

REGRESNÍ ANALÝZA DISOLUČNÍHO PROFILU LÉČIVA A ODHAD MECHANISMU UVOLŇOVÁNÍ LÉČIVA

JAN MUSELÍK^a, ALENA KOMEROVÁ^b,
VÁCLAV LOCHAŘ^b a KATEŘINA KUBOVÁ^a

^a Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, ^b Katedra fyzikální chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
alena.komersova@upce.cz

Došlo 22.3.19, přijato 23.4.19.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: disoluce, matematický model, nelineární regresní analýza

Obsah

1. Úvod
2. Přehled základních matematických modelů pro popis disolučního profilu léčiva
 - 2.1. Kinetický model 0. řádu
 - 2.2. Kinetický model I. řádu
 - 2.3. Weibullův model
 - 2.4. Korsmeyerův-Peppasův model
 - 2.5. Higuchiho model
 - 2.6. Hixsonův-Crowellův model
 - 2.7. Hopfenbergův model
3. Určení mechanismu uvolňování léčiva
 - 3.1. Postup při použití regresních modelů v analýze disolučního profilu
4. Závěr

1. Úvod

Disoluční (rozpuštěcí) studie stanovuje uvolňování léčivé látky z lékové formy v předepsané kapalině a v předepsaném čase (*in vitro*). Výsledkem je tzv. disoluční profil léčiva, který patří mezi jednu z nejvýznamnějších charakteristik lékové formy. Disoluční test se používá v oblasti farmaceutického vývoje i jako součást kontroly kvality. Z průběhu disoluční křivky lze vyvodit typ uvolňování léčiva (okamžité, řízené), typ řízeného uvolňování (prodloužené, zpožděné, pulzní) nebo kinetiku a mechanismus uvolňování léčiva. Zkouška disoluce se uplatňuje při vývoji originálních léků i generik a používá se při porovnání disolučních profilů různých přípravků před započítím bioekvivalenčních studií. Pomocí zkoušky diso-

lucy lze posuzovat kvalitu i stabilitu léčivého přípravku.

Dle Českého lékopisu lze pro zkoušku disoluce použít přístroj s pádlem, s košíčkem, s vratným válcem nebo přístroj s průtokovou celou. Nejvíce používanými jsou první dvě zmíněné metody. U tablet se zkouška disoluce nejčastěji provádí pádlovou metodou, košíčková metoda se používá např. u pelet nebo mikročástic. Metodika zkoušky disoluce uvedená v Českém lékopise kopíruje příslušný článek v platném Evropském lékopise (Ph. Eur.). Ten je v současné době harmonizován s aktuální verzí Amerického lékopisu (USP). Při návrhu disoluční metody je nutné brát v úvahu řadu faktorů, jako je množství, teplota, pH, viskozita, osmotický tlak a iontová síla disolučního roztoku (média), případně přítomnost enzymů a povrchově aktivních látek. Při stanovení disoluce léčivé látky je třeba dále specifikovat použitý přístroj; otáčky pádla nebo košíčku; průtok disoluční kapaliny; časy odběrů; metodu vzorkování a množství zkoušeného roztoku; analytickou metodu a kritéria přijatelnosti. U uzavřených systémů (disoluční přístroje s pádlem, košíčkem a vratným válcem) je zásadní dodržení podmínek aproximujících nekonečné zředění („sink“ podmínky) v průběhu zkoušky disoluce (koncentrace maximálního množství uvolněného léčiva v disolučním médiu by měla být alespoň třikrát menší než koncentrace nasyceného roztoku léčiva v disolučním médiu¹). Základním předpokladem kvalifikovaného odhadu liberace je návrh disoluční metody, která má rozlišující charakter. To znamená, že dokáže postihnout odlišnosti v uvolňování léčiva z jednotlivých lékových forem za podmínek jejich vstřebávání v organismu. Seznam disolučních metod k jednotlivým léčivům registrovaným v USA uvádí FDA na svých stránkách (FDA, Dissolution methods²).

Disoluční data je možné využít k vyhodnocení rychlosti a mechanismu uvolňování léčiva z lékových forem. Pro tento účel se používají různé matematické modely^{3–6}, ve kterých je množství uvolněného léčiva vyjádřeno jako funkce času. Shoda s určitým matematickým modelem se určuje nejčastěji na základě regresních charakteristik (např. koeficient determinace R^2 nebo Akaikeho informační kritérium) a relevantnosti odhadu parametrů regresního modelu (shoda s předpokládanou hodnotou parametru, šíře intervalu spolehlivosti). Protože disoluční křivky nejsou lineární s výjimkou kinetiky 0. řádu, je často při použití kinetických modelů používána transformace závislosti do lineárního tvaru (např. mocninná nebo logaritmičká transformace). Problémem linearizace je ovšem změna velikosti odchylek, kdy výsledná funkce neminimalizuje sumu čtverců odchylek. Z tohoto důvodu je vhodnější použití nelineární regrese, kde probíhá výpočet s původními naměřenými daty.

