



ZASTOSOWANIE *STATISTICA* PROFILE UWALNIANIA W PRACACH BADAWCZYCH I PRZEMYSŁE FARMACEUTYCZNYM

*Bartłomiej Milanowski, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku*

Prezentowany artykuł poświęcony jest zagadnieniom związanym z porównywaniem profili uwalniania substancji leczniczej z postaci leku. Po przedstawieniu najważniejszych informacji koniecznych do zrozumienia idei tych metod zaprezentowane zostaną przykłady ich zastosowań. Przedstawione w pracy obliczenia oraz wykresy zostały wykonane za pomocą programu *STATISTICA*.

Wprowadzenie

Proces uwalniania substancji leczniczej z postaci leku, zwany dostępnością farmaceutyczną, jest ważnym etapem dla efektu działania leku, niezależnie od drogi podania. W związku z tym badanie uwalniania jest przyjęte jako jedna z metod oceny jakości preparatów na etapie przygotowania nowej formułacji, a po ich rejestracji staje się testem rutynowym, mającym udowodnić powtarzalność procesu produkcyjnego dla każdej serii preparatu. Służy również ocenie wpływu zamierzonych zmian składu formułacji, parametrów procesu produkcyjnego oraz warunków przechowywania na właściwości finalnego produktu. Badanie to może wykazać różnorodne zmiany właściwości leku, nawet te trudne do wykrycia innymi metodami. W związku z tym farmakopealne badanie dostępności farmaceutycznej stanowi ważny element całkowitej charakterystyki produktu leczniczego (*Summary of Product Characteristics – SPC*).

Zależnie od potrzeb, badania te można prowadzić, stosując test jednopunktowy lub wielopunktowy. W teście jednopunktowym określa się ilość uwolnionej substancji leczniczej (Q) do płynu akceptorowego po określonym czasie, a następnie uzyskany wynik odnosi się do wcześniej przyjętych kryteriów akceptacji. W teście wielopunktowym uzyskuje się informacje dotyczące zmian ilości uwolnionej substancji leczniczej w kilku lub nawet kilkunastu punktach czasowych. Na podstawie uzyskanych danych można wyznaczyć zależność ilości uwolnionej substancji leczniczej od czasu prowadzenia badania, tworząc profil (krzywą) uwalniania substancji leczniczej. Profile uwalniania charakteryzują produkt leczniczy bardziej precyzyjnie niż test jednopunktowy i dlatego uznawane są za ważny element na etapie prac rozwojowych nad postacią leku, który dodatkowo pozwala określić



prędkość oraz stopień uwalniania substancji leczniczej. W związku z tym najkorzystniej jest sporządzić krzywe uwalniania substancji leczniczej dla różnych formułacji czy serii produkcyjnych, a następnie porównywać podobieństwo uzyskanych profili, używając odpowiednich narzędzi matematycznych, takich jak metody: statystyczne, niezależne bądź zależne od modelu. Do tego celu doskonale nadaje się jeden z modułów dedykowanego rozwiązania informatycznego *STATISTICA Zestaw Farmaceutyczny: STATISTICA Profile Uwalniania*.

Metody

Porównanie profili uwalniania może być prowadzone różnymi metodami, które ze względu na naturę procesów statystycznych zostały podzielone na dwie grupy:

- ◆ metody niezależne od modelu, m.in: test t-studenta, analiza wariancji (ANOVA), analiza kowariancji (ANCOVA) (w odniesieniu do jednopunktowego badania uwalniania substancji leczniczej, jak i do wielopunktowych profili uwalniania); czynników podobieństwa i różnicy, analiza wielowymiarowa (oparta na odległości Mahalanobisa), analiza split-split;
- ◆ metody zależne od modelu, takie jak: Weibulla, Gompertza, modelu logistycznego.

Weryfikacja podobieństwa profili uwalniania powinna być zawsze poprzedzona porównaniem na wykresie krzywych uwalniania dla zbioru testowego i referencyjnego (eksploracja danych).

W metodach niezależnych od modelu nie ma znaczenia kształt porównywanych krzywych. W przypadku metod zależnych od modelu zakłada się, że do danego profilu uwalniania można dopasować krzywą teoretyczną opisaną równaniem odpowiedniej funkcji. Wykorzystując metody tego typu, w pierwszym etapie do wyników eksperymentalnych dopasowuje się odpowiednią krzywą, co pozwala ocenić, czy nie występują znaczące różnice pomiędzy kształtem założonej funkcji a rzeczywistym przebiegiem profilu, a następnie oblicza się parametry modeli dla zbioru referencyjnego oraz testowego. Kolejnym krokiem jest porównanie parametrów uzyskanych dla obydwu modeli. W tego typu metodach wybór odpowiedniej krzywej jest czynnikiem krytycznym. Jeżeli ogólny model dla krzywych został niepoprawnie wybrany, zazwyczaj będzie to prowadzić do błędnego porównania profili uwalniania.

Poniżej zostaną omówione trzy metody służące do porównywania profili uwalniania zaimplementowane w *STATISTICA Profile Uwalniania*.

Metoda czynników podobieństwa (f_2) i różnicy (f_1)

Z grupy metod niezależnych od modelu powszechnie zalecaną, najprostszą i najczęściej stosowaną metodą porównania profili uwalniania jest metoda czynników podobieństwa i różnicy. Polega ona na wyznaczeniu dwóch czynników (f_1 , f_2) i porównaniu ich wartości z ustalonymi wartościami progowymi.



Wartość czynnika różnicy (f_1) oblicza się za pomocą następującego wzoru:

$$f_1 = \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} 100$$

gdzie: R_t i T_t stanowią średni procent uwolnienia w punkcie czasowym t , odpowiednio dla próby referencyjnej i testowej; n jest liczbą testowanych punktów w czasie t .

