УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ “ ВО СКОПЈЕ

ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

ИНСТИТУТ ЗА ФАРМАЦЕВТСКА ТЕХНОЛОГИЈА

Елизабета Милан Атанаскова

Развој на алатки базирани на процесна аналитичка технологија (ПАТ) за континуирано следење на критични атрибути на квалитет при производството на фармацевтски дозирани форми

(на македонски јазик)

Development of process analytical technology (PAT) based tools for continuous monitoring of critical quality attributes during pharmaceutical dosage forms production

(на англиски јазик)

- Докторска дисертација -

Скопје, 2025

Тема: Развој на алатки базирани на процесна аналитичка технологија (ПАТ) за континуирано следење на критични атрибути на квалитет при производството на фармацевтски дозирани форми

Автор: Елизабета Милан Атанаскова

Област: Фармацевтска технологија

Ментор: проф. д-р Никола Гешковски
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје
Република Северна Македонија

Коментор: проф. д-р. Шарарех Салар-Бехзади
Институт за фармацевтски науки
Универзитет во Грац, Австрија

Рецензентска комисија:

проф. д-р Катерина Горачинова, редовен професор,
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Маја Симоноска-Црцаревска, редовен професор,
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р Петре Макрески, редовен професор,
Институт за хемија, Природно–математички факултет,
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

проф. д-р. Шарарех Салар-Бехзади
Институт за фармацевтски науки
Универзитет во Грац, Австрија

проф. д-р Никола Гешковски, редовен професор,
Фармацевтски факултет
Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Лектор: Тања Стевановска

Елизабета Милан Атанаскова

Развој на алатки базирани на процесна аналитичка технологија (ПАТ) за континуирано следење на критични атрибути на квалитет при производството на фармацевтски дозирани форми

– Апстракт –

Оваа докторска дисертација ги опишува развојот и примената на процесната аналитичка технологија (ПАТ) како алатка за следење на фармацевтските производствени процеси. Овие алатки играат значајна улога во обезбедувањето на квалитетот и на безбедноста на финалниот производ, земајќи ги предвид и ефикасноста и ефективноста на самиот производствен процес.

Првиот дел од докторската дисертација се фокусира на дизајнирањето ПАТ алатка за следење на трансформацијата на ибупрофен во неговата брзорастворлива сол – ибупрофен натриум – за време на процесот на влажна гранулација. Во рамки на оваа студија е евалуирана примената на спектроскопијата во средно (MIR) и во блиско (NIR) инфрацрвено подрачје. Споредливите вредности на грешките на предвидување и корелациските коефициенти ја потврдуваат соодветноста на примената на овие техники за следење на процесот на трансформација. NIR е избрана за понатамошна имплементација поради умерено подобрата прецизност и помалата грешка во предвидувањето. Споредени се два NIR спектрофотометри – преносliв и статичен. Моделите изградени со примена на податоците генерирани со двата спектрофотометри покажуваат компаративна точност и прецизност ($R^2X = 0,99$, $R^2Y = 0,93$, $Q^2 = 0,99$ за статичниот и $R^2X = 0,99$, $R^2Y = 0,95$, $Q^2 = 0,99$ за преносливиот уред). Поради неговата практичност, преносливиот спектрофотометар е избран за континуирано ПАТ следење за време на фазата на гранулација. Перформансите на моделот се евалуирани со лабораториски проби со различни количини на натриум карбонат, што резултира со различни концентрации на добиен ибупрофен натриум. NIR предвидените концентрации покажуваат соодветна усогласеност со резултатите од тестот на растворливост, потврдувајќи ја соодветноста на моделот за определување на крајната точка на трансформација и за постигнување ефективна контрола на процесот на влажна гранулација.

Вториот дел од докторската дисертација е насочен кон анализа на соодветноста на примената на ПАТ алатка во развојот на липидни формулации, користејќи фелодипин како активна супстанција (BCS класа II). Формулацијата е подготвена со естер на полиглицерол со масни киселини (PGFA) и хексаглицерол (PG6) како средство за навлажнување. Произведени се формулации со варирање на присуството на PG6, времето и на температурата на мешање. Применет е хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје (NIR-HSI) за евалуација на распределбата на фелодипин. Добиениот модел за квантификација и за анализа на униформноста покажува одлична линеарност и точност ($R^2Y = 0,99$, RMSEC = 0,084) и се потврдува како робусна алатка за анализа на распределивоста на активната фармацевтска супстанција. Ослободувањето на активната фармацевтска супстанција од липидните формулации следи кинетика од прв ред и е под влијание на кристалната структура на липидите, својствата на квасење на компонентите од составот на формулацијата и видот на дисперзија на активната фармацевтска супстанција во матрицата.

Во целина, примената на NIR и на NIR-HSI како моќни ПАТ алатки за опсервација и за контрола во реално време го поддржува развојот на квалитетни, цврсти и липидни фармацевтски формулации.

Клучни зборови: блиска инфрацрвена спектроскопија (NIR); ибупрофен; хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје (NIR-HSI); фелодипин; липидни формулации; анализа на хомогеност.

Development of Process Analytical Technology (PAT) based tools for continuous monitoring of critical quality attributes during pharmaceutical dosage forms production

– Abstract –

This thesis describes the development and application of process analytical technology (PAT) based tools to monitor pharmaceutical production processes. These tools play a significant role in ensuring the final product's quality and safety, while also considering the efficacy and efficiency of the production process itself.

The first part of the study focused on designing a PAT tool to monitor the conversion of ibuprofen into its fast-dissolving salt form, ibuprofen sodium, during wet granulation. Both mid-infrared (MIR) and near-infrared (NIR) spectroscopy were evaluated as suitable methods. Comparable prediction errors and correlation coefficients indicated that both techniques were capable of being successfully used for the intended purpose. NIR was selected for further implementation due to slightly higher predictive accuracy and lower error coefficients. Two NIR spectrophotometers—a portable and a benchtop—were compared. Both demonstrated similar accuracy and precision ($R^2X = 0.99$, $R^2Y = 0.93$, $Q^2 = 0.99$ for benchtop; $R^2X = 0.99$, $R^2Y = 0.95$, $Q^2 = 0.99$ for portable). Given its practicality, the portable spectrophotometer was chosen for ongoing PAT monitoring during granulation. Model performance was assessed using laboratory batches with different amounts of sodium carbonate, resulting in varying ibuprofen sodium concentrations. The NIR-predicted concentrations aligned well with dissolution test results of the tablets, confirming the model's reliability in identifying the endpoint of the acid-to-salt transformation and effectively controlling the wet granulation process.

The second part of the thesis examined PAT application in lipid-based formulation development using felodipine, a BCS class II drug. A formulation was prepared with polyglycerol ester of fatty acids (PGFA) and hexaglycerol (PG6) as a wetting agent. Melt-casted samples with and without PG6 were produced with variation of mixing time and temperature. NIR hyperspectral imaging (NIR-HSI) was employed to evaluate API distribution. The resulting model exhibited excellent linearity and accuracy ($R^2Y = 0.99$, RMSEC = 0.084), and proved to be a robust tool for analyzing drug uniformity. Higher processing temperature enhanced drug amorphization, uniform API dispersion, and crystal inhibition. API release followed first-order kinetics and was influenced by lipid crystallinity, wettability, and dispersion type.

Overall, the use of NIR and NIR-HSI demonstrates robust PAT tools for real-time monitoring and control, supporting the development of high-quality solid and lipid-based pharmaceutical formulations.

Keywords: Near-infrared spectroscopy (NIR); Ibuprofen; Near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI); Felodipine; Lipid-based formulation; Uniformity analysis.

Благодарност

Со особена почит изразувам огромна благодарност до мојот ментор, **проф. д-р Никола Гешковски,** за несебичното споделување на своите знаења и искуства, за огромното залагање, континуираната поддршка и помош, како и за пренесениот ентузијазам и професионален пристап кон научноистражувачката работа. Сите овие сегменти придонесоа не само за успешно реализирање на активностите од оваа докторска дисертација, туку и за поставување цврсти темели во моето професионално и научно усовршување со примена на принципите на научна објективност, истрајност и критичко размислување. Ви благодарам, професоре!

Искрена благодарност до Алкалоид за овозможеното стручно усовршување и за целокупната поддршка во текот на реализацијата на активностите поврзани со оваа докторска дисертација. Особена благодарност упатувам до моите први професионални ментори, **Дејан Костовски** и **Наташа Аневска Стојановска**, за пренесеното стручно знаење и за пренесената љубов кон фармацевтската технологија. Ви благодарам што ми обезбедивте толку цврста основа во индустриското работење базирано на научни принципи и на сознанија. Благодарност и до сите претпоставени од периодот на моите студии, кои несебично веруваа во мене и во иднината на областа од оваа докторска дисертација, што ми беше особена мотивација во текот на студирањето. Благодарна сум на колегите - **Вики, Зоки, Раба, Вероника, Оја, Марина, Ѓорги** - а особено искрена благодарност до мојот тим „***BIVH***“ за неизмерното разбирање и за поддршката во моментите кога ми беа најпотребни.

I would like to express my sincere gratitude to my co-supervisor, ***Assoc. Prof. Salar-Behzadi Sharareh****, from the Research Center of Pharmaceutical Engineering (RCPE), Graz, Austria, for her invaluable guidance, shared expertise, and continuous support throughout the completion of the second part of this PhD research. Sherry, thank you sincerely for your warm hospitality, generosity, and for selflessly sharing your knowledge and providing access to all the resources essential for the successful completion of the study.*
I also wish to extend my heartfelt thanks to my colleagues at the Research Center of Pharmaceutical Engineering (RCPE), Graz - ***Nadia, Michael, Julian, Paul, Wolfgang, Carolina, Johannes, Matthias, Dominik, Tihana, Anna, Alessio*** *- for their collegiality, openness, and willingness to share their knowledge and expertise, as well as for their kind support during my stay in Graz. You made this period of my life truly memorable!*

Бескрајна и искрена благодарност до мојата сестра **Елена** без која ова животно искуство ќе беше незамисливо. Систер, дел од овој успех ти го посветувам тебе и ти благодарам за твојата љубов, разбирање и сила коишто ми ги даваше за да можам да продолжам при секој мој пад. Огромна благодарност и до **моите родители** за целосната доверба и за неизмерната љубов којашто постојано ми беше водилка и сила на патот кон успехот. Неизмерна благодарност до мојот **Борче**, за сите начини на поддршка, трпение, разбирање и љубов, кои ми помогнаа не само во професионалниот развој, туку и во сопствениот развој како личност во текот на ова животно патување.

И да, ова е патот што искрено би му го препорачала на секој што е жеден за знаење и животно искуство. Работата на себе е највредната инвестиција што можеме да ја направиме!

Изјавувам дека докторскиот труд го изработив самостојно, дека уредно ги цитирам сите користени извори и литература и дека трудот не е користен во други универзитетски студии или за стекнување друго звање.

Изјавувам дека електронската верзија на докторскиот труд е идентична со отпечатениот докторски труд.

СОДРЖИНА

ВОВЕД 1

А. Процесни сензори и процесни анализатори 3

А.1. Вибрациони спектроскопски техники 6

А.1.1. Инфрацрвена спектроскопија (IR) 7

Средно инфрацрвено подрачје (MIR) 10

Блиска инфрацрвена микроскопија (NIR) 11

А.2. Хиперспектрален имиџинг 12

Хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје 12

Б. Мултиваријантна анализа на податоци (хемометрија) 13

В. Развој на мултиваријантни модели 15

В.1. Калибрациони примероци 15

В.2. Обработка на спектрални податоци 16

В.3. Градење модели за предвидување 18

1. ИСТРАЖУВАЊЕ I 20

Развој на NIR алатка како дел од ПАТ пристапот за следење на трансформацијата на ибупрофен во ибупрофен натриум 20

1.1. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕ I 21

1.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ 24

1.2.1. Материјали и методи применети во истражување I 25

1.2.1.1. Материјали 25

1.2.1.2. Опрема применета при експерименталната работа 25

1.2.1.3 Методи 26

1.2.1.3.1 Синтеза на ибупрофен натриум при процес на гранулација на ибупрофен со натриум карбонат во присуство на вода 26

1.2.1.3.2 Потврда на добиената сол на ибупрофен со примена на спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје (MIR) 26

1.2.1.3.3 Развој на модели за квантификација со примена на спектроскопија во блиско инфрацрвено подрачје (NIR) и на спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје (MIR) 26

1.2.1.3.4 Подготовка на калибрационен сет 28

1.2.1.3.5 Спектроскопија во блиско инфрацрвено (NIR) подрачје 30

1.2.1.3.6 Мултиваријантна статистичка анализа 30

1.2.1.3.7 Подготовка на лабораториски проби (надворешна валидација) 31

1.2.1.3.8 Ин витро постапка за определување на брзината на ослободување на ибупрофенот од различните лабораториски проби 33

1.3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА 34
1.3.1. Карактеризација на добиената сол на ибупрофен, ибупрофен натриум, со примена на спектрометрија во средно инфрацрвено подрачје 35
1.3.2. Развој и компаративна анализа на скрининг-методите за квантификација 36
1.3.3. Дискусија во однос на скрининг-фазата 38
1.3.4. Компарација на ПАТ модели развиени со примена на преносен и на статичен NIR спектрофотометар 39
1.3.5. Модел за интрагрануларна квантификација – развој и валидација на MicroNIR ПАТ метод за квантификација 43
1.3.6. Ин ситу следење на транзицијата на ибупрофен во лабораториски услови 44
1.3.7. Анализа на растворливост 47
1.3.8. Заклучок од истражување I 47
2. ИСТРАЖУВАЊЕ II 48
Иновативен развој на липидни формулации: Подобрена хомогеност и растворливост на активната компонента овозможено со примена на хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје 48
2.1. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕ II 49
2.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ 53
2.2.1. Материјали и методи применети во истражување II 54
2.2.1.1. Материјали 54
2.2.1.2. Опрема применета при експерименталната работа 54
2.2.1.3. Методи 55
2.2.1.3.1. Избор на составните компоненти за развој на липидна формулација 55
2.2.1.3.2. Поларизирачки светлосен микроскоп 55
2.2.1.3.3. Оптичка кохерентна томографија (OCT) 56
2.2.1.3.4. Определување на теоретската растворливост на фелодипин во липидниот систем со примена на диференцијална скенирачка калориметрија (DSC) 56
2.2.1.3.5. Подготовка на липидни формулации на фелодипин 56
2.2.1.3.6. Анализа на липидни формулации на фелодипин 57
2.2.1.3.6.1 Диференцијална скенирачка калориметрија (DSC) 57
2.2.1.3.6.2 Дифракција на рендгенски зраци под мали и под големи агли (SWAXD) 58
2.2.1.3.6.3 Дистрибуција по големина на честичките 58
2.2.1.3.6.4 Определување на ин витро брзината на растворливост и анализа на кинетиката на ослободување на лекот 58
2.2.1.3.7. Развој и валидација на NIR-HSI калибрационен модел за анализа на содржината на фелодипин во липидни формулации 59

2.2.2.1.3.7.1 Калибрациони примероци 59
2.2.2.1.3.7.2 NIR-HSI имиџинг и развој на моделот за квантификација 59
2.2.2.1.3.7.3 Валидација на развиениот NIR-HSI модел 60
2.3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА 62
2.3.1. Избор на компонентите на липидната формулација 63
2.3.2. Растворливост на фелодипин во избраната липидна база определена со DSC 66
2.3.3. Развој и валидација на NIR-HSI модел за квантитативна анализа на фелодипин 67
2.3.4. Анализа на лабораториските експерименти 70
2.3.4.1 Термално однесување и карактеризација во цврста состојба на подготвените липидни системи 73
2.3.4.2 Анализа на растворливост 76
2.3.5. Заклучок од истражување II 79
3. ЗАКЛУЧОК 80
4. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА 83
5. ПРИЛОЗИ 93

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

PAT/ПАТ	*Process analytical technology*	Процесна аналитичка технологија
NIR	*Near infrared spectroscopy*	Спектроскопија во блиско инфрацрвено подрачје
MIR	*Mid-infrared spectroscopy*	Спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје
BCS	*Biopharmaceutics classification system*	Биофармацевтски систем на класификација
PLS	*Partial least squares*	Парцијални најмали квадрати
VIP	*Variable importance plot*	Графикон на важноста на променливите
LVF	*Linear Variable Filter*	Линеарен променлив филтер
BEM	*Batch evolution model*	Модел за следење на развојот на производна серија
SD	*Standard deviation*	Стандардна девијација
QbD	*Quality by design*	Квалитет преку дизајн
XRF	*X-ray Fluorescence*	Рендгенска флуоресценција
PVM	*Particle Vision and Measurement*	Визуализација на честитки и нивно мерење
FBRM	*Focused Beam Reflectance Measurement*	Мерења на рефлексија со фокусиран светлосен зрак
UV-Vis	*Ultraviolet–Visible Spectroscopy*	Ултравиолетово видлива спектроскопија
IR	*Infrared Spectroscopy*	Инфрацрвена спектроскопија
FTIR	*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*	Фурјеова трансформациска инфрацрвена спектроскопија
NMR	*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*	Нуклеарна магнетна резонанција
PCA	*Principal Component Analysis*	Анализа на главната компонента
PLS	*Partial Least Squares Regression*	Регресија на парцијални најмали квадрати
MLR	*Multiple Linear Regression*	Мултиваријантна линеарна регресија
SNV	*Standard Normal Variate*	Стандардна нормална распределба
MSC	*Multiplicative Scatter Correction*	Мултипликативни мерки на расејување
BCS	*Biopharmaceutics Classification System*	Биофармацевтски систем за класификација
RMSEP	*Root Mean Square Error of Prediction*	Квадратен корен од средна квадратна грешка од предвидување
RMSEcv	*Root Mean Square Error of Cross-Validation*	Квадратен корен од средна квадратна грешка од естимација, пресметана со кросвалидација на моделот
RMSEE	*Root Mean Square Error of Estimatioon*	Квадратен корен од средна квадратна грешка од естимација
HSI	*Hyperspectral Imaging*	Хиперспектрален имицинг

ВОВЕД

Современиот развој и производство на фармацевтски дозирани форми (ФДФ) вклучуваат систем за вградување квалитет со примена на пристапот на квалитет преку дизајн (Quality by design – QbD). Овој пристап се заснова на принципите на вградување квалитет преку идентификација и управување со потенцијалните ризици, како и примена на научен пристап за контрола на производствените процеси. Процесната аналитичка технологија (ПАТ) како дел од пристапот на квалитет преку дизајн претставува систем развиен за дизајн, анализа и за контрола на процесите на производство. Овој пристап вклучува мерења во текот на производствените процеси на карактеристиките на процесот и на критичните атрибути на квалитет на влезните суровини, на меѓупроизводите, како и на крајниот производ со цел да се осигури квалитетот на финалната ФДФ.[1,2] Поимот „аналитичка“ во ПАТ вклучува хемиска, физичка, микробиолошка, математичка и ризик-анализа спроведена на контролиран начин. Целта на процесната аналитичка технологија е обезбедување поддршка при контролата на производствениот процес со податоци од мерењата на атрибутите на квалитет на фармацевтските дозирани форми.[3] Со ова целосно разбирање се овозможува контрола на процесите на производство преку дефинирање на контролната стратегија која последователно ги олеснува процесите на контрола на варијабилноста, го олеснува зголемувањето на серијата на производство, го олеснува трансферот на технологијата на производство и го олеснува исполнувањето на поставените критериуми за квалитет.

Со примена на ПАТ за контрола на производствените процеси се овозможува:

- Осигурување на квалитетот и на карактеристиките на производот преку дизајнирање ефикасен и ефективен производствен процес;
- Поставување спецификација на производот и на процесот заснована на механичко разбирање како формулацијата и процесните фактори влијаат врз карактеристиките на производот;
- Континуирано обезбедување контрола на квалитет во реално време;
- Усогласување на регулаторните барања со највисокото ниво на стручно познавање на процесот и на производот;
- Поставување контролна стратегија за елиминирање на ризикот од производство на продукт со намален квалитет.

Основен предизвик во разбирањето на комплексните физички и хемиски процеси е способноста за мерење на компонентите на процесот со минимални пертурбации во мерењето и во процесот. Основата на ПАТ, без разлика дали се применува во истражување и развој или во производство, е мерењето. Во фазата на истражување и развој, соодветни мерења можат да идентификуваат претходно непознати компоненти на процесот, механизми и односи помеѓу променливите, што води до развој на модели за предвидување – како механистички, така и хемометриски.[4] Овие предвидувачки модели може да бидат и квалитативни и квантитативни по природа, при што крајната цел е предвидување на резултатите од процесот. Со напредокот на развојот, кумулативните информации се применуваат за мапирање на дизајнираниот простор на процесот и за развој на контролна стратегија којашто овозможува одржување на процесот во рамките на тој простор. Земајќи го предвид ова, ПАТ наоѓа примена од претклиничка фаза до фаза на комерцијално

производство и претставува вреден сет на аналитички алатки за фармацевтските научници со цел подобро разбирање на процесите.

Во раните фази на развој, аналитичките методи што се потребни за дефинирање и за разбирање на процесот може да бидат сложени. Анализаторите може да бидат мултиваријантни, овозможувајќи следење на формирањето и на однесувањето на повеќе компоненти одеднаш. Со дефинирање на процесот и со добивање разбирање за процесот преку овие мерења, може да се намали бројот на параметри што се сметаат за критични. При подготовка на процесот за трансфер во производствени услови и воспоставувањето на контролните лимити, целта е следењето и контролната стратегија да се сведат на што е можно попрактично ниво. Во идеални случаи, резултатите од напредните мерења со ПАТ се поврзуваат со едноставни производствени мерења (како што се време, температура, притисок и проток) за контрола на процесот. И во овој случај, инсталацијата на ПАТ во производствениот процес е значајна за добивање информации за процесот и за градење „отпечаток“ на процесот за напредни следења и негова контрола.

Процесната аналитичка технологија вклучува комбинација на алатки кои ги овозможуваат анализата и контролата на производствените процеси:

А. Процесни анализатори и процесни сензори
Б. Мултиваријантна анализа на податоците (хемометрија)
В. Развој на мултиваријантни модели

ПАТ се применува низ целиот животен циклус на производот за да се добие разбирање и дизајнирање на производот и на процесите.[5]

А. Процесни сензори и процесни анализатори

Анализата на процесите на производство вклучува различни мерења на различни параметри, за кои се потребни анализатори од различен тип. ПАТ алатките претставуваат сет на аналитички техники кои се земаат предвид при определувањето на аналитот со цел да овозможат соодветна детекција и/или квантификација. Невозможен е пристап на дефинирање универзална алатка за примена при ПАТ бидејќи соодветноста на секоја алатка за анализа на процесот е зависна од повеќе фактори, како хемиската структура, реакцијата што се одвива, пристапот до опрема, карактеристиките на процесот и регулаторната прифатливост.

Во основа, во процесната аналитичка технологија се применуваат два вида инструменти: сензори и анализатори.[5]

Процесните сензори се применуваат при униваријантни мерења и нивните контролни системи ги утврдуваат вредностите на базична физичка или хемиска променлива (параметар или атрибут) во даден момент, како температура, притисок, спроводливост, растворен кислород, pH, брзина на проток, заматеност, потрошувачка на енергија, време и фреквенција. Овие инструменти овозможуваат неспецифична анализа во текот на процесот (in-line).

Процесните анализатори, пак, претставуваат мултиваријантни системи кои обработуваат биолошки, физички или хемиски променливи и вообичаено се применуваат за следење на критичните атрибути на квалитет на суровините, интермедиерните производи

и на готовиот производ, и учествуваат во следење на траекторијата на процесот во реално време. Процесните анализатори се дел од комплексен систем којшто вклучува аналитички софтвер, систем за управување со податоци и интерфејс за мерење на процесот.

Процесните анализатори во однос на подвижноста може да бидат статични и преносни уреди.

Статичните анализатори, како системи за кои е потребна статична инсталација, довод на електрична енергија или компримиран воздух, примена на оптички влакна со повисока цена и повисок спектрален квалитет, кабелско поврзување на сондата со анализаторот, најчесто се поврзани со соодветно просторно планирање за поставување на анализаторот на производната локација.
Спротивно на ова, преносните анализатори се компактни, лесни и самостојни уреди со поголем дел од поддржувачките функции вградени во нив. Во оваа категорија се вклучени малите преносни фотометри и спектрофотометри. Преносните анализатори се поатрактивни решенија бидејќи често се многу поиздржливи, со пониска цена, полесни за интеграција, одржување и за ракување, мобилни и погодни за брзо поставување во производната локација.

Во текот на истражувањето I во рамки на оваа докторска дисертација ќе биде направена компарација на двата типа процесни анализатори во однос на ефикасноста и на ефективноста за следење на процесот на производство.

Во однос на типот на мерење во текот на процесот на производство, процесните анализатори се применуваат:[6, 5]

- *Offline:* Примерокот е издвоен од процесот на производство и се анализира во контролна лабораторија. Мерењето е изведено одреден временски период по процесот на производство.
- *At-line:* Примерокот е издвоен од процесот во точно дефинирана временска точка и се анализира во непосредна близина, најчесто во процесна лабораторија. Вообичаено резултатите од мерењето се добиваат за неколку минути за време на процесот на производство.
- *On-line:* Примерокот е издвоен од процесот преку делот за издвојување репрезентативен примерок и анализата се одвива во непосредна близина на процесот во текот на производството. Анализаторот при овој тип мерење не е дел од производствената опрема, но се наоѓа во производствениот простор.
- *In-line:* Процесниот анализатор е дел од производствената опрема и примерокот што се анализира не се отстранува од производствениот процес, односно анализаторот е во директен контакт со производот, анализата е неинвазивна, а резултатите се добиваат во временски период од помалку од една секунда до неколку секунди. На тој начин се постигнува најбрза и најпрецизна анализа во текот на процесот, која овозможува соодветна контрола на производството.

Во традиционалната индустриска практика, контролата на квалитетот најчесто се засновала на *offline* лабораториски тестови кои се подолготрајни и применуваат поголем број ресурси, а резултатите се достапни по завршување на процесот на производството. Современиот пристап на производство вклучува сè поголема примена на процесните анализатори како ПАТ системи (наспрема историската примена на едноставните

универијантни сензори) во производствените процеси, поттикнато од можноста овие системи да придонесат за научна контрола на истите, за да се постигне пристапот на вградување квалитет со што ќе се овозможи и осигурување на безбедноста и на ефикасноста на финалниот производ.

Во зависност од принципот на мерењето, ПАТ анализаторите може да се поделат во неколку категории:

- Вибрациони спектроскопски техники (ултравиолетово-видлива спектроскопија, инфрацрвена спектроскопија и раманска спектроскопија)
- Имиџинг-техники
- Рендгенска флуоресценција (XRF)
- Визуализација на честички и нивно мерење (PVM)
- Мерења на рефлексија со фокусиран светлосен зрак (FBRM) и Ласерска дифракција
- Акустични техники
- Нуклеарна магнетна резонанција

Краток осврт на секоја од техниките е прикажан во табела 1.

Табела 1. Главни карактеристики на различните техники што се дел од ПАТ

Техника		**Опис**
Вибрациони спектроскопски техники	*Инфрацрвена (IR) спектроскопија*	Апсорпцијата во IR или средноинфрацрвениот (MIR) опсег (2,5 – 50 μm (бранова должина) или 4 000 – 200 cm^{-1} (бранов број)) дава структурни информации за соединението. IR наоѓа примена во развојот и во производството на API, како и при развој и производство на фармацевтски дозирани форми. Недостаток на оваа техника е ниската пенетрација во примерокот поради силната апсорпција.
	Раманска спектроскопија	Раманска спектроскопија се користи за рутински квалитативни и квантитативни мерења на неорганski и органски супстанции. Успешно се применува за утврдување хемиски структури и за полиморфна идентификација. Може да се анализираат гасови, пареи, аеросоли, течности и цврсти супстанции. Бидејќи не детектира вода, идеална е за анализа на водени раствори. Особено е погодна за идентификација на суровини затоа што не бара мултиваријантно моделирање и е широко применета во фармацевтската индустрија.
	Ултравиолетово -видлива спектроскопија (UV-Vis)	UV-Vis е спектрална техника којашто се користи за проучување на интеракцијата на радијацијата со примероците. Наоѓа примена при квантитативна анализа на концентрацијата на раствори, особено кога е потребна едноставна детекција. Иако често се применува директно, постојат примери во кои се користат математички модели за извлекување подетални информации. UV-Vis е робусна техника којашто има докажана примена во различни фази од процесите на производство на фармацевтски дозирани форми.
Имиџинг-техники – Хемиски имиџинг (IR, NIR, Raman, THz)		Достапни се различни системи за хемиски имиџинг базирани на IR, NIR, раманска или THz спектроскопија, коишто може да карактеризираат материјали и производи во 2D или 3D, во зависност од технологијата. Овие системи комбинираат напредна имиџинг-технологија со соодветен извор на светлина што може да навлезе во примерокот и да овозможи анализа на неговата тродимензионална структура. Се користат при развој за дизајн и за карактеризација на производи, како и за откривање фалсификувани производи.
Рендгенска флуоресценција (XRF)		XRF е елементарна, недеструктивна техника којашто најчесто се користи за анализа на конкретен елемент во материјалот. Може да се анализираат течности, полуцврсти и цврсти материјали, но чувствителноста зависи од типот на примерокот. Најчесто се користи кога постои интерес за специфичен елемент.

продолжува на следната страница

Табела 1. Главни карактеристики на различните техники што се дел од ПАТ (продолжение)

Техника	Опис
Визуализација и мерење на честички	Видеомикроскопија преку сонда се применува за разбирање на карактеристиките на честичките, како морфологија, форма, големина и површина.
Мерења на рефлексија со фокусиран светлосен зрак и ласерска дифракција (FBRM)	Ласерски зрак е фокусиран на површина на примерокот, каде што се дифрактира од честичките. Овој одразен светлосен сигнал овозможува мерење на должината на јадрото на честичките и се користи за пресметување на нивната распределба по големина. Оваа *in-line* технологија е широко користена во фармацевтската индустрија за карактеризација на честички за време на развој и во производство.
Акустични техники	Акустичните техники користат звучни бранови за следење процеси, како кристализација, агрегација на честички или промени во вискозност. Тие се неинвазивни и може да се применуваат во реално време. Поради нивната чувствителност на физички промени во материјалите, се користат за контрола на процеси во реално време.
Нуклеарна магнетна резонанција (NMR)	NMR ги користи магнетните својства на јадрата и нивната интеракција со надворешни магнетни полиња за анализа на примероци. Одговорот на течностите и гасовите што содржат протони е линеарен и квантитативен. Водата и растворувачите се идентификуваат во специфични региони од спектарот и можат да се отстранат дигитално, што овозможува чиста анализа. Целиот волумен на примерокот се анализира и притоа бојата на примерокот не влијае врз резултатот, па затоа е идеален за обоени и за безбојни супстанции. Сепак, NMR има ниска чувствителност во споредба со оптичките техники (како FTIR) и не може да детектира многу ниски концентрации (<1000 ppm). Примероците мора да се загреат заради вискозитет и потребна е специјална опрема за нивен пренос до магнетот. Присуството на парамагнетици (на пр. железо) значително може да влијае на спектарот, па затоа е потребна филтрација на примероците.

Во согласност со примената на ПАТ во рамките на оваа докторска дисертација, главниот фокус, со поставување на основите во изведба на анализата, ќе биде насочен кон вибрационите (IR) и кон имиџинг-техниките.

А.1. Вибрациони спектроскопски техники

Вибрационата спектроскопија опфаќа класа аналитички техники што се користат за истражување на вибрационите енергетски состојби на молекулите. Вибрационата спектроскопија е енергетски чувствителен метод. Се базира на периодични промени на диполните моменти (инфрацрвената (IR) спектроскопија) или поларизациските способности (раманска спектроскопија) предизвикани од молекуларните вибрации на молекули или групи атоми и комбинираните дискретни енергетски транзиции и промени на фреквенциите за време на апсорпцијата (IR) или расејувањето (Раман) на електромагнетно зрачење со бранови должини од 1 до 300 μm. Добиените спектри даваат детални информации за молекуларната структура, хемискиот состав и за меѓумолекуларните интеракции, што ја прави вибрационата спектроскопија неопходна алатка и во фундаменталните истражувања и во применетите науки.

Спектроскопските методи наоѓаат особено значајна примена во ПАТ поради способноста за брза, недеструктивната анализа и поради потенцијалот за опсервација на повеќе компоненти во текот на една анализа.[6] За разлика од традиционалната лабораториска анализа, овие техники немаат потреба од издвојување на примерокот и негова подготовка

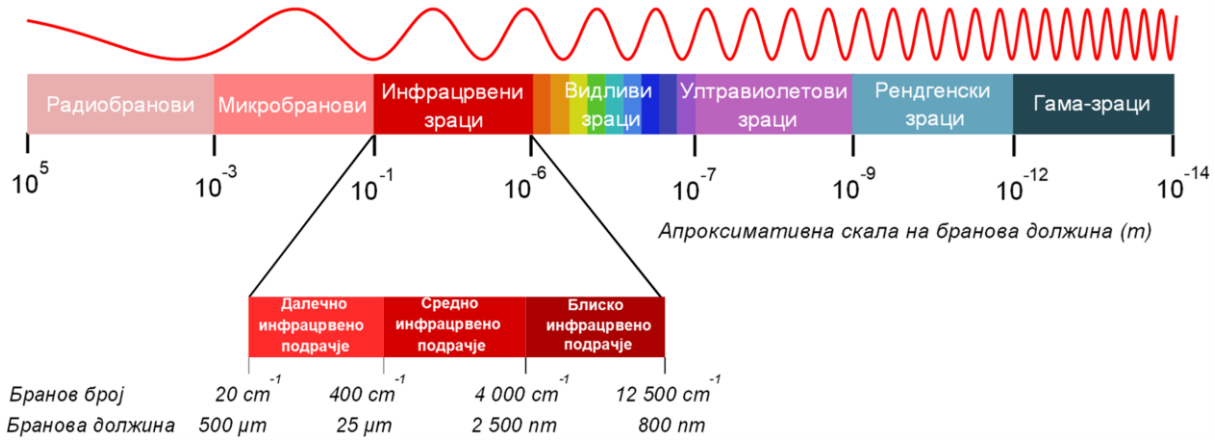
пред анализа, и вообичаено лесно се интегрираат во опремата за производство со цел овозможување навремена анализа.

Клучна предност на вибрационите техники како ПАТ алатки е способноста за следење огромен број податоци за време на самиот процес на производство во различни сегменти од процесот со примена на современи пристапи за екстракција на податоците.

А.1.1. Инфрацрвена спектроскопија (IR)

Инфрацрвената спектроскопија претставува техника заснована на молекуларните вибрации на атомите од структурата на соединението од интерес. Инфрацрвениот спектар се генерира со инфрацрвена радијација на примерокот и определување на фракцијата од радијацијата која е апсорбирана на одредена енергија. Попрецизно дефинирано, се определува апсорпцијата на инфрацрвената радијација од страна на хемиските врски на материјалот. IR спектарот претставува плод на апсорпцијата (или трансмисијата) наспрема брановата должина (или фреквенцијата). Енергијата, на која се појавува одредена лента во IR апсорпциискиот спектар, е во согласност со фреквенцијата на вибрацијата на одредена атомска врска од функционалните групи на примерокот што се анализира. Оваа техника се заснова на тоа дека молекуларните вибрации се случуваат во инфрацрвената област на електромагнетниот спектар, при што функционалните групи имаат карактеристични апсорпциски фреквенции. Функционалните групи на материјалите ја апсорбираат инфрацрвената радијација во ист ранг на фреквенција без оглед на структурата на останатиот дел од молекулата во која припаѓа оваа функционална група. IR брановите имаат електромагнетна природа и стапуваат во интеракција со поларните хемиски врски присутни во функционалните групи на молекулите. Во случај на отсуство на диполен момент во молекулата, IR интеракција е неактивна и молекулата не формира IR спектар. Поставувањето корелација помеѓу структурата на молекулата и фреквенцијата на која се појавува апсорпција на инфрацрвената радијација овозможува идентификација на непознати молекуларни ентитети, како и структурни хемиски промени на молекулите од интерес.[7]

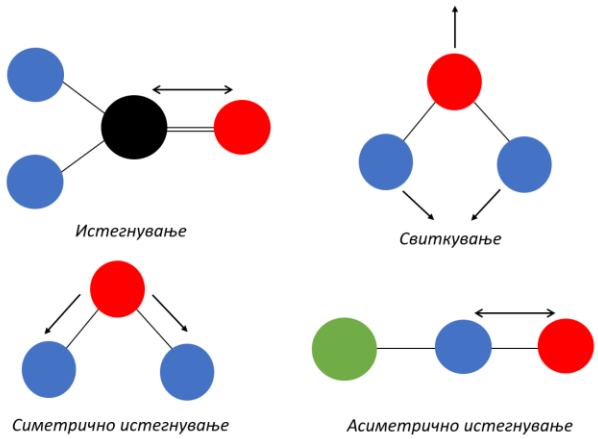
Оперативната бранова должина на инфрацрвената спектроскопија е од 800 nm до 500 000 nm (0,8 – 500 μm), односно преведено во бранов број тоа е регионот од 12 500 cm^{-1} до 20 cm^{-1} (слика 1). Фреквенциите од најголем интерес се движат од 2,5 μm до 16 μm; односно во реципрочната вредност (бранов број) од 4 000 cm^{-1} до 625 cm^{-1}. IR регионот е ограничен со видливиот регион на високите фреквенции и микробрановиот регион на ниските фреквенции. Овој регион е поделен на три основни области: далечно (<400 cm^{-1}), средно (4 000 – 400 cm^{-1}) и блиско (12 500 – 4000 cm^{-1}) инфрацрвено подрачје.



Слика 1. Електромагнетен спектар со детален приказ на поделбата на инфрацрвеното подрачје

Со поминување на инфрацрвената радијација низ примерокот, тој апсорбира енергија на радијација еднаква со вибрационата транзиција на молекулата. Вибрационата енергија може да се однесува на вибрации помеѓу два атоми во молекулата или на вибрации на цели атомски групи. Брановата должина, односно брановиот број на апсорпција зависи од релативните маси на атомите, геометријата и од константата на сила на врските.

> *Постојат два основни типа молекуларни вибрации: настанати со промена на должината на врската (истегнување) и промена на аголот на врската (свиткување). Истегнувачките молекуларни вибрации се дефинираат како вибрации што се појавуваат како резултат на истегнувањето, односно промената на должината на врските помеѓу атомите на функционалните групи, и се означуваат со симбол ν. Доколку функционалната група се состои од повеќе од два атоми, истегнувачките молекуларни вибрации можат да бидат: симетрични и асиметрични (слика 2). Движењата со виткање на врските настануваат со промена на аголот на врската на рамнината на самата врска и се означуваат со симбол δ. Вибрационите движења често се поврзуваат со останати ротациони движења. Нивното комбинирање води до појава на апсорпциски ленти.*[8]



Слика 2. Промени што доведуваат до појава на молекуларни вибрации

Три основни области од инфрацрвеното подрачје определуваат различни нивоа на молекуларни вибрации. Генерално, во средното инфрацрвено подрачје (mid – IR - MIR) се детектираат фундаменталните вибрации на хемиските врски, како резултат на нивно истегнување или свиткување, овертоновите и комбинираните ленти од фундаменталните вибрации, додека во блиското инфрацрвено подрачје (near IR – NIR) се забележува мешавина од овертоновите и комбинираните ленти од фундаменталните вибрации. Во далечното инфрацрвено подрачје се идентификуваат вибрациите на молекулите што содржат тешки атоми, молекуларни торзии и вибрации на кристалната решетка.

Фундаменталните вибрациони фреквенции на молекулата (слика 3) се однесуваат на преминот на енергијата на хемиската врска по IR радијацијата, од основно во прво енергетско ниво (од v = 0 во v = 1). Овертоновите настануваат со мултиплицирање на фундаменталната апсорпциска фреквенција. Енергијата потребна за појава на првиот овертон е двојно поголема од енергијата потребна за фундаменталните вибрации, по претпоставка на униформна распределба на енергетските нивоа. Како резултат на тоа што енергијата е пропорционална со апсорбираната фреквенција, која, пак, е пропорционална со брановиот број, првиот овертон се појавува во спектарот на двојно поголем бранов број од фундаменталните. Комбинираните ленти се појавуваат кога две фундаментални ленти што апсорбираат на енергетско ниво v1 и v2 ја апсорбираат енергијата од инфрацрвената радијација симултано. Лентата што се појавува притоа ќе биде лоцирана на бранов број v1 + v2.[9]

Слика 3. Енергетски нивоа на инфрацрвените фундаментални ленти и овертонови

Фурјеова трансформациска инфрацрвена спектроскопија (FTIR)

Фурјеовите трансформациски спектрофотометри се базираат на примената на интерферометар (Michelson interferometer) којшто се состои од разделувач на зрак којшто го дели влезниот зрак на две зрачења со еднаква јачина, под агол од 90 ° едно во однос на друго. Едното зрачење е насочено кон статично огледало, додека другото кон подвижно огледало. Огледалата ги рефлектираат двете зрачења назад кон разделувачот на зрак, каде што истите повторно се комбинираат. Со движењето на едното од огледалата се менува фазната релација помеѓу двете зрачења, што предизвикува нивно наизменично засилување и ослабување на излезниот зрак. Фреквенцијата на оваа промена помеѓу висока и ниска јачина зависи од брзината на огледалото и од брановата должина на светлината. Така, FTIR спектрофотометарот емитира зрак кој поминува низ интерферометарот и тогаш електричниот сигнал од детекторот варира синусоидално за секоја бранова

должина присутна во влезниот зрак. Зракот поминува низ комората со примерокот, каде што примерокот апсорбира специфични фреквенции на енергија. Детекторот го мери сигналот од интерферограмот во однос на енергија наспроти време за сите фреквенции истовремено. Вкупниот излезен зрак е сума од тие синусоиди. Овој сигнал наречен интерферограм математички се обработува со примена на Фурјеова трансформација за добивање на финалниот спектар на материјалот што се анализира.[3, 10]

Развојот на модерната FTIR спектроскопија овозможува зголемување на сензитивноста и на сигурноста на инфрацрвената анализа со генерирање IR спектар со висока резолуција. Фурјеовите трансформациски спектрофотометри овозможуваат побрзо добивање на IR спектарот во споредба со традиционалните спектрофотометри. Во последните неколку децении, често се користи Фурјеовата трансформациска спектрометрија.[10, 11]

Средно инфрацрвено подрачје (MIR)

Апсорпцијата во регионот на MIR потекнува главно од два вида фундаментални вибрации – истегнувачки и свиткувачки. За една вибрација да биде активна во MIR опсегот, потребна е молекуларна интеракција со електричното осцилирачко поле на електромагнетниот бран. Тоа е можно само ако поместувањето на атомите предизвикано од вибрацијата истовремено предизвикува промена на диполниот момент на молекулата. Затоа, векторот на електричното поле на зрачењето мора да осцилира со иста фреквенција како и молекуларниот диполен момент. Како резултат на тоа, MIR спектроскопијата е особено чувствителна на поларни функционални групи. Главните ленти во MIR спектрите се поделени на два основни региони: регион на функционални групи и регион на отпечаток (fingerprint). Сепак, поголемиот број релевантни информации што се применуваат за интерпретација на MIR спектрите се добиваат од регионот на функционални групи, додека регионот на отпечаток е нормално комплексен. Тој содржи повеќе структурни информации отколку информации за функционалните групи. Секое соединение создава различен и уникатен апсорпциски профил во овој регион.[12]

Високата содржина на информации достапни во MIR регионот претставува главна предност на оваа техника во споредба со другите спектроскопски методи. Фундаменталните модови што се детектираат во MIR регионот нудат поголема специфичност и сензитивност кон детекција. Високата сензитивност на MIR техниката се должи на интензивната апсорпција на поголемиот број органски материјали во овој специфичен регион како резултат на присуството на функционалните групи.

Примероците за MIR анализа е потребно да бидат подготвени на начин којшто го ограничува количеството на материјалот што стапува во интеракција со зрачењето при анализата. Примената на рефлексивни техники, како спекуларна рефлексија (SR) и дифузна рефлексија (DRIFTS), во MIR регионот е во висока мера зависна од оптичките својства и од морфологијата на површината на примероците. Потребна е внимателна интерпретација на податоците од овие мерења, како и корекција, односно обработка на податоците по нивното добивање. Во согласност со наведеното, квалитетот и содржината на информации што ќе се добијат од MIR податоците се зависни од техниката на мерењето, како и од вештината на операторот и од аналитичарот што го изведуваат самото мерење. Современите MIR

спектрофотометри се FTIR инструменти со подобрен начин на снимање и подобри севкупни карактеристики.

Блиска инфрацрвена микроскопија (NIR)

Апсорпциските летни во регионот на NIR потекнуваат главно од овертоновите и од комбинациите на фундаменталните вибрации на X-H врските кои поседуваат висок диполен момент и голема разлика во атомските маси, што резултира со изразена нехармоничност. Ефектите на спојување или резонанција помеѓу вибрациите на истата функционална група дополнително влијаат на генерираните ленти од овертоновите и на комбинираните вибрации, што дополнително ја отежнува интерпретацијата. Како последица, NIR апсорпциските ленти вообичаено се широки, преклопени и се 10 до 100 пати послаби од соодветните MIR ленти. Нискиот коефициент на апсорпција е предност затоа што овозможува поголема длабочина на пенетрација, а со тоа и недеструктивно мерење на примероците што имаат висока апсорпција и способност за расејување.

Поместувањата на лентите поврзани со интер- и интрамолекуларното водородно поврзување се поизразени во NIR отколку во MIR регионот. Од друга страна, селективноста и сензитивноста се ниски, што води кон нераскинлива потреба од примена на мултиваријантна анализа со цел поврзување на спектралните информации со специфичните својства на примероците. Оптичките својства и физичката хомогеност на примерокот влијаат врз спектралните податоци, но со примена на соодветни техники лесно се издвојуваат од спектралните информации поради севкупното мало влијание. NIR методите значително ги намалуваат потребата од дополнително ракување со примерокот и зависноста од техничката подготвеност на операторот за добивање висококвалитетни и репродуктивни податоци.

Во последните децении, блиската инфрацрвена микроскопија се издвојува како добро воспоставена техника која наоѓа сè поголема примена во фармацевтската индустрија за идентификација и за определување на содржината на влезните материјали, интермедиерните производи и за финалниот производ, како и за следење и за контрола на процесот на производство.

Најголема предност на NIR анализата во споредба со традиционалното земање примерок и негово тестирање претставува недеструктивната природа и способноста за добивање резултати во текот на самата анализа. Главни предизвици за примена на блиската инфрацрвена микроскопија е влијанието на физичките карактеристики врз генерираните спектрални податоци. Ограничувањата во селективноста и во сензитивноста на овие техники бараат неопходна примена на соодветно знаење на основите принципи вклучени во оваа анализа, особено поради поврзаноста на овие принципи со обезбедувањето соодветна корелација на спектралниот одговор со промената на аналитот, односно параметарот што се анализира, и докажувањето отсуство на случајност во добиената корелација.

Воспоставувањето корелација на NIR одговорот со промените во примерокот што се анализира се овозможува со примена на хемометриско моделирање кое детално е објаснето во делот *Мултиваријантна анализа на податоците (хемометрија).*

Методите засновани на NIR спектроскопија наоѓаат различни примени во фармацевтската индустрија, како во определувањето на карактеристиките на површината на примероците во текот на процесот на производство, така и за анализа на содржината на активната

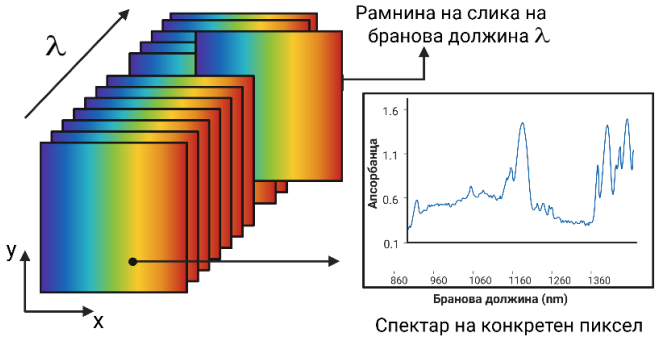
компонента, униформноста на мешавината, униформноста на содржината на финалниот производ, дебелината на филмот и определувањето на цврстината на производот во текот на процесот.

А.2. Хиперспектрален имиџинг

Хиперспектрален имиџинг е општ поим кој опфаќа широк спектар на спектроскопски и спектрометриски техники (како флуоресценција, вибрација, раманска спектроскопија, масена спектроскопија), опсег на бранови должини (како UV, Vis, NIR, MIR) и просторни резолуции (од нанониво до ниво на далечинско детектирање). Хиперспектралниот имиџинг (уште познат и како хемиски имиџинг) претставува пристап на имиџинг со примена на поголем, континуиран сет на спектрален опсег сличен на традиционалните анализи во една точка. Основниот концепт на оваа техника е обезбедување просторни, аналитички (хемиски), структурни и функционални информации во форма на хемиска слика.[13]

Хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје

Хиперспектралниот имиџинг во блиското инфрацрвено подрачје претставува комбинација на NIR спектроскопија и дигитална обработка на сигнали.[14] Системот за NIR хиперспектрален имиџинг се состои од извор на осветлување, оптика за имиџинг, спектрален енкодер за избор на бранови должини и фокална рамнинска низа (FPA - focal plane array). NIR светлината од системот за осветлување се фокусира кон примерокот. Собирањето на дифузната рефлексија од примерокот се одвива со помош на оптика за имиџинг чијашто конфигурација зависи од големината и од видот на примерокот. За макроскопски или микроскопски имиџинг, соодветно, се користи леќа за фокусирање или микроскопски објектив. Собирањето податоци се изведува со имиџинг на серија слики во блискиот инфрацрвен регион на секоја бранова должина избрана од спектралниот енкодер, при што овие податоци се организираат во тродимензионална матрица позната како спектрален хиперкуб. Првите две оски X и Y на матрицата се однесуваат на вертикалните и на хоризонталните координати, односно претставуваат просторна информација, додека третата оска Z ја претставува спектралната информација (брановите должини). Добиениот хиперкуб, со своите просторни и спектрални димензии, содржи NIR спектар за секој пиксел од сликата (слика 4).



Слика 4. Илустрација на хиперспектрален хиперкуб во блиска инфрацрвена спектроскопија кој ги опфаќа брановата должина (Z) и просторните димензии (X и Y). Спектарот на секој пиксел може да се визуализира, како и сликовната рамнина на секоја соодветна бранова должина.

Главната предност на NIR хиперспектралниот имиџинг е тоа што овозможува визуализација на распределбата на различни хемиски компоненти во еден примерок. Како резултат на колекцијата на спектар од секој пиксел на креираната слика, оваа техника е особено погодна при анализа на хетерогени примероци. Од хиперспектралната слика, дистрибуцијата на компонентите (кои апсорбираат во NIR регионот) се рефлектира во спектарот од секој пиксел, со што се овозможува и визуализација на хомогената распределба на компонентата. Поновите системи за хиперспектрален имиџинг (*pushbroom*) овозможуваат анализа на подвижни примероци, со што ја овозможуваат онлајн-анализата.

Хиперспектралниот имиџинг наоѓа примена и во идентификација на хемискиот состав на примерокот преку апсорпција од една или на повеќе компоненти присутни во примерокот на одредена „дијагностичка“ бранова должина.[3] Содржината на информации, во комбинација со зголемена репродуктивност, го издвојува хиперспектралниот имиџинг во NIR регионот како алатка сензитивна на структурни промени во составот на комплексни примероци, што придонесува во генерирањето широк спектар на квалитативни и квантитативни хемиски анализи.