V některých případech jsou matematické modely používané pro vyhodnocení disolučního profilu odvozeny

z teoretické analýzy procesu disoluce nebo na kinetickém základě, ale v řadě případů teoretický koncept neexistuje a používají se i některé empirické rovnice. Výčet nepoužívanějších matematických modelů uvádí následující kapitola.

2. Přehled základních matematických modelů pro popis disolučního profilu léčiva

Matematické modely uvedené v této kapitole jsou uvedeny ve tvaru vhodném pro použití nelineární regrese. Vyhodnocení disolučního profilu pomocí nelineární regrese je vhodnější než často používaná transformace závislosti do lineárního tvaru. Při regresní analýze je vždy žádoucí:

- pracovat s originálními experimentálními daty – uvolněné množství léčiva v závislosti na čase minimálně pro 6 tablet, nikoliv průměr z min. 6 tablet,
- identifikovat a vyloučit odlehlé body – např. na základě grafu reziduí,
- posoudit splnění základních předpokladů metody nejmenších čtverců (nepoužívanější kritérium regrese) – test heteroskedasticity (v případě nesplnění požadavku na heteroskedasticitu je vhodné použít vážená data), test normality, test autokorelace, znaménkový test reziduí.

Až poté je možné spolehlivě vyjádřit regresní charakteristiky a nevyčleněné odhady parametrů. Při použití odhadů parametrů je vhodnější na místo bodového odhadu uvádět interval spolehlivosti (CI), ve kterém leží teoretická hodnota parametru se zvolenou pravděpodobností⁷. Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje spolehlivost získaných výstupů regresní analýzy, je počet odběrových bodů. Obecně lze říci, že vzorkování by mělo být provedeno tak, aby disoluční křivka zachytila celý profil uvolňování léčiva, aby bylo během disoluce uvolněno téměř veškeré množství léčiva, a aby byla k dispozici data z alespoň deseti odběrových bodů do okamžiku, kdy uvolněné množství léčiva dosáhne 60 %. Pro získání detailnějších informací o mechanismu uvolňování léčiva je vhodné zkrátit vzorkovací intervaly v počáteční části disolučního profilu, kdy je rychlost uvolňování léčiva nejvyšší. Rychlost uvolňování léčiva v závislosti na čase je možné získat např. analytickou derivací funkce prokládající disoluční profil. Směrnice tečny ke křivce prokládající disoluční profil vyjadřuje rychlost uvolňování léčiva v konkrétním čase.

2.1. Kinetický model 0. řádu

Lékové formy, které uvolňují léčivou látku kinetikou 0. řádu, uvolní stejné množství léčiva za časovou jednotku. Jedná se o ideální kinetiku uvolňování v případě lékových forem s prodlouženým uvolňováním, která umožňuje dosažení konstantní plazmatické hladiny léčiva. Kinetický model 0. řádu může být zapsán ve tvaru:

$$M_t = k_0 t \quad (1)$$

kde M_t je množství léčiva uvolněné v čase t a k_0 je rychlostní konstanta 0. řádu s rozměrem množství léčiva · čas⁻¹ (např. mg h⁻¹).

Uvedená rovnice odpovídající rovnici přímky procházející počátkem, může být uvedena i ve tvaru zohledňující nenulový úsek na ose y (přímka neprotíná osu y v bodě 0):

$$M_t = k_0 t + b \quad (2)$$

kde parametr b je množství léčiva v disolučním médiu v čase $t = 0$. Ve většině případů se parametr b statisticky významně neliší od hodnoty 0. U reálných disolučních dat může parametr b odpovídat tzv. „burst efektu“ (rychlejší uvolňování léčiva na počátku disolučního testu). „Burst efekt“ je typický pro matricové systémy, ať již na bázi hydrofilních bobtnajících nebo nerozpustných polymerů. Příčiny jeho vzniku mohou být různé, jako např. rychlé uvolnění léčiva z povrchových vrstev matrice, nerovnoměrná distribuce léčiva v lékové formě nebo heterogenní povaha polymerní matrice⁸.

