

STANOVENÍ TLOUŠŤKY OBALU TABLET BLÍZKOU INFRAČERVENOU SPEKTROSKOPIÍ

JAN MUSELÍK^a, KATEŘINA KREJČOVÁ^a,
MILOSLAVA RABIŠKOVÁ^a, ANNA
BARTOŠÍKOVÁ^a, MICHAELA DRAČKOVÁ^b
a LENKA VORLOVÁ^b

^a Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ^b Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno
muselikj@vfu.cz

Došlo 27.1.09, přijato 5.6.09.

Klíčová slova: blízká infračervená spektroskopie, farmaceutické aplikace, obalované tablety, tloušťka obalu

Úvod

Pro obalování perorálních lékových forem (tablet, tobolek, pelet) existuje celá řada důvodů – estetické¹ (zlepšení vzhledu, maskování nepříjemné chuti a zápachu, snadnější aplikace), identifikační^{2,3}, technologické^{1,4} (zajištění stability přípravku, mechanické odolnosti, oddělení inkompatibilních složek, ochrana léčiva před kyselým prostředím žaludku) a zejména důvody terapeutické. Vhodným obalem lze zajistit absorpci léčivé látky až ve střevním traktu⁵, její uvolňování z lékové formy v daném časovém intervalu⁶, či její cílené směřování do určité části střeva. Výhodami obalených přípravků s řízeným uvolňováním jsou snižena frekvence dávkování léku, redukce výkyvů plazmatické hladiny léčiva, menší výskyt nežádoucích účinků a s tím související zlepšená spolupráce pacienta⁷. Uvolňování léčivé látky z obalených přípravků řídí jak složení obalu, tak i jeho tloušťka.

Ke stanovení tloušťky obalu tablet se ve farmaceutické technologii využívá celá řada postupů. Tyto postupy zahrnují přímé mikroskopické stanovení, sledování hmotnostního přírůstku obalovaných tablet, analytické stanovení některé složky obalu (např. kapalinovou chromatografií). V některých případech je možné sledovat kvalitu obalu zkouškou disoluce. Všechny uvedené techniky jsou však časově náročné, což vede ke snížení kapacity a efektivity výroby a ke zvýšení provozních nákladů při výrobě obalovaných tablet. Snaha zajistit požadovanou kvalitu produktů a umožnit monitorování výrobních procesů vede farmaceutický průmysl k zavádění nových analytických metod⁸. NIR spektroskopie patří mezi tzv. procesní analytické metody, u kterých se klade důraz na rychlost analýzy

včetně možnosti kontinuální on-line analýzy ve výrobním procesu. Při porovnání s běžně používanými postupy nabízí NIR spektroskopie mnoho výhod: spektrum může být zaznamenáno v několika málo sekundách, charakter analýzy je nedestruktivní, nevyžaduje obvykle žádnou speciální úpravu vzorku a v mnoha případech připouští opětovné použití již proměřených vzorků. Nevýhodou NIR spektroskopie je silný překryv absorpčních pásů, a proto musí být kalibrační algoritmus vytvořen pomocí chemometrických metod⁹. Na druhou stranu jednou vytvořená metoda je snadno aplikovatelná a poskytuje velmi rychle výsledky, a to i pro několik parametrů najednou¹⁰.

V literatuře je doposud uvedeno jen několik prací zabývajících se stanovením množství polymerního materiálu naneseného na jádra tablet^{11,12} nebo pelet¹³. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu, která by byla schopna spolehlivě stanovit průměrnou tloušťku polymerního obalu naneseného na jedné tabletě. Do kalibrační sady byly navíc zahrnuty dvě nezávislé připravené skupiny vzorků tak, aby byla popsána i variabilita výrobního procesu a tím ověřena možnost praktického využití NIR spektroskopie v kontrole procesu obalování ve farmaceutickém průmyslu.

Experimentální část

Výroba obalených tablet

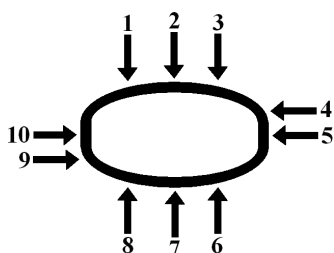
Pro přípravu tabletoviny byly použity mikrokrytická celulóza (Avicel[®] PH 101, Mingtai Chemical, Taiwan), hydrogenfosforečnan vápenatý dihydrát (Emcompress[®], Penwest Pharmaceuticals Co., Velká Británie), povidon (Kollidon[®] 25, BASF, Německo) a stearan horečnatý (RNDr. Jan Kulich, Česká republika). Z připravené tabletoviny se lisovaly tablety tvaru čočky na výstředníkovém tabletovacím lisu Korsch (EKO Korsch Pressen, Německo) s použitím razidel o průměru 10 mm. Hmotnost tablet byla nastavena přibližně na 0,450 g. Při zvolené lisovací síle 17 550 N byla pevnost tablet okolo 100 N.