Б. Мултиваријантна анализа на податоци (хемометрија)

Поимот „хемометрија“ се однесува на начинот на анализа на хемиските податоци, кој вклучува статистички и хемиски елементи, и претставува пристап на примена на мултиваријантно и емпириско моделирање при анализа на хемиските податоци.[15] Основните елементи на хемометријата се прикажани на слика 5.

Слика 5. Основни елементи на хемометријата

- Хемиските податоци се собираат од примероците за анализа. Оваа фаза се состои од интензивна анализа со примена на податоци од ПАТ анализаторите.
- Емпириското моделирање се однесува на моделирање засновано на податоци. Всушност, кога се гради „хемометриски“ калибрационен модел за процесен анализатор, често се применуваат претходни познавања и теоретски релации поврзани со хемиската структура на примерокот како и со физичките својства на анализаторот, иако овие модели не се целосно теоретски ограничени, што е од особена предност во случај на отстапувања од очекуваното теоретско однесување на системот.
- Мултиваријантниот елемент на хемометријата укажува на тоа дека за градење на моделот се користи повеќе од една променлива (одговор) од анализаторот, односно мултиваријантната анализа на податоци опфаќа анализа на податоци што се состојат од бројни променливи измерени на повеќе примероци. Целта на овој тип анализа е да се утврдат сите варијации во матрицата на податоци што се проучува. Затоа, хемометриските алатки се насочени кон идентификација на

поврзаноста помеѓу примероците и променливите во даден сет на податоци и истите соодветно ги трансформираат во латентни променливи. Комбинацијата од емпириско и мултиваријантно моделирање ја прави хемометријата моќна алатка за анализа на непознати и комплексни системи.

Мултиваријантната анализа на податоците претставува клучна дисциплина во современата процесна аналитичка технологија, овозможувајќи длабока статистичка обработка и интерпретација на големи и комплексни податочни множества кои се генерираат во реално време со примена на спектроскопски, хроматографски и мултисензорски техники.[16] Хемометријата како примарен столб на овој концепт обединува напредни математички алгоритми и хемиска експертиза со цел да се декодираат латентните информации вградени во високодимензионалните податоци, кои не можат да се опфатат со класични едноваријантни пристапи.

Во овој контекст, хемометријата се применува во процесната аналитичка технологија за развој на предвидувачко моделирање. Хемометриските модели може да предвидуваат квалитативни и/или квантитативни карактеристики.

Квалитативните методи, главно, се користат за визуализација, класификација и за откривање структури на хемиски соединенија. Анализа на главната компонента (PCA) е фундаментален квалитативен метод кој се базира на ортогонална трансформација на корелираните спектрални варијабли во нов сет на некорелирани главни компоненти што го опишуваат најголемиот процент од варијабилноста.[17] На тој начин се овозможува компресирање на информацијата без значајно губење на структурата, што е особено корисно за детекција на скриени трендови, групирања или аномалии. PCA често се комбинира со кластер-анализа (CA), која преку мерење на сличноста или на растојанието помеѓу набљудуваните примероци ги групира во кластери со хомогени карактеристики, олеснувајќи ја интерпретацијата на сложениот хемиски или биолошки простор. Од друга страна, дискриминаторна анализа (DA) се користи за изградба на предвидувачки модели кои овозможуваат класификација на нови примероци во однапред дефинирани групи врз основа на нивниот мултиваријантен профил, што е од суштинско значење за контрола на квалитетот и за откривање на неусогласеностите во производствениот тек. PCA се користи за визуелна анализа на структурите во податоците, што е критично за одредување на *outlier* примероци кои може да ја нарушат калибрацијата. По оваа фаза се пристапува кон квантитативното моделирање.

Квантитативните методи овозможуваат директна пресметка на концентрации или процесни параметри базирани на развиени калибрациски модели. Квантитативниот сегмент на хемометријата најчесто е претставен преку регресија на парцијални најмали квадрати (PLS), метод кој комбинира карактеристики на PCA и на линеарната регресија. PLS го моделира односот помеѓу спектралните податоци и матрицата на одговори (како аналитичките концентрации), со тоа што идентификува латентни варијабли кои максимално ја објаснуваат коваријансата меѓу овие две матрици.[18] PLS го минимизира шумот преку проектирање во латентен простор каде што максимално се задржува коваријансата меѓу спектралните податоци и одговорот. Овој метод е особено ефикасен кога податоците се високо колинеарни или кога бројот на варијабли е многу поголем од бројот на примероци, што е честа појава кај NIR или кај раманска спектроскопија.

Дополнително, методите како мултиваријантната линеарна регресија (MLR), која е попрецизна варијанта на класичната регресија при мултиваријантни податоци, како и некои напредни нелинеарни техники, како *kernel* PLS или поддржувачки векторски машини (SVM), наоѓаат сè поголема примена кога процесните односи се комплексни и не следат линеарни модели.

B. Развој на мултиваријантни модели

Развојот на мултиваријантните модели се заснова на неколку основни чекори, кои се прикажани во табела 2.

Табела 2. Чекори во процесот на градење мултиваријантен модел

Чекор	**Цел**
1. Избор на калибрациони примероци	Да се избере сет примероци што се репрезентативни за целата популација, со што ќе се овозможи покривање на варијацијата и избегнување недоволна репрезентативност.
2. Одредување на целниот параметар со референтен метод	Да се одреди вредноста на измереното својство на точен и прецизен начин со примена на алтернативен референтен метод. Квалитетот на оваа вредност го одредува квалитетот на калибрациониот модел.
3. Снимање на NIR спектрите	Добивање физичко–хемиски информации на соодветен и репродуктивен начин.
4. Подложување на спектрите на соодветна обработка	Да се намалат несаканите ефекти (како поместувања и расејување) во спектрите.
5. Градење на моделот	Да се воспостави релација спектар – својство користејќи мултиваријантни методи со поставување оптимален број латентни варијабли и со намалување на ризикот од *overfitting* на креираниот модел.
6. Валидација на моделот	Да се осигури дека моделот точно го предвидува својството од интерес кај примероци што не биле дел од калибрацијата (независен тест-сет).
7. Предвидување непознати примероци	Да се предвиди брзо својството од интерес кај нови, непознати примероци.

B.1. Калибрациони примероци

Развојот на модел за квантитативна анализа започнува со внимателно дефинирање на аналитичките цели и на критичните атрибути што треба да се квантификуваат, проследено со селекција на репрезентативен сет на примероци (калибрациони примероци) кој ја покрива целата природна и технолошка варијабилност на производствениот процес. За секој примерок се прибираат висококвалитетни спектрални или сензорски податоци (калибрационен сет на спектрални/сензорски податоци), паралелно со анализа на истите примероци со примена на верификувани референтни методи.

B.2. Обработка на спектрални податоци

Подготовката на спектралните податоци за анализа започнува со фазата на нивна обработка. Главната цел на обработката е да се отстранат влијанијата на надворешните фактори кои не се поврзани со спектралниот одговор, односно отстранување на непосакуваните варијации во спектралните информации. Присуството на овие артефакти може да се припише на неколку причини, како што се начинот на мерење, инструментални фактори, состојбата на примерокот, како и останати надворешни физички, хемиски и фактори од средината. Општо земено, обработката на податоците е неопходна за да се коригираат ефектите од расејување, промени во базната линија, поместување на опсезите, шумови, вредности кои недостасуваат и неколку други артефакти, така што ќе се истакне вистинската, хемиски релевантна основна структура потребна за прецизно предвидување на својството од интерес.[19, 20, 21, 22]

Постојат различни техники за отстранување различни видови несакани варијации (артефакти) при спектроскопската анализа. Детален опис на различните видови техники за обработка е прикажан во табела 3.

Табела 3. Детален приказ на различните техники за отстранување несакани варијации (артефакти) при спектроскопска анализа

➢ ***Отстранување ефекти од расејување (Scattering effects)***	
Трансформација на случајни променливи со стандардна нормална распределба - Standard Normal Variate (SNV)	Оваа техника се заснова на трансформирање на секој спектар индивидуално со цел да се елиминираат мултипликативните ефекти од расејувањето. SNV ги пресметува средната вредност и стандардната девијација на секој спектар и потоа ги нормализира податоците на тој начин што се одзема средната вредност и се дели со стандардната девијација на истиот спектар. Со тоа, значително се намалени варијациите во интензитетот и мултипликативните ефекти од расејувањето.[23, 24]
Мултипликативна корекција на расејувањето - Multiplicative Scatter Correction (MSC)	MSC претставува пософистициран пристап во кој спектрите се споредуваат со просечен или со референтен спектар. За секој спектар се пресметуваат регресиски параметри (наклон и пресек) во однос на референтниот спектар, и потоа секој спектар се коригира со овие параметри, отстранувајќи ги мултипликативните и адитивните ефекти од расејувањето.[23]
Класификација на променливи за нормализација - Variable Sorting for Normalization (VSN)	VSN е понов пристап кој ја проценува тежината на различните варијабли според нивната чувствителност на ефектите од расејувањето. Со тежински пристап овозможува приспособлива и ефективна нормализација која е особено корисна кога класичните методи не даваат доволно добри резултати. Оваа техника автоматски создава, за даден сет на мултиваријантни сигнали, тежинска функција која ги фаворизира оние сигнални варијабли што се под влијание само на адитивни и мултипликативни ефекти, а не и на целните (аналитички) својства од интерес.[23]
➢ ***Отстранување на поместувањето на базната линија (Baseline shifts)***	
Полиномска или линеарна корекција	Ова е наједноставниот пристап, во кој базната линија се пресметува со корелирање со полином од низок ред или права линија, и потоа оваа пресметана вредност се одзема од оригиналниот спектар, ефективно отстранувајќи ги промените во базната линија.[25]
Асиметрична регресија со најмали квадрати - Asymmetric Least Squares (AsLS)	AsLS ги третира пик-сигналите асиметрично во споредба со базната линија и користи повторлив процес за точно одвојување на базната линија од спектарот, овозможувајќи ефективна елиминација на сложени нелинеарни поместувања.[26]
Wavelet-трансформации	Wavelet-техниките овозможуваат ефикасна декомпозиција на сигналот на базна линија и на аналитичкиот сигнал. Преку Wavelet-просторот, базната линија може да се идентификува јасно и прецизно да се одземе од оригиналниот сигнал.[27]

продолжува на следната страница

Табела 3. Детален приказ на различните техники за отстранување несакани варијации (артефакти) при спектроскопска анализа (продолжение)

➢ ***Отстранување на поместувањата на опсези (Peak misalignments)***	
Корелациски оптимизирано врамнување - Correlation Optimized Warping (COW)	Ова е метод кој се применува за усогласување на спектралните опсези преку корелација помеѓу сигналите. COW ја дели спектралната оска на сегменти и ги усогласува со референтен спектар, преку корелациски пресметки. Тоа овозможува прецизно усогласување и корекција на поместувања на опсезите, што е посебно важно кај хроматографски и спектроскопски техники.[28]
Динамичко временско врамнување - Dynamic Time Warping (DTW)	DTW е алгоритам што се применува за мерење на сличноста помеѓу два временски сигнали, кои може да имаат различна должина, односно се извршува нелинеарна оптимизација на спектрите со различни темпорални или спектрални поместувања. Оваа техника ги мапира сигналите преку минимизирање на кумулативното растојание, што овозможува точно усогласување дури и кога поместувањата се нелинеарни или неуниформни.[28]
Ортогонална сигнална корекција - Orthogonal Signal Correction (OSC)	OSC е техника која ги отстранува сигналите што се ортогонални во однос на информациите од интерес. Со тоа ги елиминира поместувањата и варијациите во сигналот кои не се поврзани директно со хемиските својства од интерес.[29]
➢ ***Отстранување шум (Noise)***	
Савицки–Голееви филтри	Ова е една од најчесто применуваните техники за намалување на шумот преку пресметување изводи и полиномно израмнување. *Савицки–Голеевиот* метод ги задржува формата и ширината на спектралните опсези и истовремено го редуцира случајниот шум.
Wavelet-трансформации	Wavelet-методите се користат и за елиминација на шум бидејќи овозможуваат селективно одвојување на сигналот и на шумот во различни фреквенциски компоненти. Шумот се отстранува преку аплицирање на праг на Wavelet-коефициентите, по што сигналот се реконструира без значајно губење на важните информации.
Автоенкодери (Autoencoders)	Во поново време се применуваат и напредни методи базирани на машинско учење, како автоенкодерите, кои ја компресираат и реконструираат спектралната информација. Оваа метода е способна ефикасно да го отстрани шумот без значајна загуба на корисниот сигнал.[30]
➢ ***Обработка со примена на изводи (derivative preprocessing)***	
Прв извод	Изводите имаат способност да ги отстранат и адитивните и мултипликативните ефекти во спектрите и поради тоа често се користат како техника за обработка во аналитичката спектроскопија. Првиот извод ги отстранува постојаните базни линии, односно оние што се константни по целата должина на спектарот. Вториот извод е уште поефективен бидејќи, освен што ја отстранува базната линија, ги елиминира и линеарните трендови, како постепените промени во интензитетот кои произлегуваат од различни физички и инструментални ефекти. Наједноставниот начин за пресметка на изводи е преку методот на конечни разлики (finite differences). Кај овој метод, првиот извод се добива со одземање на интензитетот на секоја следна точка во спектарот од претходната точка. Така, добиениот спектар ги истакнува острите промени во спектралните карактеристики. Понатаму, вториот извод се пресметува повторно со примена на истиот принцип, но овој пат врз веќе добиениот спектар од првиот извод, со што дополнително се нагласуваат позициите и облиците на спектралните опсези.[23] Дополнително, во практиката почесто се применува напредниот Савицки–Голеев филтер бидејќи тој овозможува истовремено израмнување и пресметување на изводите, со што се намалува и шумот, а истовремено се зачувуваат важните спектрални карактеристики. Ваквата техника обезбедува значително подобар квалитет на спектралната информација, што е од суштинско значење за понатамошна квалитативна и квантитативна анализа во хемометријата.
Втор извод	
Савицки–Голееви филтри	

Овие методи, користени самостојно или во комбинација, овозможуваат ефективно и прецизно отстранување различни видови артефакти од аналитичките податоци, што е предуслов за стабилни и точни хемометриски модели и сигурни предвидувања во процесната аналитичка технологија (ПАТ).

В.3. Градење модели за предвидување

По комплетирање на фазата на обработка на спектралните податоци, започнува постапката на градење модели за предвидување преку воспоставување корелација на спектралните податоци со одговорите од референтните техники за анализа. Во оваа фаза се воспоставува корелацијата спектар – својство користејќи мултиваријантни методи опишани во делот *Мултиваријантна анализа на податоците (хемометрија)*. За изградба на емпириските техники за моделирање потребни се поголем број соодветни податоци и овие модели може да се применуваат соодветно само во условите што биле застапени во податоците со кои е изграден моделот. Исто така, достапноста на повеќе променливи за градење на моделот ја зголемува можноста за прекумерно приспособување на моделот (*overfitting*). Соодветноста на изградениот модел се проценува преку статистичките индикатори – коефициент на корелација (R^2Y), коефициент на способност на моделот за предвидување (Q^2) и квадратен корен од средна квадратна грешка од естимација (RMSEE).

Точноста и робусноста на креираните модели се проверуваат преку техники за валидација, како внатрешна или вкрстена валидација (*cross-validation*) и надворешна валидација, со што се проценува способноста на креираните модели за предвидување нови примероци во реални индустриски услови. Оптималниот број латентни варијабли, исто така, се избира преку вкрстена валидација со цел да се балансираат комплексноста и предвидувачката стабилност на моделот. Валидноста на моделот со примена на внатрешната вкрстена валидација се проценува преку статистичкиот индикатор квадратен корен од средна квадратна грешка од естимација, пресметан со кросвалидација на моделот (RMSEcv). Надворешната верификација на изградениот модел се спроведува со независен тест-сет, при што статистичките индикатори квадратен корен од средна квадратна грешка од предвидување (RMSEP) и Bias се користат за квантитативна проценка на перформансот на моделот.[31]

Во последните децении сè повеќе се докажува потенцијалот на ПАТ моделите развиени со примена на неинвазивни спектроскопски техники во комбинација со хемометриска анализа за поставување и ефективна контрола на производствените процеси. Токму ова претставува и основна цел на оваа докторска дисертација, потврда на значајноста и применливоста на процесната аналитичка технологија како основна иновативна алатка за следење и за контрола на производството на фармацевтски дозирани форми.

Во рамки на првиот дел од оваа докторска дисертација, основниот фокус се поставува на можноста за примена на ПАТ алатките за следење на трансформациите на активната компонента кои се случуваат во текот на производството. За таа цел во овој сегмент од докторската дисертација е опфатена компаративна анализа на две различни вибрациони техники – спектроскопија во блиско и спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје за следење на процесот на производство на ибупрофен натриум таблети. Процесот на производство вклучува влажна гранулација на ибупрофен и динатриум карбонат и постепена трансформација на ибупрофен во негова сол - ибупрофен натриум. Проценката на соодветноста на споменатите ПАТ алатки за следење на процесот на транзиција и

квантификација на реакцијата на трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум е од особено значење за дефинирање на крајната точка на реакцијата во процесот на производство на ибупрофен натриум таблети кои покажуваат подобрена растворливост од таблетите што во својот состав содржат ибупрофен база.[32, 33]

Во вториот дел од оваа докторска дисертација, примената на хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје како ПАТ алатка за следење на процесот на производство на фармацевтски дозирани форми е тестирана преку развој на липидна формулација на фелодипин. Воедно, можноста за дефинирање и за идентификација на критичните процесни параметри при производството на липидната формулација се тестира преку квантификација на содржината и униформната дистрибуција на активната компонента во рамки на липидната формулација за време на процесот на производство.

1. ИСТРАЖУВАЊЕ I

Развој на NIR алатка како дел од ПАТ пристапот за следење на трансформацијата на ибупрофен во ибупрофен натриум

1.1. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕ I

Ибупрофен, еден од најпознатите нестероидни антиинфламаторни лекови кои се применуваат за терапија на блага до умерена болка,[34] припаѓа во лекови од класа 2 според Биофармацевтскиот систем за класификација (BCS). Лековите припадници на оваа група се карактеризираат со висока пермеабилност, но ниска растворливост. Според тоа, растворливоста претставува критичен фактор кој ги определува степенот на апсорпција на лекот и брзината на настанување на фармаколошкиот ефект. Повеќе студии[35–37] потврдуваат дека солите на ибупрофен, како ибупрофен лизин и ибупрофен аргинат, покажуваат побрза растворливост во споредба со основната слободна форма на лекот. Последователно, растворената форма на лекот се апсорбира побрзо во системската циркулација. Друг тип сол на ибупрофен, ибупрофен натриум дихидрат (ибупрофен натриум), се потврдува како биоеквивалентен со лизинатната и со аргинатната сол на лекот.[32]

Комерцијално се веќе достапни цврсти дозирани форми кои содржат ибупрофен натриум како активна супстанција, која покажува подобрена брзина на растворливост и побрз фармаколошки одговор. За производство на овие фармацевтски дозирани форми се применува претходно синтетизиран ибупрофен натриум како активна супстанција, што дополнително ја зголемува цената на финалниот производ во споредба со цврстите дозирани форми што содржат ибупрофен како активна супстанција. Во согласност со тоа, синтезата на ибупрофен натриум е особено значаен процес за овие формулации. Наједноставен, а воедно и најекономичен процес на ин ситу синтеза на ибупрофен натриум претставува процесот на влажна гранулација на ибупрофен во присуство на база која содржи натриум, како натриум хидроксид или натриум карбонат.[33] На тој начин процесот на синтеза на ибупрофен натриум и производството на финалната цврста дозирана форма можат да се одвиваат симултано, што резултира со намалување на трошокот за производство на финалниот производ. Во таа насока, следењето на процесот на трансформација и способноста за квантификација на конверзијата на ибупрофен во ибупрофен натриум за време на процесот на производство се од клучно значење за одредување на крајната точка на реакцијата и за потврдување на квалитетот на финалниот производ. Спектроскопските алатки што се дел од процесната аналитичка технологија (ПАТ алатки), во комбинација со хемометриска анализа, се потврдуваат како ефикасен систем за контрола на производствените процеси.[38, 39]
Бројни студии достапни во научната литература ја потврдуваат примената на NIR спектроскопијата при изведбата на различни анализи во текот на процесите на производство на ибупрофен формулации, како квантификација, анализа на големина на честички, анализа на содржина на вода и сл.[40–43]

Целта на истражувањето I во рамки на оваа докторска дисертација е развој на спектроскопска алатка која би овозможила следење на процесот на трансформација на ибупрофен во неговата натриумова сол во текот на фазата на влажна гранулација.

Иницијалната скрининг-фаза како почетна фаза на истражувањето е насочена кон идентификација на способноста за примена на спектроскопските техники за квантификација на двете различни форми на активната компонента ибупрофен, односно ибупрофен база и неговата натриумова сол.

За таа цел, во скрининг-фазата од ова истражување:

- се потврдени спектроскопските својства на двете форми на лекот (сол и база) со цел идентификација на потенцијалот за спектроскопска дистинкција помеѓу ибупрофен и ибупрофен натриум, што е од особено значење за ПАТ моделите за квантификација;
- е потврдена синтезата на ибупрофен натриум во процес на влажна гранулација на бинарна смеса составена од ибупрофен и од натриум карбонат;
- е развиен модел за квантификација на содржината на ибупрофен и на ибупрофен натриум заснован на спектроскопски податоци од изработени мешавини со различен удел на двете форми на активната компонента и натриум карбонат;
- е прикажана компаративна анализа на две спектроскопски техники, спектроскопија во блиско (NIR) и средно инфрацрвено подрачје (MIR), а има за цел потврда на концептот на примена на овие техники како ПАТ алатки.

По потврда на хипотезите поставени при скрининг-фазата, истражувањето е насочено кон:

- компарација на карактеристиките на моделите за квантификација развиени со примена на спектрите добиени од преносен и од статичен NIR спектрофотометар;
- идентификација на способноста на развиениот NIR модел за квантификација на реакцијата на трансформација на ибупрофен, доколку процесот на влажна гранулација се одвива во присуство на сите интрагрануларни компоненти од финалната формулација;
- потврда на концептот на подобрена растворливост на фармацевтски дозирани форми произведени со контролирана (со примена на развиената ПАТ алатка) трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум.

1.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

1.2.1. Материјали и методи применети во истражување I

1.2.1.1. Материјали

Име	*Производител*
Ибупрофен (Ibuprofen 50)	BASF, Bishop, Тексас
Ибупрофен натриум	BASF, Bishop, Тексас
Динатриум карбонат (Fine powder)	Dr. Paul Lohmann GmbH & Co. KGaA, Emmerthal, Германија
Микрокристална целулоза (Avicel®PH-101)	DuPont Nutrition, Cork, Ирска
Микрокристална целулоза (Avicel® PH 102)	DuPont Nutrition, Cork, Ирска
Натриум кроскармелоза (Ac-Di-Sol®)	DuPont Nutrition, Cork, Ирска
Лактоза монохидрат (Tablettose® 100)	Meggle, GmbH & Co. KG, Германија
Колоиден силициум диоксид (Aerosil® 200)	Pharma Evonik, Rheinfelden, Германија
Делумно прежелатинизиран пченичен скроб (Starch 1500)	Colorcon, САД
Глицерил бехенат (Compritol 888 ATO)	Gattefoss´e, Saint-Priest, Франција

1.2.1.2. Опрема применета при експерименталната работа

Опрема	*Производител*
Електронска вага	Sartorius CP4202S, Sartorius AG, Germany; 4200g x 0.01g
Електронска вага	Sartorius Secura 224-1 CEU, Sartorius AG, Germany; 220g x 0.01g
Миксер гранулатор со голема брзина	Diosna P1/6, Diosna Dierks & Söhne GmbH, Germany
Перисталтичка пумпа	Peristaltic pump 323 S/D, Watson Marlow, UK
Стерилизатор со сува топлина	Panasonic MOV 212S, Panasonic, Japan
Апарат за одредување влага	Mettler Toledo Excellence HS153, Mettler Toledo, Holland
Опрема за регранулација	Quadro Comil U5, UK
Мешалка со дијагонално поставено цилиндрично буре	Erweka PM5, Erweka GmbH, Germany
Ротациона таблет-машина	Korsch Pro XL100, Korsch, Germany
Апарат за определување на брзината на ослободување на активната супстанција	Varian Vankel 7025 Model 115/230, Varian, USA
Мембрански филтри 0,45 μm	Ministar RC25, Sartorius, Germany
Ултрасонична бања	Elmasonic S, Germany
Апаратура за Фурјеова трансформациска инфрацрвена спектроскопија (FTIR)	Varian-660 FTIR, USA
Апаратура за Фурјеова трансформациска блиска инфрацрвена спектроскопија (FTIR)	Antaris™ II FT-NIR Analyzer, Thermo Fisher Scientific™, САД
Преносен спектрофотометар	MicroNIR 1700 ES, VIAVI, Santa Rosa, CA, САД

1.2.1.3 Методи

1.2.1.3.1 Синтеза на ибупрофен натриум при процес на гранулација на ибупрофен со натриум карбонат во присуство на вода

Процесот на гранулација на ибупрофен и на динатриум карбонат во моларен сооднос 1:1, дел од скрининг-фазата, се одвива со примена на опрема за влажна гранулација Diosna 2L. Водата се додава за иницирање на реакцијата на трансформација и за добивање грануларна форма. Пристапот на сушење на тацни со вклучување стерилизатор со сува топлина (опрема Panasonic MOV 212S) е применет при фазата на сушење на влажниот гранулат. Сушењето се одвива на температура од 50 °C во период од 150 минути, односно до постигнување вредност од 0,7 % за параметарот губиток при сушење.

1.2.1.3.2 Потврда на добиената сол на ибупрофен со примена на спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје (MIR)

Со цел потврда на добиената натриумова сол на ибупрофен во текот на реакцијата од фаза 1.2.1.3.1, направена е компаративна анализа на спектарот (генериран со примена на Varian-660 FTIR спектрометар) на добиениот гранулат во однос на ибупрофен натриум синтетизиран од производител BASF. Спектралните карактеристики на индивидуалните компоненти се анализирани со цел потврда на присуството на региони со различен спектрален сигнал помеѓу ибупрофен и ибупрофен натриум, што е значајно за одредување на способноста за примена на спектроскопијата за следење на дефинираниот процес на трансформација.

1.2.1.3.3 Развој на модели за квантификација со примена на спектроскопија во блиско инфрацрвено подрачје (NIR) и на спектроскопија во средно инфрацрвено подрачје (MIR)

Развојот на моделите за квантификација, а со цел потврда на концептот за примена на спектроскопските алатки за следење на конверзијата на ибупрофен, вклучува изработка на 33, односно на 21 стандардна мешавина (табела 4) со различни сооднои на ибупрофен активна компонента, динатриум карбонат и синтетизираниот гранулат ибупрофен натриум од фаза 1.2.1.3.1 за развој на NIR и MIR моделите, соодветно. Процентуалниот удел на секоја од компонентите во подготвените стандардни мешавини е претставен во табела 1. По фазата на суво мешање на компонентите во различен сооднос, пристапено е кон добивање на NIR спектар за секоја од мешавините со примена на опрема Thermo Scientific™ Antaris™ II FT-NIR статичен спектрофотометар. MIR спектрите се генерирани со примена на Varian-660 FTIR спектрометар. Добиените спектри се применети во развој на модели за квантификација засновани на хемометриска анализа - регресија на парцијални најмали квадрати (PLS) со примена на софтвер за мултиваријантна анализа SIMCA® (Umetrics, Sartorius, Sweden).

NIR спектралната анализа на секоја од мешавините е направена со трикратно повторување на анализата, со што се генерирани вкупно 99 спектри кои се дел од калибрациониот сет на податоци применет при развој на PLS моделот.

При MIR спектралната анализа секоја од мешавините е двојно анализирана, со што се генерирани вкупно 42 спектри, дел од калибрациониот сет на податоци применет при развој на PLS моделот.

Во насока на дефинирање на варијаблите (спектралните податоци) со најголемо значење во градењето и способноста за предвидување на PLS моделот за квантификација, направена е анализа на добиениот VIP плот.

Табела 4. Состав на стандардни мешавини применети при развој на хемометриски метод за потврда на концепт на развој на модели за квантификација базиран на NIR спектроскопските податоци; стандардните мешавини означени со сиво се применети при развој на хемометриски метод за квантификација базиран на генерирани MIR спектри

Мешавина број	Компонента		
	Ибупрофен натриум	Ибупрофен	Na_2CO_3
	Масен удел во мешавината (%)		
1	100,00	0,00	0,00
2	98,49	0,99	0,51
3	97,00	1,98	1,02
4	95,53	2,95	1,52
5	94,07	3,92	2,01
6	92,62	4,87	2,50
7	89,77	6,76	3,47
8	88,37	7,68	3,95
9	85,60	9,51	4,89
10	78,92	13,93	7,16
11	72,55	18,14	9,32
12	66,46	22,15	11,38
13	60,65	25,99	13,36
14	55,09	29,67	15,24
15	49,77	33,18	17,05
16	44,67	36,55	18,78
17	39,78	39,78	20,44
18	35,09	42,88	22,03
19	30,57	45,86	23,56
20	26,24	48,73	25,04
21	22,06	51,48	26,45
22	18,05	54,14	27,82
23	14,17	56,70	29,13
24	10,44	59,16	30,40
25	6,84	61,54	31,62
26	5,43	62,47	32,10
27	4,74	62,93	32,33
28	3,36	63,84	32,80
29	2,68	64,29	33,03
30	2,00	64,74	33,26
31	1,33	65,18	33,49
32	0,66	65,62	33,72
33	0,00	66,06	33,94

По потврда на хипотезите од скрининг-фазата направена на мешавини кои содржат само три компоненти, истражувањето е насочено кон развој на ПАТ модел за квантитативна анализа во тек на влажна гранулација со присуство на сите интрагрануларни компоненти на финалната формулација.

1.2.1.3.4 Подготовка на калибрационен сет

Калибрациониот сет на податоци за развој на NIR моделите за следење на процесот на влажна гранулација на финалната формулација ибупрофен натриум таблети е генериран со подготовка на 35 стандардни мешавини изработени со мерење и физичко комбинирање (мешање) на интрагрануларните компоненти на финалната формулација, при што се вклучени стандардни количини од Avicel® PH 101 и Tablettose® 100 како полначи, Starch 1500 како врзувач, Aerosil® 200 како лизгач, додека активните компоненти ибупрофен и ибупрофен натриум се варирани во концентрационен опсег од 0 % до 100 % (табела 4).

Подготвениот сет на стандардни мешавини е применет за развој на модели за квантификација со цел компарација на два NIR спектрофотометри, статичен (Antaris II FT NIR) и преносен (MicroNIR 1700 ES) спектрофотометар. NIR спектралната анализа на подготвените стандардни мешавини е двојно повторена, со пристап на анализа на две различни локации на секоја од мешавините, со цел минимизирање на грешките кои потекнуваат од земањето на примероците за анализа. Со овој пристап се генерирани вкупно 70 спектрални податоци кои се применети како калибрационен сет на податоци за развој на два модели за квантификација.

Во насока на развој на робустен модел за квантификација во текот на процесот на влажна гранулација, стандардните мешавини со вклучени компоненти од интрагрануларната фаза применети во компаративната анализа на NIR спектрофотометрите се надоградени со инкорпорирање на варијабилен удел на вода од 0 % до 23,5 % (табела 5), соодветен за симулација на процесот на влажна гранулација. Пристапот на анализа на секоја од мешавините на две различни локации е повторно применет при спектроскопската анализа и на овие мешавини со цел елиминирање на грешките кои потекнуваат од земањето на примероците за анализа. На овој начин се генерирани вкупно 192 спектрални податоци како калибрационен сет за развој на моделот за квантификација.

Табела 5. Количество на варијабилните компоненти при изработка на стандардните мешавини за развој на моделите за квантификација на ибупрофен и на ибупрофен натриум

Компонента	**Ибупрофен**	**Ибупрофен натриум**	**Вода***
Мешавина број	Количество (g)		
1	4,44	0,00	0,34
2	4,40	0,04	0,42
3	4,36	0,09	0,49
4	4,31	0,13	0,57
5	4,27	0,18	0,61
6	4,22	0,22	0,65
7	4,13	0,31	0,69
8	4,09	0,36	0,73
9	4,00	0,44	0,77
10	3,78	0,67	0,81
11	3,56	0,89	0,85
12	3,33	1,11	0,89
13	3,11	1,33	0,93
14	2,89	1,56	0,98
15	2,67	1,78	1,02
16	2,44	2,00	1,06
17	2,22	2,22	1,11
18	2,00	2,44	1,15
19	1,78	2,67	1,20
20	1,56	2,89	1,25
21	1,33	3,11	1,29
22	1,11	3,33	1,34
23	0,89	3,56	1,39
24	0,67	3,78	1,44
25	0,44	4,00	1,48
26	0,40	4,04	1,53
27	0,36	4,09	1,58
28	0,31	4,13	1,64
29	0,27	4,18	1,69
30	0,22	4,22	1,74
31	0,18	4,27	1,79
32	0,13	4,31	1,84
33	0,09	4,36	1,90
34	0,04	4,40	1,95
35	0,00	4,44	2,01

*****применета за развој на моделот за анализа во тек на процес на влажна гранулација*

1.2.1.3.5 Спектроскопија во блиско инфрацрвено (NIR) подрачје

За спектроскопската анализа во оваа студија се применети два NIR спектрофотометри: статичен NIR инструмент (Antaris II FT-NIR Analyzer, Thermo Fisher Scientific, САД) и преносен MicroNIR уред (MicroNIR 1700 ES, VIAVI, Santa Rosa, CA, САД).

Статичниот NIR спектрофотометар е соодветен за развој на моделите за квантификација затоа што се карактеризира со висок степен на точност и на репродуктивност. Инструментот е управуван во режим на рефлексија, а спектрите се снимени во спектрално подрачје од 1 000 nm до 2 500 nm (10 000 – 4 000 cm^{-1}), со резолуција 8 cm^{-1}, добиени преку усреднување на спектрите од 18 скенирања.

MicroNIR преносниот спектрофотометар е дизајниран за определување на дифузната рефлексија во NIR регионот од електромагнетниот спектар. Опремен со детектор со 128 пиксели и линеарен променлив филтер (LVF) како селектор на брановата должина, тој го опфаќа спектралното подрачје од 950 nm до 1 650 nm (10 526 – 6 060 cm^{-1}). Овој спектрофотометар е поврзан за лаптоп преку USB-приклучок, а снимањето на спектрите е контролирано со помош на MicroNIR Pro v.2.2 софтвер на инструментот. Дифузиониот рефлектирачки сигнал на NIR спектарот е означен како рефлексија (R), при што логаритамска вредност (1/R) е применета при хемометриската анализа.[44, 45]
Овој спектрофотометар е применет при развој на моделот за анализа на финалната формулација, како и при анализа на лабораториските проби како дел од надворешната валидација на развиениот модел за интрагрануларна квантификација.

1.2.1.3.6 Мултиваријантна статистичка анализа

Моделите за квантификација на активните компоненти се креирани со примена на софтвер за мултиваријантна статистичка анализа SIMCA (Version 14.1.0, Umetrics, Umeå, Шведска). Од причина што концентрацијата на активните компоненти е хемиска карактеристика, филтер за нормализација од избор без влијание на значајните информации присутни во спектарот е трансформација на случајни променливи со стандардна нормална распределба (SNV). Оваа техника за обработка на спектралните податоци овозможува подобрување на целокупната резолуција на информациите екстрахирани од спректрите.[46, 47, 48] Регресионата анализа на парцијални најмали квадрати (PLS) како мултиваријантна статистичка техника е применета за воспоставување корелација на зависните променливи (во овој случај концентрацијата на активните компоненти во стандардните мешавини – променливи Y) со независните променливи на процесот (спектралните податоци – променливи X). Целото спектроскопско подрачје е применето за развој на моделите за квантификација. Дополнително, се воспоставува и корелација на концентрациите на активни компоненти кои ги предвидуваат моделите во однос на познатите концентрации на активните компоненти во секоја од стандардните мешавини.

Валидацијата на NIR моделите вклучува метод на вкрстена валидација со исклучување на еден примерок со тек на време. Квадратен корен од средна квадратна грешка од предвидување, пресметана со кросвалидација на моделот (RMSEcv) се применува како дијагностички тест за евалуација на прецизноста и точноста на моделот во предвидувањата.

Проценката на соодветноста на развиените модели и нивната компарација вклучуваат анализа на статистичките индикатори за соодветност на спектроскопските модели за квантификација, како: коефициенти на корелација (R^2Y, R^2X), коефициент на

способност на моделот за предвидување (Q^2), квадратен корен од средна квадратна грешка од предвидување (RMSEE), квадратен корен од средна квадратна грешка од предвидување, пресметана со кросвалидација на моделот (RMSEcv), додека, пак, квадратен корен од средна квадратна грешка од предвидување (RMSEP) е искористен за проценка на моќта на предвидување на оптималниот модел.

1.2.1.3.7 Подготовка на лабораториски проби (надворешна валидација)

Надворешната валидација на моделите вклучува анализа на лабораториски проби за производство на ибупрофен натриум таблети со подобрена растворливост. Технолошкиот процес на влажна гранулација применет за изработка на лабораториските проби вклучува употреба на лабораториски гранулатор со висока сила на смолкнување Diosna P1/6 и дволитарски сад за гранулација. Фазата на влажна гранулација ги вклучува интрагрануларните компоненти ибупрофен, натриум карбонат, Tablettose® 100, Avicel®PH-101, Starch 1500 и Aerosil® 200. При изработка на различните лабораториски проби количеството на натриум карбонат е варирано во опсег од 0 до 2 моли на 1 мол ибупрофен (детален приказ на интрагрануларниот состав на лабораториските проби е прикажан во табела 6).

Табела 6. Состав на лабораториските проби (ЛП) за потврда на моделот за квантификација

	ЛП 1	**ЛП 2**	**ЛП 3**	**ЛП 4**	**ЛП 5**	**ЛП 6**
Гранулација:			Количина (g)			
Ibuprofen	111,11	111,11	111,11	111,11	111,11	111,11
Na_2CO_3	38,92	57,09	114,18	28,54	7,14	0,00
Tablettose® 100	17,50	17,50	17,50	17,50	17,50	17,50
Avicel®PH 101	17,50	17,50	17,50	17,50	17,50	17,50
Starch 1500	16,25	16,25	16,25	16,25	16,25	16,25
Aerosil® 200	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25
Финална мешавина:						
Avicel® PH 102	18,05	18,05	18,05	18,05	18,05	18,05
Ac-Di-Sol®	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
Compritol 888 ATO	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75

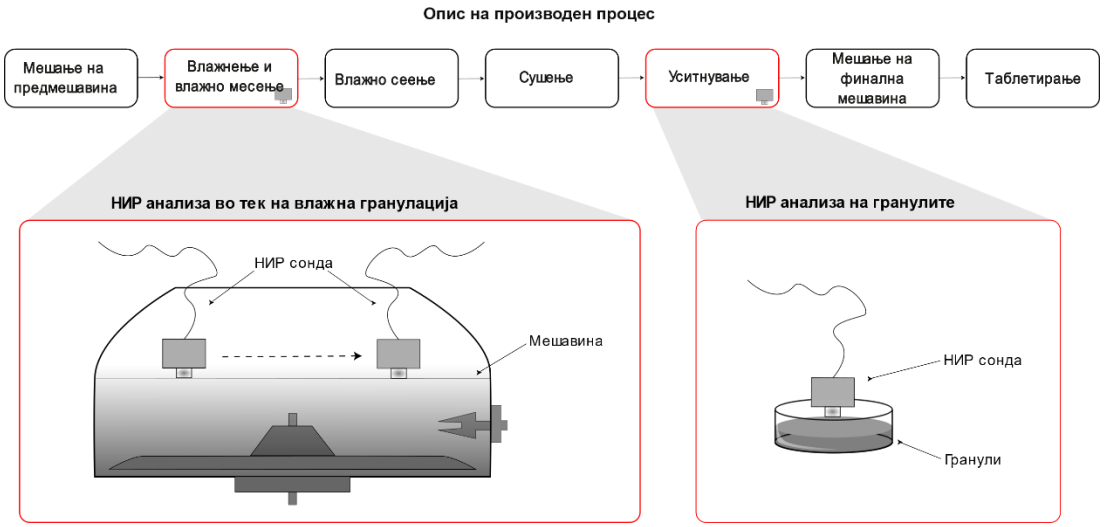
Како резултат на промената на количеството натриум карбонат, потребно е приспособување на количеството вода за изведба на процесот на влажна гранулација. Последователно, направени се и одредени приспособувања на процесните параметри во согласност со промената на количеството натриум карбонат и на количеството вода (табела 7). Целта е производство на гранули со квалитет соодветен за процесот на таблетирање.

Процесот на гранулација започнува со директно додавање вода во садот за гранулација со примена на перисталтичка пумпа. Процесот на влажнење се одвива во временски период од 4 до 6 минути со цел да се овозможи соодветна дистрибуција на водата неопходна за раст на гранулите.

Табела 7. Процесни параметри (ПП) на фазите влажна гранулација и сушење

	ЛП 1	**ЛП 2**	**ЛП 3**	**ЛП 4**	**ЛП 5**	**ЛП 6**
Чекор 1:	**Мешање на предмешавинатa**					
ПП						
Брзина на мешалка (rpm)	200	300	300	300	300	300
Брзина на секач (rpm)	1 000	1 500	1 500	1 500	1 500	1 500
Време на мешање (min)	2	3	3	3	3	3
Чекор 2:	**Влажнење**					
ПП						
Брзина на мешалка (rpm)	150	200	200	200	200	200
Брзина на секач (rpm)	1 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
Време на влажнење (min)	3,5	3	4	2,5	1,5	2,5
Брзина на перисталтичка пумпа (rpm)	15	15	15	10	15	20
Чекор 3:	**Влажно месење**					
ПП						
Брзина на мешалка (rpm)	200	300	300	300	300	300
Брзина на секач (rpm)	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000	2 000
Време на влажно месење (min)	4	5	6	6	6	6
Чекор 4:	**Влажна регранулација**					
ПП						
Брзина на секач (rpm)	1 400	1 400	1 400	1 400	1 400	1 400
Чекор 5:	**Сушење**					
ПП						
Количина на влезен воздух (m^3/h)	10	10	10	10	10	10
Температура на влезен воздух (ºC)	65	65	65	65	50	50
Чекор 6:	**Уситнување**					
ПП						
Брзина на секач (rpm)	1 400	1 400	1 000	1 000	1 000	1 000

Како што е прикажано и на слика 6, со примена на MicroNIR спектрофотометар се анализирани две основни фази од процесот на влажна гранулација. Лабораториска проба 6 без присуство на натриум карбонат е произведена како контролна серија која е последователно применета при анализата на растворливост, со цел потврда на концептот на подобрена растворливост при конверзија на ибупрофен во натриумова сол. Како резултат на отсуство на трансформација кај оваа проба, нејзиниот процес на производство не е следен со примена на MicroNIR спектрофотометар, но крајната точка на процесот на производство на гранулатот е квантификувана со претходно развиениот PLS модел. Приказ на квантитативниот состав на произведените лабораториски проби е прикажан во табела 6, додека процесните параметри што се применети за производство на секоја проба се претставени во табела 7.



Слика 6. Приказ на ин ситу NIR следењето на производството на лабораториските проби

За производство на финална мешавина за таблетирање, на произведените гранули од секоја серија се додаваат надворешните ексципиенти (Avicel® PH 102 и AC-DI-Sol) и се продолжува со мешање во период од 30 минути и 15 вртежи во минута, во 10-литарски сад за мешање на ERWEKA AR 403 буре-мешалка. Потоа, кон мешавината се додава лубрикант (Compritol 888 ATO) и се продолжува со мешање уште 10 минути со 15 вртежи во минута. Compritol 888 ATO е избран како лубрикант наместо магнезиум стеарат поради веќе потврдената интеракција на ибупрофен со магнезиум стеарат.[49] Добиените финални мешавини се компресирани во кружни 11 mm таблети со примена на лабораториска таблет преса Korsch XL 100 PRO.

1.2.1.3.8 Ин витро постапка за определување на брзината на ослободување на ибупрофенот од различните лабораториски проби

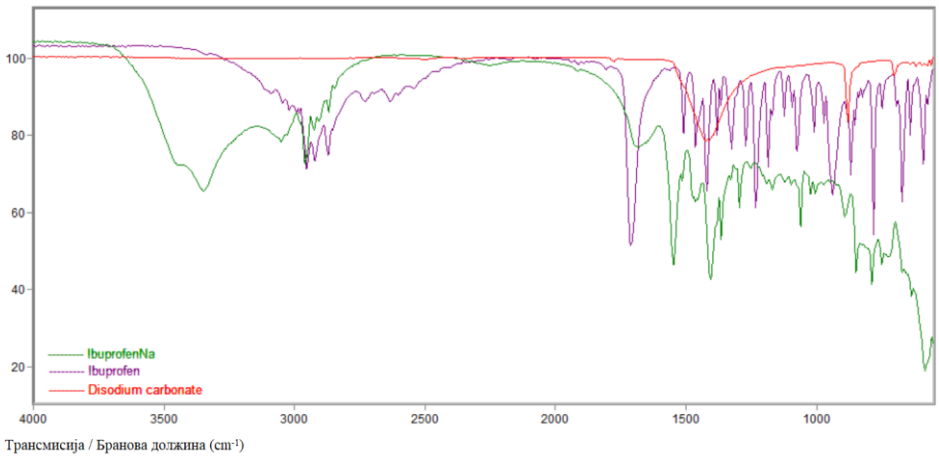
Определувањето на растворливоста на ибупрофен на вкупно шест таблети од секоја лабораториска проба е изведено со примена на претходно развиен и валидиран метод. Методот вклучува примена на апарат за тестирање растворливост тип 2 со весло со брзина на ротација од 75 вртежи во минута на 37 ± 0,2 ˚C. Медиум за изведба на тестот за растворливост е 900 mL ацетатен пуфер чијашто pH вредност е 4,5.

При анализата на примероците од различните експерименти, земени се примероци по 10 mL од медиумот за растворање, во време од 5, 10, 15, 30 и 45 минути, што воедно и се заменува со еднаков волумен на свеж медиум со температура од 37 ± 0,2 ^{0}C, со цел одржување константен вкупен волумен. Примерокот од секоја временска точка се филтрира низ 0,45 μm филтер произведен од регенерирана целулозна мембрана, а 2 mL од исфилтрираниот раствор се трансферира во 50 mL волуметриска тиква и се разредува до 50 mL со медиум. Примероците се квантитативно анализирани со UV-Vis спектрофотометриски метод. Калкулацијата на вкупното количество на растворен ибупрофен вклучува анализа на тест и стандардни раствори со примена на Cary 50 UV–Vis спектрофотометар со детекција на бранова должина од 221 nm.

1.3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

1.3.1. Карактеризација на добиената сол на ибупрофен, ибупрофен натриум, со примена на спектрометрија во средно инфрацрвено подрачје

На слика 7 е прикажана компаративна анализа на молекуларниот ентитет, кој се добива при интеракција на ибупрофен со динатриум карбонат во присуство на вода, во однос на спектралните MIR карактеристики на поединечните суровини ибупрофен и динатриум карбонат, анализирани за време на иницијалната скрининг-фаза од истражувањето.

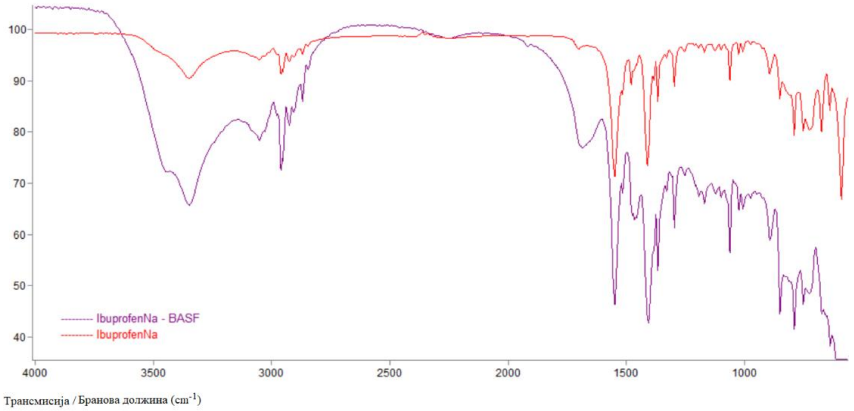


Слика 7. MIR спектар на ибупрофен и синтетизиран ибупрофен натриум

Добиениот MIR спектар на чист ибупрофен се карактеризира со интензивна лента во регионот околу 1 709 cm^{-1} (5 850 nm), што се должи на асиметричниот карбонилен мод и лента во регионот на околу 3 000 cm^{-1} (33 000 nm) како резултат на хидроксилно врзување од карбоксилната група.[50] Како што може да се забележи, MIR спектарот добиен од бинарната смеса од ибупрофен и динатриум карбонат по нивната интеракција во присуство на вода (слика 7) јасно се разликува во однос на MIR спектрите снимени на чист ибупрофен и динатриум карбонат, соодветно. Разликите во спектрите и отсуството на преклопување на спектралните региони карактеристични за активните компоненти укажуваат на соодветноста за развој на спектроскопски техники за квантификација на овие молекули.

Интензитетот на карбонилниот мод од ибупрофен на 1 709 cm^{-1} (5 850 nm) во спектарот снимен на мешавината по гранулација се намалува, што имплицира намалување на уделот на чист, неизреагиран ибупрофен во бинарната смеса. Ваквите промени водат кон заклучок дека доаѓа до формирање нов молекуларен ентитет како резултат на интеракцијата помеѓу ибупрофен и динатриум карбонат, којшто во литературата е познат како сол ибупрофен натриум дихидрат.

Целосната карактеризација на добиената сол ибупрофен натирум дихидрат е потврдена со споредба на MIR спектарот од комерцијално достапниот ибупрофен натриум дихидрат од производителот BASF (слика 8). Карактеристичните ленти што се појавуваат во регионот околу 1 545 cm^{-1} (6 470 nm), резултат на антисиметричниот ($\nu(COO^{-})_{as}$), и 1 404 cm^{-1} (7 120 nm), резултат на симетричниот карбонилен мод ($\nu(COO^{-})_{s}$), јасно го потврдуваат присуството на новодобиената сол.[33] Дополнително, синтетизираната сол на ибупрофен натриум се карактеризира со лента на 3 348 cm^{-1} (2 990 nm) што укажува на присуство на -OH валентна вибрација, бидејќи натриумовата сол на ибупрофен е во хидратна форма.