2.2. Kinetický model I. řádu

Rychlost uvolňování léčiva kinetikou I. řádu je závislá na množství léčiva v lékové formě, které klesá v závislosti na čase a tudíž i rychlost uvolňování léčiva s časem klesá. Nejvíce léčiva se tedy uvolňuje po aplikaci a s časem uvolněné množství léčiva za časovou jednotku klesá. Obecně platí, že pro lékové formy s prodlouženým uvolňováním léčiv pro terapii onemocnění vyžadujících stálou plazmatickou hladinu (např. podávání antibiotik, antihipertenziv, antidepresiv atd.) je uvolňování kinetikou I. řádu méně vhodné než uvolňování kinetikou 0. řádu⁹. Existují však případy, kdy je tento typ uvolňování výhodný, např. léčba akutních stavů¹⁰. Kinetický model I. řádu může být zapsán ve tvaru:

$$M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_1 t)) \quad (3)$$

kde M_t je množství léčiva uvolněné v čase t , M_∞ je maximální uvolnitelné množství léčiva z lékové formy a k_1 je rychlostní konstanta I. řádu s rozměrem čas⁻¹ (např. h⁻¹).

2.3. Weibullův model

Obecný empirický model distribuční funkce popsany Weibullem v roce 1951, hojně využívaný v různých vědních oborech, byl upraven v roce 1972 Langenbucherem¹¹ pro popis disolučního profilu léčiva. Tuto úpravu Weibullova modelu ve tvaru vhodném pro kvantitativní vyhodnocení disolučních dat lze vyjádřit rovnicí:

$$M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w t^\beta)) \quad (4)$$

V případě zpožděného uvolňování nebo v případě přítomnosti „burst efektu“ je vhodnější použít rovnici ve tvaru:

$$M_t = M_\infty (1 - \exp(-k_w (t - T_l)^\beta)) \quad (5)$$

kde M_t je množství léčiva uvolněné v čase t , M_∞ je maximální uvolnitelné množství léčiva z lékové formy, k_w je konstanta s rozměrem čas^{-β}, T_l vyjadřuje prodlevu v uvolňování léčiva na začátku disolučního testu tzv. „lag time“ (čas zpoždění). Záporná hodnota parametru T_l ukazuje na přítomnost „burst efektu“ a parametr β charakteri-

zuje tvar exponenciální křivky. Pro $T_i = 0$ a současně $\beta = 1$ je Weibullův model formálně shodný s kinetickým modelem I. řádu. Parametr T_i vyjadřuje počátek uvolňování léčiva z lékové formy, avšak z praktických důvodů (např. zanedbatelný terapeutický efekt při uvolnění méně než 10 % účinné látky) se často vyhodnocuje „lag time“ jako čas, kdy se uvolní množství léčiva dle specifikace. Například Český lékopis uvádí pro lékové formy se zpožděným uvolňováním, že přípravek vyhovuje zkoušce, pokud uvolněné množství léčiva po dobu zkoušky disoluce simulující průchod žaludkem nepřesáhne hodnotu 10 %.

I přesto, že Weibullův model není odvozen na kinetickém základě (nevychází tudíž z řešení rychlostních rovnic) a nevychází ani z popisu žádného transportního mechanismu, při kvantitativním popisu disolučních profilů nacházejí uplatnění, v závislosti na typu disolučních dat, obě modifikace tohoto modelu.

Dle FDA je to jeden z modelů, který je vhodný při použití modelově závislých metod pro srovnání disolučních profilů (FDA, Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms¹²). Výhodou Weibullova modelu je, že dosahuje obecně dobré shody s experimentálními daty¹³, a to i v případech, kdy disoluční křivka vykazuje „lag time“ nebo „burst efekt“. Parametr β , který charakterizuje tvar disoluční křivky, může být využit při kvalitativním popisu změn v disolučním profilu např. během vývoje lékové formy (charakterizace vlivu technologie výroby nebo složení lékové formy na disoluci^{14,15}).

2.4. Korsmeyerův-Peppasův model

Korsmeyer a spol.¹⁶ odvodili v roce 1983 jednoduchý semi-empirický model:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n \quad (6)$$

V případě přítomnosti „burst efektu“ je vhodnější pro popis disoluční křivky použít upravenou rovnici ve tvaru:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n + b \quad (7)$$

kde M_t je množství léčiva uvolněné v čase t , M_∞ je maximální uvolnitelné množství léčiva z lékové formy, k_{KP} je konstanta s rozměrem čas⁻ⁿ, b vyjadřuje rychlé uvolnění části léčiva v počátku disoluce („burst efekt“) a parametr n

charakterizuje transportní mechanismus léčiva z lékové formy. Rovnice (6) a (7) platí v uvedeném tvaru za předpokladu, že uvolněné množství léčiva nepřesáhne 60 %.

