savić, P. Sibinović, D. Milenović, A. Došić, The investigation of packaging and dose radiation effect on the photostability of karvileks tablet using an experimental design, «2ed International congress „Engineering, materials and management in the processing industry”», 9-11 march 2011., Jahorina, Republika Srpska, Proceedings CD, p. 169-175, (2011).

Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu M34

1. I. Savic, G. Nikolic, V. Marinkovic, M. Milenkovic, I. Savic, P. Sibinovic, Monitoring of the oxidation stability of sodium picosulfate by a new RP-HPLC method, *1st World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development*, 27. September – 1. October 2009, Rovinj, Croatia, Book of abstracts, PP18, pp 60, (2009).

2. I. Savic, V. Marinkovic, I. Savic, P. Sibinovic, D. Milenovic, A. Dasic, The investigation of primary packaging effect on the photostability of karvilex using an experimental design, 9-11 mart 2011, Jahorina, Republika Srpska, pp. 78.

3. V. Marinkovic, I. Savic, I. Savic, K. Nikolic, P. Sibinovic, D. Agbaba, Photostability study of alopres® tablets, *The XXXIV th symposium Chromatographic methods of investigating the organic compounds*, 8-10 june 2011, Katowice, Poland, *in press*.

Saopštenje sa skupa nacionalnog značaja štampano u izvodu M64

1. V. Marinković, I. Savić, P. Sibinović, M. Milenković, I. Savić, Uticaj primarne ambalaže na fotostabilnost Karvileks tableta, V kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem - *Od leka do zdravstvenih ishoda*, 13-17. 10. 2010. Beograd, *Arhiv za farmaciju* 60 (5) (2010) 752-753, PP-11.