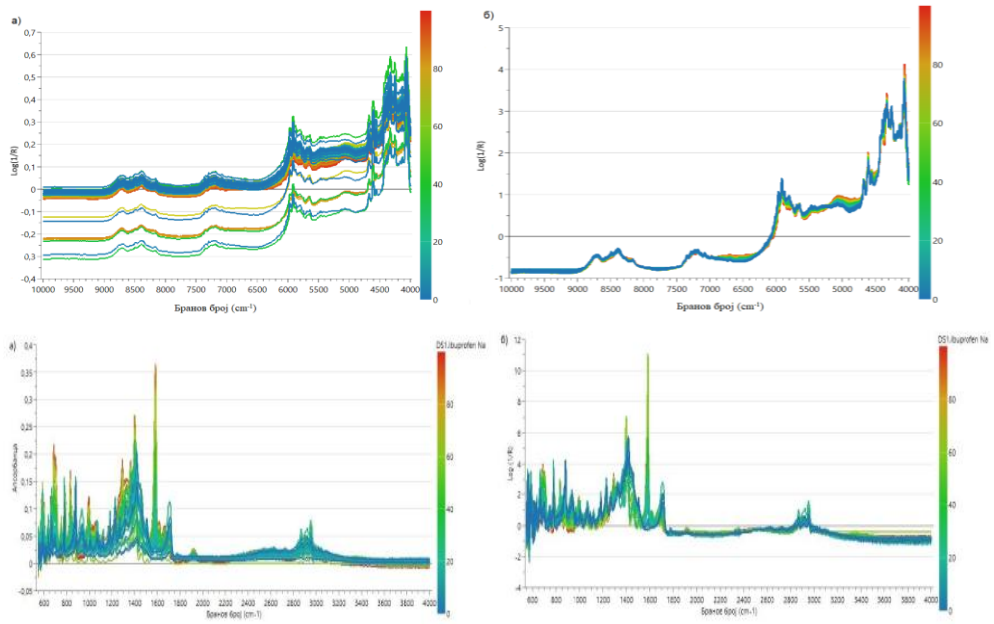


Слика 8. MIR спектар на ибупрофен натриум од BASF и синтетизиран ибупрофен натриум

По потврда, добиената сол е применета при развој на моделите за квантификација.

1.3.2. Развој и компаративна анализа на скрининг-методите за квантификација

Во рамки на скрининг-фазата од оваа студија, развојот на спектралните методи за квантификација на содржината на ибупрофен и ибупрофен натриум е овозможен со примена на SIMCA® софтвер за мултиваријантна анализа.



Слика 9. а) Снимени NIR спектри; б) NIR спектри добиени по SNV трансформација
в) Снимени MIR спектри; г) MIR спектри добиени по SNV трансформација

Во оваа студија развојот на моделите за квантификација започнува со примена на филтер за нормализација – трансформација на случајни променливи со стандардна нормална распределба (SNV) со цел поставување на сите спектри на заедничка основна линија, што го олеснува регресионото моделирање.[51] Снимените спектри и спектрите добиени по SNV трансформацијата се прикажани на слика 9.

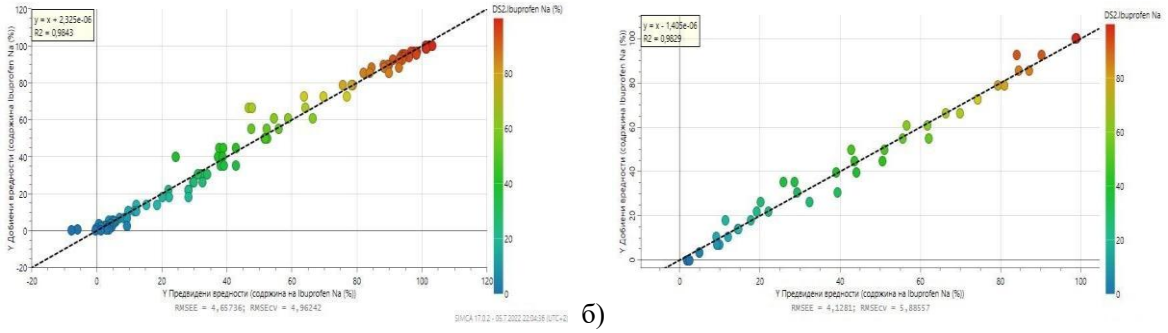
Развојот на PLS моделите за квантификација со примена на SNV спектралните податоци вклучува поставување корелација меѓу добиените NIR и MIR спектри, генерирани

при анализа на секоја подготвена мешавина, во однос на процентуалниот удел на ибупрофен и ибупрофен натриум во соодветната стандардна мешавина. И двата развиени модели се карактеризираат со високи корелациски коефициенти и споредлива предикативна способност (табела 8). Добиените вредности за RMSEE и за RMSEcv ја потврдуваат способноста на развиените модели за предвидување на добиените резултати во граници на точност од ± 5 %, односно ± 6 % од добиената вредност за NIR и MIR моделот соодветно.

Табела 8. Компарација на карактеристиките на двата скрининг-модели

Инструмент	**Thermo Scientific™ Antaris™ II FT-NIR спектрометар**	**Varian-660 FTIR спектрометар**
Модел	**NIR**	**MIR**
Број на латентни варијабли	2	2
R^2Y	0,98	0,98
R^2X	0,98	0,90
Q2	0,98	0,96
RMSEE	4,66	4,13
RMSEcv	4,96	5,89

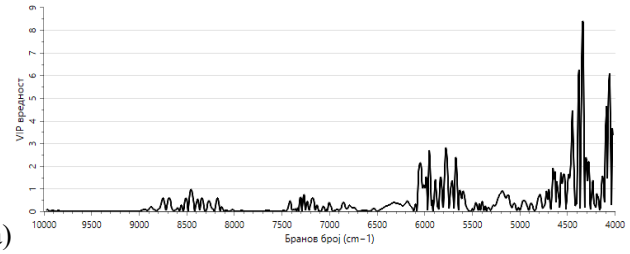
На слика 10 е претставен компаративен приказ на корелациските плот-анализи помеѓу вредностите за содржина на ибупрофен натриум предвидени со помош на генерираните PLS модели и концентрациите на ибупрофен натриум во секоја мешавина.

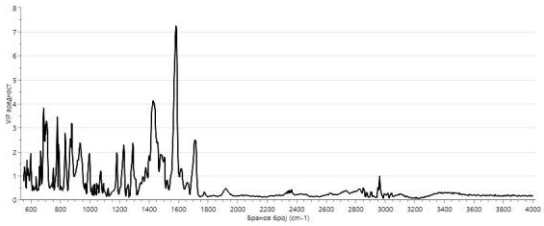


а) б)

Слика 10. Плот кој ја претставува корелацијата помеѓу предвидените вредности за содржина на ибупрофен натриум и концентрациите на активната во подготвените мешавини
а) NIR модел; б) MIR модел

Дополнително, со цел дефинирање на сетот од спектрални податоци (бранови броеви) со најголемо значење за PLS моделите, применет е пристап на анализа на варијаблите со најголемо влијание врз предвидувањето, односно анализа на генерираниот VIP плот (слика 11). Влијанието на варијаблите се проценува во однос на големината на добиената VIP вредност. Варијаблите (брановите броеви) со VIP вредност поголема од 1,0 претставуваат варијабли со најголемо значење во креираниот модел.[52]

а) 

б) 

Слика 11. VIP плот за креираниот PLS;
а) NIR модел; б) MIR модел

За NIR моделот за квантификација најзначајните спектрални региони (слика 11а) кои моделот ги користи за предвидување на содржината на ибупрофен и на ибупрофен натриум се локализирани во подрачјата од 6 100 до 5 600 cm^{-1} (1 639 – 1 786 nm) и од 4 700 до 4 000 cm^{-1} (2128 – 2500 nm).[53] Во согласност со VIP плот на MIR модел (слика 11б), карбонилниот и карбоксилните модови (1 709 cm^{-1}/ 585 nm, 1 545 cm^{-1}/ 647 nm, 1 404 cm^{-1}/ 712 nm) се издвојуваат како најзначајни. Значајни спектрални региони кои моделот ги користи за квантификација на ибупрофен и на ибупрофен натриум, исто така, се наоѓаат и во подрачјата од 660 до 990 cm^{-1} (10 101 – 15 152 nm) и од 1 180 до 1 300 cm^{-1} (7 692 – 8 475 nm).

1.3.3. Дискусија во однос на скрининг-фазата

Иницијалната скрининг-фаза од истражувањето вклучува потврда на синтезата на ибупрофен натриум при процес на влажна гранулација на ибупрофен во присуство на натриум карбонат и дополнително го потврдува концептот на развој на модели за квантификација со примена на спектроскопија во блиско и во средно инфрацрвено подрачје. Мултиваријантната анализа во комбинација со спектроскопијата во блиско и во средно подрачје се потврдува како корисна алатка за квантитативна анализа на мешавини кои содржат различни концентрации на активни компоненти. Предноста на овие методи е способноста за брза, неинвазивна анализа, со што се овозможува контрола на производствените процеси преку навремени мерења (за време на фазата на производство).

Во рамки на оваа студија се анализирани статистички модели за квантификација развиени со примена на спектралните податоци генерирани со анализа на тернарни стандардни мешавини со различен процентуален удел на компонентите ибупрофен, ибупрофен натриум и натриум карбонат. Спектроскопската анализа вклучува примена на два различни спектрофотометри, Thermo Scientific™ Antaris™ II FT-NIR статичен спектрофотометар и Varian-660 FTIR статичен спектрометар. NIR и MIR моделите се генерирани применувајќи PLS регресиона анализа за предвидување на концентрацијата на активните компоненти во мешавините, и истите покажуваат способност за предвидување со граници на точност од ± 5 % и ± 6 % за NIR и MIR моделот, соодветно.

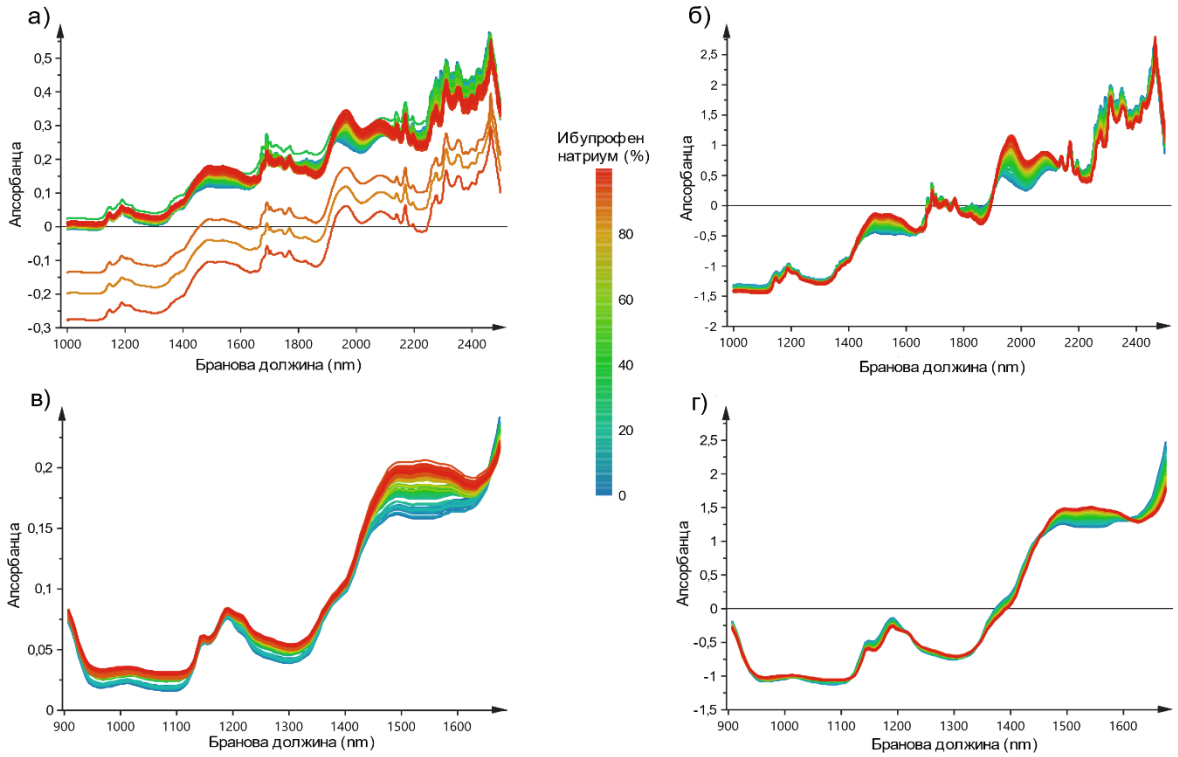
Двете техники, NIR и MIR спектрофотометрија, претставуваат дел од вибрационата спектроскопија чијшто физичко-хемиски метод на анализа се заснова на интеракција на светлосното зрачење во NIR (од 780 nm/12 800 cm^{-1} до 2 500 nm/4 000 cm^{-1}), односно MIR регионот (2 500 nm/4 000 cm^{-1} - 20 000 nm /400 cm^{-1}), со молекулите на примерокот. За разлика од MIR спектроскопијата која е насочена кон анализа на фундаменталните вибрации на молекулите, NIR спектроскопијата ги анализира комбинациите на овие режими на вибрација. NIR анализата често се карактеризира со спектри што не се прецизно дефинирани со пикови кои се слаби и често се препокриваат и NIR спектарот не се

применува за директна екстракција на информацијата од интерес. Во спротивно, при MIR спектроскопија со едноставна анализа на позицијата на пиковите во генерираниот спектар може да се направи идентификација на молекуларните врски присутни во примерокот.[54] Сепак, при квантитативната анализа заснована на изградени хемометриски модели, податоците од двете техники се докажани како соодветни за примена, што е потврдено и во согласност со заклучоците од скрининг-фазата од оваа студија.

Изборот на техниката за анализа се заснова на финалната цел на развојот на моделот и на достапноста на ресурси кои ќе овозможат контрола на процесите во текот на самото производство. Во скрининг-фазата, чијашто цел е потврда на концептот за можноста за квантитативно следење на реакцијата на трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум, се применети статични спектрофотометри за докажување на концептот. Од оваа причина во следната фаза при развојот на моделот за квантификација, кој би се применувал за контрола на процесот на производство на ибупрофен натриум таблети, е вклучена компаративна анализа на статичен со преносен NIR спектрофотометар.

1.3.4. Компарација на ПАТ модели развиени со примена на преносен и на статичен NIR спектрофотометар

Калибрационите спектрални податоци генерирани со примена на двата спектрофотометри (статичен и преносен NIR спектрофотометар) се прикажани на слика 12 (а и в). При развој и на овие модели за квантификација, обработката на спектралните податоци е вклучена со цел минимизирање на непосакуваните вибрации во необработените спектрални сигнали и нивно усогласување на заедничка базна линија преку елиминирање на различните промени во базната линија кои се случуваат како резултат на надворешни влијанија во текот на спектралната анализа, а дополнително подобруваат и робусност на моделите кон неочекувани промени кои се појавуваат при анализа на нови примероци.[55, 56] Споредено со различни техники за обработка, и во оваа фаза од студијата SNV покажува супериорност во корекција на расеаната светлина и во отстранување на варијациите во спектарот кои потекнуваат од физичките карактеристики на примероците за анализа како и од условите на мерење. Спектрите добиени по SNV обработка за двата сета на спектрални податоци се прикажани на слика 12 (б и г).



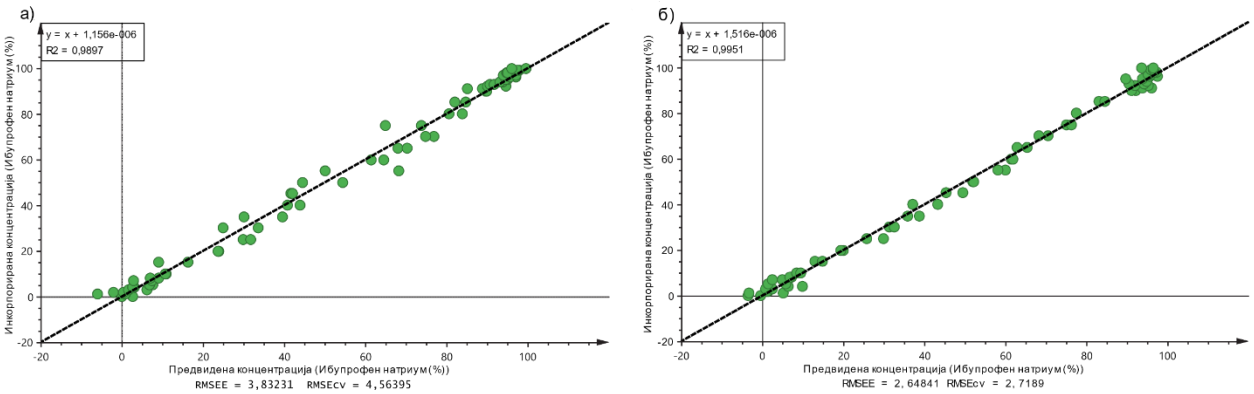
Слика 12. Необработени спектрални податоци генерирани со а) Thermo Scientific™ Antaris™ II FT-NIR и в) MicroNIR 1700 ES спектрофотометри; SNV обработени спектри на мешавини генерирани со б) Thermo Scientific™ Antaris™ II FT-NIR и г) MicroNIR 1700 ES спектрофотометри

PLS калибрационите модели за квантификација на ибупрофен и на ибупрофен натриум се развиени со примена на две латентни варијабли (LVs). Моделите поставуваат корелација помеѓу снимените спектрални податоци (со вклучена SNV обработка) со концентрацијата на активните компоненти за секоја од калибрационите мешавини. Карактеристиките на калибрационио PLS модел се евалуираат преку коефициентот на предвидување (R^2X), коефициентот на детерминација на опсервациите (R^2Y), валидноста на моделот (Q_2) и преку грешките во предвидувањата на моделот (RMSEE, RMSEcv), претставени во табела 9.

Табела 9. Споредба на карактеристиките на двата развиени модели

Инструмент	Статичен FT-NIR	Преносен MicroNIR
Број на латентни варијабли	2	2
R^2Y	0,99	0,99
R^2X	0,95	0,93
Q_2	0,99	0,99
RMSEE	3,83	2,65
RMSEcv	4,56	2,72

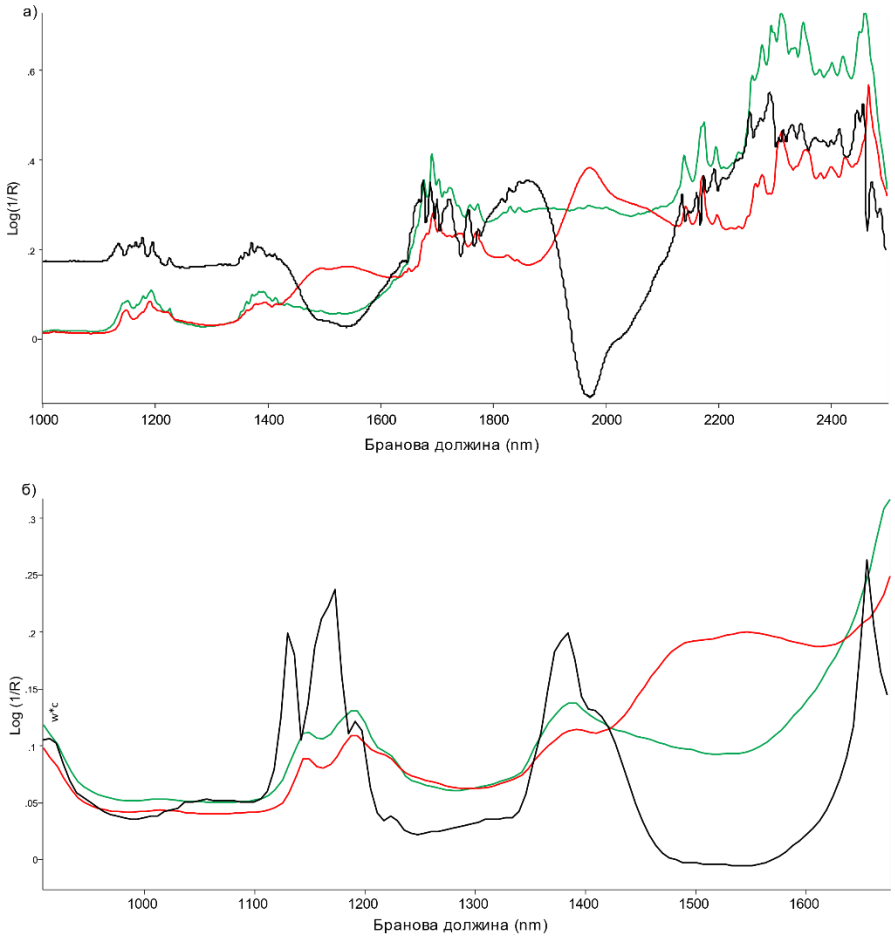
Според PLS статистичките индикатори, двата модели покажуваат способност за објаснување на повеќе од 90 % од варијабилноста во примероците. Добиените вредности за грешките во предвидувањето (RMSEE и RMSEcv) ја потврдуваат прецизноста на моделот во предвидувањето на резултатите. Графиконите на предвидување се прикажани на слика 13.



Слика 13. Графикони на предвидување; а) модел – статичен NIR спектрофотометар; б) модел – преносен NIR спектрофотометар

Иако двата инструменти се разликуваат по ширината на спектралното подрачје за анализа - MicroNIR 950 – 1 650 nm, (10 526 – 6 060 cm^{-1}) и Antaris II FT-NIR 1 000 – 2 500 nm (10 000 – 4 000 cm^{-1}), моделите што се развиени за квантитативна анализа со примена на овие спектрофотометри покажуваат високи корелациски коефициенти и ниска грешка во предвидување (ниски RMSEcv вредности). Овие резултати укажуваат соодветност на двата модели за квантификација на содржината на активните компоненти во текот на процесот. Иако преносниот MicroNIR спектрофотометар се карактеризира со потесно спектрално подрачје на анализа и послаба резолуција во споредба со статичниот FT-NIR спектрофотометар, развиениот модел резултира со помали индекси на грешки во предвидувањето (RMSEE и RMSEcv). Ова, најверојатно, се должи на значајно поголемата површина на анализа при MicroNIR анализа, што исклучува влијание на микро-нехомогеност на примерокот, а дополнително со примената на алгоритмите за обработка на спектралните податоци се компензираат (намалуваат) влијанијата на надворешните фактори од средината врз стабилноста на сигналот.

Графиконот на варијансите од интерес повторно е применет за корелација на регионите значајни за квантификација со структурните карактеристики на молекулите кои се анализираат, во овој случај ибупрофен и ибупрофен натриум. Сегментите на овие графикони со најголема вредност за оската Y укажуваат на значајноста на истите региони за квантификација.[57] При поставување на кривата на варијансите од интерес на заеднички графикон со NIR спектрите на активните супстанции (слика 14) се овозможува идентификација на главните региони од снимените NIR спектри на кои креираниот модел ја заснова предвидувачката анализа. Овие региони корелираат со регионите од NIR спектралното подрачје кои се поврзани со основните карактеристики на молекулата на активните супстанции ибупрофен и ибупрофен натриум.



Слика 14. NIR спектар на ибупрофен (црвен), ибупрофен натриум (зелен) наспрема графиконот на варијаблите од интерес (црн) а) Antaris II FT-NIR; b) MicroNIR 1700 ES

Во согласност со заклучокот и од иницијалната скрининг-фаза, двете активни супстанции имаат слични молекуларни фрагменти што последователно укажува и на спектрални сличности. Спектрите се богати со ленти бидејќи структурите на овие активни компоненти се изведени од бензен со вклучени супституенти кои ја намалуваат вкупната молекуларна симетрија, што овозможува појава на дополнителни вибрациони пикови. Во случај на супституција со алкилни групи поврзани на ароматичниот (бензенски) прстен, лентите од истегнувањето на C-H врските на алкилните групи (метил и метилен) се појавуваат на околу 1190 nm (8403 cm^{-1}) и 1210 nm (8264 cm^{-1}), додека максимумот на вториот овертон на C-H истегнувањето од алкилираните бензени се појавува на околу 1 145 nm (8734 cm^{-1}).[58] Покрај регионот од 1 100 до 1 250 nm (9 090 – 8 000 cm^{-1})[59], интензивни ленти од метилен и метил групите се појавуваат во регионот од 1 350 до 1 420 nm (7 407 – 7 042 cm^{-1}), кои потекнуваат од секундарните C–H комбинации[58] и се појавуваат во NIR спектарот на двете активни компоненти.

Забележлива разлика во NIR спектрите на ибупрофен и на ибупрофен натриум, како што е претставено и во скрининг-фазата, се појавува во подрачјето од 1 430 nm до 1 610 nm (6 993 – 6 211 cm^{-1}), регион кој е карактеристичен за првиот овертон на O–H истегнувачките вибрации[58], поврзани со водородна врска помеѓу атом од бензенскиот прстен и киселинската група, во овој случај интеракција помеѓу натриумовиот јон (Na^+) и

карбоксилната група на молекулата на ибупрофен. Кон повисоките вредности на бранова должина, во регионите 1 688 – 1 870 nm (5 924 – 5 347 cm^{-1}) и 2 240 – 2 440 nm (4 464 – 4 098 cm^{-1}), се појавуваат поголем број ленти. Областа со пониски бранови должини е карактеристична за појава на ленти кои потекнуваат од ОН истегнувањата комбинирани со С=О истегнување (прв овертон на ОН и прв овертон на С-Н), што потекнува и од ОН групата и од CH_3 групата[60,61], додека апсорпциите во регионот од 2 240 до 2 440 nm (4 464 – 4 098 cm^{-1}) припаѓаат на комбинациите на CH_3 и С=О групите (С-Н растегнување и С=О истегнување).[45, 55] Значајна лента кај ибупрофен натриум се појавува во регионот од 1 900 nm до 2 070 nm (5 263 – 4 831 cm^{-1}), што го означува вториот овертон на карбонилното истегнување. Оваа појава е конзистентна со очекуваниот опсег за појава на лента карактеристична за карбонилното врзување, односно регионот од 1 905 nm до 1 923 nm (5 249 – 5 200 cm^{-1}).[62] Сепак, значајно е да се забележи дека овој опсег се преклопува со лента која потекнува од апсорпцијата на молекулата на вода (од 1 887 nm до 2 000 nm (5 300 – 5 000 cm^{-1})), што е карактеристично за структурата во цврстата состојба на молекулата на ибупрофен натриум дихидрат.

Графиконот на варијансите од интерес за моделот развиен со примена на статичниот NIR спектрофотометар укажува на две високо корелирани NIR подрачја, од 1 430 nm (6 993 cm^{-1}) до 1 610 nm (6 211 cm^{-1}) и подрачјето од 1 887 nm (5 300 cm^{-1}) до 2 000 nm (5 000 cm^{-1}), кои се применуваат од моделот при квантификацијата на активните компоненти ибупрофен и ибупрофен натриум.

Како последица на потесното спектрално подрачје за анализа на преносниот MicroNIR 1700 ES спектрофотометар, овој модел иницијално ги заснова предвидувањата на спектралните региони кон помали бранови должини, околу 1 100 – 1 250 nm (9 090 – 8 000 cm^{-1}), 1 430 nm (6 993 cm^{-1}) и 1 610 nm (6 211 cm^{-1}).

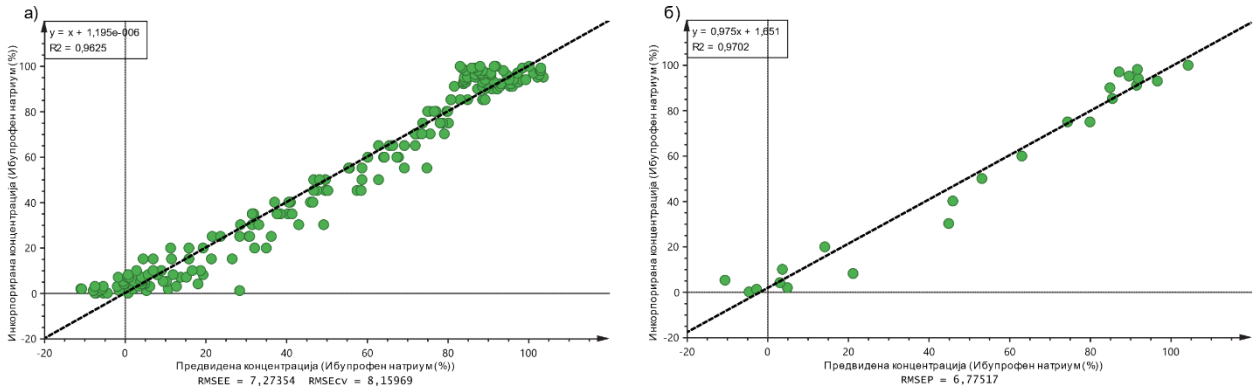
Земајќи ја предвид поедноставната физичка имплементација на преносниот спектрофотометар за мерења во тек на процес и потврдената способност за квантитативно предвидување на PLS моделот развиен со примена на спектрите генерирани со овој спектрофотометар, MicroNIR спектрофотометарот е оценет како соодветен за понатамошна примена како ПАТ алатка за следење на процесот на влажна гранулација.

1.3.5. Модел за интрагрануларна квантификација – развој и валидација на MicroNIR ПАТ метод за квантификација

При развојот на моделот за ин ситу квантификација на ибупрофен и на ибупрофен натриум во текот на процесот на влажна гранулација, применета е регресиона анализа на парцијални најмали квадрати (PLS) за квантификација и истиот е креиран со поставување корелација на SNV обработените NIR спектри во однос на концентрацијата на активната компонента инкорпорирана во секоја од стандардните мешавини соодветно. Целото спектрално подрачје е применето во развојот на моделот.

Валидацијата на моделот[63, 64] вклучува две нивоа: внатрешна валидација, вкрстена валидација со отстранување на еден примерок со тек на време од калибрациониот сет, и надворешна валидација, при која е применет посебен валидационен сет од вкупно 23 независно подготвени примероци за анализа. Со внатрешната валидација се проценува способноста на моделот за предвидување на концентрациите на активните компоненти преку вредноста на коефициентот на стандардна грешка по вкрстена валидација (RMSEcv). Коефициентот на предиктивна грешка (RMSEP) претставува коефициент кој се добива по

надворешната валидација на моделот со независен сет примероци. Развиениот PLS модел (креиран со примена на 2 латентни променливи) се карактеризира со значителна линеарност (R^2X = 0,99, R^2Y = 0,94, Q_2 = 0,94) и прецизност (RMSEE = 7,27, RMSEcv = 8,16, RMSEP = 6,78). Соодветната корелација помеѓу предвидените и внесените вредности (слика 15) на двете активни компоненти ги истакнува робусноста и ефективноста на моделот заснован на MicroNIR податоците како ПАТ алатка за следење на процесот на влажна гранулација.

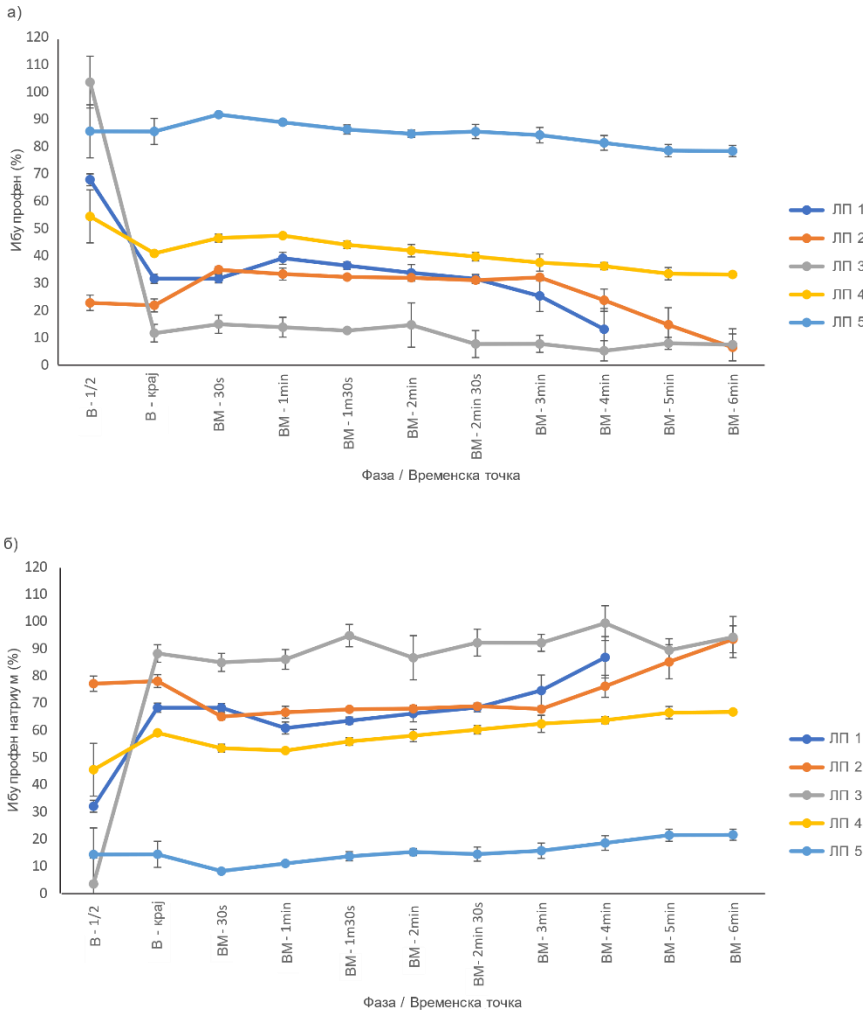


Слика 15. Графикон на инкорпорирани наспрема предвидени концентрации со примена на MicroNIR моделот; а) калибрационен сет; б) валидационен сет.

1.3.6. Ин ситу следење на транзицијата на ибупрофен во лабораториски услови

Примената на развиениот MicroNIR модел е потврдена преку производство и анализа на пет лабораториски проби во чијшто состав се инкорпорирани стандардна концентрација на ибупрофен и варијабилна концентрација на натриум карбонат со цел постигнување различен степен на конверзија на ибупрофен во ибупрофен натриум за време на процесот на влажна гранулација (табела 10). NIR спектралните податоци снимени за време на додавањето на водата за гранулација во два дела и спектрите снимени во текот на процесот на влажна гранулација се применети за тестирање на креираниот модел за квантитативно предвидување и предвидување на резултатите за параметарот содржина на активни компоненти во тек на различни фази од процесот.

Анализата во реално време потврди постепено зголемување на содржината на ибупрофен натриум за време на процесот на влажна гранулација кај лабораториските проби кои содржат доволно количество натриум карбонат, со истовремено намалување на содржината на ибупрофен (слика 16). При изработка на лабораториска проба 3 (ЛП 3) со најголема количина на натриум карбонат (114,18 g), комплетна трансформација се забележува на почетокот на процесот, веднаш по додавањето на количеството вода неопходна за влажната гранулација. Од друга страна, за време на процесот на гранулација на лабораториска проба 5 (ЛП 5), при што е додадено најмало количество на натриум карбонат (7,14 g), се забележува послаба прогресија на конверзијата на ибупрофен во ибупрофен натриум за време на влажното месење, достигнувајќи максимално ниво од 20 % на крајот на процесот (за време од 6 минути).



Слика 16. Содржина на ибупрофен (а) и ибупрофен натриум (б) во тек на процес на влажна гранулација (ЛП – лабораториска проба; В – влажнење; ВМ – влажно месење)

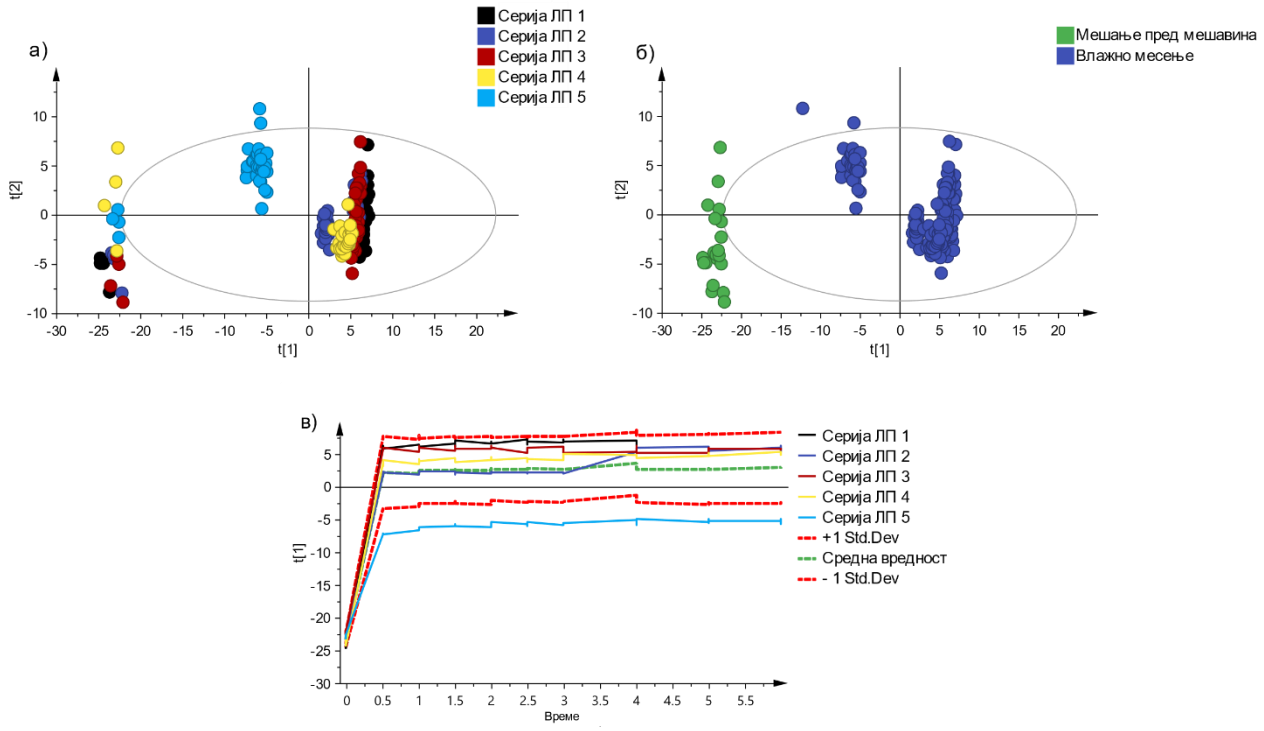
Сумирано, резултатите од анализата на параметарот содржина на активните компоненти во произведените гранули, определена со примена на развиениот PLS модел, покажуваат силна корелација со инкорпорираната количина на натриум карбонат во секоја лабораториска проба.

Табела 10. Количина на ибупрофен и на натриум карбонат во лабораториските проби и PLS предвидените вредности за содржина на активни компоненти на крајот на процесот на влажна гранулација

	ЛП 3	**ЛП 2**	**ЛП 1**	**ЛП 4**	**ЛП 5**	**ЛП 6**
Маса на						
Ибупрофен	111,11 g	111,11 g	111,11 g	111,11 g	111,11 g	111,11 g
Na_2CO_3	114,18 g	57,09 g	38,92 g	28,54 g	7,14 g	0,00 g
Предвидена концентрација на крајот на процесот на гранулација						
Ибупрофен натриум	99,65 %	93,91 %	85,12 %	81,77 %	17,97 %	–0,10 %
Ибупрофен	0,35 %	6,09 %	14,88 %	18,23 %	82,03 %	100,10 %

Со цел да се идентификува однесувањето на NIR спектралните податоци од секоја серија, беше развиен модел за анализа на еволуцијата на сериите (*batch evolution model* (BEM)), каде што добиените NIR спектри (SNV обработени) од секоја серија беа применети како независни променливи, додека временските точки на производниот процес беа поставени како зависни променливи.

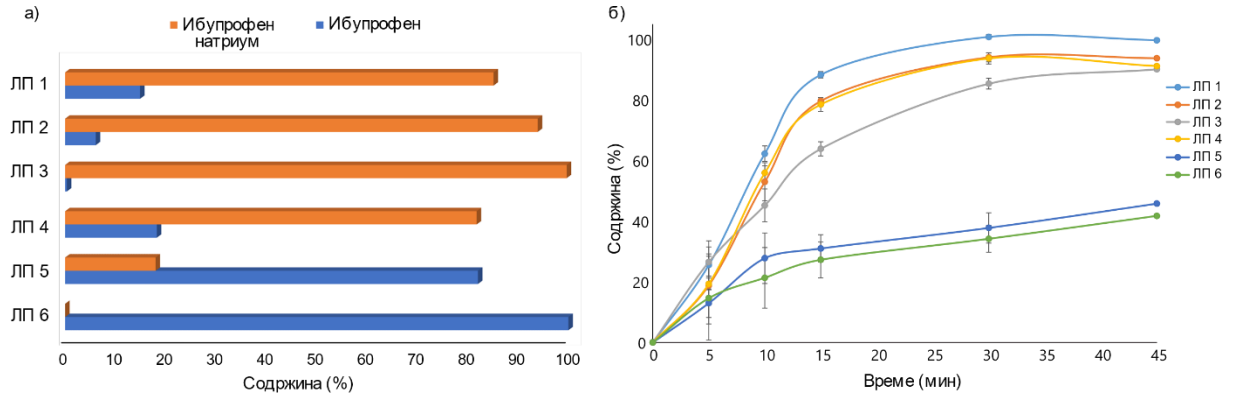
BEM-графиконите на распределба (слика 17а и слика 17б) укажуваат на присуството на два карактеристични процесни индикатори (додавањето вода и трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум), кои, главно, се објаснети со првата компонента на моделот. Како што напредува процесот, индикаторите на првата компонента се зголемуваат сè до постигнување на крајната точка на трансформација на ибупрофенот. Во контролниот дијаграм (слика 17в) линијата на еволуција на ЛП 5 значително отстапува од линиите на останатите лабораториски проби (надвор од границата ± 1 стандардна девијација (SD) од просечната вредност добиена од анализата на сите серии). Тоа се должи само на парцијалната конверзија на ибупрофен постигната за време на производството на ЛП 5, што придонесува за различно својство на NIR еволуцијата на оваа серија.



Слика 17. BEM-анализи: графикони на распределба за првите две компоненти обоени по серија (а) и фаза на производство (б); контролен дијаграм на однесувањето на сериите (в) – зелената линија ја претставува средната вредност за сите серии, додека црвените линии претставуваат ± 1 SD од средната вредност

1.3.7. Анализа на растворливост

Степенот на трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум определен преку квантитативна анализа на крајот на процесот на влажна гранулација со примена на развиениот PLS модел и профилите на растворливост на таблетите од секоја лабораториска проба се прикажани на слика 18а и на слика 18б.



Слика 18. Компаративен приказ на предвидената концентрација на активните компоненти на крајот на процесот на гранулација (а) во однос на профилот на растворливост (б) за секоја лабораториска проба

Профилите на растворливост покажуваат соодветна корелација со NIR предвидените концентрации на ибупрофен натриум, односно пробите со поголема концентрација на ибупрофен натриум покажуваат повисоки стапки на растворање на ибупрофенот. Овие резултати ја потврдуваат соодветноста на развиениот ПАТ модел за следење на процесот на трансформација на ибупрофен во неговата натриумова сол, за определување на крајната точка на реакцијата на трансформација и за постигнување ефективна контрола на процесот на влажна гранулација.

1.3.8. Заклучок од истражување I

Оваа студија открива значајни аспекти за можноста за имплементација на процесната аналитичка технологија (ПАТ) за следење на процесот на влажна гранулација. Компаративната анализа на двата NIR спектрофотометри, статичен и преносен, ја потврдува соодветноста на овие алатки за разбирање и за квантификација на цврстофазната конверзија на ибупрофен во ибупрофен натриум за време на процесот на влажна гранулација. Преносливиот NIR спектрофотометар ја потврди својата применливост за следења во текот на процесот на реакцијата на трансформација и брзо добивање информација за степенот на конверзија на активната компонента. На тој начин NIR алатката овозможува определување на крајната точка на реакцијата на трансформација кога посакуваната концентрација на ибупрофен натриум е постигната.

Како заклучок, развиената ПАТ алатка може да доведе до развој на поедноставен производствен процес на таблети ибупрофен натриум кои имаат подобрена растворливост, преку NIR следење на процесот на трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум за време на процесот на влажна гранулација.

2. ИСТРАЖУВАЊЕ II

Иновативен развој на липидни формулации: Подобрена хомогеност и растворливост на активната компонента овозможено со примена на хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје

2.1. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕ II

Слабата растворливост на лековите претставува значителен предизвик во развојот на фармацевтските дозирани форми особено земајќи го предвид фактот дека околу 40 % од новите лековити супстанции се карактеризираат со лимитирана растворливост што значително може да ја компромитира нивната терапевтска ефикасност.[65-68] Во последните децении сè повеќе се истакнува значајноста на развојот на липидните формулации како резултат на нивниот потенцијал за подобрување на биорасположливоста на активните компоненти со слаба растворливост.[69–71] Липидните формулации влијаат врз апсорпцискиот профил и врз испораката на хидрофобните лековити супстанции, преку флексибилност во солубилизацијата на лекот во липидната матрица со што се постигнува зголемување на растворливоста и олеснување на апсорпцијата од гастроинтестиналниот тракт, што финално резултира со подобрена биорасположливост. Сепак, лимитирачки фактор во примената на липидните формулации претставува нивната мала способност за навлажнување, која влијае врз рестрикцијата на диспергирањето на овие формулации во водена средина, значително влијаејќи врз ослободувањето и врз апсорпцијата на лекот. Хидрофобните својства на липидната матрица имаат значајна улога во регулација на пенетрацијата на водената средина, која последователно влијае врз ослободувањето на лекот од цврстите липидни формулации.

Естрите на полиглицеролот со масни киселини (*polyglycerol fatty acid esters* (PGFAs)) како липидни ексципиенти со голем број различни својства[72] веќе се потврдени ексципиенти со значајна примена во формулацијата на фармацевтските дозирани форми.[73, 74] PGFAs се хидроксиетери на глицеролот, целосно и делумно естерифицирани со масни киселини. Во зависност од бројот на глицеролни единици, делумно естерифицираните PGFAs поседуваат карактеристични својства поради нивната амфифилна природа, која потекнува од комбинацијата на липофилните масни киселини и хидрофилното јадро на полиглицеролот со слободни хидроксилни групи.[72] Овие групи ексципиенти претставуваат мешавина на слични молекули, кои поседуваат специфичен PGFA како основна компонента и мали фракции на полиглицеролни моноестери и на слободни полиглицероли. Односот на помалите фракции може да варира во текот на синтезата со цел приспособување на хидрофилно-липофилниот баланс (HLB) на мешавината. Така, липидните формулации што содржат парцијално естерифицирани PGFAs со приспособени помали фракции поседуваат подобрена способност за навлажнување во споредба со ацилглицеролите. Амфифилните својства на овие ексципиенти ја олеснуваат солубилизацијата на хидрофобните активни супстанции кои припаѓаат на BSC класите II и IV во липидната матрица, истовремено раскинувајќи ги интрамолекуларните водородни врски и на тој начин овозможувајќи слободни места за водородно поврзување, со што се олеснува растворливоста во водена средина. Со цел дополнително подобрување на наквасувањето и на диспергирањето, дополнителни слободни полиглицероли како интризични компоненти може да се инкорпорираат во липидните формулации. Присуството на слободни хидроксилни групи од овие молекули ја менува поларноста на системот и дополнително го подобрува наквасувањето, ефективно влијаејќи на слабата инхерентна дисперзибилност во водена средина на конвенционалните липидни ексципиенти.

Промената на поларноста на липидните системи може да ја подобри молекуларната дисперзија на АПИ и да ја стабилизира аморфната форма на лекот. Постигнувањето униформна аморфна дистрибуција на хидрофобна АПИ значително може да ја подобри нејзината солубилизација и брзината на растворање во споредба со кристалната форма на

лекот која се карактеризира со силни интермолекуларни врски кои ја намалуваат растворливоста.[75]

Обезбедувањето униформна молекуларна дистрибуција на активната компонента во текот на производниот процес е од суштинско значење за одржување на квалитетот и на карактеристиките на развиените формулации. За таа цел се потребни брзи и прецизни аналитички техники за контрола во текот на процесот за овозможување конзистентен квалитет на финалниот производ. Спектроскопијата во блиското инфрацрвено подрачје (NIR) како алатка за брза и недеструктивна анализа наоѓа широка примена при опсервација на различни производни процеси.[76–79] Нејзината примена е докажана како корисна за анализа на различни дозажни форми вклучувајќи липидни наночестички[80], лиофилизирани липозоми[81] и цврсти дисперзии[82]. Сепак, иако NIR обезбедува значителни спектрални информации, недостигот од просторна резолуција ја оневозможува неговата примена за проценка на дистрибуцијата на компонентите во хетерогени примероци.

Хиперспектрален имиџинг (HSI) претставува техника која комбинира спектроскопија со техника за формирање слика и како резултат на тоа нуди значителни предности при примена. Техниката на хиперспектралниот имиџинг во блиска инфрацрвена област (NIR-HSI), спојувајќи ги спектроскопијата во блиското инфрацрвено подрачје со хиперспектрален имиџинг, ги надминува ограничувањата на стандардната NIR анализа. Комбинирањето спектрални и просторни податоци со NIR-HSI овозможува генерирање детална хемиска мапа за распределбата на активната компонента на површината од примерокот.[83] Тоа овозможува сеопфатно истражување на концентрацијата на хемиските компоненти и нивната просторна распределба во примероците. Во согласност со тоа, NIR-HSI претставува моќна алатка за визуализација на хетерогеноста на комплексни формулации, овозможувајќи оптимизација на формулацијата и контрола на производствениот процес. Воедно, како брза и недеструктивна техника овозможува анализа во текот на процесот на производство на фармацевтски дозирани форми.

Во истражувањето II од оваа докторска дисертација е опфатен развојот на липидна формулација и ова истражување се фокусира на определување на оптималниот сооднос на естрите на полиглицерол со масни киселини (PGFAs), слободни полиглицероли (PGs) и активната компонента фелодипин во насока на обезбедување молекуларна дисперзија и униформност на лекот во финалната формулација. Иновативна примена на хиперспектрален имиџинг во блиско инфрацрвено подрачје (NIR-HSI) како директна алатка за контрола во текот на процесот на хомогената дисперзија на АПИ во липидната матрица. Критичните процесни параметри што влијаат врз квалитетот на производот се оптимизирани и верифицирани со примена на развиен и валидиран NIR-HSI метод за квантификација и анализа на униформната дистрибуција на активната компонента во формулацијата.

Иницијалната скрининг-фаза како почетна фаза на истражувањето е насочена кон развој на липидна формулација со надминување на потенцијалот за раслојување, што претставува најчеста форма на нестабилност кај липидните формулации која влијае не само врз визуелниот изглед, туку и врз терапевтската ефикасност на лекот.[84] Интензивна предформулациска фаза е неопходна за идентификација на оптималниот квалитативен и квантитативен состав и за идентификација на производствениот процес кои имаат влијание врз стабилноста на финалната формулација.

За таа цел, во скрининг-фазата од ова истражување:

- Определена е иницијалната стабилност на бинарни формулации на тетраглицерол парцијално естерифициран со палмитинска и стеаринска киселина (LipoGalen® 1684) и неколку различни концентрациски нивоа на слободен ди-, три-, тетра- и хексаглицерол;
- Потврдена е стабилноста по две недели на подготвените бинарни формулации чувани на забрзани услови на чување (40 °C/75 % RH);
- По потврда на најстабилната бинарна формулација, определена е максималната концентрација на слободен полиглицерол која резултира со стабилен липиден систем кога активната компонента фелодипин е вклучена во формулацијата.

Со потврда на стабилноста на скрининг-формулациите на фелодипин е потврдена и финалната липидна формулација. Во следната фаза истражувањето е насочено кон:

- Идентификација на влијанието на составот на формулацијата и на процесните параметри врз карактеристиките на финалната формулација;
- Развој и валидација на NIR-HSI метод за квантификација и анализа на униформната дистрибуција на активната компонента во формулацијата;
- Примена на валидираниот NIR-HSI метод за анализа на липидните формулации на фелодипин добиени со варирање на квалитативниот состав и процесните параметри на производство со што се овозможува детекција на критичните фактори што влијаат на обезбедувањето униформна дистрибуција на активната компонента фелодипин во липидната формулација.