N. A. Peppas¹⁷ použil exponent n k charakterizaci mechanismu uvolňování léčiva z polymerních filmů. Derivací rovnice (6) získáme vztah pro rychlost uvolňování léčiva, ze kterého je zřejmé, že pro $n = 1$ je rychlost uvolňování léčiva nezávislá na čase a léčivo se uvolňuje kinetikou 0. řádu. V chemii polymerů se transportní mechanismus odpovídající kinetice 0. řádu označuje jako tzv. „Case-II transport“. Pro $n = 0,5$ a $n = 1,0$ popisuje rovnice (6) dva fyzikálně zcela odlišné transportní mechanismy – uvolňování léčiva na základě „čisté“ difuze ($n = 0,5$) a uvolňování léčiva na základě bobtnání a relaxace řetězců nosného polymeru ($n = 1,0$). Hodnota n v intervalu (0,5; 1,0) indikuje transportní mechanismus na základě superpozice obou výše uvedených mechanismů tzv. anomální transport. Uvedené limitní hodnoty exponentu n ($n = 0,5$ a $n = 1,0$) jsou však platné pouze pro geometrii tenké vrstvy. Tento fakt je často opomíjen, což vede k chybné interpretaci experimentálních dat. Pro kulovou a cylindrickou geometrii lékové formy byly odvozeny limitní hodnoty n uvedené v tab. I (cit.^{18,19}). Detailní přehled lékových forem různého typu a geometrie s uvolňováním léčiva řízeným difuzí a mechanistický popis transportu léčiva z těchto systémů publikovali J. Siepmann a F. Siepmann v roce 2012 (cit.²⁰).

2.5. Higuchiho model

Higuchiho model²¹, vyjadřující rychlost uvolňování léčiva z matricových systémů, byl původně odvozen pro planární systémy, ale později byl upraven a rozšířen na matrice různé geometrie včetně porézních struktur^{22–26}. Základní Higuchiho model lze vyjádřit rovnicí:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t} \quad (8)$$

kde M_t je množství léčiva uvolněné v čase t , M_∞ je maximální uvolnitelné množství léčiva z lékové formy a k_H je Higuchiho konstanta (s rozměrem čas^{-1/2}) zahrnující difuzní plochu, difuzní koeficient léčiva, počáteční koncentraci a rozpustnost léčiva. Konstanta k_H bývá mylně považována za rychlostní konstantu. Detailní význam k_H je diskutován v publikacích^{21,22,27}.

Tabulka I

Exponent n a mechanismus uvolňování léčiva z polymerních systémů různé geometrie

tenká vrstva	Exponent n		Mechanismus uvolňování léčiva
	cylindrická geometrie	kulová geometrie	
0,5	0,45	0,43	Fickova difuze
0,5 < n < 1,0	0,45 < n < 0,89	0,43 < n < 0,85	Anomální transport
1,0	0,89	0,85	Case-II transport

Rovnice (8) je platná pouze pro geometrii tenké vrstvy. Tento fakt je často opomíjen a uvedená rovnice je používána k popisu trojrozměrných formulací (např. tablet), což vede k chybné interpretaci experimentálních dat. Rovnice (8) nezahrnuje např. difuzi z boční plochy tablet, změnu difuzního koeficientu vlivem změny objemu tablety (bobtnání nebo vznik a následné zborcení porézní struktury) nebo vliv pomocných látek (plniv, rozvolňovadel)²⁷.

Základní předpoklady, které musí být splněny při použití Higuchiho modelu²⁸:

- Koncentrace léčiva v matrici je mnohem větší než jeho rozpustnost.
- Efekty na okraji lékové formy jsou zanedbatelné (difuze je jednosměrná).
- Tloušťka lékové formy je mnohem větší než velikost molekuly léčiva.
- Bobtnání nebo rozpouštění matrice je zanedbatelné (difuzibilita léčiva je konstantní).

2.6. Hixsonův-Crowellův model

Rychlost rozpouštění krystalu v kapalině popsali v roce 1931 Hixson a Crowell²⁹ za předpokladu, že povrch krystalu je úměrný třetí odmocnině kvadrátu jeho objemu při zachování tvarového faktoru. Na základě této práce byl odvozen model popisující uvolňování léčivé látky z tablety ve tvaru:

$$M'_t = (M_\infty^{1/3} - k_{HC}t)^3 \quad (9)$$

kde M'_t je množství léčiva v lékové formě v čase t , M_∞ je maximální uvolnitelné množství léčiva v lékové formě a k_{HC} je konstanta s rozměrem množství léčiva^{1/3}čas⁻¹ (např. mg^{1/3}h⁻¹) zahrnující hustotu léčivé látky, geometrii tablety, objem rozpouštědla a difuzní koeficient.