K obalování se použila hypromelosa (Pharmacoat[®] 606, Schin-Etsu, Japonsko) ve formě 7,5% vodného roztoku. Dalšími složkami roztoku bylo 0,8 % makrogolu 400 (Fluka Chemie GmbH, Švýcarsko) a 0,05 % barviva (methylrosanilinium chlorid, Lachema, Česká republika). Předehřátá jádra tablet (60 °C) byla obalena v laboratorním obalovacím bubnu CL 200 (Medipo Z.T., s.r.o., Česká republika). Roztok polymerního filmu byl do systému přiváděn peristaltickou pumpou rychlostí 50 g min⁻¹ pod tlakem 80 kPa a při teplotě 45 ± 3 °C. Obalené tablety byly následně sušeny 10 min při teplotě 50 ± 2 °C. Nástřikem odpovídajícího množství roztoku použitého k obalování (200–1100 gramů) bylo vyrobeno deset šarží (označení vzorků 1_200 až 1_1100) obalených tablet s teoretickým hmotnostním podílem obalu 3,2–15,5 %. S cílem postihnout variabilitu výrobního procesu byl celý postup zopakován a bylo připraveno dalších deset šarží obalených tablet (označení vzorků 2_200 až 2_1100). Obalené tablety byly

ponechány před dalším testováním 48 h v polyethylenovém sáčku při laboratorní teplotě.

Stanovení referenční tloušťky obalu

Tloušťka naneseného obalu byla měřena optickým stereomikroskopem (STM902, Lambda, Česká republika) propojeným pomocí CCD videokamery (Alphaphot, Nikon, Japonsko) s počítačem. Vyhodnocení naměřených dat bylo provedeno programem Ia 32 (Leco Instruments, USA) umožňujícím přímé měření vzdáleností. U pěti náhodně vybraných tablet z každé šarže byla měřena tloušťka obalu na řezu podle schématu uvedeném na obr. 1 a výsledky pro každou tabletu byly vyjádřeny jako průměr z deseti měření.



Obr. 1. Schéma mikroskopického měření tloušťky obalu (počet měření $n = 10$)

NIR spektroskopie

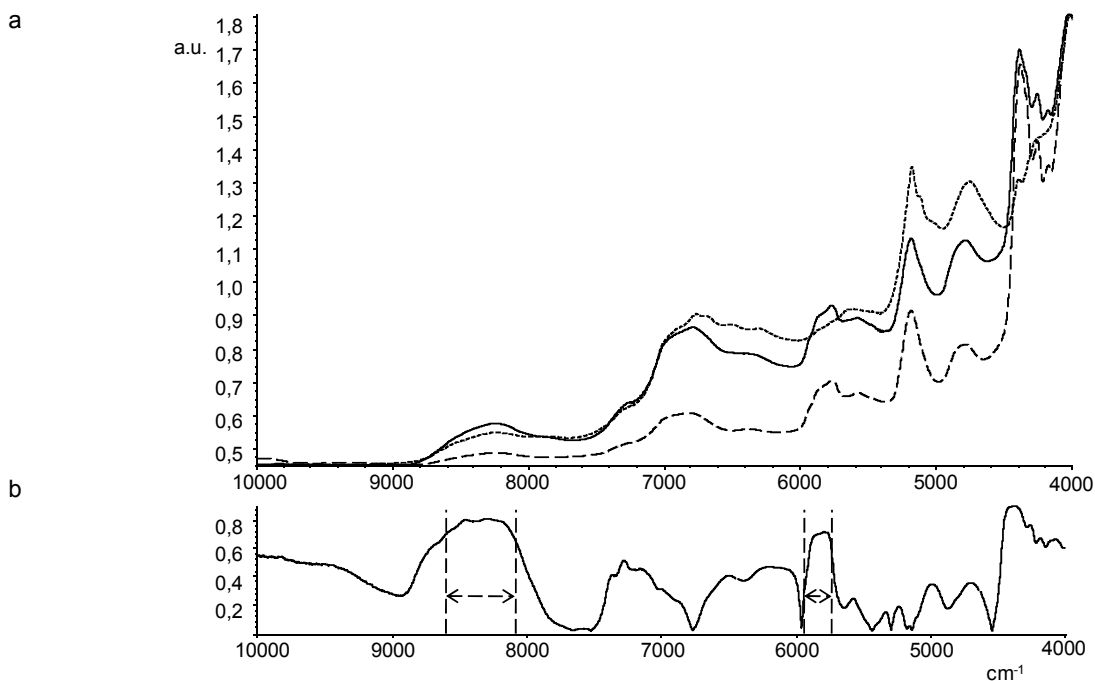
NIR spektra byla měřena v režimu difuzní reflektance na spektrometru FT-NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, USA) vybaveného integrační sférou. Vzorke byly vkládány do držáku tablet a měřená spektra byla zaznamenána v rozsahu vlnočtů $4\,000\text{--}10\,000\text{ cm}^{-1}$. U každého vzorku tablety bylo nasnímáno 100 spekter, a to pro obě strany tablety a pro následné vyhodnocení bylo použito spektrum průměrné. Celkový čas měření jedné tablety byl přibližně 3 min. Naměřená data byla zpracována počítačovým programem TQ Analyst verze 6.2.1.509 (Thermo Nicolet Corporation, Inc., USA).