Czynnik f_1 wyraża procentową różnicę pomiędzy dwoma profilami w poszczególnych punktach czasowych i jest miarą relatywnej różnicy (względnej błęd) pomiędzy dwoma krzywymi.

Z kolei wartość czynnika podobieństwa (f_2) wyrażona jest następującym równaniem:

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

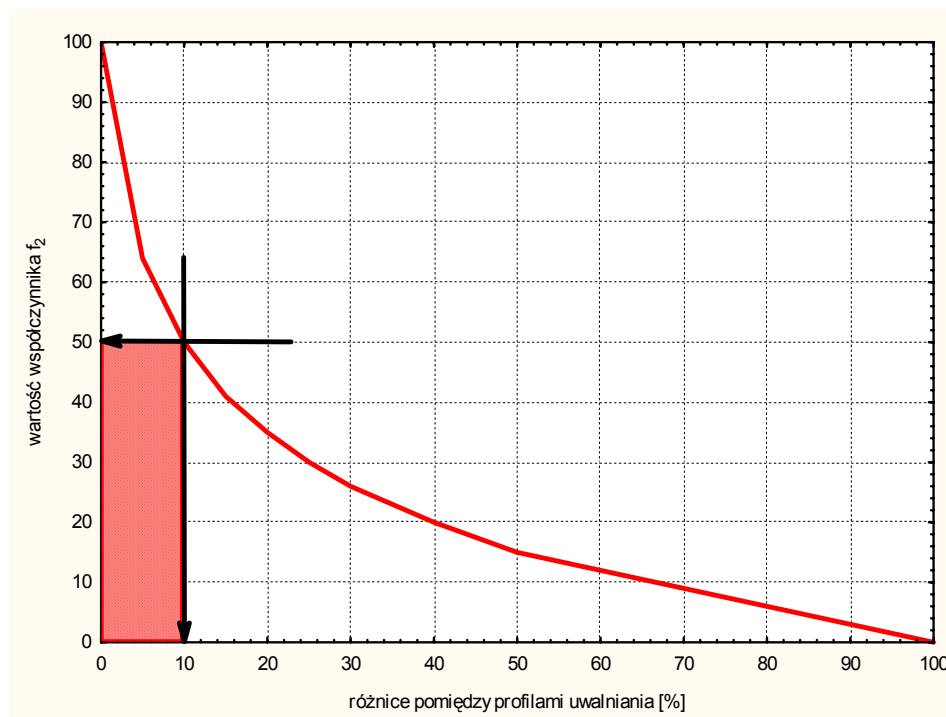
Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (*FDA*) poprawne obliczenie czynników f_1 i f_2 wymaga następujących warunków:

- ◆ badania uwalniania substancji aktywnej z postaci leku należy prowadzić w identycznych warunkach w przypadku obydwu preparatów, z zachowaniem tego samego czasu pobierania próbek;
- ◆ dla każdego z porównywanych preparatów należy wykonać co najmniej 12 profili uwalniania (12 jednostek dla każdego produktu);
- ◆ obliczenia powinny być prowadzone w oparciu o dane uzyskane co najmniej w trzech punktach czasowych;
- ◆ należy użyć średnich wartości uwalniania dla każdego punktu czasowego;
- ◆ w obliczeniach należy uwzględnić tylko jeden punkt czasowy, dla którego poziom uwolnienia substancji aktywnej wynosi powyżej 85%, gdyż od pewnego stopnia uwolnienia (>85%) profile mają praktycznie przebieg równoległy do osi odciętych (czasu) a większość z obserwowanych różnic wynika z niepewności pomiaru (uwzględniając w obliczeniach odpowiednią liczbę takich punktów, zachodzi ryzyko wykazania podobieństwa nawet tych krzywych, które wykazują różnice w najbardziej interesującym zakresie 0-85% uwolnienia substancji czynnej);
- ◆ wartość współczynnika zmienności dla poszczególnych poziomów uwolnienia wyznaczonych w początkowej fazie badania (czas <15 min.) powinna być mniejsza niż 20%,

a w dalszych etapach mniejsza niż 10% (wymusza to na badaczu uzyskanie danych o odpowiedniej jakości, która zależy m.in. od jakości pomiaru);

- ◆ w sytuacji gdy zmienność uzyskanych wyników jest zbyt duża, można wykorzystać technikę bootstrappingu w celu obliczenia przedziału ufności lub metodę opartą na wielowymiarowej analizie danych (metoda Mahalanobisa);
- ◆ w przypadku produktów leczniczych, dla których 85% substancji leczniczej ulega uwolnieniu w czasie krótszym niż 15 minut, matematyczne porównanie profili uwalniania nie jest konieczne.

Przyjmuje się, że profile uwalniania wykazują podobieństwo, gdy wartość f_1 mieści się w granicach od 0 do 15, natomiast f_2 przyjmuje wartość bliską 100 (sugerowane jest, aby nie była ona mniejsza od 50). Ogólnie stwierdzono, że im mniejsza różnica (f_1) i im większe podobieństwo (f_2), tym łatwiej wykazać podobieństwo profili. W praktyce wyniki obliczeń czynnika podobieństwa wykazują, że różnice pomiędzy profilami uwalniania w poszczególnych punktach czasowych nie przekraczają 10% (rys. 1).



Rys. 1. Zależność pomiędzy wartością współczynnika f_2 a różnicą pomiędzy profilami uwalniania.