Použití rovnice (9) je vhodné v případě, že se rozměry lékové formy během rozpouštění zmenšují úměrně takovým způsobem, že počáteční geometrický tvar lékové formy se nemění (mění se pouze její velikost).

2.7. Hopfenbergův model

Uvolňování léčiva z erodujících formulací různé geometrie (tenká vrstva, kulová a cylindrická geometrie) analyzoval a matematicky popsal Hopfenberg³⁰. Odvodil obecnou rovnici ve tvaru:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - (1 - k_{HP} t)^N \quad (10)$$

kde M_t je množství léčiva uvolněné v čase t , M_∞ je maximální uvolnitelné množství léčiva z lékové formy, k_{HP} je konstanta s rozměrem čas⁻¹ a koeficient N vyjadřuje geometrii lékové formy ($N = 1$ pro tenké vrstvy, $N = 2$ pro cylindrickou geometrii a $N = 3$ pro kulovou geometrii).

3. Určení mechanismu uvolňování léčiva

Přehled matematických modelů v předchozí kapitole uvádí modely ve tvaru, který je možné zadávat do programu vhodného pro výpočet nelineární regrese. Vhodné programy, které lze použít pro tento účel jsou např.: Origin, Statistika, QC Expert nebo GraphPad Prism. Nicméně je nutné podotknout, že ani jeden z uvedených programů neumožňuje provedení všech kroků doporučených při regresi analýze disolučního profilu, tak jak byly zmíněny v předchozí kapitole (např. v některých programech není k dispozici kompletní posouzení splnění základních předpokladů metody nejmenších čtverců, program neuvádí intervaly spolehlivosti odhadovaných parametrů, regresní charakteristiky jsou uvedeny v omezené míře). Z uvedených důvodů je výhodné pro účely regresní analýzy disolučního profilu používat kombinaci dvou nebo více programů. Při určení mechanismu uvolňování léčiva na základě disolučních dat je možné postupovat dle níže uvedeného postupu (kapitola 3.1.). Při použití modelů odvozených na kinetickém základě (0. a I. řád) získáme rovněž rychlostní konstantu uvolňování léčiva, u modelů statistických (např. Weibullův), nebo empirických či semiempirických (např. Korsmeyerův-Peppasův model) získáme konstantu, která je parametrem daného modelu.

Shoda experimentálních dat s jednotlivými matematickými modely se posuzuje nejčastěji na základě koeficientu determinace, případně Akaikeho informačního kritéria (AIC). Při porovnávání shody experimentálních dat s modely s různým počtem parametrů by měl být použit upravený koeficient determinace (R^2_{adjusted}), protože R^2 většinou roste s rostoucím počtem parametrů. V případě, že používaný program uvádí jako výsledek pouze R^2 , je možné vypočítat hodnotu R^2_{adjusted} dle rovnice:

$$R^2_{\text{adjusted}} = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)}(1-R^2) \quad (11)$$

kde n je počet bodů na disoluční křivce a p je počet parametrů v modelu.

Podobně v případě, že používaný program neuvádí hodnotu AIC, lze ji vypočítat na základě znalosti reziduálního součtu čtverců (RSC) dle rovnice:

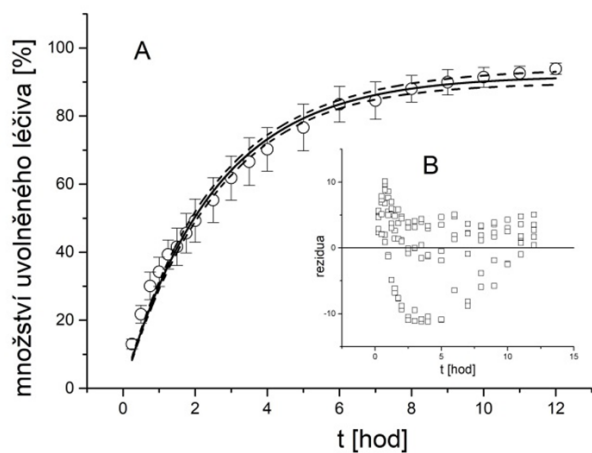
$$AIC = n \times \ln\left(\frac{RSC}{n}\right) + 2p \quad (12)$$

Za nevhodnější je považován takový model, pro který je AIC minimální a R^2_{adjusted} se blíží hodnotě 1. V některých případech ovšem mohou uvedené charakteristiky selhávat a je vždy vhodné posoudit těsnost proložení dat modelem resp. velikost systematických odchylek (např. pomocí grafické analýzy reziduí). Velké systematické odchylky ukazují na nesprávně zvolený model, ale tato skutečnost nemusí být vždy indikována snížením numerické hodnoty koeficientu determinace. Mimo výše uvedených regresních charakteristik lze pro posouzení shody