2.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ

2.2.1. Материјали и методи применети во истражување II

2.2.1.1. Материјали

Име	*Производител*
Тетраглицерол парцијално естерифициран со палмитинска и стеаринска киселина (LipoGalen® 1684)	IOI Oleo GmbH, Witten, Германија
Полиглицероли (диглицерол, триглицерол, тетраглицерол, хексаглицерол)	IOI Oleo GmbH, Witten, Германија
Фелодипин	AstraZeneca, Göthenburg, Шведска
Тетрахидрофуран	Fisher scientific, Loughborough, Англија
Диметилсулфоксид	Supelco Merck KgaA, Darmstadt, Германија
2-пропанол	VWR International S.A.S., Rosny-sous-Bois, Франција
Монобазичен содиум фосфат	VWR International byba, Leuven, Белгија
Дибазичен содиум фосфат	Honeywell, Seelze, Германија
Натриум лаурил сулфат	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Германија

2.2.1.2. Опрема применета при експерименталната работа

Опрема	*Производител*
Електронска вага	Sartorius ED224S Extend Analytical Balance, Sartorius AG, Germany; 4200g x 0.01g
Електронска вага	Sartorius™ Secura™ Analytical Balance, Sartorius AG, Germany; 220g x 0.01g
Поларизирачки светлосен микроскоп	Senterra (Bruker GmbH, Германија)
Систем за оптичка кохерентна томографија	Ganymede Spectral Domain (GAN621) OCT систем (Thorlabs, Newton, NJ, САД)
Магнетна мешалка	
Мелница за уситнување на ниска температура	Retsch CryoMill (Retsch GmbH, Germany)
Диференцијално скенирачка калориметрија	DSC 204 F1 Phoenix system, NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Германија
SWAXD-камера	Hecus S3-Micropix, Graz, Австрија
Ласерски дифрактометар	HELOS Laser Diffractometer, Sympatec GmbH, Германија
Апарат за определување брзина на ослободување на активната супстанција	Agilent dissolution apparatus 708-DS with an automated sampling station 850-DS, Agilent Technologies, USA
Мембрански филтри 0,22 μm	Ministar RC25, Sartorius, Germany
Хиперспектрален имиџинг во блиска инфрацрвена област (NIR-HIS)	EVK HELIOS EC32 push-broom hyperspectral imaging camera (EVK DI Kerschhaggl GmbH, Austria)
Високоефикасна течна хроматографија (HPLC)	High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) Acquity H-Class (Waters Corporation, САД)

2.2.1.3. Методи

2.2.1.3.1. Избор на составните компоненти за развој на липидна формулација

Скрининг-фазата за избор на квантитативниот состав на липидната формулација е насочена кон идентификација на појава на фазна сепарација кога LipoGalen®1684 се меша со слободни полиглицероли, како диглицерол (PG2), триглицерол (PG3), тетраглицерол (PG4) и хексаглицерол (PG6). Со примена на пристапот на топење и лиење во силиконски калапи изработени се бинарни формулации на LipoGalen®1684 и различни концентрации на слободни полиглицероли (табела 11). Изработката на овие формулации вклучува топење на температура од 85 °C до целосно втечнување, потоа мешање со магнетна мешалка во период од 2 минути пред лиење на формулациите во загреани (85 °C) силиконски калапи. Вака подготвените примероци се чувани 2 недели во услови на забрзана стабилност (40 °C/75 % RH) со цел идентификација на потенцијално површинско раслојување. Направена е компаративна макроскопска анализа на бинарните формулации непосредно по нивната изработка, како и по две недели стабилност на забрзани услови.

Табела 11. Состав на подготвените бинарни формулации од скрининг-фазата

LipoGalen®1684 +	**Концентрација на полиглицеролите**						
PG2	2,5 %	5 %	10 %	15 %	/	/	/
PG3	2,5 %	/	10 %	15 %	20 %	25 %	/
PG4	2,5 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %
PG6	2,5 %	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %

Во насока на определување на стабилноста на формулациите со активна компонента фелодипин, повторно со примена на пристапот на топење и на лиење во силиконски калапи, изработени се различни формулации (табела 12) со претходно селектирани компоненти на липидната матрица и со 10 % фелодипин. Составните компоненти се втечнети со мешање во период од 30 минути на температура од 95 °C, по што следува лиење на стопената маса од секоја формулација во загреани (95 °C) силиконски калапи.

Табела 12. Состав на липидната матрица на скрининг-формулациите со фелодипин

Експеримент	**Состав на липидната матрица**	
	PG6	**LipoGalen®1684**
P1	25 %	75 %
P2	15 %	85 %
P3	10 %	90 %
P4	0 %	100 %

Со цел детекција на потенцијалот за фазна сепарација, сите примероци се чувани 2 недели во услови на забрзана стабилност (40 °C/75 % RH). Визуализација на површината на примероците, како пристап за детекција на фазна сепарација, е овозможена со примена на поларизирачки светлосен микроскоп и со систем за оптичка кохерентна томографија (OCT).

2.2.1.3.2. Поларизирачки светлосен микроскоп

Поларизирачки светлосен микроскоп Senterra (Bruker GmbH, Германија) опремен со Lumenera Infinity 1-2CB 2 Megapixel CMOS дигитална камера (Teledyne Lumenera, ON,

Канада) е применет за визуелна анализа на површината од интерес на примероците. Дводимензионални микрографии со поларизирана светлина беа направени при зголемување од 4 пати. Примероците беа поставени на стаклена предметна плоча за време на снимањето. За визуализација и за обработка на сликите беше применет софтвер Infinity Analyze (Teledyne Lumenera, ON, Канада).

2.2.1.3.3. Оптичка кохерентна томографија (OCT)

Дводимензионални томограми со примена на оптичка кохерентна томографија беа добиени со Ganymede Spectral Domain (GAN621) OCT систем (Thorlabs, Newton, NJ, САД). OCT претставува недеструктивна и брза техника за снимање која нуди микрометриска резолуција за структурна анализа на регионите под површината на примероците. Голем број студии ја потврдуваат OCT техниката како значајна алатка за анализа на фармацевтските дозирани форми во различни апликации.[85-88] Овој систем применува централна бранова должина од 900 nm, со аксијална резолуција од 3 μm (во воздух) и со длабочина на снимање од 1,9 nm (во воздух). Во текот на анализата, подготвените примероци беа поставени на прецизна позиционирачка платформа (OCT-XYR1(/M)), обезбедувајќи оптимална и репродуктивна томографска аквизиција. Сите томограми беа снимени со релативно ниска стапка на скенирање од 50 kHz, при што беше применет пристап на A-скенирачко добивање на среден податок со цел подобрување на односот сигнал-шум. Сите OCT податоци се добиени со примена на ThorImage софтвер, верзија 5.4.1.

2.2.1.3.4. Определување на теоретската растворливост на фелодипин во липидниот систем со примена на диференцијална скенирачка калориметрија (DSC)

Со цел определување на растворливоста на фелодипин во претходно избраната липидна матрица, која се состои од LipoGalen®1684 и од 10 % $PG6_{w/w}$, беше применета DSC анализа (DSC 204 F1 Phoenix, NETZSCH GmbH, Германија). За анализа беа подготвени примероци што содржат концентрација од 10 %, 25 %, 50 % и од 75 % фелодипин во липидната база и 100 % фелодипин. Приближно 10 mg од секој примерок е измерен во перфорирани алуминиумски садови. Мерењата се изведуваат со загревање во опсег од 20 до 160 °C со брзина на загревање од 2 K/min, во интерна атмосфера на азот со проток од 50 mL/min. Дополнително, во мерењата се вклучени и повторени мерења од секој примерок. За анализата на добиениот термограм е применет NETZSCH Proteus® 80 софтвер, верзија 8.0.1. Поставена е корелација помеѓу добиените вредности за енталпијата на фузија (ΔHf) наспрема концентрацијата на фелодипин во секоја од формулациите и со екстраполација на корелациската линија до ΔHf = 0 се определува максималната растворливост на лекот во липидниот систем.[89, 90, 91]

2.2.1.3.5. Подготовка на липидни формулации на фелодипин

Со примена на пристапот на топење и на лиење се изработени 6 различни липидни формулации на фелодипин, со примена на различна температура и различно време на мешање со цел анализа на влијанието на променетите процесни параметри врз хомогеноста на примероците, анализа на карактеристиките во цврста состојба на липидот и на активната компонента, проучување на интеракциите што се случуваат помеѓу нив, како и на промените во молекуларната структура настанати под влијание на различните услови на производство. Во табела 13 се прикажани деталниот состав и производствените параметри за секоја од формулациите.

Табела 13. Состав и параметри на подготовка на липидните формулации на фелодипин

Експеримент	Состав	Температура на мешање	Време на мешање
E1	10 % Фелодипин + 90 % Липиди (10 % PG6 + 90 % LipoGalen®1684)	95 °C	60 min
E2	10 % Фелодипин + 90 % Липиди (10 % PG6 + 90 % LipoGalen®1684)	50 – 60 °C	60 min
E3	10 % Фелодипин + 90 % LipoGalen®1684 (0 % PG6)	95 °C	60 min
E4	10 % Фелодипин + 90 % LipoGalen®1684 (0 % PG6)	50 – 60 °C	60 min
E5	10 % Фелодипин + 90 % Липиди (10 % PG6 + 90 % LipoGalen®1684)	50 – 60 °C	15 min
E6	10 % Felodipine + 90 % LipoGalen®1684 (0 % PG6)	50 – 60 °C	15 min

Униформноста на содржината на активната компонента фелодипин во произведените липидни формулации е анализирана со NIR-HSI метод. Потоа, подготвените примероци се уситнети со примена на метод за уситнување на ниска температура (*cryomilling*) со цел добивање прашеста форма од секоја формулација за понатамошна карактеризација. Уситнувањето на ниска температура е изведено со примена на Retsch CryoMill (Retsch GmbH, Германија) опремен со 5 mL сад за уситнување и 7 mm топче за уситнување. Процесот е започнат со фаза на ладење во времетраење од 5 минути со цел постигнување оптимална температура на уситнување. По ладење на примерокот се применети 3 интервали на мелење во времетраење на секој интервал од 1 минута со интензитет од 25 Hz. Повторно ладење во времетраење од 30 секунди е вклучено помеѓу секој интервал на уситнување. Добиениот прашок по уситнување беше просеан низ сито со големина на пори од 250 μm со цел да се добијат униформни честички од секоја формулација соодветни за последователна анализа на термалното однесување и на однесувањето во цврста состојба со примена на DSC, дифракција на рендгенски зраци под мали и големи агли (SWAXD), анализа на дистрибуцијата по големина на честичките и тест на растворливост, кои се опишани во продолжение.

2.2.1.3.6. Анализа на липидни формулации на фелодипин

2.2.1.3.6.1 Диференцијална скенирачка калориметрија (DSC)

Термалното однесување на формулациите беше евалуирано со примена на DSC 204 F1 Phoenix систем (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Германија). Секоја формулација е анализирана со трикратно повторување на постапката на вагање на примерок од 5 mg од добиениот прашок од секоја формулација и последователно херметичко затворање во алуминиумски сад за мерење. DSC анализата вклучува температурно модулирана (TM) и динамичка термичка програма, составена од два циклуси на загревање до 180 °C со брзина на загревање од 2 K/min и температурни осцилации од ± 0,2 °C секои 40 секунди за време на модулираните циклуси на загревање. Помеѓу циклусите на загревање и ладење беше вклучено изотермално задржување од 3 минути на 180 °C. Пред вториот циклус на загревање, примерокот беше динамички изладен до температура од -20 °C и брзина од 2 K/min. Во текот на анализата беше одржуван константен проток на азот во количина од 50 mL/min. Анализата на термограмите беше направена со примена на Netzsch Proteus софтвер, верзија 8.0.3 (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Германија).

2.2.1.3.6.2 Дифракција на рендгенски зраци под мали и под големи агли (SWAXD)

Истовремена анализа со дифракција на рендгенски зраци под мали и под големи агли (SWAXD) беше направена со примена на лабораториска SWAXD камера (Hecus S3-Micropix, Graz, Австрија) со висок флукс и со систем за испорака на микрозрак кој работи со моќност од 50 W (50 kV и 1 mA). Применети се X-зраци со должина од 1,542 Å, а SAXD и WAXD спектрите беа снимени со два независни 1Д детектори (PSD-50, Hecus X-ray Systems, Graz, Австрија) во аголен опсег од $0{,}06° < 2\Theta < 8°$ SAXS и $17° < 2\Theta < 27°$ WAXS. Прашестиот примерок од секоја од формулациите добиен по уситнување на ниска температура и по просејување е поставен директно во делот за поставување примерок. Трипликатни мерења се спроведени на собна температура преку изложување на примерокот во период од 1 200 секунди на X-зраци со дијаметар од 200 μm. Дифракциското однесување беше анализирано со примена на Гаусова функција со стандардно приспособување на парцијални најмали квадрати во Origin Pro софтвер (OriginLab, Northampton, MA, САД).

2.2.1.3.6.3 Дистрибуција по големина на честичките

По уситнување на ниска температура и по просејување, дистрибуцијата по големина на добиените честички од секоја формулација беше анализирана со примена на HELOS Laser Diffractometer (Sympatec GmbH, Германија). Секоја формулација беше анализирана во трипликат на големина на примерок од 1 грам со примена на ќелиска комора за влажно мерење и вода како диспергирачки медиум. Беше поставена магнетна мешалка во киветата со вода, која ротираше со брзина од 1 000 rpm. Кумулативната дистрибуција на честичките по големина (PSD) беше определена со примена на Sympatec Windows софтвер (Sympatec GmbH, Германија), а вредностите среден волуменски дијаметар (VMD) d10, d50, d90 и ширината на дистрибуцијата на честичките по големина (SPAN вредност) беа применети во компаративна анализа на примероците.

2.2.1.3.6.4 Определување на ин витро брзината на растворливост и анализа на кинетиката на ослободување на лекот

Растворливоста на активната компонента фелодипин од липидните формулации (E1 - E4) и растворливоста на цврстата форма на самата активна компонента беа анализирани со примена на медиум за растворање составен од pH 6.5 фосфатен пуфер и 1 % натриум лаурил сулфат (SLS). Agilent 708-DS беше применет како апарат за определување на брзината на ослободување на активната супстанција, опремен со 850-DS автоматска единица за земање на примерок (Agilent Technologies, САД). Соодветна количина на примерок од секоја формулација, еквивалентна на 10 mg фелодипин, беше наполнета во хидроксипропил метилцелулозни (HPMC VCaps®) капсули со големина 00 (Lonza Group AG, Basel, Switzerland). Капсулите од секоја формулација беа додадени во држач за капсули при спроведувањето на тестирањето на брзината на растворање, а тестот беше спроведен со примена на брзина на ротирање на веслото од 50 rpm. Количината на растворен фелодипин на 0,5 часа, 0,75 часа, 1 час, 2 часа, 6 часа и 10 часа е определена со примена на 6 капсули од секоја формулација. Ултраефикасна течна хроматографија (UPLC) Acquity H-Class (Waters Corporation, САД) е применета за анализа, а податоците се добиени со примена на Empower® 3 софтвер (Waters Corporation, САД). Методот за квантификација на фелодипин во текот на тестирањето на растворливоста е детално опишан во претходно истражување.[92]

Кинетиката на ослободување на лекот од секоја од формулациите беше анализирана со примена на DDSolver софтвер (додаток за Microsoft® Excel™ , Microsoft Cooperation, Redmond, Washington, САД).[93] Основните модели на ослободување на лековите, како кинетика од нулти ред, кинетика од прв ред, Хигучев и Корсмајер-Пепасов моделите[94–96], се применети во анализата. Коефициентот на детерминација (R^2) беше применет како мерка за проценка на усогласеноста на ослободувањето на фелодипин од липидните формулации со наведените кинетики на ослободување. Целосните податоци од тестирањето на брзината на ослободување се применети во анализата на кинетиката на ослободување, освен за Корсмајер-Пепасов модел, во кој, во согласност со препораките за моделот, при анализата се потребни податоците до 60 % од ослободување на лекот.[95-99]

2.2.1.3.7. Развој и валидација на NIR-HSI калибрационен модел за анализа на содржината на фелодипин во липидни формулации

2.2.2.1.3.7.1 Калибрациони примероци

Калибрационио сет на примероци беше составен од активната компонента фелодипин во концентрационен ранг од 0 до 14 % (со 2 % зголемувачки интервал) молекуларно диспергиран во липиден систем изграден од 10 % PG6 и 90 % LipoGalen®1684. Примероците се подготвени со топење на сите компоненти на температура од 95 °C со постојано мешање со магнетна мешалка. Времето на мешање е приспособено во согласност со концентрацијата на фелодипин во примероците, односно со зголемување на концентрацијата на фелодипин се зголемува и потребното време на мешање (табела 14) за добивање комплетна молекуларна дисперзија на активната компонента во липидната матрица. Комплетна солубилизација е неопходна за добивање хомогени примероци како дел од калибрационио сет за развој на моделите за квантификација. По топење и мешање, следува фаза на лиење на секој од примероците во силиконски калапи со цел добивање кружни таблети со дијаметар 33 mm, висина 5 mm и средна маса од 4,5 g. Примероците се подготвени како трипликати.

Табела 14. Време на мешање во тек на подготовка на NIR-HSI калибрационио сет на примероци

Концентрација на фелодипин	Време на мешање
0 %	10 минути
2 %	10 минути
4 %	15 минути
6 %	20 минути
8 %	25 минути
10 %	60 минути
12 %	75 минути
14 %	90 минути

2.2.2.1.3.7.2 NIR-HSI имициng и развој на моделот за квантификација

Хиперспектралните податоци на примероците се добиени со примена на EVK HELIOS EC32 камера за хиперспектрален имициng со „pushbroom“ техника (EVK DI Kerschhaggl GmbH, Австрија). Спектрите во блиско инфрацрвено подрачје се добиени со мерење со рефлексија во спектрален регион од 992 nm до 1 677 nm поделено во 274 спектрални канали

со спектрална резолуција од 2,5 nm. Потребната илуминација е постигната со примена на 4 халогени ламби кои испорачуваат вкупна осветленост од 850 W. Стапката на аквизиција на NIR-HSI сензорот беше поставена на 497 fps. Како резултат на тоа што камерата е стационарна, со цел добивање површинска „мапа“ на примероците, примероците се поставени на хоризонтална подвижна подлога. Сликите се снимени со 2,8 апертура на објективот на камерата. Во текот на снимањето, движењето на подлогата беше стандардизирано на 8,6 cm/s за сите експерименти со цел добивање квадратна површина на пикселите. Секој добиен квадратен податок се карактеризираше со димензии од 220 × 312 пиксели со големина на пиксел од 30 μm × 30 μm. Собирањето на податоците, обработката на сликите, анализата на примероците за развојот на моделот, валидацијата на моделот и експерименталната анализа беа спроведени со EVK SQALAR софтвер.

Секој примерок од калибрациониот сет е анализиран во трипликат со анализа на двете површини од примерокот, што резултираше со генерирање на 48 хиперспектрални квадратни податоци како дел од калибрациониот сет на примероци. Секој пиксел од добиените слики претставува индивидуален спектар на дадената локација.[100] Со цел анализа на хиперспектралните податоци, потребна е обработка на добиените мултидимензионални податоци.[101] Во текот на истражувањето е применет модул за корекција на дефектни пиксели и просторна дисторзија[102,103], вграден во самиот сензор. Два методи за обработка на спектралните податоци, нормализација (минимум/максимум) и прв извод, се индивидуално применети на генерираните податоци, а добиените модели се споредени со цел да се избере соодветната постапка на обработка. Бројот на латентни варијабли е оптимизиран врз основа на бројот на податоци објаснети од секоја варијабла со цел обезбедување соодветна способност за предвидување на моделот и задржување на неговата робусност. Карактеристиките на моделите беа евалуирани со примена на коефициентите на предвидување и детерминација (R^2X и R^2Y), грешките во предвидувањето на моделот (RMSEC), калибрациското отстапување (BIAS) и стандардната грешка на калибрација (SEC).

2.2.2.1.3.7.3 Валидација на развиениот NIR-HSI модел

Три независни валидациони примероци кои содржат 10 % фелодипин се подготвени со примена на идентична постапка на подготовка, како и при изработката на калибрациониот сет на примероци. На температура од 95 °C при континуирано мешање во период од 60 минути активната компонента фелодипин е инкорпорирана до комплетна молекуларна дисперзија во липидната матрица составена од 10 % PG6 и 90 % LipoGalen®1684. Секој валидационен примерок е анализиран во трипликат со анализа од двете површини на примерокот со примена на NIR-HSI сензорот. Високоефикасна течна хроматографија (HPLC) беше применета како референтен метод за компарација на определената концентрација на активната компонента во валидационите примероци во однос на концентрацијата предвидена со развиениот NIR-HSI модел.

Подготовката на примероците за HPLC анализа се состои од отстранување на приближно 1 грам од двете површини на валидационите примероци со примена на лабораториски нож. Активната компонента беше екстрахирана од липидниот систем со растворање на формулацијата во тетрахидрофуран (THF) и додавање на диметилсулфоксид (DMSO) за преципитација на липидот. Растворот потоа е разреден до концентрација од 1 mg/1 ml со мешавина 50 : 50 на 2-пропанол и монобазен натриум фосфатен пуферски

раствор. Матичниот раствор беше филтриран низ 0,22 μm најлонски филтер пред HPLC анализата.

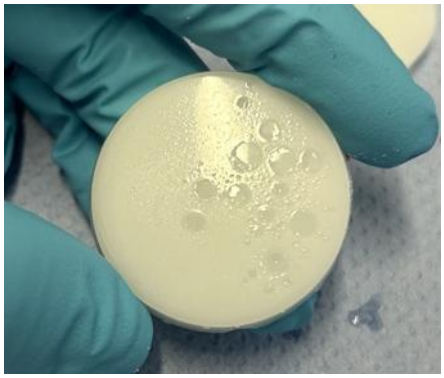
Квантификацијата на фелодипин во согласност со стандардната USP постапка за определување на содржина е направена со примена на системот Agilent 1260 Infinity II LC (Agilent Technologies, California, САД). Волуменот на инјектирање е приспособен на 2 μL, со ултравиолетова детекција на аналитот на 254 nm.

2.3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

2.3.1. Избор на компонентите на липидната формулација

LipoGalen®1684 (со температура на топење од 54,6 °C) беше избран како липиден носач. Овој ацилглицерол формиран со парцијална естерификација на глицеролот со палмитинска и стеаринска масна киселина се карактеризира со зголемена липофилност[104] (HLB = 5,9). Слободните полиглицеролни (PG) молекули се вклучени во развојот на липидната формулација во оваа студија со цел подобрување на поларноста на системот,[105] како резултат на присутните слободни хидроксилни групи кои придонесуваат за зголемување на водородните врзувачки места присутни во формулацијата. Хидроксилните групи формираат водородни врски со водородните акцепторски групи присутни во молекулата на активната компонента.[105] Овие водородни врски се клучни за молекуларната дисперзија на фелодипин во липидната матрица, обезбедувајќи нивна соодветна интеракција. Со подобрување на дисперзибилноста, воедно се овозможува и подобрување на стабилноста на системот и спречување на појавата на фазно раздвојување и рекристализација. Фазното раздвојување е клучен феномен кој се појавува при мешање на компоненти со различна поларност[106] и значително може да влијае врз стабилноста и врз ефикасноста на фармацевтските формулации.

Во оваа студија со примена на макроскопска анализа (слика 19) кај бинарните формулации е идентификувана фазна сепарација при зголемување на концентрацијата (масена) на PG2 и на PG3 над 10 % и над 20 %, соодветно. Притоа, потврдена е максимална концентрација од 25 % на PG4 и на PG6 во системот без фазна сепарација при иницијална анализа. По две недели стабилност на забрзани услови на стареење (40 °C/75 % RH), максималната стабилна концентрација е значително намалена за PG2 и PG3 на 2,5 %. Дополнително, значителна разлика е забележана и за PG4 – 10 %, додека помала разлика е потврдена кај бинарните мешавини со PG6 кои постигнуваат стабилност и со концентрација на слободен полиглицерол од 15 %. Овој дел од предформулацискатa фаза потврдува дека комбинирањето на PG6 и на LipoGalen®1684 формира најстабилна формулација која се карактеризира со отсуство на фазна сепарација на највисока концентрација на слободен полиглицерол во системот. Како резултат на заклучоците од оваа скрининг-фаза, LipoGalen®1684 и PG6 се избрани како компоненти на липидниот систем за понатамошен развој на липидната формулација на фелодипин.

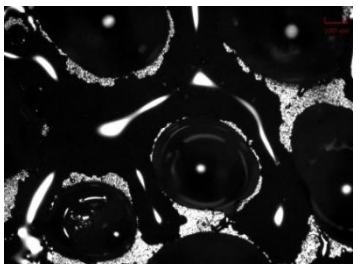
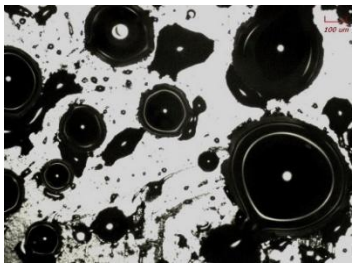
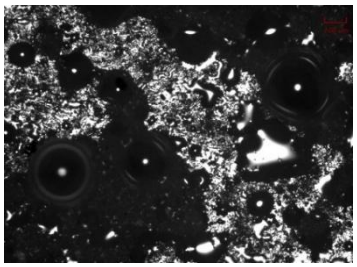
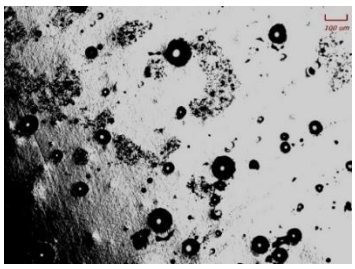
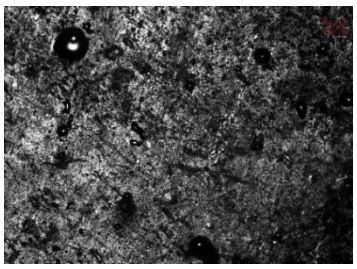
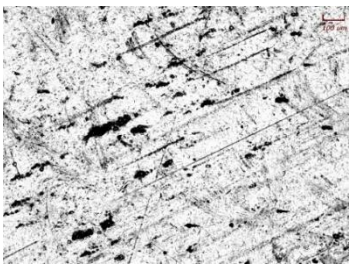
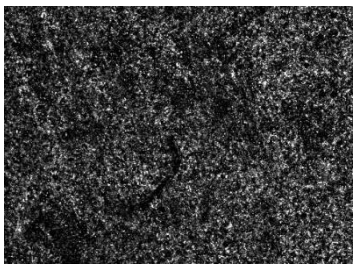


Слика 19. Визуелна опсервација на фазна сепарација со забележување издвоени капки на површината на бинарната липидна формулација

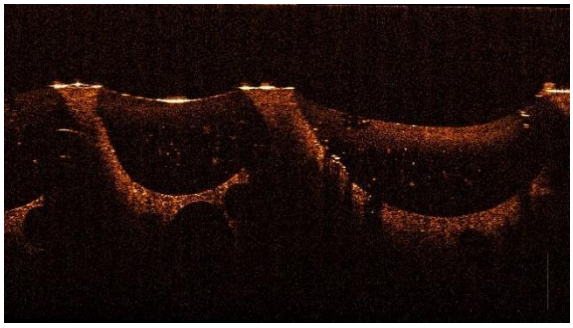
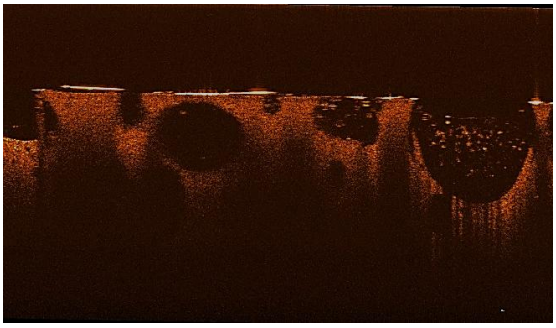
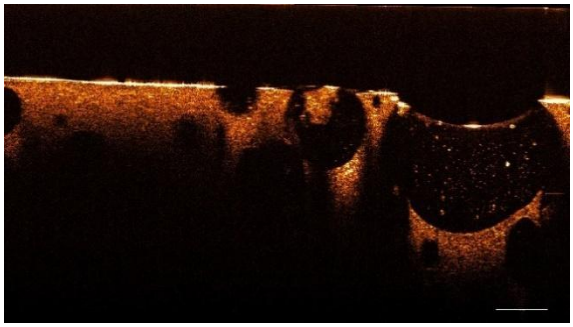
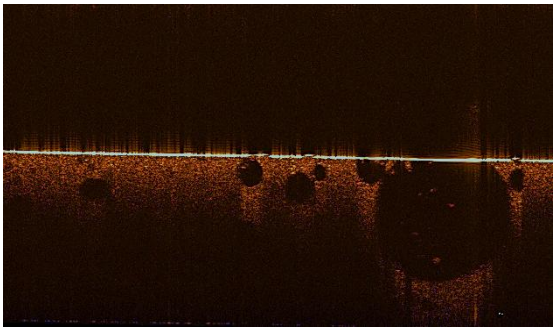
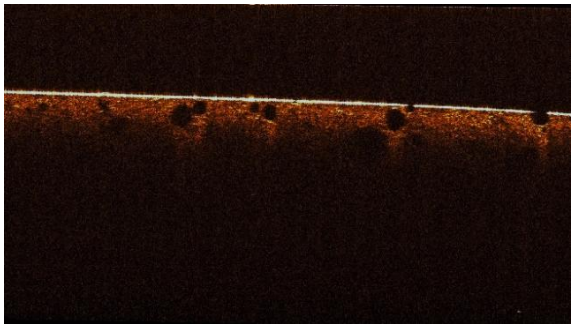
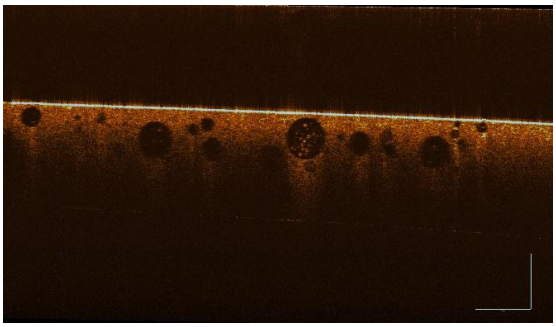
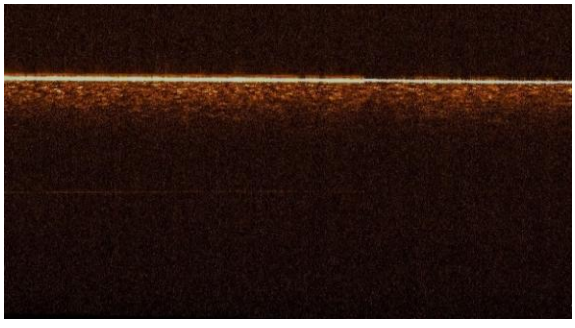
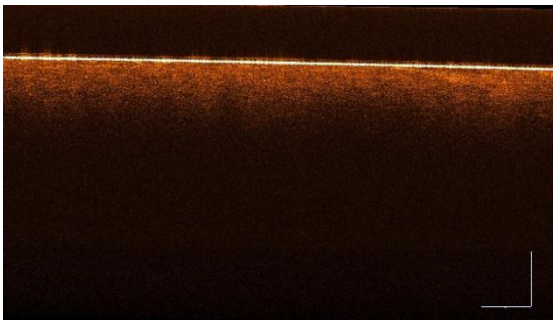
Вклучувањето на фелодипин како хидрофобна активна супстанција[107] ја засилува можноста за фазно разделување поради зголемената концентрација на неполарни групи во

системот. Како последица на тоа настанува лимитирање на максималната концентрација на слободен полиглицерол, која може да биде вклучена во системот без да предизвика фазна сепарација. Идентификација на фазната сепарација на скрининг-примероците со фелодипин и различна концентрација на PG6 е направена со вклучување на PLM анализа и OCT анализа на примероците по подготовка (иницијална анализа) и нивна анализа по две недели стабилност на забрзани услови на стареење (табела 15 и табела 16). Потврдено е раздвојување на PG6 на површината на примероците P1 и P2, кои содржат 25 % и 15 % PG6, соодветно. Од друга страна, формулациите со 10 % PG6 (P3) и без PG6 (P4) се потврдуваат како стабилни иницијално и по две недели чувани на забрзани услови на стареење.

Табела 15. PLM иницијално и анализа по две недели на скрининг-формулациите составени од 10 % фелодипин и 90 % липидна база со варијабилен состав во однос на концентрацијата на инкорпориран PG6

Експеримент	Иницијална анализа	Анализа по 2 недели
P1		
P2		
P3		
P4		

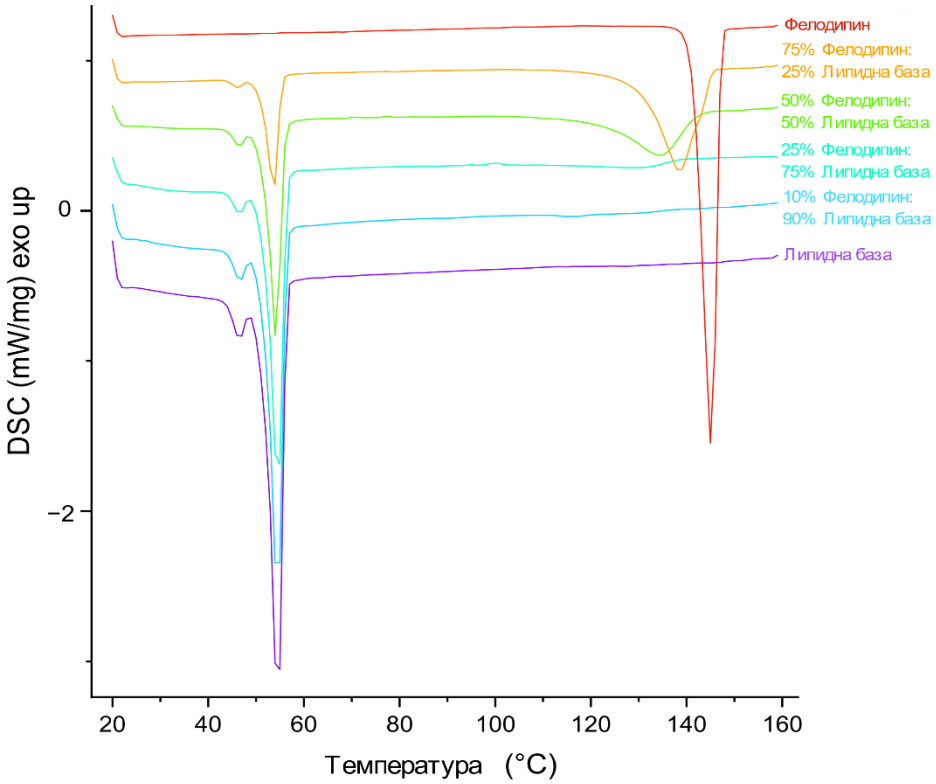
Табела 16. ОСТ иницијално и анализа по две недели на скрининг-формулациите составени од 10 % фелодипин и 90 % липидна база со варијабилен состав во однос на концентрацијата на инкорпориран PG6

Експеримент	Иницијална анализа	Анализа по 2 недели
P1		
P2		
P3		
P4		

Како резултат на потврденото отсуство на фазна сепарација, иницијално и по две недели стабилност на забрзани услови на стареење, липидната база составена од 10% PG6 и 90% LipoGalen®1684 како липидна база (P3) беше избрана како липиден систем за инкорпорирање на фелодипин.

2.3.2. *Растворливост на фелодипин во избраната липидна база определена со DSC*

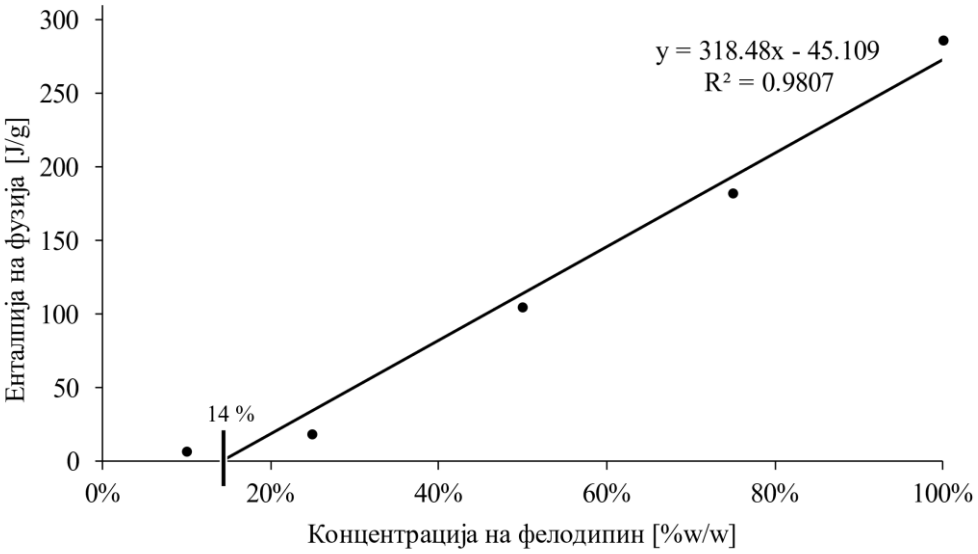
Диференцијално скенирачката калориметрија (DSC) како добро воспоставена аналитичка техника обезбедува вредни информации за термичките својства на супстанциите, овозможувајќи прецизно определување на растворливоста и на способноста за мешање голем број формулации. Примената на DSC за определување на растворливоста е претходно потврдена во голем број студии.[89, 108–111] Преку анализа на однесувањето при топење и при термичките транзиции на компонентите, DSC помага во идентификација на границите на растворливост на супстанциите и нивната компатибилност со липидната матрица.



Слика 20. Податоци од диференцијално скенирачка калориметрија за: фелодипин; формулации со сооднос 75 %, 50 %, 25 %, 10 % фелодипин: липидна матрица; и липидна база без фелодипин (LipoGalen®1684:PG6 (9:1$_{w/w}$))

Анализата на DSC (слика 20) на липидната база идентификува присуство на двофазен систем со два ендотермни пика на топење, помал пик со почеток на појава на 45 °C, заедно со главниот ендотерм на топење со почеток на 52 °C. Првиот пик на топење припаѓа на малите фракции на LipoGalen®1684, додека вториот пик се однесува на главната фракција LipoGalen®1684.[112] Двата ендотермни пика на липидната база се идентификуваат и во експериментите со различни концентрации на фелодипин, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, во липидната матрица. Овие примероци имаат конзистентна базна линија без термални промени при зголемување на температурата. Спротивно на тоа, цврстата форма на активната компонента фелодипин покажува јасно изразен ендотерм на топење кој започнува на 141 °C, со енталпија на топење од 287,65 J/g (вредност која се разликува од претходно определените вредности во литературата[39–41] како резултат на варијации во

условите на мерење). Со зголемување на концентрацијата на фелодипин во липидниот систем, се зголемува и интензитетот на топлинскиот ендотерм, како резултат на намалување на концентрацијата на фелодипин растворен во липидната база. Со поставување корелација на енталпијата на топење (ΔHf) наспрема соодветната концентрација на лекот во примерокот и екстраполација до вредност ΔHf = 0 (слика 21), определена е максималната растворливост на фелодипин во липидната матрица од 14 %. Оваа концентрација е избрана како максимална концентрација на лекот во калибрациониот сет примероци применети при развој на NIR-HSI моделот за квантификација.

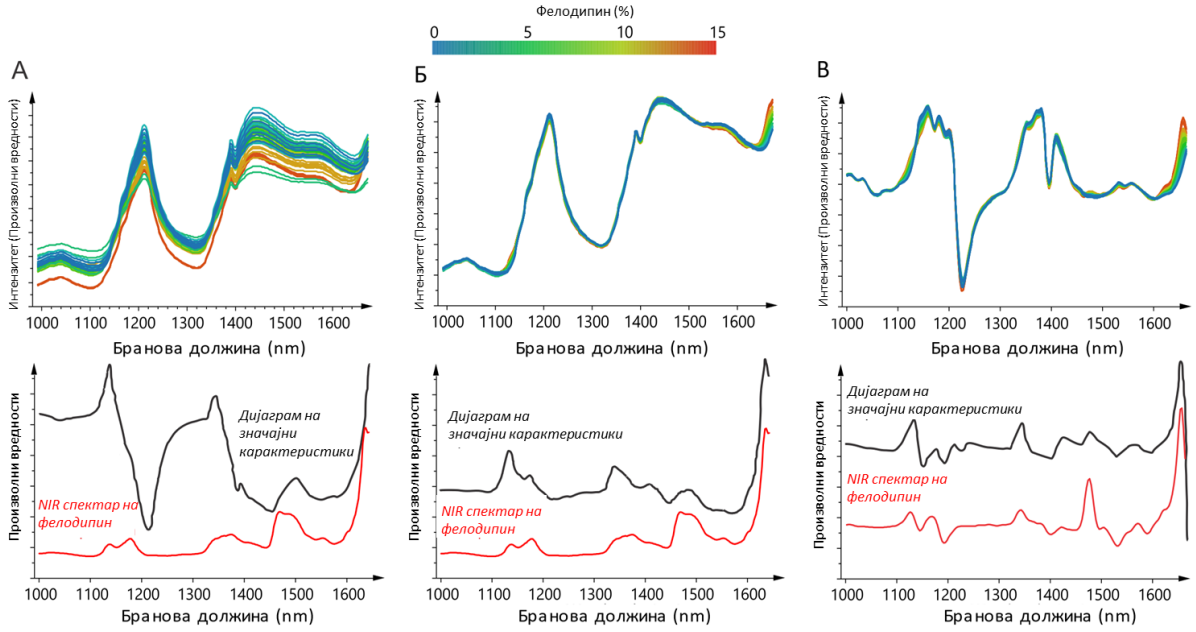


Слика 21. Графикон на енталпијата на топење (ΔHf) во однос на концентрацијата на фелодипин, екстраполирана до вредност ΔHf = 0; максимална растворливост на фелодипин (14 %) во липидниот систем (LipoGalen®1684:PG6 (9:1 w/w))

2.3.3. Развој и валидација на NIR-HSI модел за квантитативна анализа на фелодипин

Калибрациониот сет на податоци составен од 48 индивидуални хиперспектрални податоци од примероците подготвени во концентрациски опсег на фелодипин од 0 до 14 % е применет во развојот на NIR-HSI моделот за квантификација. Селектиран е регион од интерес составен од околу 10 000 пиксели од двете површини на секој примерок и последователно е генериран среден спектар од секој регион. Слика 22а го претставува необработениот калибрационен сет на податоци. Обработка на спектралните податоци најчесто е потребна со цел подобрување на способноста за предвидување на креираниот модел и намалување на поместувањата на базната линија помеѓу генерираните спектрални податоци кои потекнуваат од надворешни фактори, како расејување на светлината, промена во должината на оптичката патека и случаен шум во текот на снимањето.[113] Во текот на студијата примената на мин./макс. нормализација овозможува нормализирање на спектралните податоци преку определување на минималните и на максималните вредности на интензитет во секој спектар. Последователно, спектрите се нормализирани во согласност со определените динамички лимити. Овој пристап ги задржува иницијалните односи помеѓу податоците.[114–117] Слика 22б го претставува калибрациониот сет на податоци по апликација на филтерот за нормализација.

Спектарот на првиот извод најчесто се применува за квантитативен хемиски имиџинг со цел да се илустрира спектралниот наклон (стапката на промена на апсорбанцата со промена на брановата должина) и се изразува во единици на апсорбанца на нанометар во однос на брановата должина.[118] Со примена на прв извод се овозможува отстранување на поместувањата на базната линија и на ефектите на наклонување на спектрите со цел подобрување на идентификацијата на локализираните спектрални карактеристики значајни во квантитативната анализа. Со примена на извод, должината на јадрото (*kernel length* – број на последователни податоци кои се усреднуваат за генерирање на секоја точка од филтрираниот сигнал) од 7 точки е соодветно избрана со цел избегнување прекумерна обработка на спектралните карактеристики.[119] На слика 22в се претставени спектрални податоци добиени по обработка со вклучување на прв извод.



Слика 22. Графикон на NIR-HSI калибрационен сет (горен дел) и дијаграм на значајноста на карактеристиките и соодветниот NIR спектар на фелодипин (долен дел) од: необработените спектрални податоци на моделот (а), спектралните податоци по апликација на филтер за мин./макс. нормализација (б) и податоците обработени со вклучување на прв извод (в)

Во согласност со највисоките пикови на дијаграмот на значајни карактеристики (означен со црна линија на долниот дел од слика 22), регионите 1 120 – 1 140 nm, 1 320 – 1 350 nm и лентата на бранова должина од 1 650 nm покажуваат значителна варијабилност во зависност од концентрацијата на фелодипин во примерокот. Регионот од 1 120 до 1 140 nm го претставува вториот овертон на инфрацрвено активно CH растегнување на бензенскиот прстен присутен во молекулата на фелодипин.[120] Регионот околу 1 300 nm е специфичен за C-H поврзувањата на ароматичните јаглеводороди, додека лентата околу 1 650 nm одговара на првиот овертон на C-H растегнувачки вибрации.[121] Така, дијаграмот на значајни карактеристики ги означува претходно споменатите NIR региони како региони високо корелирани со содржината на фелодипин, издвојувајќи ги како клучни региони за предиктивната анализа на моделите за квантификација.

Компаративната анализа на индикаторите за карактеристиките на моделите укажува на супериорност на моделот за квантификација изграден со примена на прв извод на

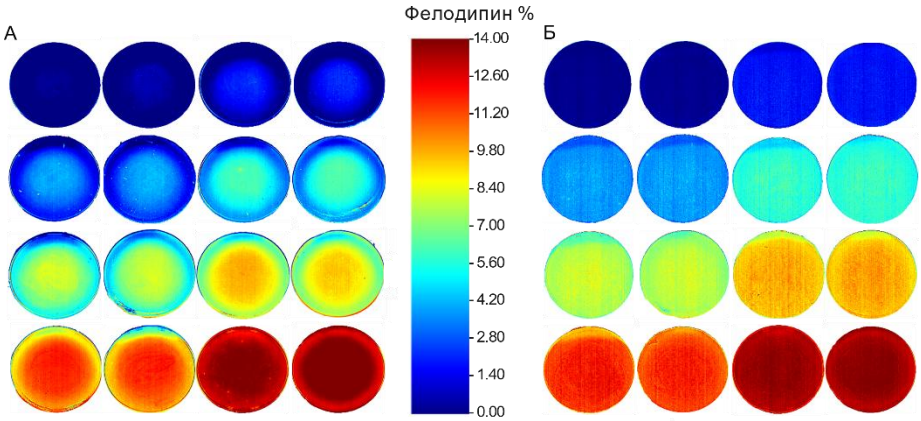
спектралните податоци. Овој модел, во споредба со моделот изграден со примена на нормализираните спектрални податоци, се карактеризира со подобра способност за предвидување и умерено повисоки коефициенти на детерминација (R^2X and R^2Y), а пониски вредности на грешките во предвидувањата (RMSEC and SEC), како што е прикажано во табела 17. Вредноста на R^2 од 0,99 укажува на соодветна предвидувачка моќ, RMSEC од 0,09 ја отсликува високата предиктивна точност, додека нискиот калибрационен BIAS и SEC ја потврдува прецизноста на развиениот модел.

Табела 17. Индикатори на карактеристиките на NIR-HSI калибрационите модели со примена на различни методи на обработка

	Модел 1	**Модел 2**
Статистички индикатори	**Мин./Макс. нормализација**	**Прв извод**
Број на латентни варијабли	**2**	**2**
R^2X	0,99	0,99
R^2Y	0,99	0,99
RMSEC	0,39	0,08
BIAS	0,0002	0,0016
SEC	0,391	0,085

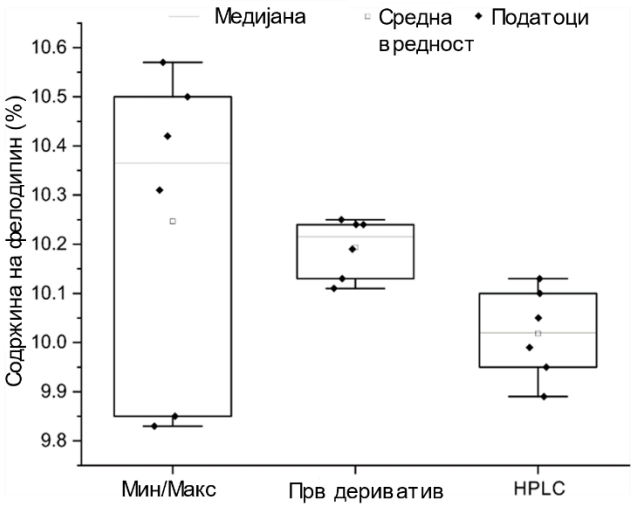
Со претставување на специфичните бранови должини од NIR спектарот како црвен, зелен и син канал (RGB channels), комплексните спектрални податоци може да бидат конвертирани во слики со соодветна боја.[119] Хемиските слики на калибрациониот сет на податоци се претставени на слика 23. Сегментацијата на заднината од секоја слика е постигната со отстранување на шумовите во спектралните сигнали кои се послаби од зададен праг од 800 a.u.

Топлинската мапа во ова студија применува боја за одредување на концентрацијата на фелодипин во примероците. Градиентот од сина кон црвена боја ја претставува дистрибуцијата на активната компонента од 0 до 14 %. Оваа визуализација овозможува полесно разбирање на концентрациската распределба на фелодипин на површината на примероците. Анализирајќи ги сликите на концентрациската распределба генерирани од моделот креиран со примена на прв извод на спектралните податоци (слика 23б), се забележува униформна дистрибуција на обојувањето на секој примерок, што јасно ја потврдува способноста на првиот извод за успешно отстранување на ефектите од расејувањето на светлината. Ова расејување придонесува за појава на спектри со поголем шум како резултат на физичките изобличувања кои потекнуваат од страничното закрвување на рабовите на примероците што, пак, придонесува за издвојување на регионите со различен интензитет на обојување, кои може да се забележат кај сликите на моделот креиран со примена на нормализираните спектрални податоци (слика 23а). Моделот креиран со примена на првиот извод успешно ги ублажува овие деформации, овозможувајќи подобра точност и конзистентност во претставувањето на концентрациите на активните компоненти низ површината на примерокот споредено со моделот на нормализирани спектрални податоци.



Слика 23. Слики на концентрацискатa распределба на фелодипин: споредба на нормализирани (А) во однос на спектрални податоци по интегрирање на првиот извод (Б)

Со цел определување на предиктивната точност на креираните модели, истите беа валидирани со примена на целосно независен сет на надворешни примероци. Предвидените концентрации на фелодипин од двата модели беа споредени со концентрациите одредени со примена на HPLC анализа (слика 24). Истражувањето потврдува дека моделот на податоците со прв извод поседува помала релативна стандардна девијација и овозможува попрецизно определување на концентрацијата на фелодипин со вредности слични на вредностите добиени со HPLC анализа. Со ова беше потврдена супериорноста на моделот креиран со примена на спектралните податоци обработени со прв извод.