Metoda oparta na wielowymiarowej analizie danych (Mahalanobisa)

W przypadku danych o większej zmienności (>15%) FDA proponuje inną, niezależną od modelu metodę, opartą na wielowymiarowej analizie danych. Wytyczne nie precyzują sposobu obliczania, a jedynie ogólne założenia, które metoda powinna uwzględnić:

- ◆ określenie kryterium akceptacji, które będzie odpowiednie dla wielowymiarowej odległości i zarazem porównywalne ze zmiennością wewnątrz danych otrzymanych dla próby referencyjnej (zatwierdzonego standardu);



- ◆ wyznaczenie wielowymiarowej odległości pomiędzy średnimi wartościami uwalniania obliczonymi dla badanych serii w kolejnych punktach czasowych;
- ◆ obliczenie 90% przedziału ufności dla powyższej odległości;
- ◆ porównanie obliczonego limitu z ustalonym kryterium akceptacji.

Dwa profile można uznać za podobne, jeżeli górna granica przedziału ufności jest mniejsza lub równa kryterium akceptacji.

W metodzie opartej na wielowymiarowej analizie danych wartości kryteriów akceptacji zależą od zmienności, jaką charakteryzuje się referencyjny zbiór danych w odróżnieniu od narzuconych z góry wartości czynników f_1 i f_2 w metodzie poprzedniej. Kolejnym wyróżnikiem jest użycie o wiele bardziej zaawansowanych obliczeń (nie omawianych w pracy), wynikających z zastosowanego w metodzie rachunku macierzowego, opartego na teorii statystycznej uwzględniającej zależność pomiędzy kolejnymi punktami w przebiegu krzywych uwalniania. Mamy tu do czynienia z autokorelacją, która w teorii jest uwzględniona w tak zwanej przestrzeni Mahalanobisa. Jeżeli jednak obliczenia zostaną już wykonane, samo wnioskowanie na temat podobieństwa profili jest tak samo proste, jak w przypadku czynników f_1 i f_2 .

Metoda oparta na funkcji Weibulla

Funkcja dystrybuanty rozkładu Weibulla, wykorzystywana w modelowaniu krzywych uwalniania, określona jest następującym wzorem:

$$m = m_{\infty} \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{t_d}\right)^{\beta}} \right)$$

gdzie: m - procent uwolnienia substancji leczniczej w czasie t , m_{∞} - asymptota uwolnienia ($m_{\infty} = 100\%$), t_d - parametr definiujący skalę czasową procesu, β - parametr charakteryzujący kształt krzywej uwalniania (jeżeli $\beta=1$, to krzywa ma przebieg wykładniczy, w przypadku gdy $\beta < 1$ - krzywa ma przebieg paraboliczny, natomiast gdy $\beta > 1$ - mamy do czynienia z krzywą sigmoidalną).

To właśnie parametr kształtu krzywej uwalniania stanowi o tym, że proponowany tutaj model jest niezwykle elastyczny i pozwala opisać niemal wszystkie przebiegi profilu uwalniania substancji leczniczej. Dzięki temu jest on polecany w wytycznych *FDA* do opisu i porównania profili uwalniania. Pomimo swej uniwersalności model Weibulla ma jednak również ograniczenia. Brak kinetycznych podstaw modelu (brak parametru bezpośrednio powiązanego z kinetyką uwalniania substancji leczniczej) pozwala jedynie opisać profil uwalniania bez możliwości charakterystyki kinetyki uwalniania substancji czynnej.

Stosując tą metodę, należy dla każdego profilu cząstkowego wyznaczyć parametry funkcji teoretycznej, które zapewnią najlepsze dopasowanie. Jedyny problem to dobór optymalnych parametrów, które można sprowadzić do dobrze znanego i opisanego zagadnienia regresji liniowej.



Program *STATISTICA Profile Uwalniania*, po obustronnym zlogarytmowaniu funkcji Weibulla, sprowadza ją do postaci liniowej $y = ax + b$, która przyjmuje następującą postać:

$$\ln\left(-\ln\left(1 - \frac{m}{m_{\infty}}\right)\right) = \beta \ln(t) - \beta \ln(t_d)$$

gdzie: $y = \ln\left(-\ln\left(1 - \frac{m}{m_{\infty}}\right)\right)$, $a = \beta$, $x = \ln(t)$, $b = -\beta \ln(t_d)$

Dla tak przekształconej funkcji, dla każdej z 12 prób (odpowiadających postaciom leku), może zostać dopasowana prosta za pomocą metody regresji liniowej. Wymagane jest, aby współczynnik korelacji dopasowania prostej regresji był większy od 0,99. Otrzymana w ten sposób wartość a będzie odpowiadała parametrowi kształtu β , natomiast wartość parametru skali t_d można obliczyć na podstawie wzoru:

$$t_d = e^{-\frac{a}{\beta}}$$

W ten sposób otrzymujemy zbiór danych, dla którego pozostaje przeprowadzić test istotności różnic. Następnie, zgodnie z wymogami *FDA*, program określa 90% przedział ufności dla różnicy pomiędzy dwoma profilami i porównuje z kryterium akceptacji – wyznaczonym w oparciu o zmienność parametrów dla zbioru referencyjnego. Używając jednoczynnikowej analizy ANOVA, przy założeniu standardowego poziomu istotności 0,05, zostaje zweryfikowana istotność różnicy pomiędzy wartościami średnimi parametrów t_d dla dwóch zbiorów (referencyjnego i testowego). Analiza daje odpowiedź na pytanie, czy wspomniane dwa zbiory różnią się od siebie w sposób istotny statystycznie. Jeżeli wartość obliczonego prawdopodobieństwa p (istotność statystyczna wyniku) jest większa od 0,05, wtedy nie ma podstaw, aby odrzucić hipotezę o równości zbiorów - czyli porównywane profile nie różnią się od siebie. Standardowo w statystyce przyjmuje się, że różnica pomiędzy dwoma profilami jest istotna w przypadku, gdy $p < 0,05$. W przypadku tej metody, będącej metodą zależną od modelu, ważne jest spełnienie założenia dobrego przybliżenia profilu poprzez teoretyczny model Weibulla. Do zweryfikowania poprawności dopasowania, po transformacji liniowej danych, program wykorzystuje statystyki R^2 .