Výsledky a diskuse

Vývoj kalibračního modelu

Hlavním krokem stanovení NIR spektroskopii je vytvoření kalibračního modelu, který je rozhodující v kvantitativní NIR spektroskopii¹⁴. Vytvoření kalibračního modelu zahrnuje výběr reprezentativní sady kalibračních vzorků, nasnímání spekter a stanovení referenčních hodnot u těchto vzorků, nalezení kalibračního algoritmu a následně validaci vytvořeného modelu¹⁵.

V prvním kroku vytvoření kalibračního modelu byla vyrobena sada referenčních vzorků obalených tablet. Ka-



Obr. 2. a) NIR spektra obalené tablety (—), polymerního filmu (---) a jádra tablety (···); b) míra korelace mezi změnami tloušťky obalu a změnami v intenzitě absorpce v závislosti na vlnočtu s vyznačením vybraných oblastí použitých při výpočtu algoritmu PLS (---)

Tabulka I
Tloušťky obalu tablet zjištěné mikroskopickou analýzou

Šarže	Tloušťka obalu [μm] ^a				
	tableta 1	tableta 2	tableta 3	tableta 4	tableta 5
1_200	22,8 ± 5,2	30,3 ± 5,0	29,6 ± 6,6	26,7 ± 7,5	26,0 ± 3,0
2_200	28,7 ± 4,5	27,3 ± 3,6	27,4 ± 3,8	27,3 ± 3,0	28,2 ± 4,2
1_300	30,5 ± 6,5	31,1 ± 4,5	38,1 ± 5,6	38,1 ± 5,6	34,5 ± 4,6
2_300	35,3 ± 3,9	34,1 ± 3,3	38,7 ± 5,0	41,8 ± 9,1	35,2 ± 3,9
1_400	44,7 ± 10,9	42,6 ± 7,5	42,8 ± 9,5	43,8 ± 8,6	43,4 ± 6,9
2_400	50,7 ± 18,2	52,8 ± 11,0	51,3 ± 11,2	48,6 ± 8,0	47,9 ± 8,5
1_500	63,5 ± 9,7	66,7 ± 10,4	60,9 ± 10,3	68,1 ± 6,8	63,4 ± 7,9
2_500	67,4 ± 17,9	60,6 ± 8,2	62,9 ± 8,9	64,1 ± 7,8	64,7 ± 8,8
1_600	67,3 ± 12,5	77,4 ± 11,5	69,9 ± 10,0	72,6 ± 10,8	77,8 ± 10,3
2_600	71,7 ± 11,8	67,4 ± 16,0	66,5 ± 13,0	71,0 ± 5,6	74,3 ± 11,5
1_700	81,6 ± 12,2	79,3 ± 8,1	80,1 ± 10,3	84,7 ± 10,4	83,3 ± 10,7
2_700	87,9 ± 14,7	82,7 ± 17,1	92,1 ± 38,1	92,0 ± 8,0	98,5 ± 16,2
1_800	79,9 ± 10,5	94,3 ± 10,2	107,1 ± 7,8	95,3 ± 8,4	94,4 ± 9,5
2_800	92,6 ± 10,6	102,3 ± 12,1	90,9 ± 16,7	100,5 ± 11,7	92,6 ± 15,7
1_900	102,6 ± 12,0	104,7 ± 11,0	94,8 ± 10,3	104,2 ± 9,9	99,1 ± 9,1
2_900	107,4 ± 15,4	111,0 ± 17,6	94,1 ± 10,8	105,4 ± 19,7	99,8 ± 18,8
1_1000	108,1 ± 12,9	118,1 ± 14,3	116,7 ± 12,4	116,2 ± 17,3	116,1 ± 12,5
2_1000	115,8 ± 23,9	99,4 ± 30,6	110,8 ± 11,3	113,9 ± 16,8	109,4 ± 11,5
1_1100	131,7 ± 14,9	119,1 ± 12,6	126,3 ± 11,6	134,6 ± 13,7	118,2 ± 11,7
2_1100	121,2 ± 24,5	107,8 ± 9,0	123,0 ± 17,5	124,7 ± 17,2	129,2 ± 17,2