Слика 24. Споредба на концентрациите на фелодипин предвидени од NIR-HSI моделите развиени со примена на мин./макс. нормализација и прв извод во однос на резултатите добиени со HPLC определување. За секој метод е претставен интерквартилниот опсег (IQR – 25^{ти} до 75^{ти} процентил), додека баровите на грешка продолжуваат ± 1,5 x IQR

2.3.4. Анализа на лабораториските експерименти

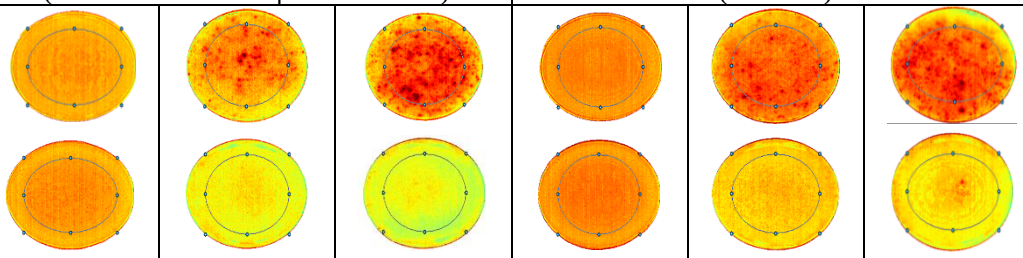
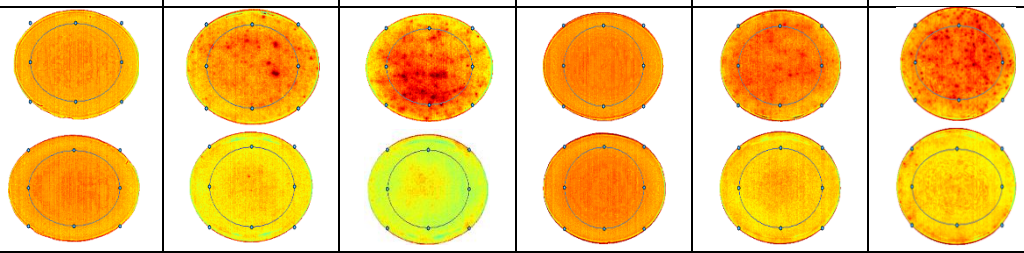
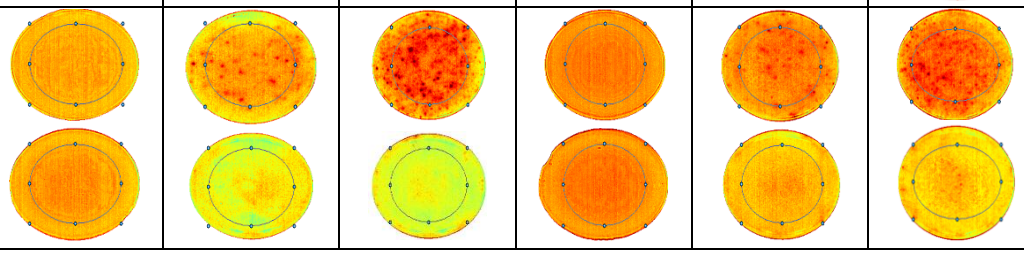
Развиениот NIR-HSI модел за квантификација на фелодипин, развиен со примена на спектралните податоци добиени по обработка со прв извод, е применет за анализа на содржината на активната компонента во различни формулации. Оваа студија вклучува липидни системи на фелодипин составени од 10 % активна супстанција и 90 % липиди (кои

содржат 10 % PG6 и 90 % LipoGalen®1684) и системи изградени од 10 % активна супстанција и 90 % LipoGalen®1684 (без PG6). Примероците се анализирани со примена на развиениот NIR-HSI модел, а во табела 18 се прикажани концентрациски мапираните NIR-HSI податоци на секој примерок претставувајќи ја промената во дистрибуцијата на фелодипин во липидниот систем под влијание на различни експериментални фактори.

Подолго време на мешање, генерално, доведува до униформна дистрибуција на фелодипин, што е евидентно во согласност со обојувањето на хемиските слики на примероците подготвени со време на мешање од 60 минути (E1 и E3) наспрема оние примероци подготвени со време на мешање од 15 минути (E2, E4, E5 и E6). Дополнително значителна разлика на концентрацијата на фелодипин од двете површини на примерокот се забележува кога мешањето при подготовка на примероците се одвива на пониска температура (E5 и E6). При мешање на температура од 95 °C (E1 и E3) се овозможува молекуларна дистрибуција на фелодипин во липидната матрица, во споредба со мешање на температура од 50 до 60 °C. Ова подобрување на молекуларната дистрибуција потекнува од зголемената растворливост на фелодипин со приближување на температурата до неговата точка на топење.

Спротивно на ова, при анализа на примероците подготвени со мешање од 15 минути на 50 – 60 °C се забележуваат локализирани области со зголемена концентрација на фелодипин (интензивно црвено пребојување). Појавата на овие области се должи на недоволно време на мешање за постигнување униформна дистрибуција на фелодипин во липидниот систем, што доведува до концентрирање на активната компонента во одредени сегменти од примероците. Дополнително, релативно ниската температура на мешање (50 – 60 °C) е несоодветна за целосно растворање или диспергирање на фелодипин во липидниот систем, дополнително влијаејќи врз појавата на локализирање на активната компонента во различни зони од примерокот. Во согласност со ова, комбинацијата на пократко време на мешање на пониска температура може да доведе до несоодветно мешање и до локализирани подрачја со зголемена концентрација на фелодипин.

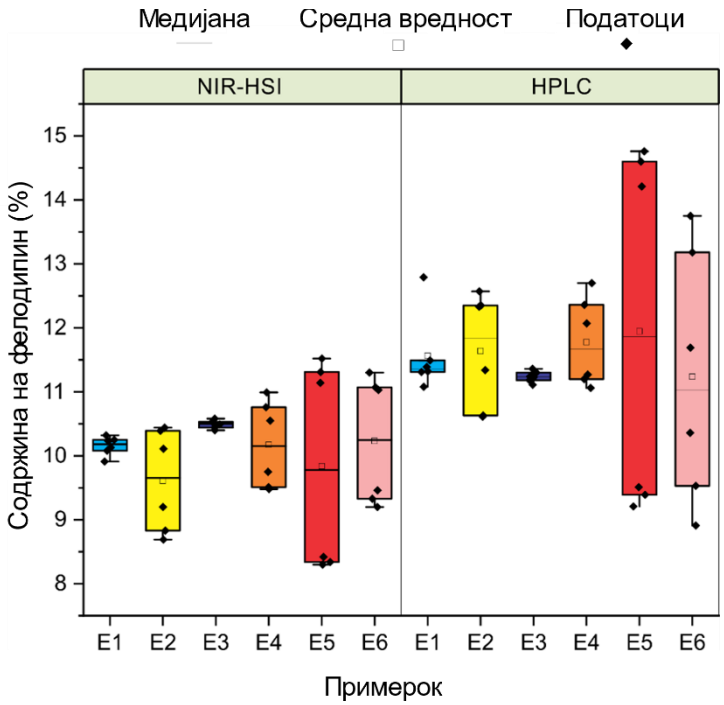
Табела 18. NIR-HSI анализа на дистрибуцијата на фелодипин во липидните системи: експериментални резултати

Експеримент	**E1**	**E2**	**E5**	**E3**	**E4**	**E6**
Време на мешање	60 минути	60 минути	15 минути	60 минути	60 минути	15 минути
Температура на мешање	95 °C	50 – 60 °C	50 – 60 °C	95 °C	50 – 60 °C	50 – 60 °C
Состав	10 % фелодипин + 90 липиди (10 % PG6 + 90 % LipoGalen®1684)			10 % фелодипин + 90 % LipoGalen®1684 (0 % PG6)		
Примерок 1						
Примерок 2						
Примерок 3						

Концентрацијата на фелодипин во експерименталните примероци определена со развиениот NIR-HSI модел е споредена со концентрацијата на фелодипин определена со HPLC анализа (слика 25). Резултатите покажуваат дека содржината на фелодипин варира во зависност од методот на подготовка и во зависност од составот на липидната формулација. При време на мешање од 60 минути на температура од 95 °C, со NIR-HSI моделот се определени средни концентрации на фелодипин од 10,15 % за првата формулација (E1) и 10,49 % за втората формулација (E3), додека HPLC резултатите изнесуваа 11,56 % и 11,24 % за истите примероци, соодветно. Релативната стандардна девијација на NIR-HSI резултатите е значително пониска за температура од 95 °C (1,45 % и 0,61 %) во споредба со пониска температура и пократко време на мешање, при што се забележува зголемување на варијабилноста до 16,58 % за E5 и 9,73 % за E6. Дополнително, значителна разлика во концентрацијата на фелодипин на двете страни од примерокот се забележува кога мешањето е изведено на температура од 50 до 60 °C.

Како заклучок, NIR-HSI резултатите укажуваат на униформна дистрибуција на активната компонента фелодипин во услови на продолжено мешање при повисока температура на мешање (E1 и E3), укажувајќи дека и времето и температурата на мешање

се критични процесни параметри при подготовка на липидните системи кои значително може да влијаат на хомогената дистрибуција на фелодипин во формулациите.

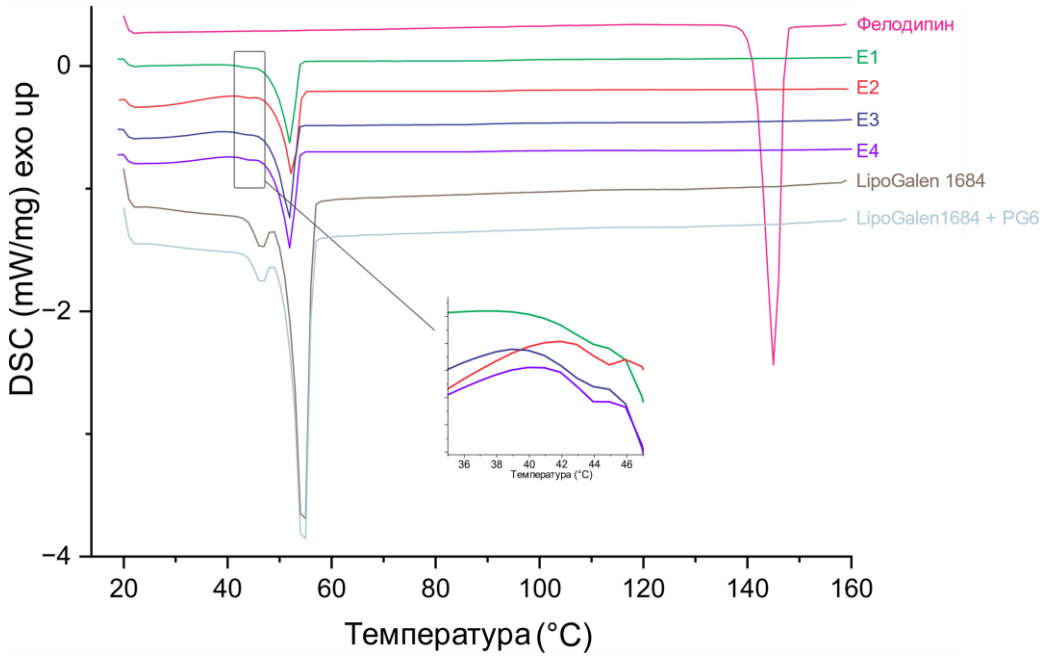


Слика 25. Компаративна NIR-HSI и HPLC анализа на содржината на фелодипин во липидните системи подготвени со примена на различни методи на подготовка (E1-E6). За секоја формулација е претставен интерквартилниот опсег, додека баровите на грешка продолжуваат ± 1,5 x IQR

Како резултат на значителна варијабилност на дистрибуцијата на активната компонента на двете површини од примероците E5 и E6, овие два примероци се исклучени од последователни анализи и единствено примероците од E1 до E4 се земени како релевантни за спроведување на останатите тестирања од ова истражување.

2.3.4.1 Термално однесување и карактеризација во цврста состојба на подготвените липидни системи

DSC термограмот претставен на слика 26 го прикажува термичкото однесување на цврстата форма на активната компонента фелодипин во споредба со различните липидни формулации (E1-E4) и компонентите на липидната база. Како што е и претходно посочено, кај липидните формулации и компонентите на липидната база се забележува двофазен систем со два ендотермни пика на топење. Остар еднотермен пик на топење со почеток на 141 °C се забележува во DSC термограмот на фелодипин кој е јасен индикатор на кристалната структура на активната компонента. Во формулациите E1-E4 не е забележано присуство на овој еднотермен пик на фелодипин. Температурата на застаклување на аморфната форма на фелодипин изнесува 45 °C (претходно потврдена[122]) што не се детектира на добиените термограми (слика 26), најверојатно поради поклопување со пикот на топење на малите фракции на LipoGalen®1684 на истата температура.



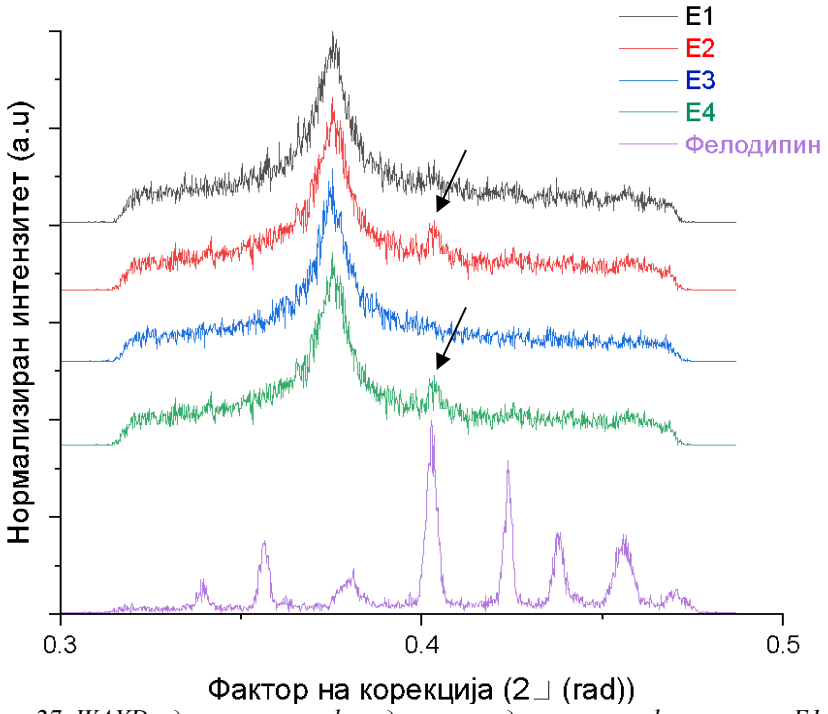
Слика 26. DSC термограм на активната компонента фелодипин, липидните формулации (E1-E4), компонентите на липидната база (LipoGalen 1684 и LipoGalen 1684+PG6). Издвоениот регион околу 50° го отсликува првиот ендотерм на топење на липидните компоненти

Со цел потврда на податоците добиени со DSC анализата, дифракција на рендгенски зраци под мали и под големи агли (SWAXD) е дополнително применета за анализа на подготвените формулации. При анализа со примена на дифракција на рендгенските зраци под големи агли (WAXD) за сите формулации (слика 27) се забележува доминантен пик кој е во согласност со хексагоналниот молекуларен распоред (H, α-форма) на PG4-C16/C18.[72] Овој распоред останува стабилен и при промена на условите на подготовка (варирање на температурата и на времетраењето на процесот на мешање) како и присуството на PG6 во формулацијата, што укажува на отсуство на влијание на овие формулациски и процесни промени врз молекуларната стабилност на липидните формулации. Стабилниот молекуларен распоред на PGFAs е детално опишан во статијата *Novel approach for overcoming the stability challenges of lipid-based excipients. Part 1: Screening of solid-state and physical properties of polyglycerol esters of fatty acids as advanced pharmaceutical excipients* (видете под точка 72 во индексот).

Иако со DSC анализата во генерираните термограми не се потврдува присуство на кристален фелодипин (слика 26), WAXD анализата на формулациите E2 и E4 потврдува дополнителен пик кој е карактеристичен за кристалната форма на фелодипин, што укажува на присуство на резидуална кристална форма на активната супстанција во овие примероци подготвени на температура од 50 до 60 °C. Неусогласеноста на резултатите од двете техники (DSC наспрема WAXD), најверојатно, се должи на лимитираната сензитивност на DSC техниката и на потенцијалните термални ефекти што се случуваат во текот на самата анализа и коишто може да предизвикаат дополнително растворање на резидуалниот кристален фелодипин присутен во формулациите. Дополнително, високата способност за застаклување и стабилната стаклена форма на фелодипин, во согласност со истражувањето на Бирд и др.[123], го спречуваат растот на кристалната форма за време на фазите на ладење и на греење при DSC анализата. Како резултат на тоа, присуството на резидуална кристална

форма не доведува до појава на термален пик, резултирајќи со несоодветно определување на присуството на кристален фелодипин при DSC анализа.

При WAXD анализата на формулациите Е1 и Е3, кои се подготвени на температура на мешање од 95 °C, не се забележуваат дополнителни пикови од кристалната форма на активната супстанција. Овие резултати се во согласност со заклучоците од NIR-HSI анализата за варијабилност во дистрибуцијата на активната компонента во овие формулации, а исто така се и во согласност со претходно потврдени литературни податоци.[124]



Слика 27. WAXD однесување на фелодипин и подготвените формулации Е1-Е4

Во согласност со дифракциското растојание определено со примена на дифракцијата на рендгенски зраци под мали агли (SAXD), се потврдува ламеларната конфигурација на LipoGalen®1684 во сите примероци, врз основа на растојанието на хармоничните пикови во однос на главниот пик. Оваа конфигурација е карактеристична за ацилглицеролите и е претходно потврдена за PFGAs.[72] Ламеларната и кристалната дебелина се пресметани со примена на Бреговиот закон и со Шереровата равенка, како што е опишано во статијата под број 72 во индексот и како што е прикажано во табела 19. Во согласност со прикажаното, не е забележано издолжување на ламелите кај липидните формулации на LipoGalen®1684 по додавање на АПИ и/или на PG6 бидејќи дебелината на ламелите (d) на чистиот липид и подготвените примероци Е1 и Е4 е конзистентна, со вредност околу 6 nm. Тоа укажува на фактот дека ниту фелодипин ниту PG6 не се распоредува во кристалната решетка на липидот. Бројот на ламели во конфигурацијата на липидот и последователната големина на кристалот (D), сепак, се афектирани од температурата на подготовка и од додавањето фелодипин и PG6. Општо е познато дека додадените липофилни адитиви што немаат хемиска сличност со липидот се потенцијални кандидати за одложена нуклеација и за раст на кристалите.[125, 126] Според таа теорија, ако се земат фелодипин и PG6 како адитиви, може да се очекува дека фелодипинот има поголем потенцијал да дејствува како инхибитор на

кристализацијата во споредба со PG6. Намалена кристална големина кај примероците од E1 до E4, во споредба со чистиот липид, најверојатно се должи на присуството на фелодипин. Неговата изразена улога како инхибитор на раст на кристалите на липидот е појасна кога се зема предвид и ефектот на температурата како стрес-фактор.[127] Големините на кристалите во примероците E2 и E4, подготвени на температура од 55 °C, се слични и значително помали од кристалната големина на чистиот липид (15,71 и 15,16 nm за E2 и E4, соодветно, како последица на присуството на две последователни ламели во структурата). Примената на повисока температура на мешање од 95 °C за производство на примероците E1 и E3 резултира со висока стапка на нуклеација и раст на кристалната големина на E1 со разлика од само една ламела во дебелината на кристалот во споредба со чистиот липид (шест последователни ламели што резултираат со кристална големина од 33,91 nm кај E1, наспроти седум ламели кај чистиот липид). За разлика од ова, примерокот E3 подготвен на иста температура, но кој содржи само фелодипин и липид, поседува пониска стапка на нуклеација. Кристалната големина на липидот кај примероците од E1 до E4 е во согласност со стапката на ослободување на фелодипин од липидната матрица.

Табела 19. Средна големина на кристалот, дебелина на ламела и број на ламели, определени со примена на SAXD анализата на експериментите (E1 – E4)

Примерок	**Средна големина на кристалот – D [nm]**	**Дебелина на ламела [nm]**	**Број на ламели**
LipoGalen®1684	43,63 ± 3,29	6,28 ± 0,07	7
E1	33,91 ± 2,9	6,15 ± 0,01	6
E2	15,71 ± 0,22	6,29 ± 0,0	2
E3	7,82 ± 0,28	6,21 ± 0,10	1
E4	15,16 ± 0,42	6,22 ± 0,0	2

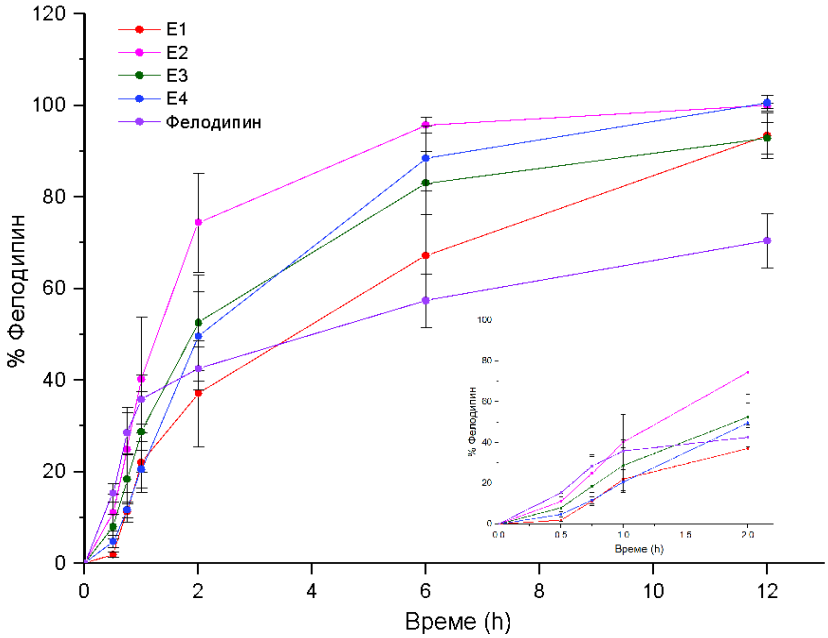
2.3.4.2 Анализа на растворливост

Анализата на растворливост вклучува компаративно тестирање на уситнетите експерименти E1 - E4 и на активната компонента фелодипин, по нивно дозирање во капсули со големина 00. Под исти услови на уситнување на ниска температура, добиениот примерок од секоја формулација покажува тесен ранг на дистрибуција по големина на честичките со вредности за d90 од 140 μm до 191 μm, што овозможува примена на добиените формулации во директна компаративна анализа на карактеристиките на растворливост. Добиените резултати од анализата на дистрибуцијата по големина на честичките се претставени во табела 20.

Табела 20. Компаративна анализа на дистрибуцијата по големина на различните експерименти

Експеримент	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
Број на опсервации		3		
Параметар		Средна вредност		
VMD	89 μm ± 13 μm	82 μm ± 12 μm	75 μm ± 4 μm	80 μm ± 3 μm
d10	7 μm ± 2 μm	6 μm ± 3 μm	10 μm ± 7 μm	7 μm ± 1 μm
d50	74 μm ± 12 μm	69 μm ± 11 μm	68 μm ± 3 μm	57 μm ± 7 μm
d90	191 μm ± 22 μm	179 μm ± 22 μm	140 μm ± 13 μm	190 μm ± 15 μm
SPAN	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.3	3.3 ± 0.8

Профилот на растворливост на чиста активна супстанција фелодипин и формулациите добиени по инкорпорирање на фелодипин во липидната матрица во текот на 12-часовна анализа на ослободувањето се прикажани на слика 28.



Слика 28. Профили на растворливост на фелодипин во pH 6,5 фосфатен пуфер со 1 % SLS: споредба на профилите на растворливост на липидните формулации (E1-E4) и на активната компонента фелодипин; Издвоениот регион го прикажува наклонот на профилот на растворливост на фелодипин во текот на првите два часа од тестирањето

Фелодипин, како припадник на активните компоненти BSC класа II[128] поради неговата хигроскопна природа и ниската способност за влажнење, се карактеризира со ниска водена растворливост (приближно 2 mg/L во pH 6.8 на 37 °C[129, 122]).

Изборот на 10 mg фелодипин, односно количина на примерок еквивалентна со 10 mg фелодипин, се заснова на потребата за потврдување на растворливоста на активната супстанција во синк-услови на растворливост и избор на формулации кои содржат иста количина на активна супстанција како и формулациите со продолжено ослободување кои се достапни на пазарот.

Активната компонента фелодипин покажува постепено зголемување на растворливоста со текот на времето постигнувајќи максимална растворливост од 70 % за период од 10 часа во присуство на SLS. Од друга страна, сите липидни формулации покажаа значително подобрување на растворливоста постигнувајќи од 90 до 100 % растворливост на фелодипин под истите услови во временски период од 12 часа. Во текот на првите два часа на растворливост сите формулации покажуваат значителна линеарност во ослободувањето, проследена со постепено или контролирано ослободување на фелодипин од липидната база. Ова брзо иницијално ослободување на АПИ е карактеристично за матрикс-системи со голема површина која ја олеснува дифузијата на медиумот низ матрицата.[129, 130, 131]

Со цел опишување на кинетиката на ослободување на лекот, кумулативното ослободување на фелодипин во текот на времето беше споредено со неколку кинетички модели на ослободување, како кинетика од нулти и од прв ред, Хигучев модел и Корсмајер-Пепасов модел. Табела 21 ги сумира параметрите на секој од моделите на растворливост заедно со коефициентите на детерминација (R^2) за секој модел.

Табела 21. Параметри на кинетиката на растворливост и коефициентите на детерминација (R^2)

	Zero order		First order		Higuchi model		Korsmeyer-Peppas		
Формулација	k_0	R^2	k_1	R^2	k_H	R^2	k_{KP}	n	R^2
E1	8,77	0,87	0,20	0,99	25,78	0,93	16,70	1,19	0,91
E2	10,69	0,42	0,51	0,97	33,95	0,80	40,43	1,79	1,00
E3	9,49	0,66	0,32	0,99	29,20	0,91	25,14	1,09	0,97
E4	10,06	0,78	0,29	0,98	30,08	0,90	18,50	1,43	0,99
Фелодипин	7,21	0,21	0,19	0,65	23,20	0,79	30,52	0,37	0,89

Кинетиката од прв ред и Корсмајер-Пепасовиот модел покажуваат подобра корелација со сите липидни формулации (E1-E4), споредено со кинетиката од нулти ред и Хигучевиот модел. Експонентот (n) на ослободување од Корсмајер-Пепасовата калкулација ($n > 0.89$) укажува на нефикова дифузија на ослободување. Овие резултати се во согласност со ослободувањето на АПИ од комплексни липидни матрици. Ослободувањето на лекот од формулациите, главно, е управувано од концентрацискиот градиент на брзодостапната АПИ во медиумот и од ерозијата на липидната матрица. Дифузијата на медиумот за растворливост низ липидната матрица и брзината на ерозија се поврзани со степенот на кристализација на липидот, како и со површината и способноста за навлажнување на системот.

WAXD, NIR-HSI и анализите на содржината на примероците покажуваат комплетно усогласување на подобрувањето на растворливоста и на хомогеноста на АПИ во липидната матрица кај формулациите E1 и E3. Иако речиси целосно ослободување на АПИ се постигнува по 12 часа за сите примероци, најрамен наклон на брзината на ослободување се забележува кај примероците од експериментот E1. Оваа појава се поврзува со тоа што кристалот е поголем кај овој експеримент, заедно со солубилизацијата и со хомогената дистрибуција на АПИ во липидната матрица која содржи PG6, што овозможува целосно опкружување на солубилизираната АПИ во липидот. Последица на ова е одложување на дифузијата на медиумот за растворливост во матрицата и посигнување молекуларна дисперзија на АПИ. Овој феномен, исто така, е потврден во други студии.[131] Кај формулацијата E2, која се состои од мешавина на солубилизирана и кристално диспергирана АПИ во липидната матрица со мала големина на кристалот и присутен PG6, се потврдува најбрза стапка на ослободување. Во овој примерок PG6 дејствува како средство за навлажнување и ја забрзува дифузијата на медиумот во липидната матрица со мала големина на кристал. При контакт со дисолуциониот медиум, неуниформно дистрибуираната активна супстанција, кристална дисперзна форма, се ослободува иницијално со растворување, додека фракцијата на лек, која била молекуларно диспергирана во липидната матрица во текот на подготовката, е последователно ослободена од формулацијата по пат на дифузија низ липидната матрица. Брзината на ослободување на фелодипин од примероците E3 и E4 (со мала кристална големина на липидот) е помала во споредба со примерокот E2, што, најверојатно, се должи на присуството на PG6 како средство за влажнење и комплетната солубилизација на АПИ во липидната матрица кога станува збор за примерокот E3.

2.3.5. Заклучок од истражување II

Истражувањето II од оваа докторска дисертација го потврдува концептот на примена на хиперспектрален имиџинг во блиска инфрацрвена микроскопија (NIR-HSI) како алатка за определување на хомогеноста на активната компонента во липидни формулации. Оваа студија потврдува метод кој може да се примени како ПАТ алатка при развој на фармацевтски производи, особено во контрола на конзистентноста на квалитет на липидните системи. Предностите, вклучувајќи ја недеструктивната природа, едноставноста на примена и способноста за добивање брзи резултати и резултати во тек на процес, ја поставуваат NIR-HSI како особено значајна алатка за опсервација и за оптимизација на процесите на производство.

Во оваа студија се постигнува и суштинско разбирање за однесувањето на липидните матрици, за улогата на средствата за навлажнување, за процесните параметри во хомогената дистрибуција на активната компонента во липидната матрица и за карактеризацијата во цврста состојба и на липидот и на АПИ. Ова знаење понатаму може да се примени за развој на липидни формулации, со приспособено ослободување на АПИ преку постигнување цврста дисперзија или промена на степенот на кристализација и навлажнување на системот.

3. ЗАКЛУЧОК

Примената на процесната аналитичка технологија во различни сегменти од производството на конвенционалните фармацевтски дозирани форми овозможува премин од пристап на тестирање на квалитетот на производите кон пристап на вградување на квалитетот во текот на производството. Со воспоставувањето на основата за разбирање на процесите на производство, примената на ПАТ алатките при постојана процесна контрола особено придонесува за производство на производи со подобар и контролиран квалитет.

Интегрирајќи ги сознанијата за потенцијалот на примената на спектроскопските алатки и значењето на брзиот и недеструктивен тип на анализа кој го овозможуваат во следењето на производствените процеси, во овој докторски труд детално се прикажани развојот и примената на ПАТ алатките за опсервација во реално време и за контрола на критичните атрибути на квалитет во критичните процеси на производство.

Во согласност со зададените цели во оваа докторска дисертација:

- ✓ Во истражувањето I е опишана и потврдена трансформацијата на активната компонента ибупрофен за време на процесот на производство како процес кој е особено критичен не само за квалитетот на производот, туку и за безбедноста и за ефикасноста на самиот лек. Со развојот на соодветна NIR спектроскопска техника во рамки на оваа докторска дисертација, процесот на трансформација на ибупрофен во ибупрофен натриум се овозможува да биде насочен и контролиран со цел постигнување финален производ со посакувани карактеристики. Развиената ПАТ алатка со примена на спектроскопија во блиско инфрацрвено подрачје овозможува следење на фазата на трансформација на активната компонента ибупрофен во негова сол во текот на фазата на влажна гранулација. Имено, ибупрофен во присуство на натриум карбонат и вода, во зависност од условите на работа, постепено се конвертира во натриумова сол – ибупрофен натриум. Посочената трансформација е од позитивен карактер, односно со добивање натриумова сол на ибупрофен се овозможува подобрување на растворливоста, а со тоа и на биорасположливоста на лекот. Степенот на трансформација, во согласност со потврденото, е зависен и од количеството натриум карбонат присутно во средината во текот на процесот на влажна гранулација. Развиената алатка овозможува определување на потребното количество и на потребното време неопходни за целосна конверзија на ибупрофен во ибупрофен натриум.

- ✓ Истражувањето II е насочено кон најчестиот предизвик со кој се соочува фармацевтската индустрија, односно процесот на обезбедување хомогеност на финалниот производ преку контрола на процесите на производство и преку дефинирање на критичните процесни параметри кои покажуваат директно влијание врз хомогеноста. Овој предизвик особено се потенцира кај липидните формулации чиешто производството вклучува инкорпорирање на активната компонента во липиден носач за што е потребно дефинирање соодветен процес на производство кој би обезбедил соодветен квалитет на финалниот производ. Со цел да се потврди потенцијалот за примена на ПАТ алатките во следење на процесите на производство на липидни формулации, избрана е активна компонента фелодипин, блокатор на калциум каналите, со особено значење во третман на хипертензија. Хиперспектралниот имиџинг во блиска инфрацрвена област (NIR-HSI) се потврдува како техника за визуализација на површината на липидната таблета со што се овозможува локализација на региони со неуниформна дистрибуција/распределба на активната компонента. Со комбинирањето

спектрални и просторни информации, развиениот NIR-HSI метод во оваа фаза овозможува подетална анализа со визуализација на примерокот и со соодветна квантификација на содржината на активната компонента фелодипин.

Дополнително, во оваа фаза е опишан и процесот на развој на липидна формулација која како основна компонента во својата структура содржи LipoGalen®1684 (ацилглицерол формиран со парцијална естерификација на тетраглицерол со палмитинска и стеаринска масна киселина), како и потребата и значајноста на додавањето слободен хексаглицерол (PG6) во формулацијата во насока на подобрување на наквасувањето и хомогената дистрибуција на активната компонента во липидната матрица. Определувањето на максималната концентрација на овој слободен хексаглицерол е значајно од аспект на задржување на позитивното влијание на неговото присуство во формулацијата, притоа елиминирајќи го ризикот од генерирање нестабилна формулација. Во рамки на оваа студија е потврдено дека присуство на 10 % PG6 со LipoGalen®1684 и 10 % фелодипин резултира со генерирање стабилна формулација. За фазата на развој и оптимизација на формулацијата и на производствениот процес е применета развиената и потврдена NIR-HSI алатка.

Профилите на растворување на изработените липидни формулации ја потврдуваат предноста на формулацијата составена од LipoGalen®1684 и од PG6 во постигнувањето подобрување на солубилизацијата со 90 – 100 % растворливост на фелодипин во компарација со цврстата форма на активната компонента која покажува максимална растворливост од 70 % во истите услови.

Ова истражување ја потврдува применливоста на липидните формулации во подобрување на растворливоста на хидрофобните активни супстанции и дополнително го потврдува потенцијалот за примена на NIR-HSI како робусна алатка на анализата во тек на процес (ПАТ алатка) на униформната дистрибуција на активната компонента при различни услови на производство, со цел постигнување конзистентен квалитет на липидните формулации

Истражувањата од оваа докторска дисертација придонесуваат за продлабочување на сознанијата за примена на спектроскопските техники во развојот на алатки за континуирано следење на процесите на производство на фармацевтски дозирани форми.

4. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1 FDA, *Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, manufacturing, and Quality Assurance*, 2004, Accessed: 16-Apr-2025. [Online]. Available: http://www.fda.gov/cvm/guidance/published.html.

2 Step, *Committee for Human Medicinal Products ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development*, 2017, Accessed: 16-Apr-2025. [Online]. Available: www.ema.europa.eu/contact.

3 Bakeev, K. A. *Process analytical technology: spectroscopic tools and implementation strategies for the chemical and pharmaceutical industries*: 2010, p. 557

4 Chanda, A. *et al*. *Industry perspectives on process analytical technology: Tools and applications in API development*, *Org. Process Res. Dev.*, vol. 19, no. 1, pp. 63–83, Jan. 2015, doi: 10.1021/OP400358B/ASSET/IMAGES/LARGE/OP-2013-00358B_0029.JPEG.

5 Schlindwein W. S. and Gibson M., *Pharmaceutical quality by design : a practical approach*, 2018, Accessed: 26-Jun-2025. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Pharmaceutical_Quality_by_Design.html?id=uqVFDwAAQBAJ.

6 Korasa K. and Vrečer F., *Overview of PAT process analysers applicable in monitoring of film coating unit operations for manufacturing of solid oral dosage forms*, Eur. J. Pharm. Sci., vol. 111, pp. 278–292, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.EJPS.2017.10.010.

7 Ng L. M. and Simmons R., *Infrared spectroscopy*, Anal. Chem., vol. 71, no. 12, Jun. 1999, doi: 10.1021/A1999908R,.

8 Charles E. Miller and Benoît Igne, *Chapter 15: Preprocessing Methods in NIR Spectroscopy*. CRC Press, 2021.

9 Stuart B. H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Infrared Spectrosc. Fundam. Appl., pp. 1–224, Jul. 2005, doi: 10.1002/0470011149.

10 Mohamed M. A., Jaafar J., Ismail A. F., Othman M. H. D., and Rahman M. A., *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*, Membr. Charact., pp. 3–29, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2.

11 Gaffney J. S., Marley N. A., and Jones D. E., *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy*, *Charact. Mater.*, pp. 1–33, Oct. 2012, doi: 10.1002/0471266965.COM107.PUB2.

12 Anjos V., *Near And Mid Infrared Spectroscopy To Assess Milk Products Quality: A Review Of Recent Applications*, J. Dairy Res. Technol., vol. 3, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2020, doi: 10.24966/DRT-9315/100014.

13 Emil W. Ciurczak, Benoît Igne, Jerome Workman, and Donald A. Burns, *Handbook of Near-Infrared Analysis*. CRC Press, 2007.

14 Manley M., *Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials*, Chem. Soc. Rev., vol. 43, no. 24, pp. 8200–8214, Dec. 2014, doi: 10.1039/C4CS00062E.

15 Gautam R., Vanga S., Ariese F., and Umapathy S., *Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy*, EPJ Tech. Instrum. 2015 21, vol. 2, no. 1, pp. 1–38, Jun. 2015, doi: 10.1140/EPJTI/S40485-015-0018-6.

16 Martens H., Tormod N. *Multivariate calibration*, Data Handl. Sci. Technol., vol. 20, no. PART 2, pp. 349–381, Jan. 1998, doi: 10.1016/S0922-3487(98)80046-4.

17 Wold S., Esbensen K., and Geladi P., *Principal component analysis*, Chemom. Intell. Lab. Syst., vol. 2, no. 1–3, pp. 37–52, 1987, doi: 10.1016/0169-7439(87)80084-9.

18 Wold S., Sjöström M., and Eriksson L., *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*, Chemom. Intell. Lab. Syst., vol. 58, no. 2, pp. 109–130, Oct. 2001, doi: 10.1016/S0169-7439(01)00155-1.

19 Mishra P., Biancolillo A., Roger J. M., Marini F., and Rutledge D. N., *New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques*, TrAC Trends Anal. Chem., vol. 132, p. 116045, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.TRAC.2020.116045.

20 Roger J. M., Boulet J. C., Zeaiter M., and Rutledge D. N., *Pre-processing Methods*, Compr. Chemom. Chem. Biochem. Data Anal. Second Ed. Four Vol. Set, vol. 3, pp. 1–75, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14878-4.

21 Wienke D. et al., *Comparison of an adaptive resonance theory based neural network (ART-2a) against other classifiers for rapid sorting of post consumer plastics by remote near-infrared spectroscopic sensing using an InGaAs diode array*, Anal. Chim. Acta, vol. 317, no. 1–3, pp. 1–16, Dec. 1995, doi: 10.1016/0003-2670(95)00406-8.

22 Blanco M. and Villarroya I., *NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool*, TrAC Trends Anal. Chem., vol. 21, no. 4, pp. 240–250, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00404-1.

23 Rinnan Å., Van den Berg F., and Engelsen S. B., *Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra*, TrAC Trends Anal. Chem., vol. 28, no. 10, pp. 1201–1222, Nov. 2009, doi: 10.1016/J.TRAC.2009.07.007.

24 Barnes R. J., Dhanoa M. S., and Lister S. J., *Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra*, Appl. Spectrosc., vol. 43, no. 5, pp. 772–777, 1989, doi: 10.1366/0003702894202201;JOURNAL:JOURNAL:ASPC;CTYPE:STRING:JOURNAL.

25 Zhang Z. M., Chen S., and Liang Y. Z., *Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares*, Analyst, vol. 135, no. 5, pp. 1138–1146, 2010, doi: 10.1039/B922045C.

26 Peng J., Peng S., Jiang A., Wei J., Li C., and Tan J., *Asymmetric least squares for multiple spectra baseline correction*, Anal. Chim. Acta, vol. 683, no. 1, pp. 63–68, Dec. 2010, doi: 10.1016/J.ACA.2010.08.033.

27 Zhang Z. M. et al., *An intelligent background-correction algorithm for highly fluorescent samples in Raman spectroscopy*, J. Raman Spectrosc., vol. 41, no. 6, pp. 659–669, Jun. 2010, doi: 10.1002/JRS.2500.

28 Tomasi G., Van Den Berg F., and Andersson C., *Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data*,"J. Chemom., vol. 18, no. 5, pp. 231–241, May 2004, doi: 10.1002/CEM.859;WEBSITE:WEBSITE:ANALYTICALSCIENCEJOURNALS;JOURNAL:JOURNAL:1099128X;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

29 Wold S., Antti H., Lindgren F., and Öhman J., *Orthogonal signal correction of near-infrared spectra*, Chemom. Intell. Lab. Syst., vol. 44, no. 1–2, pp. 175–185, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0169-7439(98)00109-9.

30 Zhang C., Zhou L., Zhao Y., Zhu S., Liu F., and He Y., *oise reduction in the spectral domain of hyperspectral images using denoising autoencoder methods*, Chemom. Intell. Lab. Syst., vol. 203, p. 104063, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.CHEMOLAB.2020.104063.

31 Massart D. L., *Chemometrics : a textbook*, p. 488, 1988, Accessed: 27-Jun-2025. [Online]. Available: https://books.google.com/books/about/Chemometrics.html?id=G8JMac7OCtAC.

32 Álvarez C., Núñez I., Torrado J. J., Gordon J., Potthast H., and García-Arieta A., *Investigation on the possibility of biowaivers for ibuprofen*, J. Pharm. Sci., vol. 100, no. 6, pp. 2343–2349, Jun. 2011, doi: 10.1002/jps.22472.

33 Gruber P., *Solubilized ibuprofen EP patent 2 559 430 A1*, Bull. , 2013.

34 Kumar Giri T., Badwaik H., Alexander A., and Tripathi D. K, *Solubility enhancement of ibuprofen in the presence of hydrophilic polymer and surfactant*, International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology , 2010. https://www.mendeley.com/reference-manager/library/all-references (accessed Feb. 25, 2025).

35 Dewland P. M., Reader S., and Berry P., *Bioavailability of ibuprofen following oral administration of standard ibuprofen, sodium ibuprofen or ibuprofen acid incorporating poloxamer in healthy volunteers*, BMC Clin. Pharmacol., vol. 9, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2009, doi: 10.1186/1472-6904-9-19/TABLES/3.

36 Mehlisch D. R., Ardia A., and Pallotta T., *A Controlled Comparative Study of Ibuprofen Arginate versus Conventional Ibuprofen in the Treatment of Postoperative Dental Pain*, J. Clin. Pharmacol., vol. 42, no. 8, pp. 904–911, Aug. 2002, doi: 10.1177/009127002401102821.

37 Black P., Max M. B., Desjardins P., Norwood T., Ardia A., and Pallotta T., *A randomized, double-blind, placebo-controlled comparison of the analgesic efficacy, onset of action, and tolerability of ibuprofen arginate and ibuprofen in postoperative dental pain*, Clin. Ther., vol. 24, no. 7, pp. 1072–1089, Jul. 2002, doi: 10.1016/S0149-2918(02)80020-0.

38 Deidda R. et al., *Vibrational spectroscopy in analysis of pharmaceuticals: Critical review of innovative portable and handheld NIR and Raman spectrophotometers*, TrAC Trends Anal. Chem., vol. 114, pp. 251–259, May 2019, doi: 10.1016/J.TRAC.2019.02.035.

39 Huck C. W. et al., *Near Infrared Spectroscopy Patents for the Physicochemical Characterization of Nanomaterials: The Road from Production to Routine High-Throughput Quality Control*, Recent Pat. Nanotechnol., vol. 6, no. 2, pp. 135–141, Jun. 2012, doi: 10.2174/187221012800270171.

40 Meza C. P., Santos M. A., and Romañach R. J., *Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy*, AAPS PharmSciTech 2006 71, vol. 7, no. 1, pp. E206–E214, Mar. 2017, doi: 10.1208/PT070129.

41 Wang X., Fu Q., Sheng J., Yang X., Jia J., and Du W., *Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from different manufacturers using near-infrared diffuse reflection spectroscopy*, Vib. Spectrosc., vol. 53, no. 2, pp. 214–217, Jul. 2010, doi: 10.1016/J.VIBSPEC.2010.03.002.

42 Stojanovska Pecova M., Geskovski N., Petrushevski G., and Makreski P., *A Novel Method for Rapid Particle Size Analysis of Ibuprofen Using Near-infrared Spectroscopy*, AAPS PharmSciTech, vol. 22, no. 8, pp. 1–13, Nov. 2021, doi: 10.1208/S12249-021-02156-X/METRICS.

43 Preskar M., Korasa K., Vrbanec T., Klement D., Vrečer F., and Gašperlin M., *Applicability of Raman and near-infrared spectroscopy in the monitoring of freeze-drying injectable ibuprofen*, Drug Dev. Ind. Pharm., vol. 47, no. 5, pp. 758–769, 2021, doi: 10.1080/03639045.2021.1934864.

44 Escuredo O. et al., *Prediction of physicochemical properties in honeys with portable near-infrared*

(Micronir) spectroscopy combined with multivariate data processing, Foods, vol. 10, no. 2, Feb. 2021, doi: 10.3390/FOODS10020317.

45 Becht A., Schollmayer C., Monakhova Y., and Holzgrabe U., *Tracing the origin of paracetamol tablets by near-infrared, mid-infrared, and nuclear magnetic resonance spectroscopy using principal component analysis and linear discriminant analysis*, Anal. Bioanal. Chem., vol. 413, no. 11, pp. 3107–3118, May 2021, doi: 10.1007/S00216-021-03249-Z/TABLES/3.

46 Genkawa T. et al., *Baseline Correction of Diffuse Reflection Near-Infrared Spectra Using Searching Region Standard Normal Variate (SRSNV)*, Appl. Spectrosc., vol. 69, no. 12, pp. 1432–1441, Dec. 2015, doi: 10.1366/15-07905.

47 Barnes R. J., Dhanoa M. S., and Lister S. J., *Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra*, Appl. Spectrosc., vol. 43, no. 5, pp. 772–777, 1989, doi: 10.1366/0003702894202201.

48 Gavan A., Colobatiu L., Mocan A., Toiu A., and Tomuta I., *Development of a nir method for the in-line quantification of the total polyphenolic content: A study applied on ajuga genevensis l. Dry extract obtained in a fluid bed process*, Molecules, vol. 23, no. 9, Aug. 2018, doi: 10.3390/MOLECULES23092152.

49 Stojanovska Pecova M., Geskovski N., Petrushevski G., Chacorovska M., Krstevska Lj., Ugarkovic S. and Makreski P., *Solid-state interaction of ibuprofen with magnesium stearate and product characterization thereof*, Drug Dev Ind Pharm. 2020 Aug;46(8):1308-1317. doi: 10.1080/03639045.2020.1788067.

50 Elkordy A. A. and Essa E. A., *Dissolution of ibuprofen from spray dried and spray chilled particles*, Pak. J. Pharm. Sci., 2010.

51 CW H. et al., *Near infrared spectroscopy patents for the physicochemical characterization of nanomaterials: the road from production to routine high-throughput quality control*, Recent Pat. Nanotechnol., vol. 6, no. 2, pp. 135–141, Jun. 2012, doi: 10.2174/187221012800270171.

52 Shawky E., Abu El-Khair R. A., and Selim D. A., *NIR spectroscopy-multivariate analysis for rapid authentication, detection and quantification of common plant adulterants in saffron (Crocus sativus L.) stigmas*, LWT, vol. 122, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.LWT.2020.109032.

53 Popo M., Romero-Torres S., Conde C., and Romañach R. J., *Blend uniformity analysis using stream sampling and near infrared spectroscopy*, AAPS PharmSciTech, vol. 3, no. 3, pp. 61–71, Sep. 2002, doi: 10.1208/PT030324.

54 Burns D. A. and Ciurczak E. W., *Handbook of near-infrared analysis, 3rd ed.*, Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009.

55 Porfire A., Muntean D., Achim M., Vlase L., and Tomuta I., *Simultaneous quantification of simvastatin and excipients in liposomes using near infrared spectroscopy and chemometry*, J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 107, pp. 40–49, Mar. 2015, doi: 10.1016/J.JPBA.2014.12.013.

56 Lopes J. A., Costa P. F., Alves T. P., and Menezes J. C., *Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications*, Chemom. Intell. Lab. Syst., vol. 74, no. 2, pp. 269–275, Dec. 2004, doi: 10.1016/J.CHEMOLAB.2004.07.006.

57 Ferreira A. P. and Tobyn M., *Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era*, Pharm. Dev. Technol., vol. 20, no. 5, pp. 513–527, Aug. 2015, doi: 10.3109/10837450.2014.898656.

58 Workman J. Jr. and Weyer L., *Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy,* Pract. Guid. Spectr. Atlas Interpret. Near-Infrared Spectrosc., Apr. 2012, doi: 10.1201/B11894.

59 Dalvi H. et al., *In-line monitoring of Ibuprofen during and after tablet compression using near-infrared spectroscopy*, Talanta, vol. 195, pp. 87–96, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.TALANTA.2018.11.034.

60 Workman J. J., *Interpretive Spectroscopy for Near Infrared,* Appl. Spectrosc. Rev., vol. 31, no. 3, pp. 251–320, 1996, doi: 10.1080/05704929608000571.

61 Ozaki Y., Liu Y., Czarnecki M. A., and Noda I., *FT-NIR Spectroscopy of some long-chain fatty acids and alcohols*, Macromol. Symp., vol. 94, no. 1, pp. 51–59, May 1995, doi: 10.1002/MASY.19950940106.

62 Schwanninger M., Rodrigues J. C., and Fackler K., *A Review of Band Assignments in near Infrared Spectra of Wood and Wood Components*, http://dx.doi.org/10.1255/jnirs.955, vol. 19, no. 5, pp. 287–308, Jan. 2011, doi: 10.1255/JNIRS.955.

63 FDA, *Guidance for Industry PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, manufacturing, and Quality Assurance*, 2004, Accessed: 28-Feb-2025. [Online]. Available: http://www.fda.gov/cvm/guidance/published.html.

64 *Committee for Human Medicinal Products (CHMP) Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP) Guideline on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations,* 2014, Accessed: 28-Feb-2025. [Online]. Available: www.ema.europa.eu.

65 Stegemann S., Leveiller F., Franchi D., Jong H., and Lindén H., *When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept,* Eur. J. Pharm. Sci., vol. 31, no. 5, pp. 249–261, Aug. 2007, doi: 10.1016/J.EJPS.2007.05.110.

66 Coltescu A. R., Butnariu M., and Sarac I., *The importance of solubility for new drug molecules*, Biomed. Pharmacol. J., vol. 13, no. 2, pp. 577–583, Mar. 2020, doi: 10.13005/BPJ/1920.

67 Heimbach T., Fleisher D., and Kaddoumi A., *Overcoming Poor Aqueous Solubility of Drugs for Oral Delivery*, Prodrugs, pp. 157–215, Aug. 2007, doi: 10.1007/978-0-387-49785-3_5.

68 O'Shea J. P., O'Driscoll C. M., and Griffin B. T., *Lipid-based Formulations*, Oral Drug Deliv. Modif. Release Formul., pp. 137–160, Jun. 2021, doi: 10.1002/9781119772729.CH8.

69 Esposito E. et al., *Lipid nanoparticles for administration of poorly water soluble neuroactive drugs,* Biomedical Microdevices, vol. 19, no. 3. 2017, doi: 10.1007/s10544-017-0188-x.

70 Patel V., Lalani R., Bardoliwala D., Ghosh S., and Misra A., *Lipid-Based Oral Formulation Strategies for Lipophilic Drugs*, AAPS PharmSciTech, vol. 19, no. 8. pp. 3609–3630, 2018, doi: 10.1208/s12249-018-1188-8.