O programie

STATISTICA Profile Uwalniania pracuje wyłącznie w środowisku wszechstronnego programu *STATISTICA Pakiet Podstawowy* w wersji 8. *Zestaw Profile Uwalniania* na podstawie danych zebranych dla serii referencyjnej oraz dla jednej lub kilku serii testowych automatycznie przeprowadza odpowiednie testy statystyczne, które w szybki sposób udzielają odpowiedzi na pytanie, czy profile uwalniania dla rozważanych serii nie różnią się od siebie w istotny sposób. Warto podkreślić, że program nie nakłada ograniczeń co do liczby tabletek wykorzystanych w teście, ani co do maksymalnej liczby punktów czasowych (co najmniej 3), w których był badany stopień uwolnienia substancji czynnej z postaci leku. Cecha ta jest niewątpliwą zaletą w przypadku prac badawczo-rozwojowych nad nową formacją. W końcowym raporcie tworzone są statystyki, które pozwalają sprawdzić



założenia dla wykonanego testu oraz sporządzić komentarz o jego wyniku, co ułatwia interpretację. W zestawie dostępne są trzy metody porównujące podobieństwo profili:

- ◆ metoda niezależna od modelu - czynników podobieństwa i różnicy (f_1, f_2),
- ◆ metoda niezależna od modelu oparta na odległości Mahalanobisa,
- ◆ metoda zależna od modelu oparta na funkcji Weibulla.

Wymienione metody zostały zaproponowane w opublikowanym przez FDA dokumencie "Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms". W przypadku pierwszej z przytoczonych wyżej metod dokument opisuje sposób obliczania czynników oraz podaje założenia, których wypełnienie jest niezbędne, aby posłużyć się wynikami testu. Dla pozostałych dwóch metod przytoczone zostały ogólne zasady konstruowania testów, bez szczegółowego opisu. Dlatego też, bazując na własnym doświadczeniu oraz uwzględniając sugestie i uwagi branżowe, firma StatSoft zaproponowała odpowiednie testy statystyczne, które zostały zawarte w pakiecie.

Przykład wykorzystania programu *STATISTICA Profile Uwalniania*

Działanie programu zostanie zaprezentowane na przykładzie wykorzystania wyników otrzymanych w czasie ćwiczenia realizowanego przez studentów V roku na kierunku Farmacja, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Ćwiczenie polega na określeniu wpływu substancji wiążących na szybkość i profil uwalniania kwasu acetylosalicylowego (ASA) z tabletek. Badanie wykonywane jest z użyciem tabletek referencyjnych i testowych (wytworzonych w ramach ćwiczeń) o następującym składzie:

Tabletki referencyjne o składzie:

<i>Kwas acetylosalicylowy</i>	<i>500 mg</i>
<i>Celuloza i skrobia kukurydziana</i>	<i>100 mg</i>

Tabletki badane o składzie:

<i>Kwas acetylosalicylowy</i>	<i>500 mg</i>
<i>Granulat prosty</i>	<i>500 mg</i>
<i>Talk</i>	<i>40 mg</i>
<i>Stearynian magnezu</i>	<i>10 mg</i>
<i>1% kleik z metylocelulozy (lub 5% kleik żelatynowy lub skrobiowy)</i>	<i>q.s.</i>

W eksperymencie użyto po dwanaście tabletek dla każdej z czterech serii (jedna referencyjna i trzy testowe). Badania uwalniania prowadzono w 500 ml płynu akceptorowego (bufor octanowy o pH 4,5 i temp. $37 \pm 0,5$ °C) z wykorzystaniem aparatu łopatkowego (szybkość obrotów mieszadła na poziomie 50 obrotów/min.). Ilość uwolnionego ASA oznaczono spektrofotometrycznie w sześciu punktach czasowych, tj. 5, 10, 15, 20, 25 i 30 min, przy $\lambda_{\max} = 267$ nm. Na podstawie uzyskanych danych dla każdej tabletki obliczono % uwolnionego ASA w danym punkcie czasowym, a następnie wykorzystując *STATISTICA Profile Uwalniania*, porównano krzywe uwalniania badanych tabletek i preparatu referencyjnego.

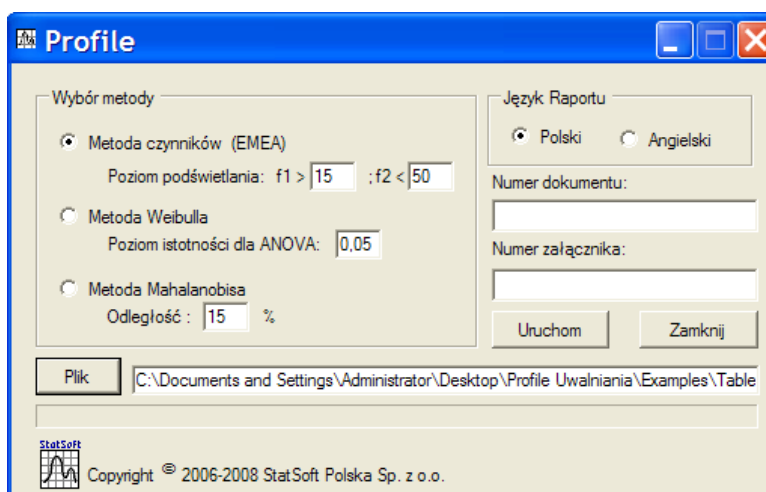


W tym celu dane wprowadzono do arkusza *STATISTICA* i zapisano utworzony plik (rys. 2). Następnie uruchomiono program *Profile*, gdzie do analizy wybrano zapisany wcześniej plik, test oraz język raportu i wygenerowano analizę (rys. 3).