^a Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr z 10 měření ± směrodatná odchylka

librační sada zahrnovala 100 obalených tablet (5 tablet z každé z 20 vyrobených šarží) s tloušťkou polymerního filmu v rozmezí přibližně 25–125 μm . Referenční hodnoty tloušťky polymerního filmu obalených tablet byly stanoveny mikroskopickou analýzou a jsou uvedeny v tab. I.

Vzhledem k velkému množství vícekvantových přechodů (overtónů) a kombinačních vibrací jsou spektra v NIR oblasti málo charakteristická a můžeme pozorovat pouze obalovou křivku těchto absorpčních čar. Pro získání analyticky významných informací z NIR spekter je proto nutné použít metody matematické statistiky – chemometrie¹⁵. V této práci byl kalibrační model zkonstruován algoritmem PLS, přiřazením referenční hodnoty tloušťky obalu ke každému spektru a zadáním těchto dat do programu TQ Analyst. Rozsah vlnočtů vhodných pro výpočet kalibračního modelu byl hodnocen na základě pozorování změn intenzity absorpčních pásů ve spektrech tablet s různým množstvím naneseného polymerního obalu (obr. 2). Kalibrační proces umožňuje nalézt pro každý vlnočt míru korelace mezi změnami tloušťky obalu a změnami v intenzitě absorpce. Pro kalibrační model byly vybrány ty oblasti vlnočtů, ve kterých vykazovaly změny v intenzitách absorpčních pásů významnou korelaci v závislosti na změnách tloušťky obalu. Vybrané oblasti použité v kalibračním mo-

delu byly 5681–5926 cm^{-1} a 8040–8802 cm^{-1} (obr. 2) a při rozlišení 4 cm^{-1} obsahovaly 251 datových bodů. Za absorpci NIR záření obalenými tabletami v těchto oblastech vlnočtů zodpovídají zejména skupiny $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$ a $>\text{CH}-$ (C–H první a druhý overtone).

Charakteristiky kalibračního modelu

Kvalita vyvinutého kalibračního modelu byla ověřena porovnáním referenčních hodnot tloušťky obalu s hodnotami vypočítanými algoritmem PLS, vyjádřením chyby kalibračního modelu (RMSEC), počtem odlehklých standardů a počtem faktorů PLS. Zjištěná korelační rovnice ve tvaru: predikovaná tloušťka Y (μm) = absolutní člen + směrnice \times referenční tloušťka X (μm) byla $Y = 1,964 + 0,975 \times X$ ($R^2 = 0,975$). Interval spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro směrnici (0,943–1,007) zahrnoval hodnotu 1, což ukázvalo na nepřítomnost systematické chyby v kalibračním modelu. Interval spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro absolutní člen (–0,715 až 4,643) zahrnoval hodnotu 0, nenulový absolutní člen tudíž nebyl prokázán. Nalezená hodnota chyby kalibračního modelu RMSEC byla 4,9 μm .

Pro nalezení statisticky významně odlehklých standar-

du byl použit výpočet Mahalanobisovy vzdálenosti, která je vyjádřením odlišnosti mezi průměrným spektrem a spektrem každého kalibračního standardu. Pro posouzení, zda je odlišnost významná, byl použit Chauvenetův test. V naší kalibrační sadě nebyly odlehle standardy nalezeny.