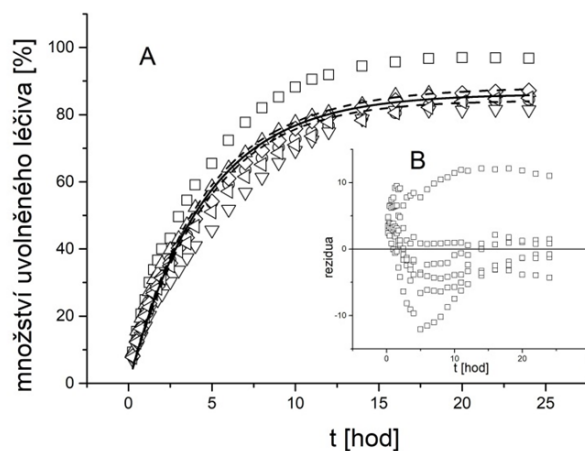
experimentálních dat s modely použít např. reziduální směrodatnou odchylku (MSE) nebo střední kvadratickou chybu predikce (MEP) v závislosti na tom, co umožňuje použité programové vybavení. Za nejvhodnější je považován takový model, pro který jsou hodnoty MSE nebo MEP minimální.

Mimo hodnocení kvality dosažené těsnosti proložení dat modelem je nutné hodnotit i kvalitu nalezených odhadů parametrů, která se posuzuje podle jejich intervalů spolehlivosti nebo rozptylů⁷. Nalezené odhady parametrů by měly mít také fyzikální smysl, tj. měly by ležet v teoreticky předpokládaném intervalu (např. hodnota maximálního uvolnitelného množství léčiva by měla přibližně odpovídat teoretické hodnotě 100 % nebo hodnota exponentu n při použití Korsmeyerova-Peppasova modelu by měla ležet v intervalu uvedeném v tab. I, atd.). V řadě experimentálních publikací se jako hlavní kritérium těsnosti proložení používá hodnota R^2 (např. $R^2 \geq 0,99$). Nicméně je nutno zdůraznit, že samotná hodnota R^2 není jednoznačným kritériem pro posouzení, zda model správně popisuje experimentální data. Na obr. 1A a obr. 2A je ukázáno vyhovující a nevyhovující proložení se srovnatelnou hodnotou R^2 (viz tab. II). Z grafické analýzy reziduí na obr. 1B je zřejmé, že systematické odchylky vykazují trend. Při

podezření na přítomnost trendu v reziduích je vhodné provedení další analýzy dat (např. znaménkový test reziduí) pro potvrzení významnosti trendu. Na druhou stranu, v případě analýzy „raw“ (surových) dat může být, v důsledku většího rozptylu, koeficient R^2 nižší, a přesto model správně popisuje experimentální data (obr. 2A a tab. II). Z grafické analýzy reziduí (obr. 2B) je zřejmé, že systematické odchylky jsou náhodně rozloženy („mrak“ bodů) a nevykazují trend. Nižší hodnota R^2 je způsobena variabilitou mezi jednotlivými disolučními profily, kdy jednotlivé disoluční profily splňují kinetický model I. řádu (obr. 3). Z výše uvedeného je zřejmé, že závěry učiněné na základě hodnoty R^2 je vždy vhodné ověřit alespoň grafickým posouzením vhodnosti modelu, grafickou analýzou reziduí a hodnocením kvality nalezených odhadů parametrů (fyzikální smysl nalezených odhadů parametrů a širší příslušných intervalů spolehlivosti). Příklady disolučních profilů s ukázkou proložení dat vyhovujícími i nevyhovujícími modely ukazuje obr. 4A–D. Regresní charakteristiky a odhady parametrů včetně 95% intervalů spolehlivosti ilustrativních příkladů z obr. 4A–D uvádí tab. III. K regresní analýze a vyčíslení odhadů parametrů byly u těchto ilustrativních příkladů použity programy OriginPro a GraphPad Prism.