The screenshot shows the STATISTICA software window with a menu bar and a toolbar. The main window displays a data table with the following content:

	1	2	3	4	5	6
tabletka/czas	5.00	10.00	15.00	20.00	25.00	30.00
1	42.06	65.58	77.77	85.67	90.41	93.14
2	44.16	67.17	76.11	83.27	86.64	88.01
3	45.63	65.56	76.92	83.91	86.37	86.83
4	48.52	66.51	78.54	84.99	87.49	88.00
5	50.49	69.06	78.99	86.86	89.28	89.70
6	40.56	66.33	74.85	84.33	89.42	92.50
7	48.23	68.00	77.13	82.55	86.86	89.16
8	46.13	67.13	76.55	85.43	87.21	87.00
9	43.54	64.92	79.16	83.99	87.56	89.12
10	47.36	68.15	77.54	84.76	89.04	91.33
11	44.92	66.97	78.66	86.14	88.01	87.88
12	49.77	69.77	80.18	84.20	87.54	88.88

Rys. 2. Skoroszyt z arkuszami do wprowadzania danych referencyjnych i testowych (badanych).



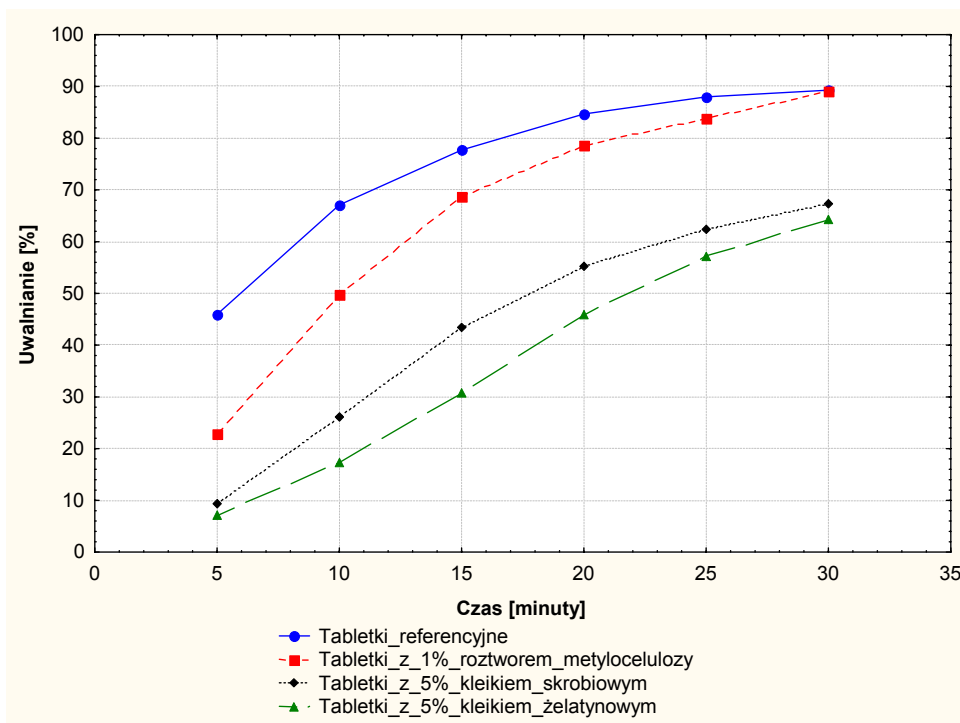
Rys. 3. Okno dialogowe programu *Profile*.

W oknie programu wybrano metodę oraz ewentualnie zmieniono domyślne ustawienia parametrów dla wybranej analizy. W wyniku działania każdej z metod utworzone zostały arkusze podsumowujące. Dla każdej z rozpatrywanych serii i dla każdego punktu czasowego program wyznaczył statystyki opisowe (rys. 4). W raporcie podsumowującym, niezależnie od użytej metody, znajduje się również wykres pomocny w graficznym porównaniu profili uwalniania (rys. 5).