71 Sahbaz Y. et al., *Transformation of poorly water-soluble drugs into lipophilic ionic liquids enhances oral drug exposure from lipid based formulations*, Molecular Pharmaceutics, vol. 12, no. 6. pp. 1980–1991, 2015, doi: 10.1021/mp500790t.

72 Corzo C., Lopes D. G., Lochmann D., Reyer S., Stehr M., and Salar-Behzadi S., *Novel approach for overcoming the stability challenges of lipid-based excipients. Part 1: Screening of solid-state and physical properties of polyglycerol esters of fatty acids as advanced pharmaceutical excipients*, Eur. J. Pharm. Biopharm., 2020, doi: 10.1016/j.ejpb.2020.01.012.

73 Fröhlich E. et al., *In vitro toxicity screening of polyglycerol esters of fatty acids as excipients for pulmonary formulations,* Toxicol. Appl. Pharmacol., vol. 386, Jan. 2020, doi: 10.1016/j.taap.2019.114833.

74 Zhang M. and Zhang G., *Recent Advances in the Properties and Applications of Polyglycerol Fatty Acid Esters,* Polymers (Basel)., vol. 17, no. 7, p. 879, Apr. 2025, doi: 10.3390/POLYM17070879.

75 Narang A. S. and Boddu S. H., *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery,* Excip. Appl. Formul. Des. Drug Deliv., pp. 1–10, Jan. 2015, doi: 10.1007/978-3-319-20206-8_1.

76 Freireich B., Kumar R., Ketterhagen W., Su K., Wassgren C., and Zeitler J. A., *Comparisons of intra-tablet coating variability using DEM simulations, asymptotic limit models, and experiments*, Chemical Engineering Science, vol. 131. pp. 197–212, 2015, doi: 10.1016/j.ces.2015.03.013.

77 Jørgensen A. C., Luukkonen P., Rantanen J., Schæfer T., Juppo A. M., and Yliruusi J., *Comparison of torque measurements and near-infrared spectroscopy in characterization of a wet granulation process*, Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 93, no. 9. pp. 2232–2243, 2004, doi: 10.1002/jps.20132.

78 El-Hagrasy A. S., Morris H. R., D'Amico F., Lodder R. A., and Drennen J. K., *Erratum: Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity (Pharmaceutical Sciences (2001) 90 (1298-1307)*, Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 90, no. 11. p. 1915, 2001, doi: 10.1002/jps.1141.abs.

79 Vovko A. D. and Vrečer F., *Process analytical technology tools for process control of roller compaction in solid pharmaceuticals manufacturing,* Acta Pharm., 2020, doi: 10.2478/acph-2020-0038.

80 Jacquart A. et al., *LipImage™ 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging* , J. Biomed. Opt., 2013, doi: 10.1117/1.jbo.18.10.101311.

81 Ahmed O. A. A., Kurakula M., Banjar Z. M., Afouna M. I., and Zidan A. S., *Quality by design coupled with near infrared in formulation of transdermal glimepiride liposomal films,* Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 104, no. 6. pp. 2062–2075, 2015, doi: 10.1002/jps.24448.

82 Maniruzzaman M., Islam M. T., Halsey S., Amin D., and Douroumis D., *Novel Controlled Release Polymer-Lipid Formulations Processed by Hot Melt Extrusion,* AAPS PharmSciTech, vol. 17, no. 1. pp. 191–199, 2016, doi: 10.1208/s12249-015-0470-2.

83 Stranzinger S. et al., *Near-Infrared Hyperspectral Imaging as a Monitoring Tool for On-Demand Manufacturing of Inkjet-Printed Formulations,* AAPS PharmSciTech, vol. 22, no. 6, pp. 1–10, Aug. 2021, doi: 10.1208/S12249-021-02091-X/FIGURES/6.

84 Hauss J. D., Oral lipid-based formulations: Enhancing the bioavailability of poorly Water-soluble drugs. 2013.

85 Wolfgang M. et al., *In-situ monitoring of in vitro drug release processes in tablets using optical coherence tomography,* J. Pharm. Biomed. Anal., vol. 247, Sep. 2024, doi: 10.1016/J.JPBA.2024.116258.

86 Sacher S., Peter A., and Khinast J. G., *Feasibility of In-line monitoring of critical coating quality attributes via OCT: Thickness, variability, film homogeneity and roughness,* Int. J. Pharm. X, 2021, doi: 10.1016/j.ijpx.2020.100067.

87 Wolfgang M., Stranzinger S., and Khinast J. G., *Ascertain a minimum coating thickness for acid protection of enteric coatings by means of optical coherence tomography,* Int. J. Pharm., 2022, doi: 10.1016/j.ijpharm.2022.121680.

88 Lin H., Zhang Z., Markl D., Zeitler J. A., and Shen Y., *A review of the applications of OCT for analysing pharmaceutical film coatings,* Applied Sciences (Switzerland). 2018, doi: 10.3390/APP8122700.

89 Gramaglia D., Conway B. R., Kett V. L., Malcolm R. K., and Batchelor H. K., *High speed DSC (hyper-DSC) as a tool to measure the solubility of a drug within a solid or semi-solid matrix*, International Journal of Pharmaceutics, vol. 301, no. 1–2. pp. 1–5, 2005, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.04.038.

90 Marsac P. J., Shamblin S. L., and Taylor L. S., *Theoretical and practical approaches for prediction of drug-polymer miscibility and solubility*, Pharmaceutical Research, vol. 23, no. 10. pp. 2417–2426, 2006, doi: 10.1007/s11095-006-9063-9.

91 Aultons and Taylor, *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines (6th ed).* pp. 248–253, 2022.

92 Afonso Urich J. A. et al., *Stability-Indicating UPLC-PDA-QDa Methodology for Carvedilol and Felodipine in Fixed-Dose Combinations Using AQbD Principles,* Scientia Pharmaceutica, vol. 92, no. 2. 2024, doi: 10.3390/scipharm92020022.

93 Zhang Y. et al., *DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles,* AAPS J., vol. 12, no. 3, p. 263, Sep. 2010, doi: 10.1208/S12248-010-9185-1.

94 Siepmann J. and Siepmann F., *Mathematical modeling of drug delivery,* Int. J. Pharm., vol. 364, no. 2, pp. 328–343, Dec. 2008, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2008.09.004.

95 Costa P. and Sousa Lobo J. M., *Modeling and comparison of dissolution profiles*, Eur. J. Pharm. Sci., vol. 13, no. 2, pp. 123–133, May 2001, doi: 10.1016/S0928-0987(01)00095-1.

96 Paarakh M. P., Jose P. A., Setty C., and Peterchristoper G. V., *Release kinetics – concepts and applications,* Int. J. Pharm. Res. Technol., vol. 8, no. 1, pp. 12–20, Jan. 2018, doi: 10.31838/IJPRT/08.01.02.

97 Wu I. Y., Bala S., Škalko-Basnet N., and Cagno M. P., *Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes,* Eur. J. Pharm. Sci., vol. 138, p. 105026, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.EJPS.2019.105026.

98 Ojsteršek T., Vrečer F., and Hudovornik G., *Comparative Fitting of Mathematical Models to Carvedilol Release Profiles Obtained from Hypromellose Matrix Tablets,* Pharmaceutics, vol. 16, no. 4, p. 498, Apr. 2024, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS16040498/S1.

99 Ritger P. L. and Peppas N. A., *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs,* J. Control. Release, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, Jun. 1987, doi: 10.1016/0168-3659(87)90034-4.

100 Manley M., *Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials,* Chemical Society Reviews, vol. 43, no. 24. pp. 8200–8214, 2014, doi: 10.1039/c4cs00062e.

101 Gowen A. A., *Chapter 7: NIR Hyperspectral Imaging,* Handbook of Near-Infrared Analysis. pp. 125–144, 2021, doi: 10.1201/b22513-43.

102 Pieszczek L. and .Daszykowski M., *Improvement of recyclable plastic waste detection – A novel strategy for the construction of rigorous classifiers based on the hyperspectral images*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, doi: https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.02.009.

103 Boldrini B., Kessler W., Rebnera K., and Kessler R. W., *Hyperspectral imaging: A review of best practice, performance and pitfalls for in-line and on-line applications,* Journal of Near Infrared Spectroscopy, vol. 20, no. 5. pp. 483–508, 2012, doi: 10.1255/jnirs.1003.

104 Larsson K., Quinn P., Sato K., and Tiberg F., Lipids: Structure, Physical Properties and Functionality. 2006.

105 Sato K., Crystallization of Lipids: Fundamentals and Applications in Food, Cosmetics and Pharmaceuticals. 2018.

106 Xu Z., Wang W., Cao Y., and Xue B., *Liquid-liquid phase separation: Fundamental physical principles, biological implications, and applications in supramolecular materials engineering*, Supramolecular Materials. 2023, doi: 10.1016/j.supmat.2023.100049.

107 Zadymova N. M., Dolzhikova V. D., and Kharlov A. E., *Adsorption of a Lipophilic Drug, Felodipine, at Different Interfaces*, Colloid J., 2020, doi: 10.1134/S1061933X20030151.

108 Margarit M. V., Marín M. T., and Contreras M. D., *Solubility of solid dispersions of pizotifen malate and povidone,* Drug Dev. Ind. Pharm., 2001, doi: 10.1081/DDC-100105176.

109 Mohan R., Lorenz H., and Myerson A. S., *Solubility measurement using differential scanning calorimetry*, Ind. Eng. Chem. Res., 2002, doi: 10.1021/ie0200353.

110 Aulton M. E. and K. Taylor M. G., Aulton's Pharmaceutics E-Book. 2013.

111 Theeuwes F., Hussain A., and Higuchi T., *Quantitative analytical method for determination of drugs dispersed in polymers using differential scanning calorimetry*, J. Pharm. Sci., 1974, doi: 10.1002/jps.2600630325.

112 Abdelhamid M. et al., *Mechanically promoted lipid-based filaments via composition tuning for extrusion-based 3D-printing,* Int. J. Pharm., 2023, doi: 10.1016/j.ijpharm.2023.123279.

113 Reich G., *Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications,* Advanced Drug Delivery Reviews. 2005, doi: 10.1016/j.addr.2005.01.020.

114 Gautam R., Vanga S., Ariese F., and Umapathy S., *Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy*, EPJ Tech. Instrum., 2015, doi: 10.1140/epjti/s40485-015-0018-6.

115 Agustika D. K. et al., *Fourier transform infrared spectrum pre-processing technique selection for detecting PYLCV-infected chilli plants,* Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc., vol. 278, 2022, doi: 10.1016/j.saa.2022.121339.

116 Ha J., Kambe M., and Pe J., *Data Mining: Concepts and Techniques*. 2011.

117 Jain S., Shukla S., and Wadhvani R., *Dynamic selection of normalization techniques using data complexity measures,* Expert Syst. Appl., 2018, doi: 10.1016/j.eswa.2018.04.008.

118 O'Haver T. C., *Potential clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry,* Clin. Chem., 1979, doi: 10.1093/clinchem/25.9.1548.

119 Ciurczak E. W., Igne B., J. Workman, and Burns D. A., *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 2021.

120 Workman J. Jr. and Weyer L., Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. 2012.

121 Koradia V. et al., *Phase transformations of amlodipine besylate solid forms,* Pharm. Sci., vol. 100, no. 7, pp. 2896–2910, 2011, doi: 10.1002/JPS.22509.

122 Saboo S., Bapat P., Moseson D. E., Kestur U. S., and Taylor L. S., *Exploring the role of surfactants in enhancing drug release from amorphous solid dispersions at higher drug loadings*, Pharmaceutics, vol. 13, no. 5, p. 735, May 2021, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS13050735/S1.

123 Baird J. A., Van Eerdenbrugh B., and Taylor L. S., *A Classification System to Assess the Crystallization Tendency of Organic Molecules from Undercooled Melts*, J. Pharm. Sci., vol. 99, no. 9, pp. 3787–3806, Sep. 2010, doi: 10.1002/JPS.22197.

124 Abdelhamid M. et al., *Personalization of lipid-based oral dosage forms via filament-based 3D-printing,* Appl. Mater. Today, vol. 40, 2024, doi: 10.1016/j.apmt.2024.102399.

125 Ribeiro A. P. B. et al., *Crystallization modifiers in lipid systems*, J. Food Sci. Technol., vol. 52, no. 7, pp. 3925–3946, Jul. 2015, doi: 10.1007/S13197-014-1587-0/METRICS.

126 Cerdeira M., Pastore V., Vera L. V., Martini S., Candal R. J., and Herrera M. L., *Nucleation behavior of blended high-melting fractions of milk fat as affected by emulsifiers*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., vol. 107, no. 12, pp. 877–885, Dec. 2005, doi: 10.1002/EJLT.200500257;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.

127 Sato K., Bayés-García L., Calvet T., Cuevas-Diarte M. À., and Ueno S., *External factors affecting polymorphic crystallization of lipids,* Eur. J. Lipid Sci. Technol., vol. 115, no. 11, pp. 1224–1238, Nov. 2013, doi: 10.1002/EJLT.201300049.

128 Shen C. et al., *Enhancement of the Solubility of BS Class II Drugs with MOF and MOF/GO Composite Materials: Case Studies of Felodipine, Ketoprofen and Ibuprofen,* Mater. 2023, Vol. 16, Page 1554, vol. 16, no. 4, p. 1554, Feb. 2023, doi: 10.3390/MA16041554.

129 Andersson S. B. E. et al., *Interlaboratory Validation of Small-Scale Solubility and Dissolution Measurements of Poorly Water-Soluble Drugs*, J. Pharm. Sci., vol. 105, no. 9, pp. 2864–2872, Sep. 2016, doi: 10.1016/J.XPHS.2016.03.010.

130 Windbergs M., Strachan C. J., and Kleinebudde P., *Tailor-made dissolution profiles by extruded matrices based on lipid polyethylene glycol mixtures*, J. Control. Release, vol. 137, no. 3, pp. 211–216, Aug. 2009, doi: 10.1016/J.JCONREL.2009.04.002.

131 Pluntze A. M., Cape J. L., Klaus N. D., and Lyon D. K., *Control of API release with matrix polymorphism in tristearin microspheres*, Int. J. Pharm., vol. 636, p. 122806, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2023.122806.

5. ПРИЛОЗИ

ПУБЛИКАЦИИ И КОНФЕРЕНЦИИ ПРОИЗЛЕЗЕНИ ОД ДОКТОРСКАТА ДИСЕРТАЦИЈА

Трудови објавени во списанија со фактор на влијание:

1. **Atanaskova E,** Angelovska V, Chachorovska M, Stojanovska A.N, Petruševski Gj, Makreski P, Geskovski N, *Development of novel portable NIR spectroscopy process analytical technology (PAT) tool for monitoring the transition of ibuprofen to ibuprofen sodium during wet granulation process*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy 317 (2024), 124369, https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124369 **(IF 4.6)**

2. **Atanaskova E,** Poms J, Wolfgang M, Alva C, Mussner N, Zimmer A, Geskovski N, Salar-Behzadi S, *Novel development of lipid-based formulations: Improved wettability and homogeneous API solid dispersion visualised via near-infrared hyperspectral imaging*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 216 (2025) 114864, https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114864 **(IF 4.3)**

Трудови презентирани на конференции – усни презентации:

1. **Atanaskova E,** Chachorovska M, Stojanovska A.N, Petruševski Gj, Makreski P, Geskovski N, *MVA model development for quantification of API in solid state using vibrational spectroscopy,* 14th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 28-30.09.2023, Ohrid, North Macedonia.

Трудови презентирани на конференции – постер презентации:

1. **Atanaskova E,** Chachorovska M, Stojanovska A.N, Petruševski Gj, Makreski P, Geskovski N, *Development of a NIR based PAT tool for quantification of ibuprofen acid-salt transformation during a wet granulation process*, 21st International Conference on Near Infrared Spectroscopy, 20-24.08.2023, Innsbruck, Austria.

2. **Atanaskova E,** Poms J, Wolfgang M, Alva C, Mussner N, Zimmer A, Geskovski N, Salar-Behzadi S, *NIR Hyperspectral imaging for monitoring of drug content uniformity in lipid-based formulation development*, 15th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology, 25-27.09.2025, Bled, Slovenia.

НАУЧНИ ПРЕСТОИ РЕАЛИЗИРАНИ ЗА ВРЕМЕ НА ДОКТРОСКИТЕ СТУДИИ

- 01.03.2024 – 30.05.2024 – Гостински докторанд при Истражувачкиот центар за фармацевтско инженерство (Research Center Pharmaceutical Engineering (RCPE)) во Грац, Австрија. Академска мобилност реализирана преку Централноевропската програма за размена на универзитетски студии (CEEPUS). Област на истражување: Липидни формулации и современи системи за следење на процесите на производство на овие формулации.

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 317 (2024) 124369

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.journals.elsevier.com/spectrochimica-acta-part-a-molecular-and-biomolecular-spectroscopy

Development of novel portable NIR spectroscopy process analytical technology (PAT) tool for monitoring the transition of ibuprofen to ibuprofen sodium during wet granulation process

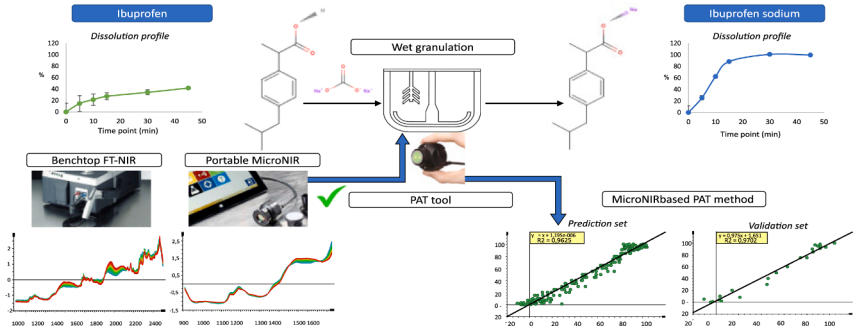
Elizabeta Atanaskova [a,b,*], Veronika Angelovska [a], Marina Chachorovska [a], Natasha Anevska Stojanovska [a], Gjorgji Petrushevski [c,d], Petre Makreski [d], Nikola Geskovski [b,**]

[a] Research and Development, Alkaloid AD, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia
[b] Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia
[c] Quality control, Alkaloid AD, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia
[d] Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Institute of Chemistry, Arhimedova 5, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia

HIGHLIGHTS

- A NIR based PAT tool for monitoring transformation of ibuprofen to ibuprofen sodium.
- PLS models for quantification of ibuprofen conversion during wet granulation.
- Model validation on trial batches with varying ibuprofen acid-salt conversion rate.
- Dissolution rates match NIR-predicted ibuprofen sodium concentrations post-granulation.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Near-infrared spectroscopy
Ibuprofen
Chemometrics
PAT tool
PLS models
Acid-salt transformation
End-point determination

ABSTRACT

The aim of this research was to develop a process analytical technology (PAT) tool for monitoring the transformation of the active ingredient ibuprofen into the fast-dissolving salt ibuprofen sodium during the wet granulation process. Two near-infrared (NIR) spectrophotometers, portable and benchtop spectrophotometer, were compared. During the analysis with the built models, both demonstrated comparable accuracy and precision (R2X = 0.995, R2Y = 0.927, Q2 = 0.995, and R2X = 0.990, R2Y = 0.948, Q2 = 0.992, respectively). Considering the applicability, a model based on the portable NIR spectroscopic data was chosen for further development and application as a PAT tool for monitoring different steps during the wet granulation process. The evaluation of the model's predictive capability involved analyzing laboratory trial batches with varying amounts

* Corresponding author at: Research and development, Alkaloid AD, Blvd. Aleksandar Makedonski 12, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia. Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia.
** Corresponding author at: Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, Majka Tereza 47, 1000, Skopje, Republic of North Macedonia.
E-mail addresses: eatanaskova@Alkaloid.com.mk (E. Atanaskova), ngeskovski@ff.ukim.edu.mk (N. Geskovski).

https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124369
Received 28 December 2023; Received in revised form 21 April 2024; Accepted 27 April 2024
Available online 27 April 2024
1386-1425/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

of sodium carbonate, resulting in different concentrations of ibuprofen sodium at the end of the wet granulation process. Subsequently, tablets were manufactured from each trial batch, followed by dissolution analysis. The dissolution rate assays were in good agreement with the NIR-predicted concentrations of ibuprofen sodium at the end of the wet granulation process. Based on the results, the proposed model provides an excellent tool to monitor the ibuprofen acid-salt transformation, to determine the end-point of the reaction, and to efficiently control the wet granulation process.

1. Introduction

Ibuprofen, a widely used nonsteroidal anti-inflammatory drug for treating mild to moderate pain [1], belongs to class 2 drugs in the Biopharmaceutical Drug Classification System (BCS). This classification of the drug signifies its high permeability but low solubility. However, solubility is a crucial factor that determines the drug absorption and the speed of onset of its pharmacological action. Numerous studies [2,3,4] have confirmed that ibuprofen salts, such as ibuprofen lysine and ibuprofen arginate, exhibit faster solubility compared to the acidic free form. Consequently, these salt forms are absorbed more rapidly into the central circulation. Another type of ibuprofen salt, sodium ibuprofen dihydrate (ibuprofen sodium), has been confirmed to be bioequivalent to the lysinate and arginate forms [5].

Ibuprofen sodium solid dosage forms, demonstrating improved dissolution rates and rapid pharmacological response are already on the market. However, those formulations employ pure ibuprofen sodium as an active pharmaceutical ingredient (API) which markedly increases the price of the final product, relative to the ibuprofen solid dosage forms. The simplest and most cost-effective process of in-situ synthesis of ibuprofen sodium is wet granulation of ibuprofen with a sodium-containing base such as sodium hydroxide or sodium carbonate [6]. In this manner the process of synthesis of ibuprofen sodium and production of its solid dosage form could be merged together thus lowering the overall cost of the final product. Having this in mind, the monitoring of this transition and the ability to quantify the conversion of ibuprofen to ibuprofen sodium during the production of a solid dosage form are crucial for determining the endpoint of the reaction and therefore the quality of the final product.

Process Analytical Technology (PAT) is a system developed for the analysis and control of production processes. It involves real-time measurements taken during production, of both process performance and critical quality attributes. The goal is to ensure the quality of the end product. Utilizing non-invasive spectroscopic techniques and the inclusion of chemometric analyses (MVA) during the production process allow for fast and effective control of the manufacturing process [7].

Spectroscopy is a field that deals with the study of the interaction between materials and electromagnetic radiation. Infrared spectroscopy enables both qualitative and quantitative analyzes. In recent years, near-infrared spectroscopy (NIRS) has proven to be highly effective [8], particularly in real-time analysis in the context of PAT. NIRS is recognized as a non-destructive tool for the rapid analysis of granular samples and offers the advantage of direct analysis without sample preparation [9]. Numerous studies within the scientific literature have harnessed the power of NIR spectroscopy to conduct diverse analyses of ibuprofen, encompassing quantification, particle size determination, water content assessment, and other applications [10,11,12,13].

The objective of this study was to develop a statistical model for the quantification of ibuprofen and ibuprofen sodium content, focusing on the evaluation of the conversion process of ibuprofen to its ibuprofen sodium salt during wet granulation phase of the production of solid dosage forms. The model was developed using a step-wise approach, starting with the comparison of two NIR spectrophotometers: portable NIR device covering the spectral range from 950 to 1650 nm (10526–6060 cm^{-1}) versus benchtop NIR device operating in the region from 1000 to 2500 nm (10000–4000 cm^{-1}). After identifying the most suitable equipment, the model was further developed to create a tool applicable in the wet granulation process.

In the final phase of the study, the real-time application of the developed model was tested in laboratory trials, and proof of concept was provided by a dissolution analysis of the end product.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ibuprofen (grade 50) and ibuprofen sodium dihydrate were procured from BASF Corporation in Bishop, Texas, while sodium carbonate (fine powder) was sourced from Dr. Paul Lohmann GmbH & Co. KGaA in Emmerthal, Germany. Microcrystalline cellulose, specifically Avicel® PH 101 and Avicel® PH 102, along with croscarmellose sodium (Ac-Di-Sol), were acquired from DuPont Nutrition in Cork, Ireland. Lactose monohydrate 100 was purchased from MEGGLE GmbH & Co. KG in Germany. Colloidal silicon dioxide (Aerosil® 200) was obtained from Pharma Evonik Corporation in Rheinfelden, Germany, and partially pregelatinized maize starch (Starch 1500) from Colorcon in the United States. Glyceryl behenate (Compritol 888 ATO) was sourced from Gattefossé in Saint-Priest, France.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of samples for the calibration set

With the intention of creating a reliable sample set to develop a model for the quantification of the active ingredients, 35 standard mixtures were prepared. These mixtures were prepared by weighing and physically combining intragranular ingredients, mainly used for production of solid dosage forms, including Avicel® PH 101, Starch 1500, Aerosil® 200, lactose monohydrate 100, and the active ingredients ibuprofen and ibuprofen sodium, with concentrations ranging from 0 % to 100 %. As an extragranular components Avicel® PH 102 and Compritol 888 ATO were included. Compritol 888 ATO was selected over the most widely used lubricant magnesium stearate due to the confirmed interaction of this excipient with ibuprofen [12]. The prepared sample set was used to compare the NIR spectrophotometers. Various amounts of water in the range appropriate for the wet granulation process were then added to the standard mixtures for real-time analysis of the wet granulation process.

Details of the composition of these mixtures, which were essential for the creation of the calibration set for the models, can be found in Table 1.

2.2.2. Near-infrared spectroscopy

The quantification models were developed using data obtained with two distinct NIR spectrophotometers: a benchtop NIR instrument (Antaris II FT-NIR Analyzer, Thermo Fisher Scientific, USA) and a portable MicroNIR Pro v2.5 device (MicroNIR 1700 ES, VIAVI, Santa Rosa, CA, USA).

The Antaris II FT-NIR analyzer offers a high degree of accuracy and reproducibility and is therefore ideally suited for method development purposes. The near-infrared (NIR) spectral data of the prepared final product standard mixtures were collected in duplicate, measuring different areas of the powder each time. The instrument was operated in reflectance mode and spectra were acquired between 1000 and 2500 nm (10000–4000 cm^{-1}) as the average of 18 scans (resolution of 8 cm^{-1}) [14].

Table 1
Quantity of variable components of the standard mixtures.

Raw material	Ibuprofen	Ibuprofen Na	Water*	Raw material	Ibuprofen	Ibuprofen Na	Water*
Mix no.		Quantity (g)		Mix no.		Quantity (g)	
1	4.44	0.00	0.34	19	1.78	2.67	1.20
2	4.40	0.04	0.42	20	1.56	2.89	1.25
3	4.36	0.09	0.49	21	1.33	3.11	1.29
4	4.31	0.13	0.57	22	1.11	3.33	1.34
5	4.27	0.18	0.61	23	0.89	3.56	1.39
6	4.22	0.22	0.65	24	0.67	3.78	1.44
7	4.13	0.31	0.69	25	0.44	4.00	1.48
8	4.09	0.36	0.73	26	0.40	4.04	1.53
9	4.00	0.44	0.77	27	0.36	4.09	1.58
10	3.78	0.67	0.81	28	0.31	4.13	1.64
11	3.56	0.89	0.85	29	0.27	4.18	1.69
12	3.33	1.11	0.89	30	0.22	4.22	1.74
13	3.11	1.33	0.93	31	0.18	4.27	1.79
14	2.89	1.56	0.98	32	0.13	4.31	1.84
15	2.67	1.78	1.02	33	0.09	4.36	1.90
16	2.44	2.00	1.06	34	0.04	4.40	1.95
17	2.22	2.22	1.11	35	0.00	4.44	2.01
18	2.00	2.44	1.15				

* used only for development of the final model for real time analysis.

The MicroNIR 1700 ES spectrophotometer is an instrument designed to measure diffuse reflectance in the NIR region of the electromagnetic spectrum. The development of the model was based on the intragranular and extragranular spectral data of the prepared standard mixtures collected using the MicroNIR 1700 ES spectrometer with a windowed collar equipped with a 128-pixel detector array coupled with a linear variable filter (LVF) as a wavelength selector, covering a spectral range of 950–1650 nm (10526–6060 cm^{-1}). The properly homogenized samples were placed on the spectrometer and to minimize sampling errors, each mixture was scanned at least twice. The MicroNIR 1700 ES was connected directly to a USB port of the laptop and the spectra were recorded using the MicroNIR Pro v.2.2 instrument acquisition software. The diffuse reflectance signal of the NIR spectrum is referred to as reflectance (R), where log (1/R) values are used to perform chemometric analysis [15,16]. The MicroNIR 1700 ES spectrophotometer was further used to record the NIR spectral data of laboratory trials.

2.2.3. Multivariate statistical analysis

The development of the APIs quantification models was performed using SIMCA (Version 14.1.0, Umetrics, Umeå, Sweden) software.

Since the API concentration is a chemical feature, the SNV preprocessing method was applied without losing any information. Partial Least Squares (PLS) regression, a statistical multivariate technique, was employed to create regression models. These models correlated a dependent process variable (the concentration of active ingredients in the prepared standard mixtures) with a number of independent process-derived variables (spectral data). Model validation was performed using the cross-validation method, leaving out one sample at a time. The predicted concentrations were then compared with the known concentrations of the active ingredients in each mixture. The Root Mean Square Error of Cross-Validation (RMSEcv) served as a diagnostic test that evaluates both the precision and accuracy of the predictions.

In this study, two PLS models were developed to compare benchtop and portable NIR instruments. Subsequently, the MicroNIR model was upgraded by incorporating spectral data obtained from the analysis of standard mixtures with different amounts of water to fit the model for the prediction of ibuprofen sodium during wet granulation.

Furthermore, a multivariate analysis was performed in batch mode to monitor the laboratory trials. Batch evolution models from the collected MicroNIR spectra at different time points during the wet granulation process were used.

2.2.4. Production of laboratory trials (method validation)

Laboratory trials were carried out to produce a solid dosage form of ibuprofen with enhanced dissolution rate capabilities. This was achieved by using high-shear mixer granulation technology and conducting trials under conditions that facilitated the in situ conversion of ibuprofen to its salt form. The formulation, consisting of ibuprofen, Na_2CO_3, lactose monohydrate 100, Avicel pH 101, starch 1500, and Aerosil 200, was granulated using a Diosna P1/6 laboratory-scale mixer and 2L bowl. The amount of sodium carbonate was varied from 0 to 2 mol per mole of ibuprofen during the experiments to monitor the API conversion (Table 2). Correspondingly, adjustments were made to the water used for granulation according to the levels of Na_2CO_3 added. As a result, minor adjustments to the process parameters were required due to the differing quantities of Na_2CO_3 and water used in the experimental trials (Table 3). The overall objective was to obtain granules of the necessary quality for subsequent compression into tablets.

Table 2
Composition of experimental trials.

	LT 1	LT 2	LT 3	LT 4	LT 5	LT 6
Granules:			Quantity (g)			
Ibuprofen	111.11	111.11	111.11	111.11	111.11	111.11
Na_2CO_3	38.92	57.09	114.18	28.54	7.14	0.00
Lactose monohydrate 100	17.50	17.50	17.50	17.50	17.50	17.50
Avicel pH 101	17.50	17.50	17.50	17.50	17.50	17.50
Starch 1500	16.25	16.25	16.25	16.25	16.25	16.25
Aerosil 200	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Final blend:						
Avicel pH 102	18.05	18.05	18.05	18.05	18.05	18.05
AC-DI-Sol	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50	7.50
Compritol 888 ATO	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75

LT – Laboratory trial.

Table 3
Process parameters of wet granulation and drying process steps.

	LT 1	LT 2	LT 3	LT 4	LT 5	LT 6
Step I: Mixing pre-blend						
Impeller speed	200 rpm	300 rpm	300 rpm	300 rpm	300 rpm	300 rpm
Chopper speed	1000 rpm	1500 rpm	1500 rpm	1500 rpm	1500 rpm	1500 rpm
Mixing time	2 min	3 min	3 min	3 min	3 min	3 min
Step II: Wetting						
Impeller speed	150 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm	200 rpm
Chopper speed	1000 rpm	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm
Wetting time	3.5 min	3 min	4 min	2.5 min	1.5 min	2.5 min
Peristaltic pump speed	15 rpm	15 rpm	15 rpm	10 rpm	15 rpm	20 rpm
Step III: Wet massing						
Impeller speed	200 rpm	300 rpm	300 rpm	300 rpm	300 rpm	300 rpm
Chopper speed	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm	2000 rpm
Wet massing time	4 min	5 min	6 min	6 min	6 min	6 min
Step IV: Wet screening						
Impeller speed	1400 rpm	1400 rpm	1400 rpm	1400 rpm	1400 rpm	1400 rpm
Step V: Drying						
Inlet airflow rate	10 m^3/h	10 m^3/h	10 m^3/h	10 m^3/h	10 m^3/h	10 m^3/h
Inlet air temperature	65°C	65°C	65°C	65°C	50°C	50°C
Step VI: Dry Screening						
Impeller speed	1400 rpm	1400 rpm	1000 rpm	1000 rpm	1000 rpm	1000 rpm

The wet granulation process commenced with the direct addition of water into the granulation bowl through a spray lance connected to a peristaltic pump. The amount of water varied depending on the amount of Na_2CO_3 added. This wetting process was followed by a 4–6 min wet massaging phase to distribute the liquid and allow the granules to grow. The two main phases were in-line NIR monitored using MicroNIR 1700 ES sensor system as presented on Fig. 1. A laboratory trial was conducted to establish a control batch by excluding Na_2CO_3 (LT 6), thereby preventing any salt conversion. This was undertaken to elucidate the impact of ibuprofen salt formation on the dissolution profile. Given the absence of conversion, continuous monitoring of LT 6 was unnecessary; instead, solely the endpoint was scanned and quantified using the pre-existing PLS model.

The quantitative composition of the processed formulations is presented in Table 2, while the process parameters for each batch are given on Table 3.

To prepare the final mixture for tableting, the granules were first blended with Avicel pH 102 and AC-DI-Sol in an ERWEKA AR 403 drum mixer. This blending was carried out for 30 min at 15 revolutions per minute (rpm). Compritol 888 ATO was then added to the blend and mixed for a further 10 min at 15 rpm. The resulting final blends were then compacted into round 11 mm tablets using a laboratory tablet press (Korsch XL 100 PRO).

2.2.5. *In vitro dissolution testing*

The determination of the ibuprofen dissolution rate from the prepared tablets was carried out in a type II dissolution apparatus (paddle) at a speed of 75 rpm and a temperature of 37 ± 0.2 °C. The dissolution medium used was 900 mL acetate buffer solution pH = 4.5. Six tablets from each laboratory trial containing 200 mg API were analyzed. During dissolution analysis, 10 mL of the sample was removed from the dissolution vessel after 5, 10, 15, 30, and 45 min and an equal volume of fresh medium maintained at 37 ± 0.2 °C was replaced.

The samples were then filtered through 0.45 μm filters with regenerated cellulose membrane and 2 mL of the resulting solution was transferred to a 50 mL volumetric flask and diluted with medium. To calculate the dissolved ibuprofen content, the UV absorbances of the test and standard solutions were measured using a Cary 50 UV–Vis spectrophotometer at a detection wavelength of 221 nm.

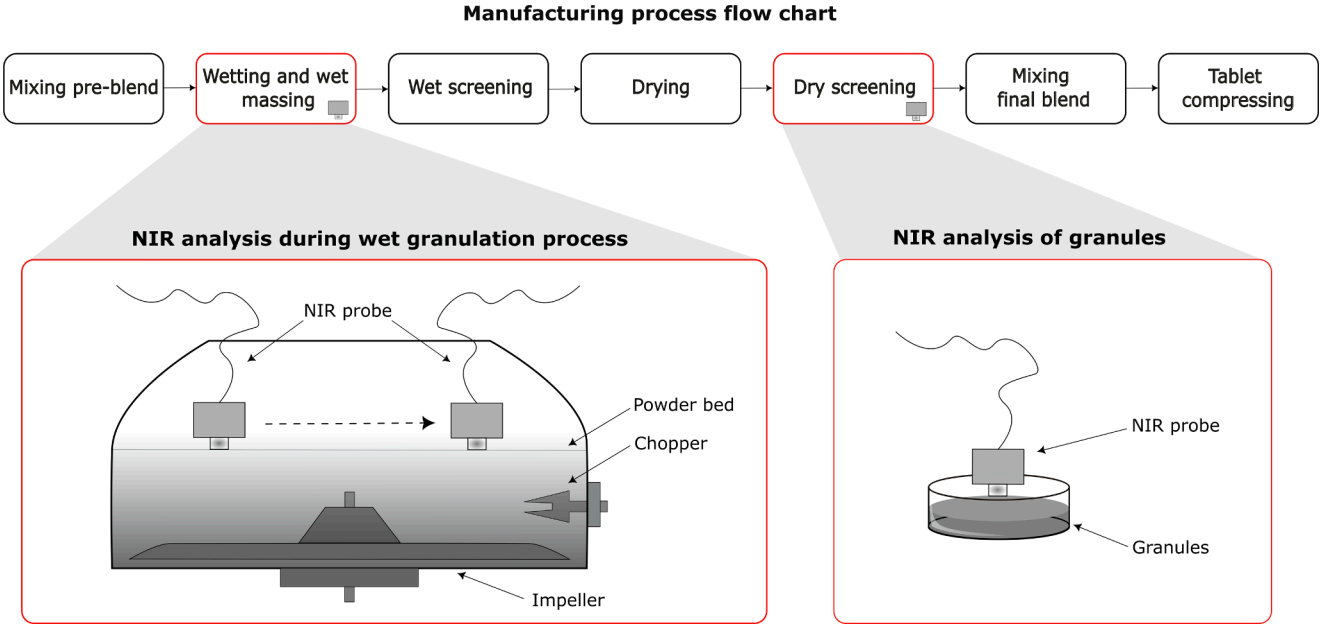


Fig. 1. Scheme for NIR in-line monitoring of the wet granulation process.

3. Results and discussion

3.1. Comparing the PAT models developed using benchtop and portable near-infrared spectrometers

The analysis of each test mixture was repeated twice using both the Antaris II FT-NIR analyzer (benchtop NIR spectrophotometer) and the MicroNIR 1700 ES Sensor System (portable NIR spectrophotometer), so that a total of 70 spectral data were collected for the calibration dataset for model development.

Fig. 2(a) and Fig. 2(c) show the raw near-infrared (NIR) spectra of the 70 mixture samples obtained using Antaris II FT-NIR and MicroNIR 1700 ES spectrophotometers. The pre-processing of the data plays a crucial role in the calibration process. It includes the implementation of techniques to minimize unwanted signal variations, to align the spectra by removing variations in the offset or different linear baselines, and to improve the robustness of the model to unexpected perturbations in new samples [17,18].

When compared, SNV proved superior in this study in correcting scattered light and removing slope variations as effects of the physical properties of the mixture samples and the measurement conditions. The SNV-preprocessed spectra are presented in Fig. 2(b) and Fig. 2(d).

Partial Least Squares (PLS) calibration models for the quantification of ibuprofen and ibuprofen sodium were constructed using two latent variables (LVs). The models correlated the obtained near-infrared (NIR) spectra with the concentration of the active ingredients in each standard mixture. The performance of the PLS models was evaluated by the coefficient of determination of predictions (R2X), coefficient of determination of observations (R2Y), model validity (Q2) and prediction errors (RMSEE, $RMSE_{CV}$), which are presented in Table 4.

Table 4
Comparison of calibration and prediction errors for different methods.

Instrument	Benchtop FT-NIR	Portable MicroNIR
Number of LVs	2	2
R2Y	0.99	0.99
R2X	0.95	0.93
Q2	0.99	0.99
RMSEE	3.83	2.65
RMSEcv	4.56	2.72

According to the PLS metrics, both models demonstrated an ability to explain more than 90 % of the sample variability. The obtained values for RMSEE and RMSEcv confirm the accuracy of the models in predicting the results. The prediction plot is depicted in Fig. 3. Although the instruments cover different optical frequency ranges — the second and first overtone for Viavi's MicroNIR (950–1650 nm; 10526–6060 cm^{-1}) and the first, second, and combination bands region for Thermo Fisher's Antaris II FT-NIR analyzer (1000–2500 nm; 10000–4000 cm^{-1}) — both models exhibited strong prediction correlation coefficients and low $RMSE_{CV}$ values. These results indicate robust fitting outcomes and low prediction errors.

While the MicroNIR apparatus features a narrower spectral scanning range and lower resolution compared to the benchtop FT-NIR, it demonstrates lower RMSEE and $RMSE_{CV}$. This is likely attributable to its significantly larger scanning area, which compensates for sample homogeneity issues, and the utilization of signal processing algorithms that mitigate the impact of environmental factors on signal stability.

Loading plots are used to visualize the correlation structure of variables. X variables with large w*c values that are either positive or

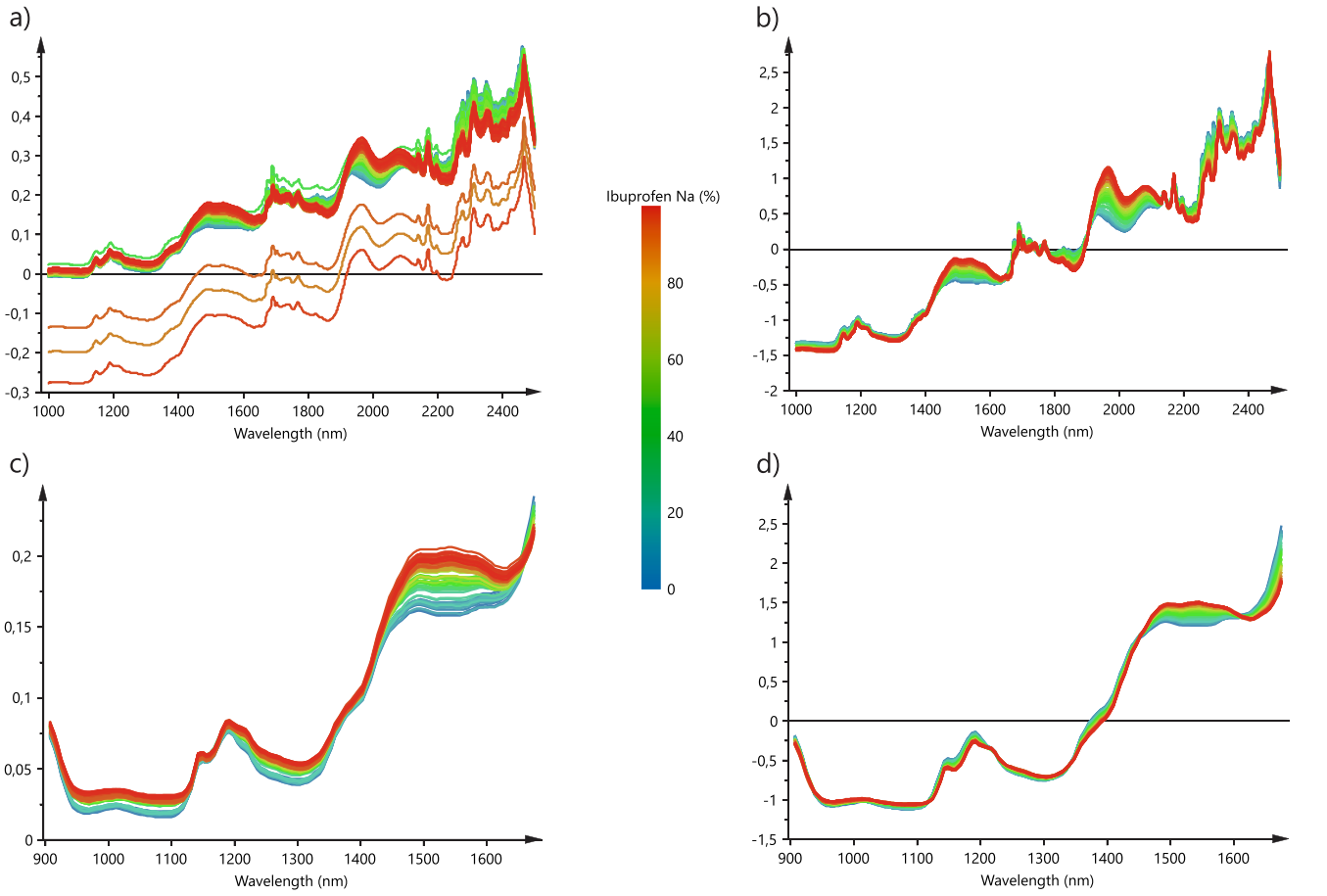


Fig. 2. Raw spectra generated by a) Antaris II FT-NIR spectrophotometer and c) MicroNIR 1700 ES spectrophotometer; SNV preprocessed spectra of all mixtures – b) Antaris II FT-NIR spectrophotometer and d) MicroNIR 1700 ES spectrophotometer.

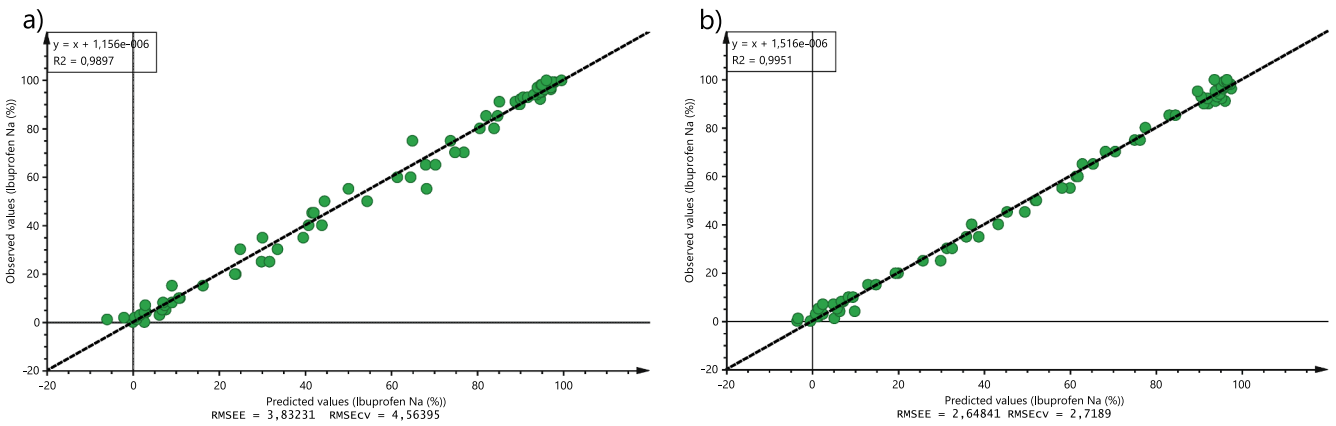


Fig. 3. Observed vs. predicted plot – Antaris II FT-NIR model (a), MicroNIR model (b).

negative indicate a high correlation with Y variables [19]. When plotted together with the raw material NIR spectra (Fig. 4), the main features of the collected NIR spectral data can be recognized.

Spectral analysis of the pure active ingredients, ibuprofen and ibuprofen sodium dihydrate, revealed several distinct features across the spectral range. Both substances contain similar molecular fragments and are therefore expected to have spectral similarities. The spectra are rich in bands because their structures could be derived from benzene comprising several substitutions that reduce the overall molecular symmetry so that additional vibrational peaks to appear. In the case of substitutions of alkyl groups attached to the aromatic (benzene) moiety, the bands from the alkyl CH stretch absorptions (of methyl and methylene groups) occurred around 1190 nm (8403 cm^{-1}) and 1210 nm (8264 cm^{-1}) and the maxima of the second overtone of the aromatic CH stretch in alkylated benzenes occurred around 1145 nm (8734 cm^{-1}) [20]. In addition to the 1100–1250 nm (9090–8000 cm^{-1}) range [21], strong bands of methylene and methyl groups at 1350–1420 nm (7407–7042 cm^{-1}), which are assigned to the second C–H combinations [20], also appear in both NIR spectra.

A discernible contrast in the NIR spectra of ibuprofen and ibuprofen sodium becomes evident in the range from 1430 nm to 1610 nm (6993–6211 cm^{-1}), which is dominated by the 1st overtone of the O–H stretching vibrations [20] associated with the hydrogen-bonding interaction between an acidic group and another basic atom - in this case, the interaction between the sodium ion (Na^+) and the carboxylate group of the ibuprofen molecule.

Towards higher wavenumbers, the 1688–1870 nm (5924–5347 cm^{-1}) and 2240–2440 nm (4464–4098 cm^{-1}) regions displays rich bands behavior. The lower wavenumber region is typical for occurrence of the bands of the OH stretch combined with C = O stretch (1st overtone of OH and 1st overtone of C–H), which correspond to both the OH group and the CH_3 group [22,23], while the absorptions at 2240–2440 nm (4464–4098 cm^{-1}) correspond to the CH_3 group and C = O group combinations (C–H stretch and C = O stretch) [16,17].

A notable band in ibuprofen sodium emerges in the range from 1900 nm to 2070 nm (5263 to 4831 cm^{-1}), indicating the second overtone of carbonyl stretching. This occurrence is consistent with the anticipated range of 1905 nm to 1923 nm (5249 to 5200 cm^{-1}) [24]. However, it is noteworthy that this range overlaps with the broader spectrum of the water band from 1887 nm to 2000 nm (5300–5000 cm^{-1}), typically associated with the solid-state structure of ibuprofen sodium dihydrate.

The loading plot for the benchtop NIR model indicates two highly correlated NIR regions, around 1430 nm (6993 cm^{-1}) and 1610 nm (6211 cm^{-1}), and the region from 1887 nm (5300 cm^{-1}) to 2000 nm (5000 cm^{-1}), that are used by the model to quantify ibuprofen and ibuprofen sodium. Due to the narrower working region of the MicroNIR 1700 ES handheld spectrometer, this model primarily relies on the lower wavelength regions around 1100–1250 nm (9090–8000 cm^{-1}), 1430 nm (6993 cm^{-1}), and 1610 nm (6211 cm^{-1}) for the prediction analysis.

Considering the compact physical implementation of the portable MicroNIR spectrophotometer for in-line measurements and its proven prediction capability in the created PLS model, the MicroNIR probe was deemed more convenient for further application as a PAT tool for wet granulation analysis.

3.2. *PAT model for intragranular quantification – Development and validation of the MicroNIR based PAT method*

To develop an in-line calibration model, intragranular calibration mixture samples were meticulously prepared with varying API contents ranging from 0 % to 100 % w/w, along with variable water amounts ranging from 0 % to 23.5 % - a quantity predicted for use during the wet

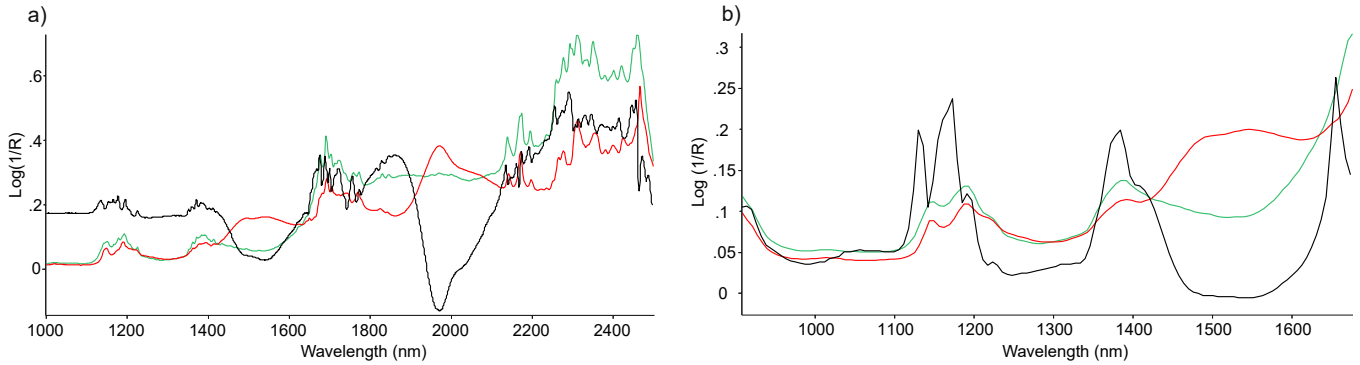


Fig. 4. Single NIR spectra of ibuprofen (red), ibuprofen sodium (green) versus the models' loading plot (black) – a) Antaris II FT-NIR model; b) MicroNIR 1700 ES model.