Obr. 1. Ukázka nevyhovujícího proložení disolučního profilu kinetickým modelem I. řádu (A) a grafická analýza reziduí (B)

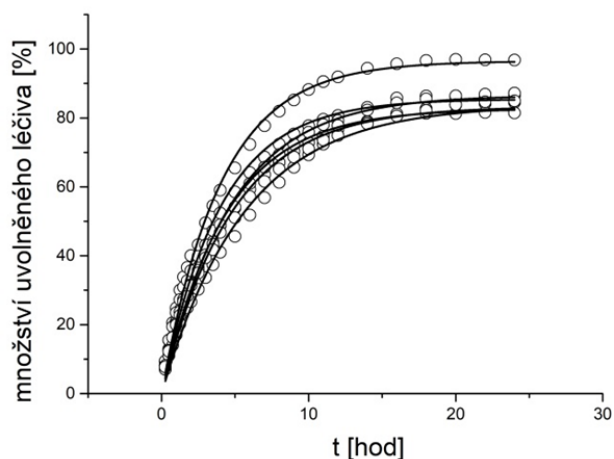


Obr. 2. Ukázka proložení disolučních profilů s velkým rozptylem dat kinetickým modelem I. řádu (A) a grafická analýza reziduí (B). Vyhovující kinetický model, ale nízká hodnota R^2 v důsledku velkého rozptylu dat

Tabulka II

Souhrn regresních parametrů k obr. 1 a obr. 2

Model	Parametry	Experimentální data	
		obr. 1	obr. 2
I. řád	$M_\infty \pm \text{CI}$	$91,86 \pm 2,10$	$86,18 \pm 1,90$
	$k_t \pm \text{CI}$	$0,398 \pm 0,026$	$0,221 \pm 0,014$
	R^2	0,9565	0,9581



Obr. 3. Ukázka proložení disolučních profilů s velkým rozptylem dat, jednotlivé profily splňují kinetický model I. řádu

3.1. Postup při použití regresních modelů v analýze disolučního profilu

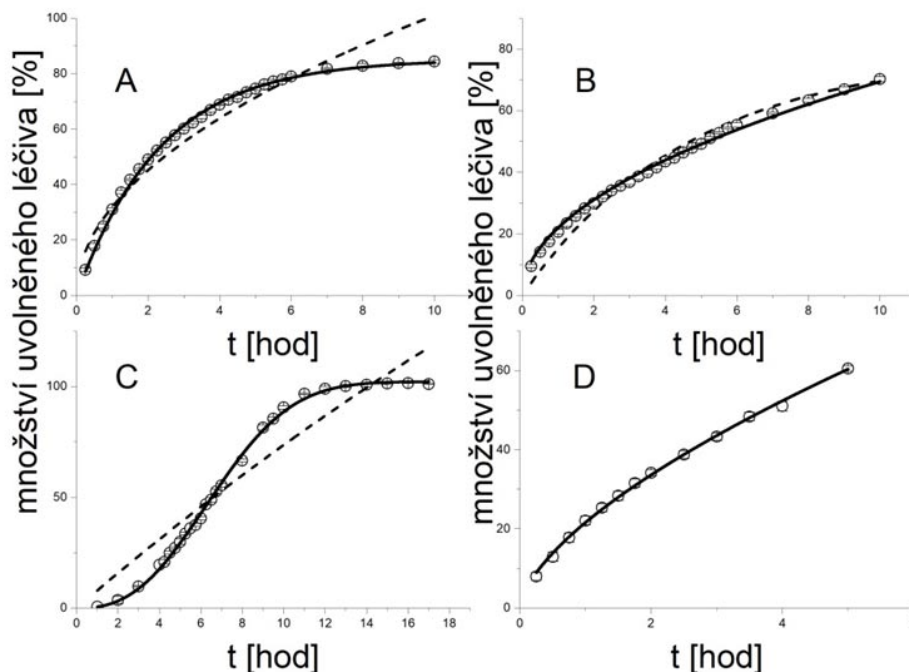
Při regresní analýze pracujeme s původními experimentálními daty, tedy s množstvím uvolněného léčiva v závislosti na čase pro minimálně 6 tablet, nikoliv s průměrným množstvím. Množství uvolněného léčiva M_t

a maximální uvolnitelné množství M_∞ vyjadřujeme obvykle v mg nebo %. U modelů, které je možné upravit na tvar obsahující podíl M_t/M_∞ (např. I. řád nebo Weibullův model), se způsob vyjádření M_t a M_∞ neprojeví v rozměru konstanty. U modelů, kde toto vyjádření není možné (např. 0. řád nebo Hixsonův-Crowellův model), je rozměr uvolněného množství léčiva (např. mg nebo %) obsažen v rozměru konstanty.

Vybereme vhodné matematické modely, které mohou charakterizovat disoluci léčiva z hodnocené lékové formy. V tomto kroku je třeba zohlednit typ lékové formy a její složení, tedy zda se předpokládá např. bobtnání lékové formy, její postupné rozpouštění nebo eroze. Obvykle ověřujeme věrohodnost kinetických modelů (0. řád a I. řád) a dále Weibullova modelu. Pro určení mechanismu uvolňování léčiva použijeme Korsmeyerův-Peppasův model. Z dalších modelů použijeme takové, které odpovídají předpokládanému mechanismu uvolňování (difuze, rozpuštění, eroze, apod.). Další základní kroky při regresní analýze disolučního profilu jsou shrnuty v následujících bodech I. až VI.