	Tabletki z 1% roztworem metylcelulozy							Tabletki z 5% kleikiem skrobiowym					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
tabletki/czas	5	10	15	20	25	30	tabletki/czas	5	10	15	20	25	30
1	17.99	47.77	65.69	75.69	81.37	89.39	1	7.65	24.19	40.57	52.42	60.04	67.71
2	22.08	49.46	67.22	77.22	82.42	87.93	2	10.74	25.88	42.1	53.95	61.09	66.25
3	23.93	47.76	65.25	75.25	83.49	88.19	3	9.59	24.18	40.13	51.98	62.16	66.51
4	20.44	49.72	69.21	79.21	84.93	90.12	4	10.04	26.14	44.09	55.94	63.62	68.44
5	25.67	52.68	71.51	81.51	86.61	90.8	5	10.33	29.18	46.39	58.24	65.28	69.12
6	26.37	51.01	69.44	79.44	85.9	89.45	6	8.03	27.43	44.32	56.17	64.57	67.77
7	25.44	48.45	72.01	82.01	81.99	90.77	7	10.12	24.87	46.89	58.74	60.66	69.09
8	22.55	47.99	66.44	76.44	87.01	88.25	8	9.21	24.41	41.32	53.17	65.68	66.57
9	23.44	52.16	68.99	78.99	83.55	88.66	9	10.57	28.58	43.87	55.72	62.22	66.98
10	25.13	49.33	67.15	77.15	82.77	91.54	10	9.79	25.75	42.03	53.88	61.44	69.86
11	18.79	48.72	69.55	79.55	83.14	87.08	11	6.45	25.14	44.43	56.28	61.81	65.44
12	22.88	50.99	70.66	80.66	82.15	85.02	12	9.54	27.41	45.54	57.39	60.82	63.34
Średnia	22.89	49.67	68.59	78.59	83.78	88.93	Średnia	9.34	26.1	43.47	55.32	62.45	67.26
Minimum	17.99	47.76	65.25	75.25	81.37	85.02	Minimum	6.45	24.18	40.13	51.98	60.04	63.34
Maksimum	26.37	52.68	72.01	82.01	87.01	91.54	Maksimum	10.74	29.18	46.89	58.74	65.68	69.86
Odchylenie standardowe	2.7	1.69	2.23	2.23	1.89	1.82	Odchylenie standardowe	1.31	1.7	2.23	2.23	1.89	1.81
Współczynnik zmienności (%)	11.8	3.4	3.26	2.84	2.26	2.05	Współczynnik zmienności (%)	14	6.53	5.14	4.04	3.03	2.7
	Tabletki z 5% kleikiem żelatynowym							Tabletki referencyjne					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
tabletki/czas	5	10	15	20	25	30	tabletki/czas	5	10	15	20	25	30
1	5.74	16.34	27.18	42.65	55.06	62.95	1	42.06	65.58	77.77	85.67	90.41	93.14
2	8.05	18.14	33.24	48.86	58.07	64.34	2	44.16	67.17	76.11	83.27	86.64	88.01
3	7.99	17.98	31.46	47.22	59.02	66.38	3	45.63	65.56	76.92	83.91	86.37	86.83
4	7.58	18.94	33.14	49.71	62.14	69.91	4	48.52	66.51	78.54	84.99	87.49	88.11
5	7.75	19.37	33.89	46.84	63.55	61.52	5	50.49	69.06	78.99	86.86	89.28	89.71
6	6.02	14.06	28.35	43.52	57.41	65.58	6	40.56	66.33	74.85	84.33	89.42	92.52
7	7.87	18.94	33.04	48.72	54.14	69.91	7	48.23	68.01	77.13	82.55	86.86	89.16
8	6.91	17.27	30.22	45.33	56.66	63.75	8	46.13	67.13	76.55	85.43	87.21	87.02
9	7.13	18.32	31.89	49.83	54.24	59.91	9	43.54	64.92	79.16	83.99	87.56	89.12
10	7.34	18.35	32.16	44.19	60.73	67.76	10	47.36	68.15	77.54	84.76	89.04	91.33
11	4.84	12.09	25.95	35.75	47.65	54.64	11	44.92	66.97	78.66	86.14	88.01	87.88
12	7.16	17.89	27.31	46.96	58.69	66.03	12	49.77	69.77	80.18	84.21	87.54	88.88
Średnia	7.03	17.31	30.65	45.8	57.28	64.39	Średnia	45.95	67.1	77.7	84.67	87.99	89.3
Minimum	4.84	12.09	25.95	35.75	47.65	54.64	Minimum	40.56	64.92	74.85	82.55	86.37	86.83
Maksimum	8.05	19.37	33.89	49.83	63.55	69.91	Maksimum	50.49	69.77	80.18	86.86	90.41	93.14
Odchylenie standardowe	1	2.17	2.77	3.96	4.24	4.33	Odchylenie standardowe	3.07	1.45	1.49	1.22	1.27	2.05
Współczynnik zmienności (%)	14.29	12.55	9.03	8.65	7.4	6.72	Współczynnik zmienności (%)	6.67	2.17	1.92	1.45	1.44	2.3

Rys. 4. Arkusze podsumowujące zebrane dane z policzonymi statystykami opisowymi.



Rys. 5. Profile średnie (n=12) uwalniania kwasu acetylosalicylowego (ASA) z tabletek referencyjnych i badanych.



Po wybraniu w oknie dialogowym (rys. 3) pierwszej z metod i określeniu kryteriów akceptacji (poziomów podświetlenia) dla czynników kliknięto przycisk *OK*. Wynikiem działania programu był raport w programie *STATISTICA*. Podsumowanie wyników zilustrowano na rys. 6.

f1.	Profile podobne gdy czynnik f1 < 15.		
	1	2	3
	Tabletki_z_1%_roztworem_metylocelulozy	Tabletki_z_5%_kleikiem_skrobiowym	Tabletki_z_5%_kleikiem_zelatynowym
a) Tabletki_referencyjne	13.31	41.7	50.86

f2.	Profile podobne gdy czynnik f2 > 50.		
	1	2	3
	Tabletki_z_1%_roztworem_metylocelulozy	Tabletki_z_5%_kleikiem_skrobiowym	Tabletki_z_5%_kleikiem_zelatynowym
b) Tabletki_referencyjne	44.68	24.65	20.26

Rys. 6. Wyniki porównania profili uwalniania metodą czynników: a) różnicy f_1 ; b) podobieństwa f_2 .

Podświetlenie komórek z wartościami f_1 i f_2 oznacza, że odpowiednie wartości przekraczają założone kryteria akceptacji. W tym przypadku serie badane wykazały brak podobieństwa z serią referencyjną.