Faktory PLS použité v kalibračním modelu zahrnují spektrální a současně koncentrační informace. Každý faktor reprezentuje nezávislý zdroj proměnlivosti v kalibračních datech. První faktor popisuje nejvíce variability kalibračních standardů a každý další faktor popisuje většinu ze zbývající variability. Význam každého dalšího faktoru PLS postupně klesá a je třeba počítat s tím, že vysoký počet faktorů PLS může zahrnovat variabilitu šumu a nemá pro analýzu význam¹⁵. Zvolený počet faktorů PLS v kalibračním modelu byl 6, což značilo nízké riziko modelování šumu měření z důvodu zahrnutí příliš mnoha komponent do modelu.

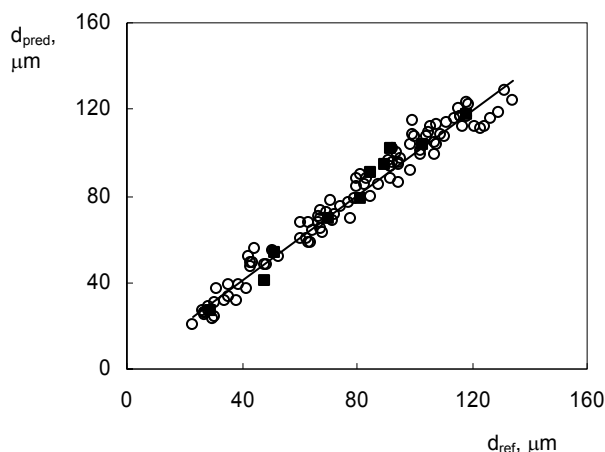
Opakovatelnost měření

Vliv náhodných proměnných na přesnost měření byl testován desetkrát opakovaným měřením NIR spekter náhodně vybraného vzorku obalené tablety z kalibrační sady (šarže 1_1000). Naměřená tloušťka polymerního obalu \pm interval spolehlivosti ($\alpha = 0,05$; počet měření $n = 10$) byla $108,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Relativní směrodatná odchylka těchto výsledků byla 0,27 %, což je výrazně méně, než je obvykle akceptovaná hodnota 1 % (cit.¹⁶). Opakovatelnost měření NIR spekter byla prokázána. Vliv náhodných proměnných (např. umístění tablety tvaru čočky v držáku tablet) nemá významný vliv na přesnost stanovení tloušťky polymerního filmu, protože zjištěný interval spolehlivosti byl řádově menší než chyba kalibračního modelu.

Validace kalibračního modelu

Pro ověření spolehlivosti kalibračního modelu byly použity křížová a externí validace. Při křížové validaci byla použita stejná sada vzorků jako při kalibraci. Křížová validace (leave-one-out) byla provedena vyloučením vždy jednoho ze standardů a ze zbylých kalibračních dat byl sestaven nový model, který byl použit pro kvantifikaci vyloučeného standardu¹⁷. Následně byla z regresní analýzy vypočítána korelační rovnice křížové validace a dále byla vyjádřena chyba křížové validace (RMSECV). Zjištěná korelační rovnice popisující vztah mezi algoritmem PLS, predikovanou tloušťkou obalu a referenční tloušťkou obalu ve tvaru: predikovaná tloušťka Y (μm) = absolutní člen + směrnice \times referenční tloušťka X (μm) byla $Y = 1,893 + 0,975 \times X$ ($R^2 = 0,970$). Intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro směrnici (0,942–1,009) a pro absolutní člen (–0,913 až 4,698) zahrnovaly hodnotu 1, resp. 0. Chyba zjištěná při křížové validaci byla 5,4 μm .

Externí validace byla provedena se sadou deseti vzorků obalených tablet (s tloušťkou polymerního obalu 29 až 119 μm) neobsažených v kalibrační sadě. Tyto vzorky



Obr. 3. Srovnání tloušťek obalu získaných referenční metodou (d_{ref}) a predikovaných (d_{pred}) při křížové (○) a externí (■) validaci

byly vyhodnoceny pomocí vyvinutého kalibračního modelu a výsledky byly porovnány s hodnotami získanými referenční metodou, podobně jako při křížové validaci (obr. 3). Nalezená rovnice korelace mezi predikovanými a referenčními daty byla: $Y = -4,898 + 1,075 \times X$ ($R^2 = 0,976$). Intervaly spolehlivosti při $\alpha = 0,05$ pro směrnici (0,939–1,212) a pro absolutní člen (–15,970 až 6,174) zahrnovaly hodnotu 1, resp. 0. Chyba zjištěná při externí validaci (RMSEP) byla 4,8 μm .