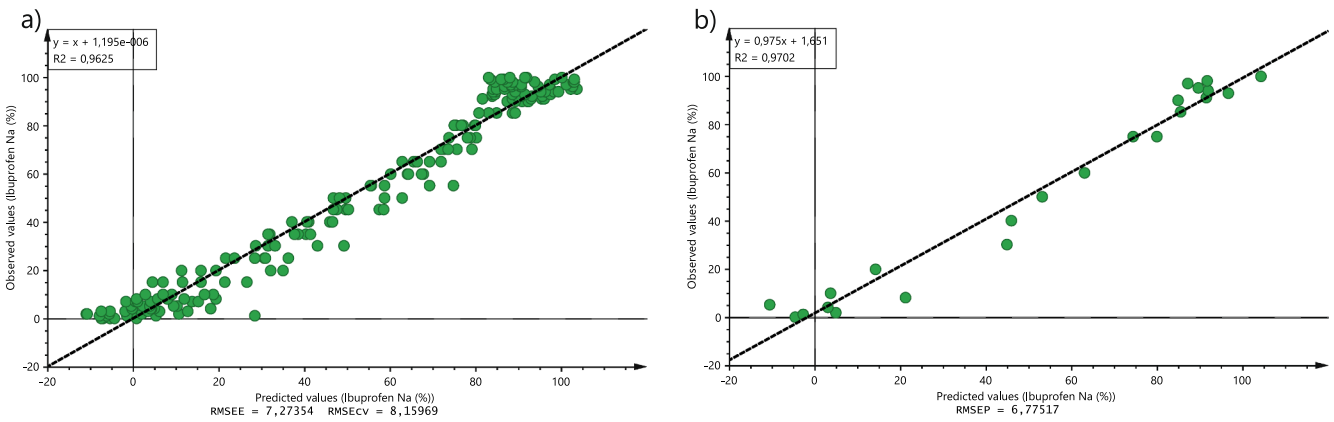


Fig. 5. Observed vs. predicted plot – MicroNIR's model – calibration set (a) and validation set (b).

granulation process. Each standard mixture underwent double scanning, and different locations within the same mixture were analyzed to mitigate the effects of sampling error. A comprehensive total of 191 spectral data points were collected as calibration dataset.

A partial Least Square (PLS) calibration model for ibuprofen and ibuprofen sodium (%) was established by correlating the SNV pre-processed NIR spectra with the concentration of APIs in each mixture. The entire spectral range was selected for the model development.

Two levels of validation were considered: internal (cross-validation, removing one sample at a time from the calibration set) and external validation, using a separate validation set of 23 independently prepared samples [25,26].

The developed PLS calibration model (2 latent variables used) clearly demonstrates an excellent linearity (R2X = 0.99, R2Y = 0.94, Q2 = 0.94) and accuracy (RMSEE = 7.27, RMSEcv = 8.16, RMSEP = 6.78). The appropriate correlation among the predicted and observed values (Fig. 5) of ibuprofen and ibuprofen sodium point out the robustness and effectiveness of the MicroNIR-based Process Analytical Technology (PAT) model as a credible tool for monitoring of the wet granulation process.

3.3. *In situ monitoring of ibuprofen transition in laboratory trials*

The model application was confirmed through the production and analysis of five laboratory trials (LT1 - LT5, Table 2). These trials involved standard concentrations of ibuprofen and varying amounts of sodium carbonate to achieve different degrees of ibuprofen conversion during the wet granulation process. NIR spectral data, recorded during the addition of water in two parts (as a liquid for granulation), and throughout the wet granulation process, were utilized for model testing and predicting the results of the parameter assay for active ingredients at different process steps. Real-time analysis revealed a gradual increase in the assay of ibuprofen sodium during the wet granulation process for trials with the appropriate quantity of sodium carbonate, concomitant with a decrease in ibuprofen quantity (see Fig. 6). In LT 3, with the highest quantity of sodium carbonate (114.18 g), the complete conversion could be detected at the beginning of the process, immediately after the addition of the water required for granulation. Conversely, during

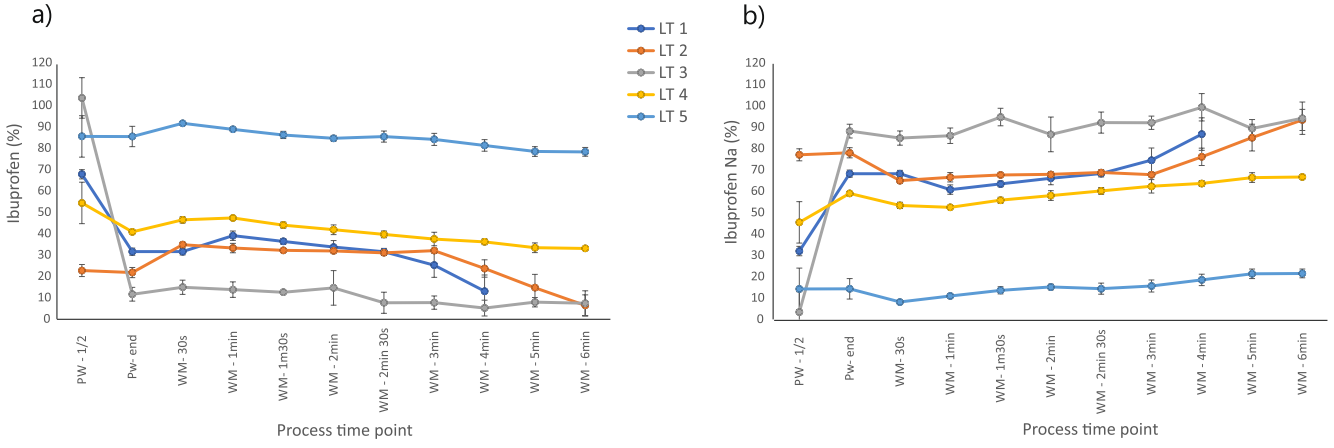


Fig. 6. Assay of ibuprofen (a) and ibuprofen sodium (b) during the wet granulation process (PW – powder wetting; WG – wet granulation).

Table 5
Quantity of ibuprofen and sodium carbonate and PLS model predictions of the API assay at the end of the granulation.

	LT 3	LT 2	LT 1	LT 4	LT 5	LT 6
Mass of						
Ibuprofen	111.11 g	111.11 g	111.11 g	111.11 g	111.11 g	111.11 g
Na_2CO_3	114.18 g	57.09 g	38.92 g	28.54 g	7.14 g	0.00 g
			Predicted content at the end of the granulation			
Ibuprofen sodium	99.65 %	93.91 %	85.12 %	81.77 %	17.97 %	–0.10 %
Ibuprofen	0.35 %	6.09 %	14.88 %	18.23 %	82.03 %	100.10 %

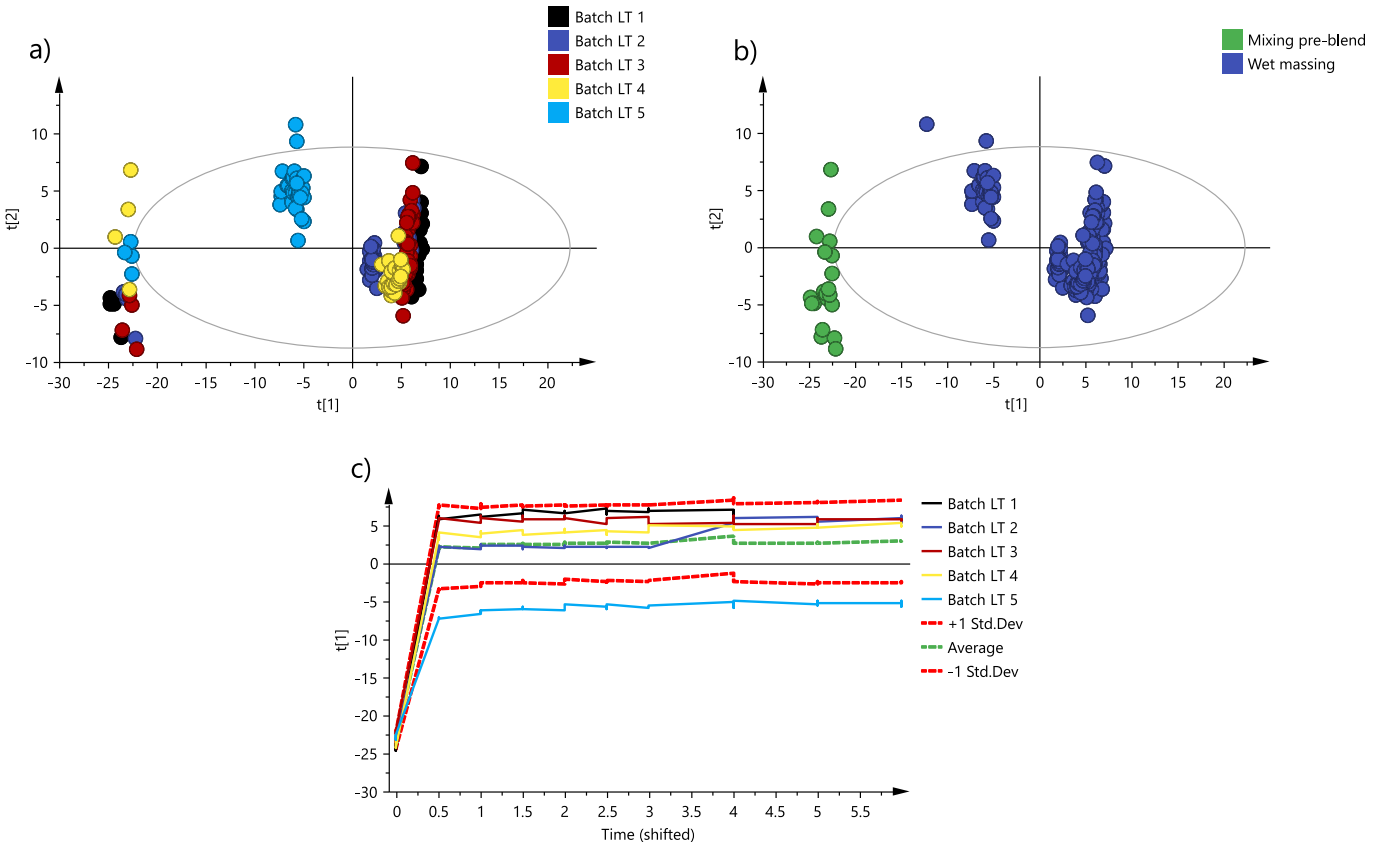


Fig. 7. BEM output: score scatter plot for the first two components colored according to batch (a) and process phase (b); Scores batch control chart (c) – the green dashed line represents average score line for all batches while the red dashed lines represent +/− 1SD of the average.

the wet granulation of LT 5, where the lowest quantity of sodium carbonate was added (7.14 g), the conversion process occurred with slow progress during the wet massing (WM) time, reaching a maximum level of 20 % at the end of the process (6 min).

In summary, the results of the parameter assay of active ingredients in produced granules determined by the developed PLS model, exhibit a strong correlation with the incorporated quantity of sodium carbonate for each laboratory trial (Table 5).

In order to analyze the specific NIR spectral output batchwise, a separate batch evolution model (BEM) was developed where the acquired NIR spectra (SNV transformed) where employed as independent variables, while the time points were considered as dependent variables.

The BEM score scatter plot reveals (Fig. 7 a and b) the distinctive process benchmarks (addition of water and ibuprofen to ibuprofen sodium conversion) as mainly described by the first component. As the process evolves, the first component scores are increasing, up to the point of the end of the ibuprofen conversion. The batch evolution line of LT 5 noticeably diverges (out of ±1 SD boundary of the average t1 score for all batches) from the rest of the lines describing the laboratory trials in the scores batch control chart (Fig. 7c). This is because only partial ibuprofen conversion was achieved in LT 5, thus giving specific NIR signature.

After drying and mixing with the extragranular components, tablets were produced from each laboratory trial. Subsequently, the experimental tablets underwent dissolution analysis, serving as an external test for the calibration model.

3.3.1. *Dissolution analysis*

The degree of transformation of ibuprofen into ibuprofen sodium at the end of the wet granulation process, predicted by the PLS model, and

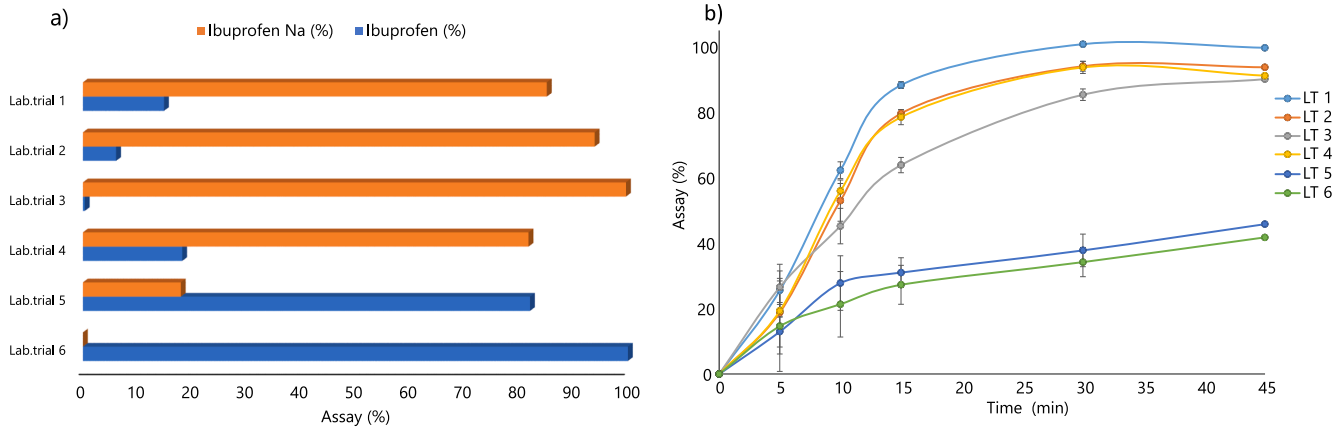


Fig. 8. Predicted quantity of each API form at the end of the granulation process (a) and the dissolution profile (b) of each laboratory trial.

the dissolution profiles of the tablets prepared from the appropriate batches are presented in Fig. 8a and Fig. 8b.

The dissolution profiles are in good agreement with the NIR-predicted concentrations of ibuprofen sodium (the trials with larger concentrations of ibuprofen sodium presented higher ibuprofen dissolution rates). These findings indicate that the proposed model serves as an excellent tool for monitoring the ibuprofen acid-salt transformation, determining the end-point of the reaction, and effectively controlling the wet granulation process.

4. Conclusion

The present study provides valuable insight into the potential implementation of process analytical technology for monitoring the wet granulation process. Both benchtop and portable NIR spectrophotometers were found suitable to understand and quantify the solid-state conversion of ibuprofen to ibuprofen sodium in the presence of sodium carbonate during the wet granulation process. In particular, the portable NIR probe demonstrated its suitability for in-line measurements during the transformation reaction when water is introduced into the process, as identified during model development. This method for quantitative, in situ monitoring of wet granulation processes with NIR enables collection of information on the extent of active pharmaceutical ingredient conversion in real time. Furthermore, it proves to be an indicator for target concentration and process end-point determination. In conclusion, such PAT tool could lead to a development of a simplified production process of ibuprofen sodium tablets with improved dissolution characteristics, achieved through the NIR monitoring of the transformation process of ibuprofen into ibuprofen sodium throughout the wet granulation production process.

CRediT authorship contribution statement

Elizabeta Atanaskova: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Veronika Angelovska:** Investigation. **Marina Chachorovska:** Formal analysis. **Natasha Anevska Stojanovska:** Writing – review & editing, Resources. **Gjorgji Petrushevski:** Writing – review & editing, Resources. **Petre Makreski:** Writing – review & editing, Formal analysis. **Nikola Geskovski:** Writing – review & editing, Supervision, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support granted by Ministry of Education and Science of the Republic of North Macedonia under the call No. 0815590/5: Project No. 15-15590/43.

References

[1] T.K. Giri, H.R. Badwaik, A. Alexander, D.K. Tripathi, Solubility enhancement of ibuprofen in the presence of hydrophilic polymer and surfactant, Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol. 1 (2) (2010) 793–800.

[2] P.M. Dewland, S. Reader, P. Berry, Bioavailability of ibuprofen following oral administration of standard ibuprofen, sodium ibuprofen or ibuprofen acid incorporating poloxamer in healthy volunteers, BMC Clin Pharmacol. 9 (2009) 1–10, https://doi.org/10.1186/1472-6904-9-19.

[3] D.R. Mehlisch, A. Ardia, T. Pallotta, A controlled comparative study of ibuprofen arginate versus conventional ibuprofen in the treatment of postoperative dental pain, J Clin Pharmacol. 42 (8) (2002) 904–911, https://doi.org/10.1177/009127002401102821.

[4] P. Black, M.B. Max, P. Desjardins, T. Norwood, A. Ardia, T. Pallotta, A randomized, double-blind, placebo-controlled comparison of the analgesic efficacy, onset of action, and tolerability of ibuprofen arginate and ibuprofen in postoperative dental pain, Clin Ther. 24 (7) (2002) 1072–1089, https://doi.org/10.1016/s0149-2918(02)80020-0.

[5] C. Alvarez, I. Núñez, J.J. Torrado, J. Gordon, H. Potthast, A. García-Arieta, Investigation on the possibility of biowaivers for ibuprofen, J Pharm Sci. 100 (6) (2011) 2343–2349, https://doi.org/10.1002/jps.22472.

[6] P. Gruber, Solubilized ibuprofen EP patent 2 559 430 A1, (2013), Bulletin 2013/08.

[7] C.W. Huck, C. Pezzei, V.A. Huck-Pezzei, J.D. Pallua, S.A. Schoenbichler, L. K. Bittner, G.K. Bonn, Near infrared spectroscopy patents for the physicochemical characterization of nanomaterials: The road from production to routine high-throughput quality control, Recent Pat. Nanotechnol. 6 (2) (2012) 135–141, https://doi.org/10.2174/187221012800270171.

[8] R. Deidda, P.Y. Sacré, M. Clavaud, L. Coic, H.T. Avohou, P. Hubert, E.M. Ziemons, Vibrational spectroscopy in analysis of pharmaceuticals: Critical review of innovative portable and handheld NIR and Raman spectrophotometers, TrAC Trends Anal. Chem. 114 (2019) 251–259, https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.035.

[9] J.B. Johnson, H. Farquhar, M. Ismay, M. Naiker, Infrared spectroscopy for the quality control of a granular tebuthiuron formulation, Eng 3 (2022) 596–619, https://doi.org/10.3390/eng3040041.

[10] C.P. Meza, M.A. Santos, R.J. Romañach, Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy, AAPS PharmSciTech 7 (2006) 29, https://doi.org/10.1208/pt070129.

[11] X. Wang, Q. Fu, J. Sheng, X. Yang, J. Jia, W. Du, Construction of a universal quantitative model for ibuprofen sustained-release capsules from different manufacturers using near-infrared diffuse reflection spectroscopy, Vib. Spectrosc 53 (2) (2010) 214–217, https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.03.002.

[12] M. Stojanovska Pecova, N. Geskovski, G. Petrushevski, P. Makreski, A novel method for rapid particle size analysis of ibuprofen using near-infrared spectroscopy, AAPS PharmSciTech 22 (2021) 268, https://doi.org/10.1208/s12249-021-02156-x.

[13] M. Preskar, K. Korasa, T. Vrbanec, D. Klement, F. Vrečer, M. Gašperlin, Applicability of Raman and near-infrared spectroscopy in the monitoring of freeze-drying injectable ibuprofen, Pharm. Dev. Technol. 47 (2021) 758–769, https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1934864.

[14] A.L. Pomerantsev, O.Y. Rodionova, Process analytical technology: a critical view of the chemometricians, J. Chemom. 26 (2012), https://doi.org/10.1002/cem.2445.

[15] O. Escuredo, M.S. Rodríguez-Flores, L. Meno, M.C. Seijo, Prediction of physicochemical properties in honeys with portable near-infrared (microNIR) spectroscopy combined with multivariate data processing, Foods (basel, Switzerland) 10 (2) (2021) 317, https://doi.org/10.3390/foods10020317.

[16] A. Becht, C. Schollmayer, Y. Monakhova, U. Holzgrabe, Tracing the origin of paracetamol tablets by near-infrared, mid-infrared, and nuclear magnetic resonance spectroscopy using principal component analysis and linear discriminant analysis, Anal. Bioanal. Chem. 413 (11) (2021) 3107–3118, https://doi.org/10.1007/s00216-021-03249-z.

[17] A. Porfire, D. Muntean, M. Achim, L. Vlase, I. Tomuta, Simultaneous quantification of simvastatin and excipients in liposomes using near infrared spectroscopy and chemometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 107 (2015) 40–49, https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.12.013.

[18] J.A. Lopes, P.F. Costa, T.P. Alves, J.C. Menezes, Chemometrics in bioprocess engineering: process analytical technology (PAT) applications, Chemom. Intel. Lab. Syst. 74 (2) (2004) 269–275, https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.07.006.

[19] A.P. Ferreira, M. Tobyn, Multivariate analysis in the pharmaceutical industry: enabling process understanding and improvement in the PAT and QbD era, Pharm. Dev. Technol. 20 (5) (2014) 513–527, https://doi.org/10.3109/10837450.2014.898656.

[20] J. Jr, L.W. Workman, Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy, (2nd ed.), CRC Press, 2012, https://doi.org/10.1201/b11894.

[21] H. Dalvi, A. Langlet, M.J. Colbert, A. Cournoyer, J.M. Guay, N. Abatzoglou, R. Gosselin, In-line monitoring of Ibuprofen during and after tablet compression using near-infrared spectroscopy, Talanta 195 (2019) 87–96, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.034.

[22] Y. Ozaki, Y. Liu, M.A. Czarnecki, I. Noda, FT-NIR Spectroscopy of some long-chain fatty acids and alcohols, Macromol. Symp. 94 (1) (1995) 51–59, https://doi.org/10.1002/masy.19950940106.

[23] J. Workman, Interpretive spectroscopy of near infrared, Appl. Spectrosc. Rev. 31 (2006) 251–320, https://doi.org/10.1080/05704929608000571.

[24] M. Schwanninger, J. Rodrigues, K. Fackler, A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components, J. Near Infrared Spectrosc. 19 (5) (2011) 287–308, https://doi.org/10.1255/jnirs.955.

[25] World Health Organization. Guideline on the use of near-infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations. EMA, 2009. https://www.ema.europa.eu/.

[26] United States Food and Drug Administration. (2004). Guidance for Industry, PAT-A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance. https://www.fda.gov/.

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 216 (2025) 114864

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejpb

Research paper

Novel development of lipid-based formulations: Improved wettability and homogeneous API solid dispersion visualised via near-infrared hyperspectral imaging☆

Elizabeta Atanaskova [a,b], Johannes Poms [c], Matthias Wolfgang [c], Carolina Alva [c,d], Nadia Mussner [c], Andreas Zimmer [d], Nikola Geskovski [a], Sharareh Salar-Behzadi [c,d,*]

[a] Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Technology, Majka Tereza 47, 1000 Skopje, Republic of North Macedonia
[b] Research and Development, Alkaloid AD, Blvd. Aleksandar Makedonski 12,1000 Skopje, Republic of North Macedonia
[c] Research Center Pharmaceutical Engineering GmbH, Inffeldgasse 13, 8010 Graz, Austria
[d] University of Graz, Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical, Technology and Biopharmacy, Graz, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:
Lipid-based formulation
Wettability
Near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI)
Chemometric modeling
Homogeneity analysis

ABSTRACT

Lipid-based formulations have been successfully applied to improve the aqueous solubility of active pharmaceutical ingredients (APIs), however, with the bottleneck of limited wettability of the system.

In this study, a lipid-based system was developed using polyglycerol ester of fatty acids (PGFA) as the main component and hexaglycerol (PG6) as a wetting agent. Felodipine, a BCS class II compound was selected as a model API. Two different temperatures (95 °C and 55 °C) were used to produce API loaded melt-casted samples, with and without PG6. Near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) was used as an advanced tool to evaluate and optimize felodipine dispersion in the lipid-based system.

The established NIR-HSI model demonstrated excellent linearity and accuracy (R^2Y = 80.999, RMSEC = 0.084) and acted as a powerful tool for screening and optimizing the API dispersibility. Applying 95 °C for producing melt-casted samples enhanced the molecular distribution of felodipine, drug amorphization and uniform dispersion within the matrix. Felodipine inhibited the crystal growth of the lipid. A concentration dependent API release (first order kinetics) was observed from all lipid-based formulations. The API release rate was affected by the lipid crystalline size, the wettability of the system and the type of solid dispersion of API in the lipid-based matrix.

Deep understanding of these parameters combined with the application of the novel and robust analytical tools such as NIR-HSI is necessary to pave the way of developing advanced lipid-based formulations with tailored API release.

1. Introduction

Over recent decades, the development of lipid-based formulations has garnered significant attention due to their potential to enhance the bioavailability of poorly soluble drugs [1–3]. Poor aqueous solubility is a challenge in pharmaceutical development, with nearly 40 % of new chemical entities exhibiting limited solubility, which hampers their therapeutic efficacy [4–6,7]. Lipid-based formulations offer flexibility in solubilizing of hydrophobic active pharmaceutical ingredients (APIs) within the lipid matrix, leading to increased apparent drug solubility and absorption from gastrointestinal tract (GIT), ultimately enhancing bioavailability.

However, a major limitation of lipid-based formulations is the poor inherent wettability, which can restrict the dispersion of the formulation in aqueous environments, affecting drug release and absorption. The hydrophobicity of the lipid matrix plays a crucial role in regulating water penetration, which in turn influence the drug release from such solid lipid formulations [8–10].

Previously, we introduced polyglycerol fatty acid esters (PGFAs) as a group of lipid-based excipients with versatile properties [11] and

☆ This article is part of a special issue entitled: 'Excipients' published in European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.

* Corresponding author at: Research Center Pharmaceutical Engineering GmbH, Inffeldgasse 13, 8010 Graz, Austria.
E-mail address: Sharareh.salar@rcpe.at (S. Salar-Behzadi).

https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2025.114864
Received 30 June 2025; Received in revised form 27 August 2025; Accepted 5 September 2025
Available online 6 September 2025
0939-6411/© 2025 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

reported on strong case studies for their application in pharmaceutical formulations [12,13]. PGFAs are hydroxyethers of glycerol, fully or partially esterified with fatty acids. Depending on the number of glycerol moieties, the partially esterified PGFAs exhibit characteristic interfacial properties due to their amphiphilic nature, which arises from combination of lipophilic fatty acid moieties and the hydrophilic polyglycerol backbone with free hydroxyl groups [11]. This group of excipients are a mixture of similar molecules, having the specific PGFA as the main component and minor fractions of polyglycerol monoesters and free polyglycerols. The ratio of minor fractions can be varied during the synthesis to fine-tune the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of the mixture. Thus, lipid-based formulations containing partially esterified PGFAs with tailored ratios of minor fractions possess better wettability compared to acylglycerols. The amphiphilic property facilitates the solubilization of hydrophobic APIs belonging to BCS class II and IV within the lipid matrix, while simultaneously disrupting intra-drug hydrogen bonds and providing hydrogen-bonding sites necessary for improving their water-solubility. To further improve wettability and dispersion, additional free polyglycerols as intrinsic compounds may be incorporated into the formulation. The presence of free hydroxyl groups changes the system polarity and further enhances wettability, effectively addressing the inherent poor aqueous dispersibility associated with conventional lipid excipients.

Modifying the polarity of the lipid system can improve molecular dispersion of the API and stabilize the amorphous state. Achieving a uniform amorphous distribution of hydrophobic API can significantly enhance solubility and dissolution rates compared to their crystalline counterparts, which exhibit a strong intermolecular interaction that hinder dissolution [14].

Ensuring uniform molecular distribution of API within the lipid-based matrix is essential for maintaining quality and performance of developed formulations. Hence, rapid and precise in-process analytical techniques are needed to ensure consistent product quality. Near-infrared spectroscopy (NIR), a fast and non-destructive analytical tool, has been widely employed across various pharmaceutical processes [15–18] and seems an ideal candidate for monitoring content uniformity. Its application has already proven beneficial in various dosage forms, including lipid nanoparticles [19], lyophilized liposomes [20], and solid dispersions [21]. However, while NIR provides valuable spectral information, it lacks the spatial resolution required to assess the distribution of components within heterogeneous samples.

Hyperspectral imaging (HSI), an emerging technology that combines spectroscopy and image formation, offers considerable advantages in this regard. The NIR-HSI technique merges the strengths of near-infrared spectroscopy with hyperspectral imaging, surpassing the capabilities of standard NIR. By integrating spectral and spatial data, NIR-HSI creates detailed chemical maps of a product's surface composition [22]. This enables a more comprehensive investigation of chemical components' concentration and spatial distribution within a sample. Thus, NIR-HSI is a powerful tool for visualizing heterogeneity in complex formulations, enhancing both in-process control and formulation optimization. Simultaneously, as a rapid and non-destructive method, it can provide real-time quality monitoring of pharmaceutical production processes.

The current study deals with the development of lipid-based formulations and focuses on determining the optimal ratio of polyglycerol esters of fatty acids (PGFAs), free polyglycerols (PGs), and the active pharmaceutical ingredient (API, i.e., felodipine) to achieve enhanced molecular dispersion and drug uniformity. A novel application of near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) is introduced as a direct in-process control technique to screen the homogeneity of API dispersed in the lipid matrix. The critical process parameters affecting product quality were optimized and verified using the developed and validated NIR-HSI method for API quantification and homogeneity analysis.

2. Material and methods

2.1. Materials

Tetraglycerol partial ester of palmitic and stearic acids with a melting onset at 50.4 ± 0.2 °C and hydrophilic-lipophilic balance (HLB) of 5.6 was used as lipid-based excipient. This molecule belongs to the polyglycerol fatty acid esters (PGFAs), is synthesized by IOI Oleo GmbH (Witten, Germany) and available as LipoGalen 1684. Polyglycerols (PGs) were externally added to the system to improve the wettability of lipid-based formulation. Di-, tri-, tertra, and hexaglycerol were used, which were also synthesized and provided by IOI Oleo GmbH. These polyglycerols will be termed in this work as PG2, PG3, PG4, and PG6, respectively. The active ingredient felodipine ($C_{18}H_{19}Cl_2NO_4$) was provided by AstraZeneca (Gothenburg, Sweden). Tetrahydrofuran (THF) was sourced from Fisher scientific (Loughborough, England), Dimethylsulfoxide (DMSO) from Supelco Merck KGaA (Darmstadt, Germany), 2-propanol – VWR International S.A.S. (Rosny-sous-Bois, France), Monobasic sodium phosphate – VWR International (Leuven, Belgium), Sodium phosphate dibasic – Honeywell (Seelze, Germany) and Sodium lauryl sulphate from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany). All reagents and materials used for analysis were of analytical grade and used as received.

2.2. Methods

2.2.1. Selection of lipid-based composition for loading felodipine

Different concentrations of PG2, PG3, PG4, and PG6 were added to the molten LipoGalen® 1684 to improve the hydrophilicity and hence the wettability of the composition. The miscibility was visually evaluated after preparation of the mixtures and potential phase separation was screened after storage under accelerated conditions (40 °C, 75 % relative humidity) for two weeks. In the presence of 10 $\%_{w/w}$ felodipine, only formulations with PG6 remained stable during accelerated storage, whereas formulations with the other PGs exhibited phase separation at lower concentrations. Therefore, the mixture of LipoGalen 1684 with 10 $\%_{w/w}$ PG6 was selected as a lipid-based system for loading felodipine.

2.2.2. Determination of the theoretical solubility of felodipine in lipid-based system via differential scanning calorimetry (DSC)

To quantify the solubility of felodipine in the lipid-based system of LipoGalen 1684 and 10 % PG6, DSC (DSC 204 F1 Phoenix, NETZSCH GmbH, Germany) was used. Concentrations of 10 %, 25 %, 50 %, 75 % of felodipine in lipid-based system, and 100 % of pure API were prepared. Approximately 10 mg of each sample was weighed into the pans and sealed with pierced lids. Samples were heated from 20 °C to 160 °C at a constant nitrogen flow rate of 50 mL/min and a heating rate of 2 K/min. Duplicate analyses were performed for each concentration. Thermogram analysis was carried out using NETZSCH Proteus® 80 software, version 8.0.1. Enthalpy of fusion (ΔHf) values against drug concentrations were plotted and extrapolated to $\Delta Hf = 0$ to estimate the drug's solubility in the lipid-based system [23–25].

2.2.3. Preparation of felodipine loaded lipid-based systems

Melt-casted samples of six different compositions were prepared by applying different temperatures and mixing time intervals, to investigate the homogeneity of mixtures, the solid state of lipid and API, and drug-lipid interactions as well as the changes of molecular state under different processing conditions. Mixing temperatures and exposure times were selected based on preliminary studies to avoid temperatures higher than 100 °C, with potential cause of API-lipid interactions and API degradation. Table 1 outlines detailed composition and preparation parameters.

Drug content uniformity of the melt-casted samples was analyzed via NIR-HSI analysis. Afterwards, samples were cryomilled to produce powder for further characterization. Cryo-milling was performed using a

Table 1
Composition and preparation parameters of felodipine formulations.

Experiment no.	Composition	Mixing temperature [°C]	Mixing time [min]
E1	10 % Felodipine + 90 % Lipids (10 % PG6 + 90 % LipoGalen 1684)	95	60
E2	10 % Felodipine + 90 % Lipids (10 % PG6 + 90 % LipoGalen 1684)	50–60	60
E3	10 % Felodipine + 90 % LipoGalen 1684 (0 % PG6)	95	60
E4	10 % Felodipine + 90 % LipoGalen 1684 (0 % PG6)	50–60	60
E5	10 % Felodipine + 90 % Lipids (10 % PG6 + 90 % LipoGalen 1684)	50–60	15
E6	10 % Felodipine + 90 % LipoGalen 1684 (0 % PG6)	50–60	15

Retsch CryoMill (Retsch GmbH, Germany) equipped with a 5 mL grinding jar and a 7 mm grinding ball. The process began with a 5-minute precooling phase to achieve the optimal grinding temperature, followed by three milling cycles of 1 min each at 25 Hz. A 30-second recooling interval with liquid nitrogen was applied between each milling cycle. The resulting powder was then sieved through a 250 μm sieve to obtain uniform particles from each sample for subsequent analysis of thermal behaviour and solid state via DSC and small- and wide-angle X-ray diffraction (SWAXD), particle size distribution analysis, and dissolution testing, as described below.

2.2.4. Analysis of felodipine loaded lipid-based systems

2.2.4.1. Differential scanning calorimetry (DSC). The thermal behaviour of the formulations was evaluated using a DSC 204 F1 Phoenix system (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Germany). Each formulation was analysed in triplicate by weighing approximately 5 mg of formulation powder into aluminium pans, which were then sealed with pierced lids. The DSC analysis involved a temperature-modulated (TM) and dynamic thermal program, consisting of two heating cycles from 20 °C to 180 °C at a heating rate of 2 K/min, with temperature oscillations of ±0.2 °C every 40 s during the modulated heating segments. A 3-minute isothermal hold at 180 °C was included between the heating and cooling cycles. Before the second heating curve, the sample was cooled dynamically to −20 °C at a rate of 2 K/min. Throughout the analysis the constant nitrogen flow of 50 mL/min was maintained. Thermogram analysis was performed using Netzsch Proteus software version 8.0.3 (NETZSCH-Gerätebau GmbH, Selb, Germany).

2.2.4.2. Small and wide-angle X-ray diffraction (SWAXD). Simultaneous small and wide-angle X-ray diffraction (SWAXD) analysis was performed using a high-flux laboratory SWAXS camera (Hecus S3-Micropix, Graz, Austria) equipped with a point-focus optics (FOX3D) and high-brilliance micro-beam delivery system operated at the power of 50 W (50 kV and 1 mA). The X-ray wavelength used was 1.542 Å, and the SAXD and WAXD spectra were recorded with two independent 1D-detectors (PSD-50, Hecus X-ray Systems, Graz, Austria) in the angular range of $0.06° < 82\Theta < 88°$ SAXS and $17° < 82\Theta < 827°$ WAXS. Powders obtained after the cryo-milling and sieving procedure were placed directly into the sample holder. Triplicates were performed at room temperature by exposing the samples for 1200 s to X-ray beam with a diameter of 200 μm. The diffraction pattern was analysed using a Gaussian function through classical least squares fitting in Origin Pro software (OriginLab, Northampton, MA).

2.2.4.3. Particle size distribution. Particle size distribution after cryo-milling and sieving was determined using the HELOS Laser Diffractometer (Sympatec GmbH, Germany). Each formulation was analyzed in triplicate using 1 g of each sample, employing a wet cell chamber with 50 mL volume and water as a dispersing media. A magnetic stirrer was placed in the water-filled cuvette and set to rotate at 1000 rpm. The cumulative particle size distribution (PSD) was obtained using Sympatec Windows software (Sympatec GmbH, Germany), and the volume mean diameter (VMD) d10, d50, d90, and SPAN values were used for comparison.

2.2.4.4. In vitro dissolution rate and drug release kinetics analysis. The dissolution behavior of the API from felodipine loaded lipid-based systems (E1 − E4), along with pure felodipine, was investigated using a pH 6.5 phosphate buffer with 1 % sodium lauryl sulfate (SLS), 500 mL as a dissolution medium as suggested in USP monography of felodipine extended-release tablets [26]. The dissolution apparatus 708-DS (USP Apparatus II with capsule sinker) with an automated sampling station 850-DS (Agilent Technologies, USA) was operated at a paddle stirring speed of 50 rpm. The appropriate quantity of powder from test formulations no. E1, E2, E3, and E4, equivalent to 10 mg of felodipine, and 10 mg pure felodipine powder, were encapsulated in HPMC VCaps® capsules, size 00, (Lonza Group AG, Basel, Switzerland). The amount of felodipine dissolved at 0.5, 0.75, 1, 2, 6, and 10 h was determined using six powder-filled capsules. An Ultra Performance Liquid Chromatograph (UPLC) Acquity H-Class (Waters Corporation, USA) was employed for the analysis, and the data were acquired using Empower® 3 software (Waters Corporation, USA). The exact method for quantifying felodipine content after dissolution is described in previous work by Afonso Urich et al. [27].

The dissolution data were further analysed for release kinetics using DDSolver software (a freely available add-in for Microsoft® Excel™, Microsoft Cooperation, Redmond, Washington, USA) [28]. The main-release kinetics models were applied, including Zero-order, First-order, Higuchi and Korsmeyer-Peppas models [29–31]. As a goodness-of-fit criterion coefficient of determination (R^2) of all models was used. The entire dissolution dataset for each formulation was used for the model fitting analysis, except for the Korsmeyer-Peppas model, where only the initial 60 % of the drug release was considered, as per model assumptions [30–34].

2.2.5. Development and validation of NIR-HSI calibration model for felodipine content analysis

2.2.5.1. Calibration samples. The calibration set of samples was composed of felodipine ranging from 0 % to 14 % (in 2 % steps), molecularly dispersed in the lipid-based system containing 10 % PG6 and 90 % LipoGalen 1684. The preparation involved melting the ingredients at 95 °C while continuously mixing with a magnetic stirrer. The mixing time was adjusted according to the amount of felodipine in each sample, with longer mixing times required for higher concentrations to ensure complete molecular dispersion within the matrix, as listed in Table 2. Complete solubilization is crucial for obtaining uniform samples for model development. Following the melting and mixing phases, samples were cast into silicon molds to form uniform round tablets with a diameter of 33 mm, a height of 5 mm, and an average mass of 4.5 g. Samples prepared in triplicates.

2.2.5.2. NIR-HSI image acquisition and model development. The hyperspectral data from the samples was acquired using the EVK HELIOS EC32 push-broom hyperspectral imaging camera (EVK DI Kerschhaggl GmbH, Austria). Near-infrared (NIR) spectra were collected via

Table 2
Mixing time of molten composition for preparing NIR-HSI calibration samples.

Concentration of felodipine	Mixing time
0 %	10 min
2 %	10 min
4 %	15 min
6 %	20 min
8 %	25 min
10 %	60 min
12 %	75 min
14 %	90 min

reflectance measurement in a spectral range of 992 nm to 1677 nm divided into 274 spectral channels with a 2.5 nm spectral resolution. Four halogen lamps provided the required broad-band illumination (focused on the line of sight), delivering a total illumination power of 850 W. The NIR-HSI sensor's acquisition rate was set to 497 fps. As the camera operates as a line-scan camera, the samples were placed on a movable horizontal linear stage and were moved to acquire spatially resolved surface maps. The images were captured with a lens aperture of 2.8. During image acquisition, the stage's movement speed was maintained at 8.6 cm/s for all experiments to guarantee quadratic pixel surfaces acquired. Each resulting data cube had spatial dimensions of 220 × 312 pixels with a pixel size of 30 μm × 30 μm. Data acquisition, image pre-processing, sample analysis for model development, validation, and experimental analysis were conducted using EVK SQALAR software.

Each sample of the calibration set was analyzed in triplicate and on both sides, resulting in a total of 48 hyperspectral data cubes used as the calibration dataset. Each pixel in these images represents an individual spectrum at a defined location [35]. To analyze the hyperspectral data, processing of the acquired multi-dimensional raw data is required [36]. A module for correcting defective pixels and spatial distortion inherently built into the sensor was used throughout the study [37,38]. Two pre-processing methods, normalization (min/max) and 1st derivative, were applied separately to the acquired data, and the resulting models were compared to select the most suitable pre-treatment procedure. The number of latent variables was optimized for each scenario, based on the amount of data explained by each variable to ensure the model's appropriate predictive ability and to maintain robustness. The performances of the models were evaluated using coefficients of determination (R^2X and R^2Y), the root mean square error of calibration (RMSEC), the calibration BIAS, and the standard error of calibration (SEC).

2.2.5.3. Model validation. Three independent validation samples containing 10 % felodipine were prepared using the same procedure employed for producing the calibration samples. Felodipine was molten at 95 °C and continuously stirred for 60 min until fully dissolved in the lipid matrix composed of 10 % PG6 and 90 % LipoGalen 1684. Each sample underwent a double-sided analysis using the NIR-HSI sensor. High-performance liquid chromatography (HPLC) was employed as a reference to compare the concentrations predicted by the NIR-HSI model with the actual felodipine concentrations in the validation samples.

Samples for HPLC analysis were prepared by removing 1 g of material from both the upper and lower surfaces of each melt-casted form using a laboratory knife. The API was extracted from the lipid-based system by dissolving the formulation in tetrahydrofuran (THF) and adding dimethylsulfoxide (DMSO) to precipitate the lipid. The solution was then diluted to 1 mg/ml with a 50:50 mixture of 2-propanol and monobasic sodium phosphate buffer solution. The supernatant was filtered through a 0.22 μm nylon filter before HPLC analysis.

Quantification was performed using an Agilent 1260 Infinity II LC System equipped with a Diode Array Detector (DAD) according to USP procedure for assay determination. The injection volume was adjusted to 2 μL, with UV detection of the analyte at 254 nm.

3. Results and discussion

3.1. Theoretical solubility of felodipine in pre-selected lipid-based formulation determined via DSC

Differential Scanning Calorimetry (DSC) is a well-established analytical technique that provides valuable insights into the thermal properties of compounds, allowing the precise determination of solubility and miscibility of components in various formulations. The use of DSC for solubility determination has been previously confirmed in multiple studies [23,39–42]. By analyzing the melting behaviour and thermal transitions of the components, DSC helps identify the solubility limits and compatibility within the lipid matrix.

The DSC analysis (Fig. 1) of the blank lipid-based system revealed a biphasic system with two endothermic melting peaks, a minor melting peak with an onset at approximately 45 °C, followed by the main melting endotherm with an onset at around 52 °C. The first melting peak corresponds to the intrinsic minor fractions of LipoGalen1684, while the second major peak corresponds to the main fraction, which is LipoGalen 1684 [43]. Both endothermic melting peaks were observed while heating the blank lipid as well as for experiments with concentrations of 10 %, 25 %, 50 %, 75 % of felodipine in the lipid-based system. These samples have a consistent baseline with no significant thermal events upon increasing temperature. In contrast, pure felodipine showed a distinct melting endotherm with an onset at 141 °C, accompanied by an enthalpy of fusion of 287.65 J/g, a value that differs from other studies [44–46] due to variations in measurement conditions.

The maximum solubility of felodipine in the lipid matrix was determined following the methodology first described by Theeuwes et al. [42]. This approach is a thermal method that measures the dynamic relationship between temperature and enthalpy, and it relies on the principle that the fraction of drug fully solubilized in the lipid matrix does not contribute to the melting endotherm of the remaining crystalline drug. By measuring the enthalpy of fusion (ΔHf) across blends with varying drug loadings and extrapolating to zero ΔHf, the theoretical maximum solubility of felodipine in the lipid matrix above its melting point was estimated. Please note that the estimated solubility reflects the fraction of drug that dissolves in the matrix during melting, since only the undissolved fraction contributes to the melting endotherm. The solubility corresponds to the melting temperature, as the relatively slow heating rates in standard DSC protocols allow drug molecules to detach from the crystalline lattice and dissolve into the lipid. While this temperature is higher than typical production conditions, it provides a reliable upper limit for API incorporation.

As the concentration of felodipine in the lipid-based system increased, the magnitude of the melting endotherm also grew, because of decreased concentration of dissolved felodipine in the lipid base. By plotting the enthalpy of fusion (ΔHf) against drug concentration and extrapolating to where ΔHf is zero (Fig. 2), the maximum solubility of felodipine above its melting temperature in the lipid matrix was determined to be 14 %, which was then selected as the upper concentration limit for formulation and NIR-HSI model development.

3.2. Development and validation of NIR-HSI calibration model for felodipine content analysis

The calibration dataset consisting of 48 individual hyperspectral images of samples prepared with a concentration of felodipine in the range from 0 % to 14 % was used for NIR-HSI model development, as described in the Methods section. Regions of interest of approximately 10,000 pixels from each tablet surface were selected, and average spectra were obtained from each image. Fig. 3a represents the original spectral profiles of the calibration data set. Spectral data pre-treatment is often necessary to enhance prediction performance and minimize

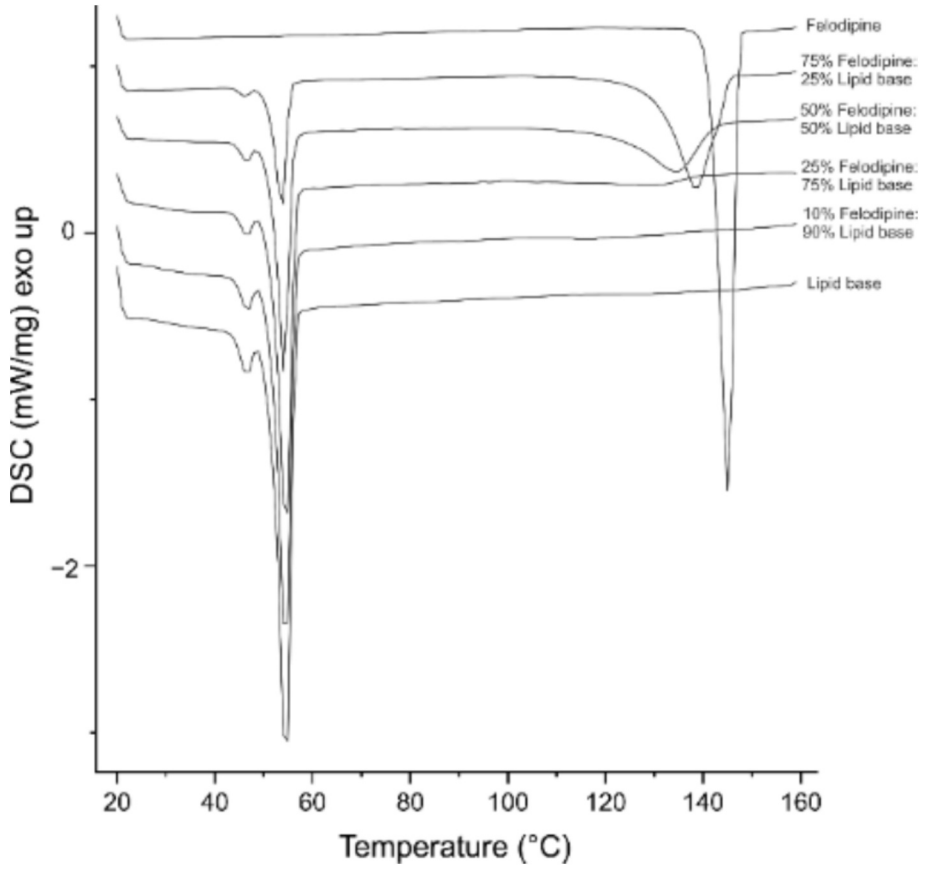


Fig. 1. Differential scanning calorimetric data for Felodipine, physical mixtures of 75 %, 50 %, 25 %, 10 % Felodipine:Lipid base and Lipid base (LipoGalen 1684: PG6 (9:1 w/w)).

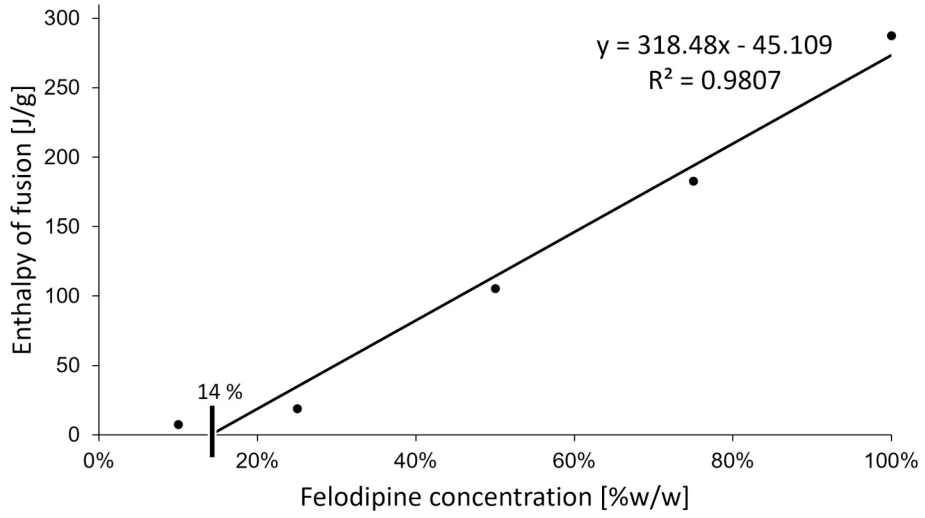


Fig. 2. Plot of enthalpy of fusion (ΔHf) vs. felodipine concentration, extrapolated to ΔHf zero; maximum solubility (14 %) of felodipine in LipoGalen 1684:PG6 (9:1 w/w).

baseline offset differences between spectra, which can arise from light scattering, path length variations, and random noise during data acquisition [47]. Two spectral preprocessing techniques, min–max normalization, and first derivative transformation, were applied independently to the calibration dataset. Using a min–max normalization, the spectral data is normalized by first determining the 'maximum' and 'minimum' intensity values within each spectrum. Subsequently, the spectra are scaled, fitting the determined dynamic boundaries. This approach preserves the original relationships between the data values [48,49]. Fig. 3b shows the result of applying a normalization filter to the calibration data set.