Alternatywnie, dla tego samego pliku danych, wybrano metodę Weibulla (rys. 3). Również w tym przypadku w wyniku analizy statystycznej z użyciem testu ANOVA hipoteza o równości profili uwalniania dla serii referencyjnej i serii badanych została odrzucona (rys. 7).

p.	Profile podobne gdy $p > 0.05$		
	1	2	3
	Tabletki_z_1%_roztworem_metylocelulozy	Tabletki_z_5%_kleikiem_skrobiowym	Tabletki_z_5%_kleikiem_zelatynowym
Tabletki_referencyjne	0	0	0

Rys. 7. Wynik analizy podobieństwa profili uwalniania metodą Weibulla (komórki z prawdopodobieństwem testowym są podświetlone na czerwono).

Zestawienie współczynników determinacji (R^2).				
	1	2	3	4
	Tabletki_referencyjne	Tabletki_z_1%_roztworem_metylocelulozy	Tabletki_z_5%_kleikiem_skrobiowym	Tabletki_z_5%_kleikiem_zelatynowym
1	0.999	0.983	0.987	0.998
2	0.983	0.987	0.992	0.994
3	0.979	0.998	0.994	0.996
4	0.982	0.986	0.989	0.998
5	0.986	0.992	0.981	0.989
6	0.994	0.995	0.974	0.993
7	0.995	0.98	0.977	0.995
8	0.971	0.992	0.989	0.998
9	0.983	0.985	0.984	0.989
10	0.998	0.996	0.994	0.998
11	0.969	0.969	0.961	0.995
12	0.983	0.962	0.964	0.992
Śr.	0.985	0.985	0.982	0.995

Rys. 8. Zestawienie współczynników determinacji (R^2).



Poprawne stosowanie metody wymaga odpowiedniego dopasowania dystrybuanty rozkładu Weibulla do danych, dlatego dla każdej z prób został obliczony parametr R^2 (rys. 8), który powinien przyjmować wartości $R^2 > 0,95$.

W przypadku analizy podobieństwa profili, dla rozważanego pliku danych, metodą niezależną od modelu opartą na odległości Mahalanobisa, w głównym oknie programu wybrano trzecią z opcji (rys. 3). W raporcie wygenerowana zostaje tabela z wynikami testu (rys. 9).

Dopuszczalna odległość: 15%.			
	1 Tabletki_z_1%_roztworem_ metylocelulozy	2 Tabletki_z_5%_kleikiem_ skrobiowym	3 Tabletki_z_5%_kleikiem_ żelatynowym
Tabletki_referencyjne	Podobieństwo	Brak podob.	Brak podob.

Rys. 9. Wynik analizy podobieństwa profili uwalniania metodą opartą na odległości Mahalanobisa.

Aby przyjąć hipotezę o równości dwóch profili uwalniania, przedział ufności dla różnicy pomiędzy profilami musi mieścić się w założonym przedziale zdefiniowanym przez parametr *Dopuszczalna odległość profili w %* (rys. 3). Wynik tego testu został również przedstawiony w formie tabeli (rys. 10).

1 Serie	2 GGPU	3 DR
Tabletki_referencyjne - Tabletki_z_1%_roztworem_metylocelulozy	2.03	15
Tabletki_referencyjne - Tabletki_z_5%_kleikiem_skrobiowym	23.71	15
Tabletki_referencyjne - Tabletki_z_5%_kleikiem_żelatynowym	26.57	15

Rys. 10. Porównanie obliczonego limitu z ustalonym kryterium akceptacji, gdzie: GGPU oznacza górną granicę przedziału ufności, DR to dopuszczalna różnica.

Opisany przykład doskonale ilustruje łatwość użytkowania, szybkość wykonywania analiz i funkcjonalność pakietu *STATISTICA Profile Uwalniania*.

OCENA: Preparat referencyjny oraz badany z dodatkiem 1% roztworu metylocelulozy spełniają normy farmakopealne dla tabletek konwencjonalnych (uwalniają >80% substancji aktywnej w ciągu 30 min). Na podstawie przeprowadzonego eksperymentu można stwierdzić, że procentowa zawartość ASA oraz substancji pomocniczych w tablecie ma decydujący wpływ na stopień uwolnienia substancji leczniczej. Najmniejszą szybkość i stopień uwalniania, a tym samym najsilniejsze właściwości wiążące (w porównaniu do preparatu referencyjnego), wykazują tabletki z dodatkiem 5% kleiku żelatynowego > 5% kleiku skrobiowego > 1% roztworu metylocelulozy. Wykazano, że profile uwalniania ASA z badanych formuacji są statystycznie istotnie różne od krzywej uwalniania sporządzonej dla tabletek referencyjnych.

Wykonała: Grupa 6a Data: 13/11/2008r Podpis:

Zatwierdził: mgr farm. Bartłomiej Milanowski Data: 14/11/2009 Podpis:

Rys. 11. Okno z wnioskami z przeprowadzonej analizy wygenerowane w raporcie programu *STATISTICA*.



Widać, że po wprowadzeniu danych, program automatycznie przeprowadza odpowiednie analizy statystyczne oraz generuje kompleksowy, gotowy do wykorzystania raport w języku polskim lub angielskim, zawierający zestawienie wyników w formie tabelarycznej, graficznej oraz w postaci wniosków osoby przeprowadzającej analizę (rys. 11).

Wygenerowany raport może zostać zapisany w postaci pliku raportu *STATISTICA*, pliku w formacie *PDF* lub w postaci pliku *Microsoft Word*.