Správnost metody

Správnost byla vyjádřena jako průměrná výtěžnost vypočítaná porovnáním výsledků referenční metody (mikroskopická analýza) a výsledků predikovaných při křížové a externí validaci¹⁶. Průměrná výtěžnost a její interval spolehlivosti byly při křížové validaci $100,04 \pm 1,63 \%$ ($\alpha = 0,05$; $n = 100$) a při externí validaci $99,83 \pm 4,73 \%$ ($\alpha = 0,05$; $n = 10$). Výsledky predikované při křížové a externí validaci byly dále statisticky porovnány s výsledky referenční metody. Na základě párového t-testu ($\alpha = 0,05$) bylo prokázáno, že rozdíly mezi referenčními a predikovanými hodnotami nejsou statisticky významné.

Závěr

Byla vyvinuta a validována metoda pro off-line stanovení tloušťky polymerního obalu tablet. Dosažené výsledky prokázaly, že kvantitativní NIR spektroskopie je spolehlivou a rychlou metodou při stanovení tloušťky obalu. Tato metoda je použitelná jako jedna z procedur kontroly kvality obalených tablet ve farmaceutické technologii. Při

analýzách není vyžadována žádná úprava vzorku, doba trvání jedné analýzy je přibližně 3 min na rozdíl od běžných metod, které jsou časově náročnější.

LITERATURA

- Chisholm B. J., Stafslie S. J., Christianson D. A., Gallagher-Lein C., Daniels J. W., Rafferty C., Vander W. L., Webster D. C.: *Appl. Surf. Sci.* 254, 692 (2007).
- Pandey P., Turton R., Joshi N., Hammerman E., Ergun J.: *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 7, 4 (2006).
- Krejčová K., Rabišková M., Vetchý D., Tomášek V., Prokopová A.: *Čes. Slov. Farm.* 56, 190 (2007).
- Levina M., Cunningham C. R.: *Pharm. Techn. Eur.* 17, 29 (2005).
- Siepmann F., Siepmann J., Walther M., Macrae R. J., Bodmeier R.: *J. Control. Release* 125, 1 (2008).
- Bose S., Bogner R. H.: *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 8, 57 (2007).
- Rabišková M., Fričová V.: *Praktické Lékárenství* 4, 186 (2008).
- Fitzgerald A. J., Cole B. E., Today P. F.: *J. Pharm. Sci.* 94, 177 (2005).
- Luypaert J., Massart D. L., Heyden Y. V.: *Talanta* 72, 865 (2007).
- Azzouz T., Tauler R.: *Talanta* 74, 1201 (2008).
- Andersson M., Josefson M., Langkilde F. W., Wahlund K. G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 27 (1999).
- Kirsch J. D., Drennen J. K.: *Pharm. Res.* 13, 234 (1996).
- Andersson J., Folestad S., Gottfries J., Johansson M. O., Josefson M., Wahlund K. G.: *Anal. Chem.* 72, 2099 (2000).
- Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., Pagès J.: *Anal. Chim. Acta* 384, 207 (1999).
- Reich G.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 1109 (2005).
- Laasonen M., Harmia-Pulkkinen T., Simard C., Räsänen M., Vuorela H.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 21, 493 (2004).
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., Jong S., Smeyers-Verbeke J., v knize: *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A* (Vandeginste B. G. M., Rutan S. C., ed.), kap. 10. Elsevier, Amsterdam 1997.

J. Muselík^a, K. Krejčová^a, M. Rabišková^a, A. Bartošiková^a, M. Dračková^b, and L. Vorlová^b (^a Department of Pharmaceutics, ^b Institute of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic): **Determination of the Thickness of Tablet Coating by Near-Infrared Spectroscopy**

The aim of this study was to develop a fast and reliable method for determination of tablet coating thickness. Tablets were coated with polymeric Pharmacoat[®] 606 in a laboratory coater. The coating thickness was measured by near-IR absorption of the coating material using calibration. The calibration and validation results afforded the following parameters: determination coefficient $R^2 > 0.97$, the number of factors 6 and the standard error of cross-validation 5.4 μm at the coating thickness 25–125 μm . The obtained results confirmed suitability of the method for evaluation of coating quality.