A first-derivative spectrum is often used for quantitative chemical imaging to illustrate the spectral slope (the rate of change of absorbance with respect to wavelength), represented in units of absorbance per nanometer, against the wavelength [50]. Applying derivative spectra enables the removing of baseline offset and slope effects in spectra to

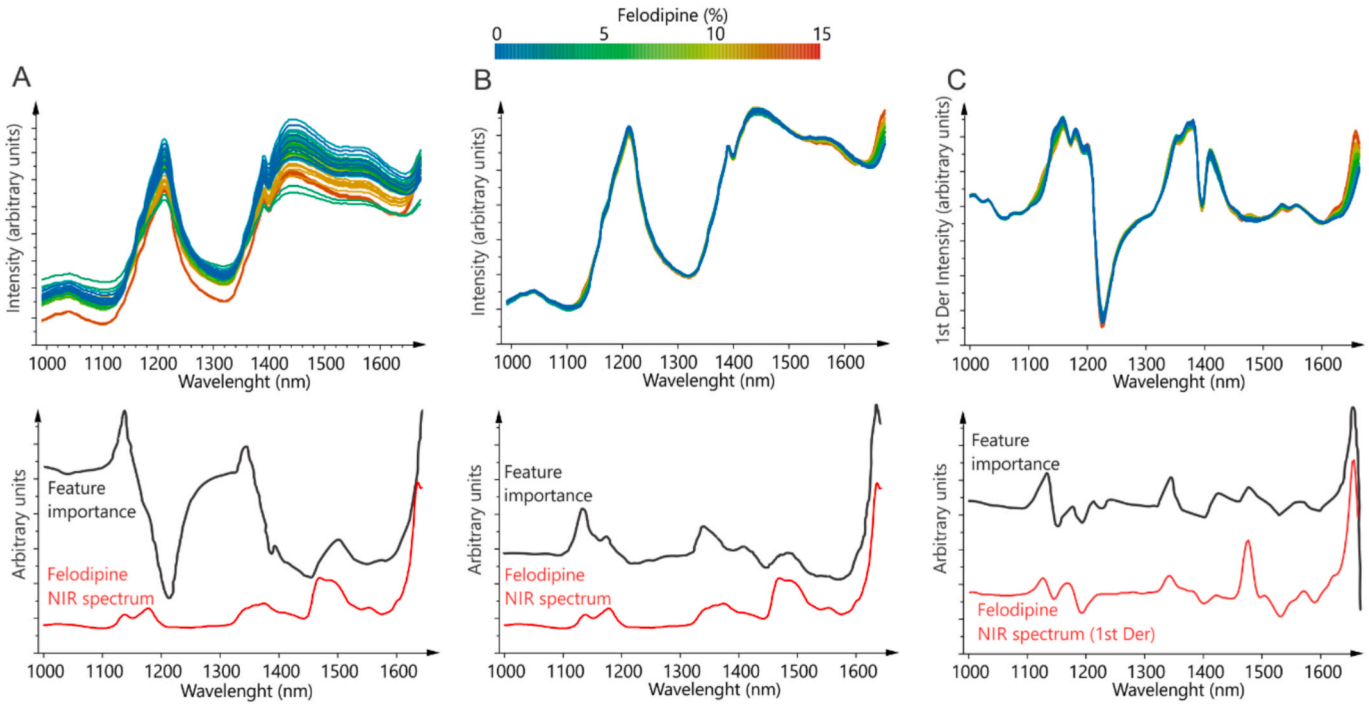


Fig. 3. Plots of NIR-HSI calibration set spectra (upper panel) and feature importance plot and corresponding felodipine NIR spectrum (lower panel) from: original spectral data model (a), min/max normalized spectral data model (b), and 1st derivative pre-processed spectra model (c).

enhance localized spectral features. Using this preprocessing feature, the kernel length (i.e., the number of consecutive data points averaged to produce each point in the filtered signal) was properly selected in order to avoid "smoothing over" finer spectral band features [51]. In this study, 1st derivative with a kernel length of 7 was used. Fig. 3c represents the 1st derivative pre-processed spectra.

According to the highest peaks of the feature curve (black line, lower panel in Fig. 3), the regions 1120–140 nm, 1320–1350 nm and the band at 1650 nm showed significant differences between the obtained spectral data depending upon the concentration of felodipine in the sample. The range between 1120–1140 nm represents the second overtone of the infrared active CH stretch of the benzene ring present in the felodipine molecule [52]. The range around 1300 nm is as well specific for C–H from aromatic hydrocarbons, while the band ~1650 nm corresponds to the first overtone of C–H stretching vibrations [53]. Thus, the feature importance curve highlights the previously mentioned NIR regions as a highly correlated with the felodipine content, making them crucial for the predictive performance of the models.

Comparing the models' performance metrics, revealed that 1st derivative provided superior results. The model developed using derivatized spectral data exhibited better predictive performance and slightly higher coefficients of determination (R2X and R2Y), along with lower RMSEC and SEC values as summarized in Table 3. The R2 value of 0.99 indicates excellent explanatory power, and the RMSEC of 0.09 reflects the model's high predictive accuracy, while the low calibration BIAS and SEC values underscore its precision.

Table 3
Performance metrics of NIR-HSI calibration models using different preprocessing methods.

	Model 1	Model 2
Preprocessing	Min/Max normalization	1st derivative
Number of LVs	2	2
R^2X	0.993	0.999
R^2Y	0.993	0.999
RMSEC	0.386	0.084
BIAS	0.0002	0.0016
SEC	0.391	0.085

By assigning specific wavelength ranges from the near-infrared spectrum to the red, green, and blue (RGB) channels, complex spectral information can be converted into colour images [36]. The chemical images of the calibration data set are presented in Fig. 4. Background segmentation was achieved using a threshold-based approach, which removed noise spectral signals weaker than the set threshold of 800 a.u.

The heat map presented in the study uses a colour code to indicate the concentration of felodipine within the samples. A gradient from blue to red represents the API distribution from 0 % to 14 %. This visual tool facilitates an intuitive understanding of API concentration across the sample surface. In the concentration-mapped images generated by the model using derivatized spectral data (Fig. 4b), the uniform colour distribution confirms the effective elimination of light scattering effects. These scattering effects resulted in nosier spectra as the result of the physical distortions induced by slight curvature at the sample edges and typically observed as different colour regions in images produced by the model utilizing a normalization filter (Fig. 4a). The derivatized spectral data model successfully mitigates these distortions, providing a more accurate and consistent representation of API concentration across the sample surface compared to the normalization filter approach.

To evaluate the predictive accuracy, the models were validated by analyzing a completely independent external validation set of samples. The predicted felodipine concentrations by both models were compared to the practically measured concentrations via HPLC analysis (see Fig. 5). The findings reveal that the model employing the first derivative preprocessing method achieved a lower relative standard deviation and provided more accurate determinations that closely matched the HPLC results. These results underscore the superiority of the first derivative model.

3.3. NIR-HSI analysis of laboratory experiments

The developed NIR-HSI felodipine quantification model based on the 1st derivative pre-processed spectral data was implemented to analyse felodipine content in different formulations. The study included the developed lipid-base felodipine formulation composed of 10 %

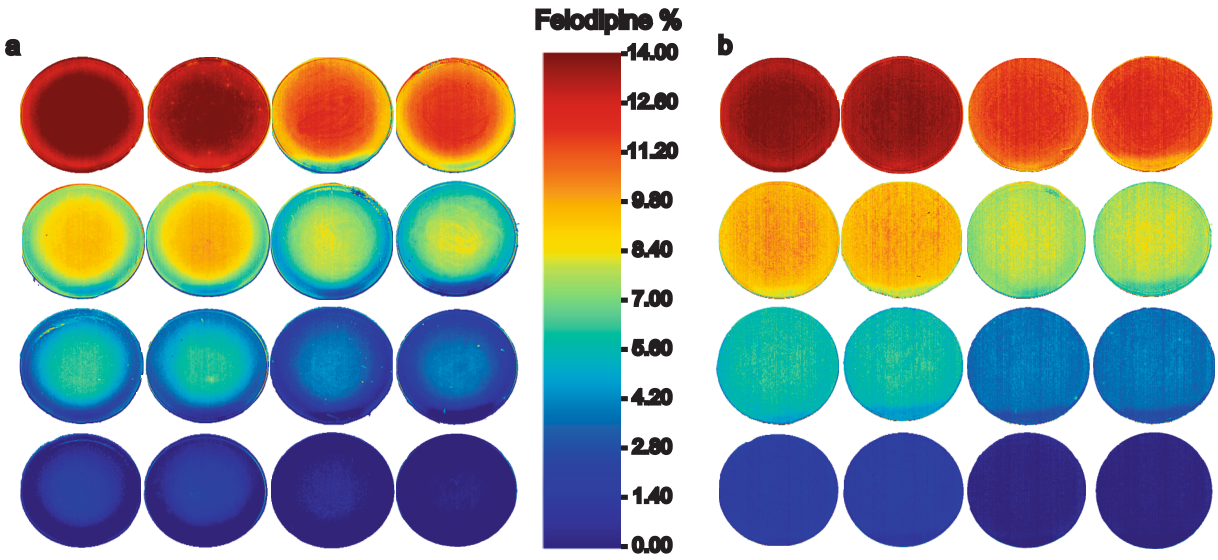


Fig. 4. Concentration-mapped images of felodipine: comparison of the normalized (a) and derivatized (b) calibration data set.

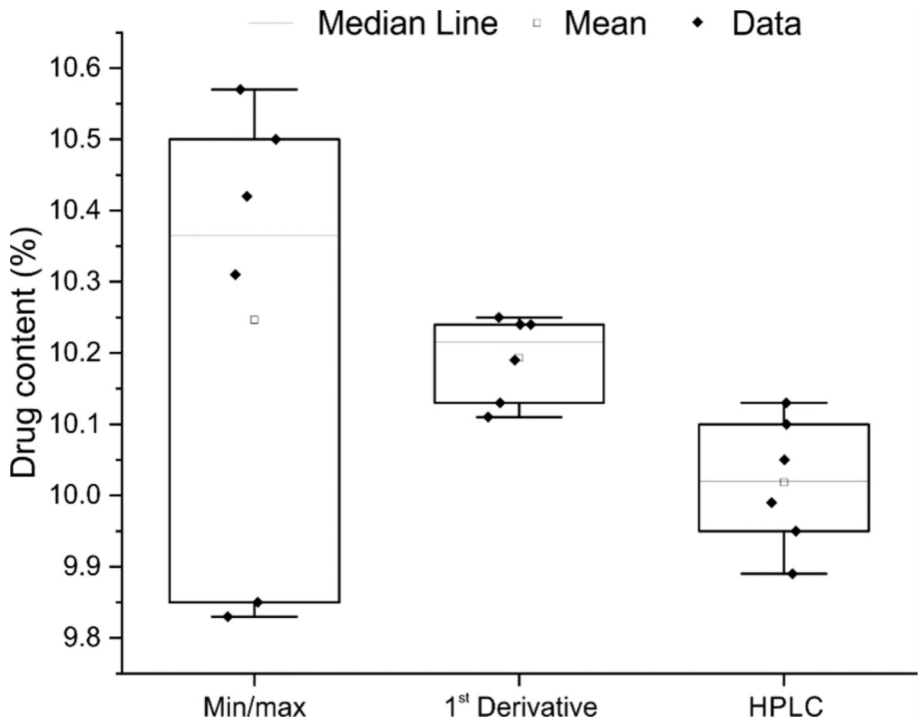
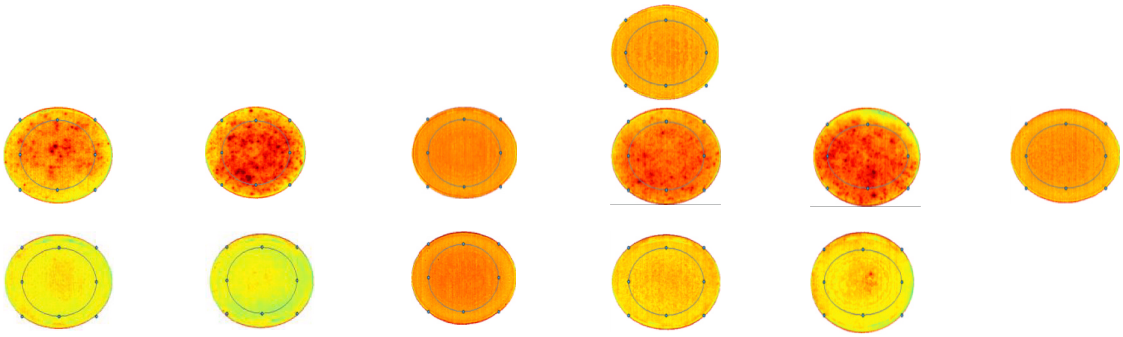
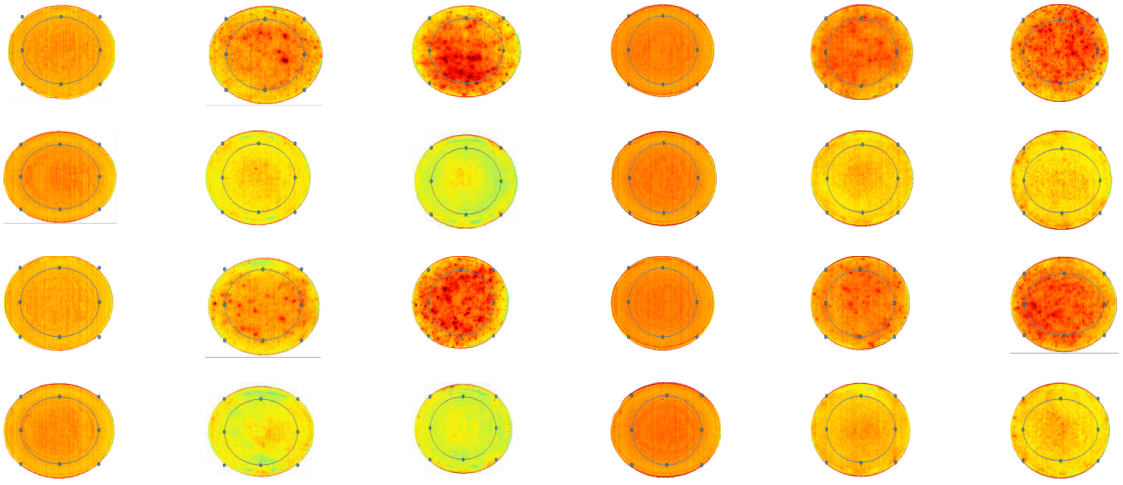


Fig. 5. Comparison of felodipine concentrations predicted by NIR-HSI models developed with min/max normalization and 1st derivative filters versus values obtained HPLC measurements. The box represents the interquartile range (IQR − 25th to 75th percentile) of the data, while the error bars extend ± 1.5 times the IQR.

felodipine and 90 % lipids (containing 10 % PG6 and 90 % LipoGalen 1684) and formulation with 10 % felodipine and 90 % LipoGalen 1684 (without PG6). Table 4 shows the concentration-mapped NIR-HSI images of each sample representing the distribution of the felodipine within the lipid-based formulations under different experimental conditions. These visual representations allow assessing the dispersion of felodipine within the lipid matrix under different conditions. A longer mixing time generally leads to a more uniform distribution of felodipine, as evidenced by the more consistent colour patterns in the heat maps for experiments mixed for 60 min compared to those mixed for only 15 min. Additionally, there is a more evident difference between the felodipine concentration in both sample sides when mixing is performed at lower temperatures. The higher mixing temperature of 95 °C, as used in experiments E1 and E3, enhances the molecular distribution of felodipine compared to the 50–60 °C used in the other experiments. This improvement in distribution is due to the increased solubility of felodipine at higher temperatures, which facilitates the uniform dispersion of the active ingredient within the melted lipid matrix.

In contrast, when samples prepared by mixing for only 15 min at 50–60 °C, localized areas of higher felodipine concentration (intensive red colour) can be observed. These hotspots result from insufficient mixing time, which does not allow enough time for felodipine to be evenly dispersed and dissolved within the lipid matrix, leading to areas where the API remains concentrated. Consequently, combining a shorter mixing time and lower temperature can lead to inadequate mixing and the formation of localized areas with higher API concentrations.

Table 4
NIR-HSI analysis of felodipine distribution in lipid-based formulations: experimental results.

Experiment	E1	E2	E5	E3	E4	E6
Mixing time	60 min	60 min	15 min	60 min	60 min	15 min
Mixing temperature	95 °C	50–60 °C	50–60 °C	95 °C	50–60 °C	50–60 °C
Composition	10 % Felodipine + 90 Lipids (10 % PG6 + 90 % LipoGalen 1684)			10 % Felodipine + 90 % LipoGalen 1684 (0 % PG6)		
Sample 1						
Sample 2						
Sample 3						

The concentration of felodipine within the samples predicted by the NIR-HSI-developed model were compared with those determined by the HPLC analysis (Fig. 6). The results indicate that the felodipine homogeneous distribution varies depending on the preparation method and the lipid composition. Specifically, under the 60-minute mixing at 95 °C condition, NIR-HSI yielded an average felodipine content of 10.15 % for the formulation with PG6 and 10.49 % for the formulation without PG6, while HPLC reported 11.56 % and 11.24 %, respectively. The relative standard deviation of NIR-HSI results was notably lower at 95 °C (1.45 % and 0.61 %) compared to lower temperatures and shorter mixing times, where variability increased to 16.58 % for the formulation with PG6 and 9.73 % for the formulation without PG6. Additionally, the evident difference in the concentration of felodipine in both sample sides is observed when the mixing is performed at 50–60 °C.

In conclusion, the NIR-HSI results indicated improved uniformity of felodipine distribution under prolonged and higher-temperature mixing conditions (E1 and E3), suggesting that both the mixing temperature and mixing duration significantly influence the homogeneity of felodipine within the formulations.

Due to pronounced variability in API distribution across both sides of the sample in experiments E5 and E6, only the samples exhibiting consistent API variation (E1–E4) were considered relevant for further studies. Those samples were cryomilled to obtain a powder and subsequently filled into capsules to investigate API release from the lipid-based matrix, as well as its correlation with sample preparation and API solubilization within the matrix. Thermal behaviour and solid-state of samples were screened after cryo-milling, to consider any potential impact of the cryomilling on API crystallinity.

3.4. Thermal behaviour and solid-state of cryomilled samples

The DSC thermogram presented in Fig. 7 provides valuable insights into the thermal behaviour of pure felodipine compared to various lipid-based formulations (E1–E4). As previously described, the biphasic melting behaviour of the lipid-base components and the resulting experiments, could be observed. The sharp endothermic peak with an onset at 141 °C in DSC thermogram of pure felodipine, is a clear indicator of the pure drug's crystalline structure. The DSC curves for the lipid-based formulations (E1-E4) exhibit a complete absence of this endothermic peak, due to solubilizing of felodipine in the system. The Glass transition temperature of amorphous felodipine is reported at approximately 45 °C [54], which was not detectable in the thermograms (Fig. 7), most probably due to overlapping with melting signal of lipid minor fractions at the same range of temperature.

To confirm the observations of the DSC analysis, small- and wide-angle X-ray diffraction (SWAXD) was employed to analyse the cryomilled formulations.

The wide-angle X-ray diffraction (WAXD) patterns for all experiments (Fig. 8) revealed a dominant peak corresponding to the hexagonal subcellular arrangement (H, α-form) of PG4-C16/C18 [11]. Notably, no changes were associated with different mixing temperatures across the experiments, indicating that the lipids maintained a stable sub-cell arrangement even after higher production temperatures. The stable sub-cell arrangement of PGFAs is extensively described in [11].

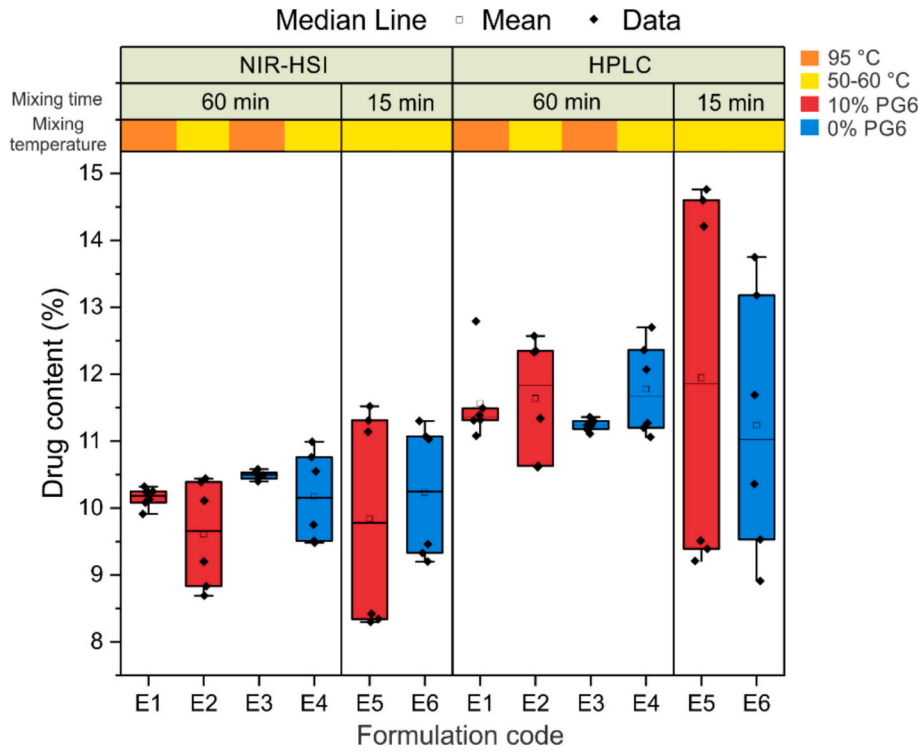


Fig. 6. Comparative NIR-HSI and HPLC analysis of felodipine content in lipid-based formulations with different preparation methods (E1-E6). The box represents the IQR of the data, while the error bars extend ± 1.5 times the IQR.

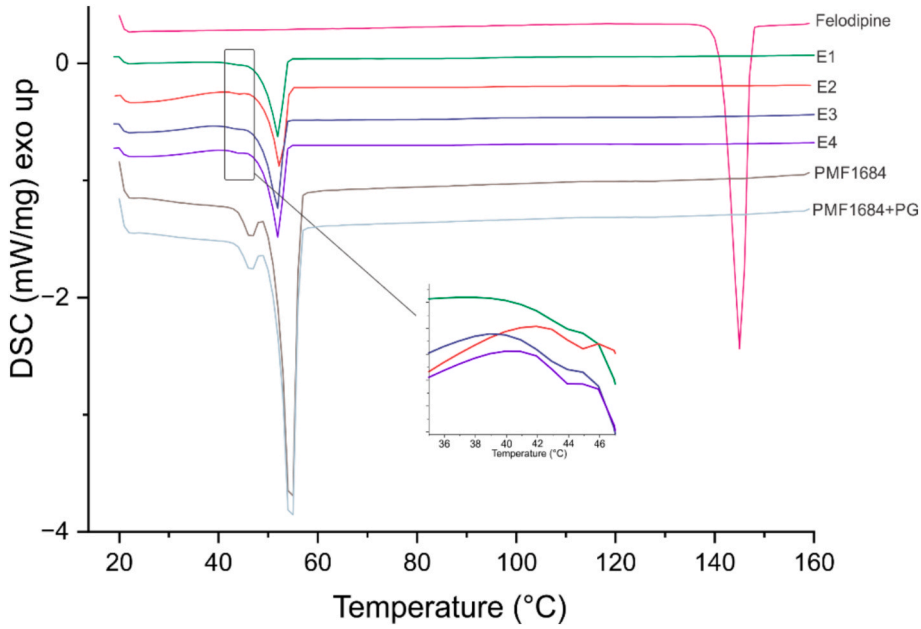


Fig. 7. DSC thermogram of pure felodipine API and lipid-based formulations (E1-E4) along with lipid base components (LipoGalen1684 and LipoGalen1684 + PG6); The zoomed region around 50° depicts the first melting endotherm of the lipid components.

Although no signs of residual crystallinity were visible in any thermograms (Fig. 7), WAXD analysis of experiments E2 and E4 revealed an additional peak characteristic of crystalline felodipine. This indicates the presence of residual crystalline drug in those samples prepared at 50–60 °C. The discrepancy between DSC and SWAXD data may be attributed to the limited sensitivity of the DSC technique and potential thermal effects during the heating cycle, which can induce solubilization of trace amount of residual crystalline API. Furthermore, the high glass forming ability and the glass stability of felodipine, as reported by Baird et al. [12], inhibit crystal growth during both cooling and heating phases of DSC analysis. As a result, small crystalline domains, if present, may not produce detectable thermal signal, leading to an underestimation of crystallinity by DSC.

WAXD analysis of experiments E1 and E3, which were prepared at a mixing temperature of 95 °C, showed no additional peaks (E3) or peaks with very low intensity (E1) associated with the drug's crystalline form.

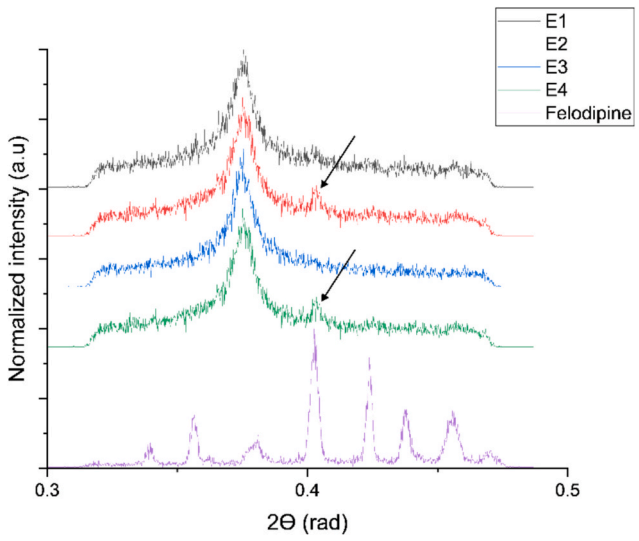


Fig. 8. WAXD pattern of felodipine active ingredient and experiments E1-E4.

This suggests that a significant portion of felodipine underwent amorphization in these formulations. The finding aligns with the NIR-HSI analysis, which indicated different drug distribution within these samples, and is also consistent with literature reports [55].

The lipid crystal long-spacing was determined in the small region and revealed the lamellar configuration of LipoGalen 1684 in all samples, based on the harmonic peaks at integer ratios to the main peak. This configuration is typical for acylglycerols and it was also previously reported for PGFAs [11]. Lamella and crystalline thicknesses were calculated by applying Bragg's law and Scherrer equation, respectively, as described in [11] and listed in Table 5.

As shown in this table, no lamella elongation was observed in melt casted LipoGalen 1684 by adding API and/or PG6, for the lamella thickness (d) of melt casted pure lipid and samples E1 to E4 were consistent around 6 nm. This indicates that neither PG6 nor felodipine molecules were deposited in the crystal lattice of lipid. The number of stacked lamellae and resulted crystalline size (D), however, was affected by both applied temperature and adding felodipine and PG6. It is generally claimed that lipophilic additives with chemical dissimilarity with the lipid are potentially good candidates for delayed nucleation and crystal growth of the lipid [56,57]. According to this theory, considering felodipine and PG6 as additives, it can be expected that felodipine has a higher potential for acting as crystallization inhibitor compared to PG6. Generally, the reduced crystalline size of E1 to E4 samples compared to pure lipid can be due to the existence of felodipine. Its prominent role as crystal growth inhibitor is clearer by considering the effect of temperature as a stress factor [58]. The crystallite sizes of E2 and E4 samples prepared at 55 °C were similar and significantly lower than the crystallize size of pure melt-casted lipid (15.71 and 15.16 nm, for E2 and E4, respectively, resulted by stacking of two lamellae). Applying higher temperature of 95 °C for producing E1 and E3 samples, resulted in a higher nucleation rate and crystallite size of E1 sample with a difference of just one lamella in crystallite thickness compared to pure lipid (six stacked lamellae resulting in the crystallite size of 33.91 nm for E1 compared to 7 stacked lamellae for pure lipid). In contrast, E3 sample which was prepared at same temperature but consisted of just felodipine and lipid had a significantly slower nucleation rate. Crystallite size of lipid in E1 to E4 samples was aligned with the rate of felodipine release from matrix.

Table 5
Mean crystallite size, thickness of lamellae and number of lamellas determined by SAXD analysis of the melt casted (MC) LipoGalen 1684 and samples E1 – E4.

Sample	Mean crystallite size – D [nm]	Thickness of lamellae [nm]	No. of lamella
MC LipoGalen 1684	43.63 ± 3.29	6.28 ± 0.07	7
E1	33.91 ± 2.9	6.15 ± 0.01	6
E2	15.71 ± 0.22	6.29 ± 0.0	2
E3	7.82 ± 0.28	6.21 ± 0.10	1
E4	15.16 ± 0.42	6.22 ± 0.0	2

3.5. API release from lipid-based matrix

A comparative dissolution study was conducted on encapsulated cryo-milled felodipine powder from experiments E1-E4 and pure felodipine, filled into size 00 capsules. Overall, under same cryomilling conditions, obtained powders exhibited a narrow range of size distribution between a d90 of 140 μm to 191 μm, allowing a straightforward comparison of dissolution performance.

The obtained particle size distributions of samples E1-E4 after cryomilling are listed in Table 6.

Release profile of pure felodipine and the embedded felodipine in lipid matrix during 12 h of dissolution testing are shown in Fig. 9.

Felodipine, a BCS class II drug, due to its hydrophobic nature and poor wettability, exhibits poor aqueous solubility (approximately 2 mg/L in pH 6.8 at 37 °C) [54,59].

Selection of 10 mg pure felodipine or amounts of cyomilled powder equivalent to 10 mg of felodipine was based on providing the dissolution test for pure API under sink conditions, and selecting the API loaded powder equivalent to available extended release felodipine tablets in the market.

The dissolution of pure felodipine in sink condition, showed a gradual increase, reaching only a maximum of 70 % after 10 h despite the presence of SLS in dissolution medium. In contrast, all lipid-based formulations demonstrated significantly improved dissolution performance, presenting a steep slop of API release rate after one hour and achieving 90 % to 100 % dissolution of felodipine in the same conditions at 12 h. During the first two hours, all formulations exhibited two significant linear drug release (after 30 min and 2 h), followed by a gradual or controlled release from the lipid-base. This burst release of API is typical for pulverized matrices with high surface area, resulting in easier diffusion of medium through the matrix [54,60,61].

Further, to describe the drug release kinetics, cumulative percentage drug release data were fitted to several models, including Zero and First order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas models. Table 7 summarize the models' parameters and their coefficients of determination (R^2).

The first order and Korsmeyer-Peppas models provided a better fit for all lipid-based formulations (E1–E4), compared to zero-order and Higuchi models. The release exponent (n) from the Korsmeyer-Peppas equation was >0.89, indicating a non-Fickian diffusion model. These results are aligned with the API release from the complex lipid-based matrices. The drug release from the cryomilled powder could be mainly governed by the concentration gradient by the fast exposing of not embedded API to the medium and erosion of the lipid matrix.

Table 6
Comparative particle size metrics across the experiments.

Experiment	E1	E2	E3	E4
No of observations	3			
Parameter	Results			
VMD	89 μm ± 13 μm	82 μm ± 12 μm	75 μm ± 4 μm	80 μm ± 3 μm
d10	7 μm ± 2 μm	6 μm ± 3 μm	10 μm ± 7 μm	7 μm ± 1 μm
d50	74 μm ± 12 μm	69 μm ± 11 μm	68 μm ± 3 μm	57 μm ± 7 μm
d90	191 μm ± 22 μm	179 μm ± 22 μm	140 μm ± 13 μm	190 μm ± 15 μm
SPAN	2.5 ± 0.1	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.3	3.3 ± 0.8

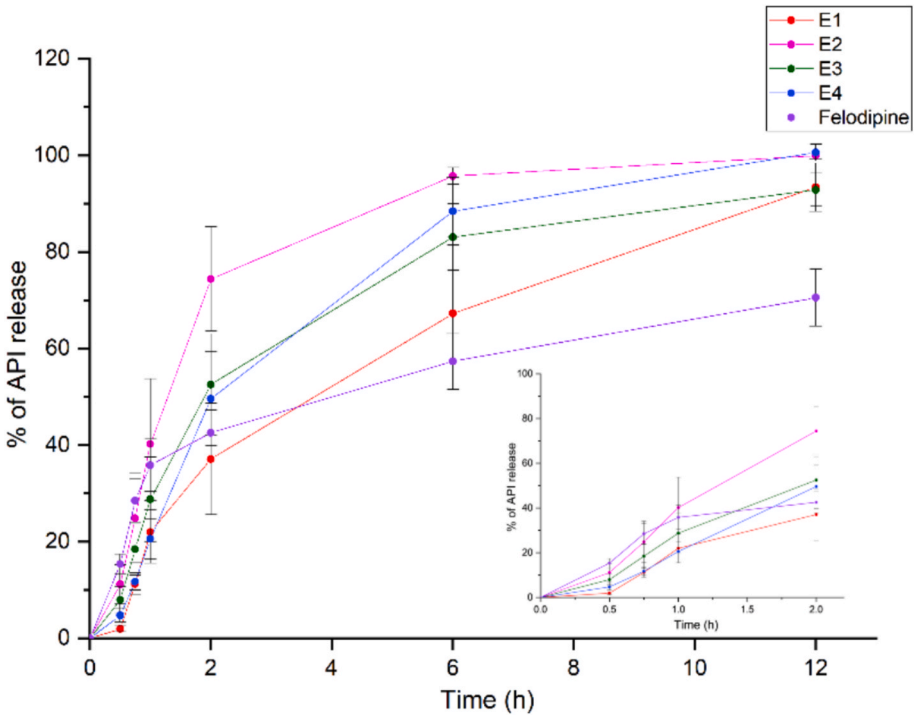


Fig. 9. Dissolution of felodipine in pH 6.5 phosphate buffer with 1% SLS: comparison of cryo-milled formulations (E1-E4) and pure felodipine; The zoomed region depicts the slope of felodipine dissolution during the first two hours.

Table 7
Models' parameters with Coefficients of determination (R^2).

Formulation	Zero order		First order		Higuchi model		Korsmeyer-Peppas		
	k_0	R^2	k_1	R^2	k_H	R^2	k_{KP}	n	R^2
E1	8.77	0.87	0.20	0.99	25.78	0.93	16.70	1.19	0.91
E2	10.69	0.42	0.51	0.97	33.95	0.80	40.43	1.79	1.00
E3	9.49	0.66	0.32	0.99	29.20	0.91	25.14	1.09	0.97
E4	10.06	0.78	0.29	0.98	30.08	0.90	18.50	1.43	0.99
Felodipine	7.21	0.21	0.19	0.65	23.20	0.79	30.52	0.37	0.89

Diffusion of dissolution medium through the lipid matrix and erosion are governed by the degree of lipid crystallinity, the surface area and the wettability of the system among others.

WAXD, NIR-HSI and content assay results showed in complete alignment the better API solubilization and its homogeneous distribution in the matrix of samples E1 and E3. Although almost a complete API release was achieved after 12 h for all samples, the flattest slope of release rate was observed for sample E1. This can be explained by larger lipid crystallite size in this sample, together with the solubilization and homogeneous distribution of API in the lipid- PG6 matrix, resulting in complete surrounding of solubilized API in the lipid. The consequent is retarding the diffusion of medium through the matrix and reaching the molecularly dispersed API. This phenomenon has been also reported by others [61]. In contrast, sample E2 consisting of a mixture of solubilized and crystal disperse API embedded in the matrix of lipid with small crystallite size and PG6 showed the fastest API release rate. In this sample, PG6 can easier act as wetting agent and accelerate the diffusion of medium in the matrix of lipid with small crystallite size. The non-uniformly distributed API, probably in crystalline disperse form, released primarily by dissolution, while the fraction of drug molecularly dispersed into the lipid-base is subsequently released through erosion of lipid. API release rates from sample E3 & E4 (both with small lipid crystallite size) were slower than sample E2, maybe due to the absence of PG6 as wetting agent and the complete embedding of solubilized API in lipid in the case of sample E3.

4. Conclusions

This study provides a deep understanding on the behaviour of lipid-based matrices, the effect of wetting agents and process conditions on the homogeneous distribution of API in the lipid-matrix and the solid-states of lipid and API. The knowledge can be used to develop advanced lipid-based formulations, with tailored API release by providing solid dispersions and design the degree of lipid crystallinity and wettability.

Near-infrared hyperspectral imaging (NIR-HSI) was implemented for the first time as a novel tool to assess drug content homogeneity within lipidic formulations. We have shown that the method can be successfully used as a robust process analytical technology (PAT) tool for pharmaceutical development, particularly in ensuring consistent product quality of lipid-based systems. Its advantages, including cost-effectiveness, non-destructive nature, operational simplicity, and the ability to deliver rapid, real-time insights, position NIR-HSI as a valuable tool for process monitoring and optimization.

CRediT authorship contribution statement

Elizabeta Atanaskova: Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Johannes Poms:** Writing – review & editing, Methodology, Conceptualization. **Matthias Wolfgang:** Writing –

review & editing, Methodology, Conceptualization. **Carolina Alva:** Writing – review & editing, Methodology, Conceptualization. **Nadia Mussner:** Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis. **Andreas Zimmer:** Writing – review & editing, Resources. **Nikola Geskovski:** Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Funding acquisition. **Sharareh Salar-Behzadi:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the CEEPUS student mobility program for mobility grant provided through the CEKA PharmTech network (CIII-RS-1113-Central European Knowledge Alliance for Teaching, Learning, and Research in Pharmaceutical Technology), which enabled this research. AstraZeneca and IOI OLEO for providing the materials.

Data availability

Data will be made available on request.

References

[1] E. Esposito, et al., Lipid nanoparticles for administration of poorly water soluble neuroactive drugs, Biomed. Microdev. 19 (3) (2017), https://doi.org/10.1007/s10544-017-0188-x.
[2] V. Patel, R. Lalani, D. Bardoliwala, S. Ghosh, A. Misra, Lipid-based oral formulation strategies for lipophilic drugs, AAPS PharmSciTech. 19 (8) (2018) 3609–3630, https://doi.org/10.1208/s12249-018-1188-8.
[3] Y. Sahbaz, et al., Transformation of poorly water-soluble drugs into lipophilic ionic liquids enhances oral drug exposure from lipid based formulations, Mol. Pharm. 12 (6) (2015) 1980–1991, https://doi.org/10.1021/mp500790t.
[4] S. Stegemann, F. Leveiller, D. Franchi, H. de Jong, H. Lindén, When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept, Eur. J. Pharm. Sci. 31 (5) (Aug. 2007) 249–261, https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2007.05.110.
[5] A.R. Coltescu, M. Butnariu, I. Sarac, The importance of solubility for new drug molecules, Biomed. Pharmacol. J. 13 (2) (Mar. 2020) 577–583, https://doi.org/10.13005/BPJ/1920.
[6] T. Heimbach, D. Fleisher, A. Kaddoumi, Overcoming poor aqueous solubility of drugs for oral delivery, Prodrugs (2007) 157–215, https://doi.org/10.1007/978-0-387-49785-3_5.
[7] J.P. O'Shea, C.M. O'Driscoll, B.T. Griffin, Lipid-based formulations, Oral Drug Deliv. Modif. Release Formul. (2021) 137–160, https://doi.org/10.1002/9781119772729.CH8.
[8] S. Güres, P. Kleinebudde, Dissolution from solid lipid extrudates containing release modifiers, Int. J. Pharm. 412 (1–2) (Jun. 2011) 77–84, https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2011.04.010.
[9] A.S. Narang, S.H. Boddu, Excipient applications in formulation design and drug delivery, Excip. Appl. Formul. Des. Drug Deliv (2015) 246, https://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8/COVER.
[10] C.W. Pouton, C.J.H. Porter, Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies, Adv. Drug Deliv. Rev. 60 (6) (Mar. 2008) 625–637, https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2007.10.010.
[11] C. Corzo, D.G. Lopes, D. Lochmann, S. Reyer, M. Stehr, S. Salar-Behzadi, Novel approach for overcoming the stability challenges of lipid-based excipients. Part 1: Screening of solid-state and physical properties of polyglycerol esters of fatty acids as advanced pharmaceutical excipients, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2020), https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.01.012.
[12] E. Fröhlich, et al., In vitro toxicity screening of polyglycerol esters of fatty acids as excipients for pulmonary formulations, Toxicol. Appl. Pharmacol. 386 (2020) Jan, https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114833.
[13] M. Zhang, G. Zhang, Recent advances in the properties and applications of polyglycerol fatty acid esters, Polymers (Basel) 17 (7) (Apr. 2025) 879, https://doi.org/10.3390/POLYM17070879.
[14] A.S. Narang, S.H. Boddu, Excipient applications in formulation design and drug delivery, Excip. Appl. Formul. Des. Drug Deliv. (2015) 1–10, https://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8_1.
[15] B. Freireich, R. Kumar, W. Ketterhagen, K. Su, C. Wassgren, J.A. Zeitler, Comparisons of intra-tablet coating variability using DEM simulations, asymptotic limit models, and experiments, Chem. Eng. Sci. 131 (2015) 197–212, https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.03.013.
[16] A.C. Jørgensen, P. Luukkonen, J. Rantanen, T. Schæfer, A.M. Juppo, J. Yliruusi, Comparison of torque measurements and near-infrared spectroscopy in characterization of a wet granulation process, J. Pharm. Sci. 93 (9) (2004) 2232–2243, https://doi.org/10.1002/jps.20132.
[17] A.S. El-Hagrasy, H.R. Morris, F. D'Amico, R.A. Lodder, J.K. Drennen, Erratum: Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity (Pharmaceutical Sciences (2001) 90 (1298-1307), J. Pharm. Sci. 90 (11) (2001) 1915, https://doi.org/10.1002/jps.1141.abs.
[18] A.D. Vovko, F. Vrečer, Process analytical technology tools for process control of roller compaction in solid pharmaceuticals manufacturing, Acta Pharm. (2020), https://doi.org/10.2478/acph-2020-0038.
[19] A. Jacquart, et al., LipImage™ 815: novel dye-loaded lipid nanoparticles for long-term and sensitive in vivo near-infrared fluorescence imaging, J. Biomed. Opt. (2013), https://doi.org/10.1117/1.jbo.18.10.101311.
[20] O.A.A. Ahmed, M. Kurakula, Z.M. Banjar, M.I. Afouna, A.S. Zidan, Quality by design coupled with near infrared in formulation of transdermal glimepiride liposomal films, J. Pharm. Sci. 104 (6) (2015) 2062–2075, https://doi.org/10.1002/jps.24448.
[21] M. Maniruzzaman, M.T. Islam, S. Halsey, D. Amin, D. Douroumis, Novel controlled release polymer-lipid formulations processed by hot melt extrusion, AAPS PharmSciTech 17 (1) (2016) 191–199, https://doi.org/10.1208/s12249-015-0470-2.
[22] S. Stranzinger, et al., Near-infrared hyperspectral imaging as a monitoring tool for on-demand manufacturing of inkjet-printed formulations, AAPS PharmSciTech 22 (6) (Aug. 2021) 1–10, https://doi.org/10.1208/S12249-021-02091-X/FIGURES/6.
[23] D. Gramaglia, B.R. Conway, V.L. Kett, R.K. Malcolm, H.K. Batchelor, High speed DSC (hyper-DSC) as a tool to measure the solubility of a drug within a solid or semi-solid matrix, Int. J. Pharm. 301 (1–2) (2005) 1–5, https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.04.038.
[24] P.J. Marsac, S.L. Shamblin, L.S. Taylor, Theoretical and practical approaches for prediction of drug-polymer miscibility and solubility, Pharm. Res. 23 (10) (2006) 2417–2426, https://doi.org/10.1007/s11095-006-9063-9.
[25] Simon Gaisford, Chapter 23: Pharmaceutical preformulation, 6th ed. 2021.
[26] USP, USP–NF Monograph: Felodipine Extended–Release Tablets, Nov. 2009, doi: 10.31003/USPNF_M32660_03_01.
[27] J.A. Afonso Urich, et al., Stability-indicating UPLC-PDA-QDa methodology for carvedilol and felodipine in fixed-dose combinations using AQbD principles, Scientia Pharmaceutica 92 (2) (2024), https://doi.org/10.3390/scipharm92020022.
[28] Y. Zhang, et al., DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles, AAPS J. 12 (3) (Sep. 2010) 263, https://doi.org/10.1208/S12248-010-9185-1.
[29] J. Siepmann, F. Siepmann, Mathematical modeling of drug delivery, Int. J. Pharm. 364 (2) (Dec. 2008) 328–343, https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2008.09.004.
[30] P. Costa, J.M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, Eur. J. Pharm. Sci 13 (2) (2001) 123–133, https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1.
[31] M.P. Paarakh, P.A. Jose, C. Setty, G.V. Peterchristoper, Release kinetics – concepts and applications, Int. J. Pharm. Res. Technol. 8 (1) (Jan. 2018) 12–20, https://doi.org/10.31838/IJPRT/08.01.02.
[32] I.Y. Wu, S. Bala, N. Škalko-Basnet, M.P. di Cagno, Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes, Eur. J. Pharm. Sci. 138 (2019) 105026, https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2019.105026.
[33] T. Ojsteršek, F. Vrečer, G. Hudovornik, Comparative fitting of mathematical models to carvedilol release profiles obtained from hypromellose matrix tablets, Pharmaceutics 16 (4) (Apr. 2024) 498, https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16040498/S1.
[34] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, J. Control. Release 5 (1) (1987) 23–36, https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4.
[35] M. Manley, Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: Non-destructive analysis of biological materials, Chem. Soc. Rev. 43 (24) (2014) 8200–8214, https://doi.org/10.1039/c4cs00062e.
[36] A.A. Gowen, Chapter 7: NIR Hyperspectral Imaging, Handbook of Near-Infrared Analysis. pp. 125–144, 2021, doi: 10.1201/b22513-43.
[37] L. Pieszczek, M.D. Aszykowski, Improvement of recyclable plastic waste detection – A novel strategy for the construction of rigorous classifiers based on the hyperspectral images, Chemo. Intelli. Lab. Syst. (2019), https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.02.009.
[38] B. Boldrini, W. Kessler, K. Rebnera, R.W. Kessler, Hyperspectral imaging: A review of best practice, performance and pitfalls for in-line and on-line applications, J. Near Infrared Spectrosc. 20 (5) (2012) 483–508, https://doi.org/10.1255/jnirs.1003.
[39] M.V. Margarit, M.T. Marín, M.D. Contreras, Solubility of solid dispersions of pizotifen malate and povidone, Drug Dev. Ind. Pharm. (2001), https://doi.org/10.1081/DDC-100105176.
[40] R. Mohan, H. Lorenz, A.S. Myerson, Solubility measurement using differential scanning calorimetry, Ind. Eng. Chem. Res. (2002), https://doi.org/10.1021/ie0200353.
[41] M.E. Aulton, K.M.G. Taylor, Aulton's Pharmaceutics E-Book. (2013).

[42] F. Theeuwes, A. Hussain, T. Higuchi, Quantitative analytical method for determination of drugs dispersed in polymers using differential scanning calorimetry, J. Pharm. Sci. (1974), https://doi.org/10.1002/jps.2600630325.
[43] M. Abdelhamid, et al., Mechanically promoted lipid-based filaments via composition tuning for extrusion-based 3D-printing, Int. J. Pharm. (2023), https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123279.
[44] G.L. Perlovich, S.V. Blokhina, N.G. Manin, T.V. Volkova, V.V. Tkachev, Polymorphs and solvates of felodipine: analysis of crystal structures and thermodynamic aspects of sublimation and solubility processes, CrstEngComm 14 (24) (Nov. 2012) 8577–8588, https://doi.org/10.1039/C2CE25949D.
[45] J. Kerč, S. Srčič, M. Mohar, J. Šmid-Korbar, Some physicochemical properties of glassy felodipine, Int. J. Pharm. 68 (1–3) (Feb. 1991) 25–33, https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90123-6.
[46] W. Guo, et al., Thermal properties of drug polymorphs: A case study with felodipine form I and form IV, J. Saudi Chem. Soc. 24 (6) (Jun. 2020) 474–483, https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2020.04.003.
[47] G. Reich, Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications, Adv. Drug Deliv. Rev. (2005), https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.01.020.
[48] R. Gautam, S. Vanga, F. Ariese, S. Umapathy, Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy, EPJ Tech. Instrum. (2015), https://doi.org/10.1140/epjti/s40485-015-0018-6.
[49] D.K. Agustika, et al., Fourier transform infrared spectrum pre-processing technique selection for detecting PYLCV-infected chilli plants, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 278 (2022), https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121339.
[50] T.C. O'Haver, Potential clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry, Clin. Chem. (1979), https://doi.org/10.1093/clinchem/25.9.1548.
[51] E. Charles, Miller and Benoît Igne, chapter 15: Preprocessing Methods in NIR Spectroscopy, CRC Press, 2021.
[52] J. Workman Jr., L. Weyer, Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy, Pract. Guid. Spectr. Atlas Interpret. near-Infrared Spectrosc. (2012), https://doi.org/10.1201/B11894.
[53] V. Koradia, et al., Phase transformations of amlodipine besylate solid forms, J. Pharm. Sci. 100 (7) (2011) 2896–2910, https://doi.org/10.1002/JPS.22509.
[54] S. Saboo, P. Bapat, D.E. Moseson, U.S. Kestur, L.S. Taylor, Exploring the role of surfactants in enhancing drug release from amorphous solid dispersions at higher drug loadings, Pharmaceutics 13 (5) (May 2021) 735, https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13050735/S1.
[55] M. Abdelhamid, et al., Personalization of lipid-based oral dosage forms via filament-based 3D-printing, Appl. Mater. Today 40 (2024), https://doi.org/10.1016/j.apmt.2024.102399.
[56] M. Cerdeira, V. Pastore, L.V. Vera, S. Martini, R.J. Candal, M.L. Herrera, Nucleation behavior of blended high-melting fractions of milk fat as affected by emulsifiers, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 107 (12) (Dec. 2005) 877–885, https://doi.org/10.1002/EJLT.200500257;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
[57] A.P.B. Ribeiro, et al., Crystallization modifiers in lipid systems, J. Food Sci. Technol. 52 (7) (Jul. 2015) 3925–3946, https://doi.org/10.1007/S13197-014-1587-0/METRICS.
[58] K. Sato, L. Bayés-García, T. Calvet, M.À. Cuevas-Diarte, S. Ueno, External factors affecting polymorphic crystallization of lipids, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 115 (11) (Nov. 2013) 1224–1238, https://doi.org/10.1002/EJLT.201300049.
[59] S.B.E. Andersson, et al., Interlaboratory validation of small-scale solubility and dissolution measurements of poorly water-soluble drugs, J. Pharm. Sci. 105 (Sept 2016) 2864–2872, https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.010.
[60] A.M. Pluntze, J.L. Cape, N.D. Klaus, D.K. Lyon, Control of API release with matrix polymorphism in tristearin microspheres, Int. J. Pharm. 636 (2023) 122806, https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2023.122806.
[61] M. Windbergs, C.J. Strachan, P. Kleinebudde, Tailor-made dissolution profiles by extruded matrices based on lipid polyethylene glycol mixtures, J. Control. Release 137 (3) (Aug. 2009) 211–216, https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2009.04.002.