Zastosowanie

Właściwie opracowana metodyka badań dostępności farmaceutycznej, na którą składa się również porównanie profili uwalniania, powinna dostarczać informacji z trzech podstawowych dziedzin. Po pierwsze badania uwalniania powinny odzwierciedlać zmiany właściwości fizyko-chemicznych produktu leczniczego, na skutek których zmienia się ilość lub szybkość uwalniania substancji leczniczej. Po drugie powinny umożliwiać różnicowanie preparatów produkowanych innymi metodami, zawierających inne substancje pomocnicze. Po trzecie, gdy istnieje korelacja pomiędzy wynikami uzyskanymi w warunkach *in vitro* i *in vivo* (*In vitro in vivo correlation – IVIVC*), uwalnianie substancji leczniczej powinno odzwierciedlać jej dostępność biologiczną.

O niezmiernej istotności badania uwalniania substancji leczniczej z postaci leku świadczy fakt opublikowania szeregu wytycznych porządkujących związane z nim zagadnienia. Wytyczne opracowane przez Europejską Agencję ds. Leków (*EMEA*) dotyczą przede wszystkim zastosowania badań dostępności farmaceutycznej jako wstępnego badania w ramach badań dostępności i równoważności biologicznej oraz kontroli jakości produktów leczniczych o przedłużonym uwalnianiu. W związku z tym przedstawione są w nich następujące aspekty badania uwalniania substancji leczniczej z oceną uzyskanych profili:

- ◆ porównanie preparatów referencyjnych z różnych krajów;
- ◆ porównanie różnych formułacji;
- ◆ element kontroli jakości wytwarzania produktu leczniczego (m.in. porównanie powtarzalności serii, badania stabilności produktów leczniczych);
- ◆ źródło informacji, zarówno na temat produktu referencyjnego, jak i informacji uzupełniających, w badaniach dostępności i równoważności biologicznej;
- ◆ element badań równoważności biologicznej zastępujący w uzasadnionych przypadkach badania *in vivo*.

W odróżnieniu od wytycznych europejskich (*EMEA*), wytyczne opracowane przez *FDA* prezentują wielokierunkowe podejście do problematyki dotyczącej badań dostępności farmaceutycznej. Podstawowe kierunki, dla których opracowano wytyczne, obejmują:

- ◆ metody badania dostępności farmaceutycznej ze stałych doustnych postaci leku o natychmiastowym uwalnianiu substancji leczniczej;



- ◆ zastosowanie badań uwalniania substancji leczniczej z preparatów o przedłużonym działaniu w badaniach *IVIVC*;
- ◆ uzasadnienie rezygnacji z badań dostępności i równoważności biologicznej (*biowaiver*) w oparciu o właściwości biofarmaceutyczne produktu leczniczego;
- ◆ charakterystykę zmian porejestacyjnych związanych ze zwiększeniem skali wytwarzania (*SUPAC*) produktów leczniczych o natychmiastowym i przedłużonym uwalnianiu.

Podsumowanie

STATISTICA Profile Uwalniania, na podstawie uzyskanych danych automatycznie wykonuje niezbędne, często skomplikowane matematycznie obliczenia oraz przygotowuje gotowe do wydruku raporty podsumowujące wyniki analiz w postaci przejrzystych tabel, wykresów oraz wniosków czy komentarzy użytkownika. Zastosowanie takiego rozwiązania pozwala na ogromną oszczędność czasu, a dodatkowo fakt, że jest ono walidowane, gwarantuje poprawne wykonanie oraz interpretację analiz i raportów, co jest szczególnie ważne w obliczu rosnących wymagań rynku, przyjętych przez branżę standardów oraz rygorystycznych norm narzucanych przez organy regulacyjne.

Literatura

1. Costa P., Lobo M.S., *Modeling and comparison of dissolution profiles*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 13, 123-133, 2001.
2. Dressman J., Amidon G.L., Reppas C., Shah V.P., *Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption, immediate release dosage forms*, Pharmaceutical Research, 15 (1), 12-21, 1998.
3. Dressman J., Kramer J., *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Taylor & Francis, New York 2005.
4. Dorożyński P., *Równoważność farmaceutyczna* (rozdział), w *Badania dostępności i równoważności biologicznej*, pod red. Marzec, A., Ośrodek Informacji Naukowej OINPHARMA Sp. z o. o., Warszawa 2007.
5. Dorożyński P., *Odstąpienie od badań dostępności i równoważności biologicznej* (rozdział), w *Badania Dostępności i Równoważności biologicznej*, pod red. Marzec, A., Ośrodek Informacji Naukowej OINPHARMA Sp. z o. o., Warszawa 2007.
6. *European Pharmacopeia 6*, EDQM, Council of Europe Strasbourg, 2007.
7. Iwaniec M., Popieluch M., *Ocena podobieństwa profili uwalniania*, Świat Przemysłu Farmaceutycznego, 5, 23-26, 2008.
8. Iwaniec M., *Program do porównywania profili uwalniania PROFILE – dokumentacja*, StatSoft Polska Sp. z o. o., Kraków 2008.
9. Janicki S., Sznitowska M., Zieliński W., *Dostępność farmaceutyczna i dostępność biologiczna leków*, Ośrodek Informacji Naukowej „Polfa” Sp. z o.o., Warszawa 2001.



10. O'Hara T., Dunne A., Butler J., Devane J., *A review of methods used to compare dissolution profile data*, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 5, 214-223, 1998.
11. Azarmi S., Roa W., Lobenberg R., *Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms*, *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 12-21, 2007.
12. Tsong Y., Hammerstrom T., Sathe P., Shah V.P., *Statistical assessment of mean differences between two dissolution data sets*, *Drug Information Journal*, 30, 1105-1112, 1996.
13. *United States Pharmacopeia 32*, U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, 2009.
14. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Evaluation and Research, *Guidance for Industry. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*, 1997.