I.

Prvním krokem při analýze disolučního profilu je vizuální posouzení tvaru křivky. V případě, že závislost uvolněného množství na čase vykazuje lineární průběh, k vyhodnocení profilu použijeme lineární regresi – rovnice (1) pro kinetický model 0. řádu. Vyjádříme regresní



Obr. 4. Ukázka proložení různých typů disolučního profilu: (A) (—) vyhovující model I. řád, (---) nevhovující Higuchiho model, (B) (—) vyhovující Higuchiho model, (---) nevhovující model I. řád, (C) (—) vyhovující Weibullův model, (---) nevhovující model I. řád, (D) (—) vyhovující Korsmeyerův-Peppasův model

Tabulka III
Souhrn regresních parametrů k obr. 4A–D

Model		Experimentální data, obr. 4			
		A	B	C	D
I. řád $M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_1 t))$	$M_\infty \pm \text{CI}$	85,21 ± 1,01	71,80 ± 2,24	439,41 ± 731,3	69,62 ± 2,92
	$k_1 \pm \text{CI}$	0,424 ± 0,014	0,251 ± 0,015	0,018 ± 0,034	0,348 ± 0,025
	R^2	0,9969	0,9674	0,9112	0,9876
Higuchi $\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \sqrt{t}$	$k_H \pm \text{CI}$	31,95 ± 1,07	21,96 ± 0,09	22,43 ± 2,62	24,73 ± 0,45
	R^2	0,9021	0,9940	0,7116	0,9630
Weibull $M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_w t^\beta))$	$M_\infty \pm \text{CI}$	88,00 ± 1,20	388,9 ± 215,62	102,14 ± 1,28	203,73 ± 89,90
	$k_w \pm \text{CI}$	0,400 ± 0,013	0,006 ± 0,007	0,131 ± 0,002	0,044 ± 0,036
	$\beta \pm \text{CI}$	0,91 ± 0,03	0,57 ± 0,02	2,58 ± 0,10	0,70 ± 0,04
	R^2	0,9999	0,9976	0,9986	0,9977
Korsmeyer-Peppas $\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n$	$k_{KP} \pm \text{CI}$	–	–	–	21,64 ± 0,23
	$n \pm \text{CI}$	–	–	–	0,64 ± 0,009
	R^2	–	–	–	0,9973

charakteristiky (např. R^2) a pokud hodnota použité regresní charakteristiky potvrzuje dostatečné proložení dat modelem, provedeme další hodnocení k potvrzení uvolňování kinetikou 0. řádu (grafická analýza reziduí, odhady parametrů regrese včetně širší intervalů spolehlivosti, posouzení splnění základních předpokladů metody nejmenších čtverců, apod.).

V případě lineárního průběhu křivky s podezřením na přítomnost „burst efektu“ použijeme rovnici (2). Dále postupujeme při ověření věrohodnosti navrženého modelu, jak je popsáno výše. Pro odhad parametru b je třeba vzít v úvahu, zda má vznik „burst efektu“ u dané lékové formy opodstatnění a zda je tento parametr v modelu dobře podmíněn (interval spolehlivosti by neměl obsahovat hodnotu 0).

II.

V případě, že není potvrzen kinetický model 0. řádu, pokračujeme kinetickým modelem I. řádu. Pracujeme s nelineární regresí dle rovnice (3) odpovídající kinetickému modelu I. řádu. Opět vyjádříme regresní charakteristiky a provedeme ověření věrohodnosti modelu. V případě uvolnění téměř veškerého léčiva během zkoušky disoluce by se měl odhad parametru M_∞ blížit hodnotě reprezentující maximální uvolnitelné množství léčiva v lékové formě. Odhad parametru M_∞ může být nižší než očekávaná teoretická hodnota v případě, že zkouška disoluce neproběhla až do uvolnění téměř veškerého léčiva z lékové formy. V případě, že není jednoznačně ověřena věrohodnost kinetického modelu 0. řádu ani I. řádu, může se jednat o mechanismus „čistě“ difuzní nebo erozní, častěji se však jedná o superpozici více transportních mechanismů.

III.

Pro ověření uvolňování kinetikou I. řádu nebo v případě podezření na „burst efekt“ použijeme Weibullův model (rovnice (4) a (5)). Tento model použijeme také v případě, že je v datech pozorován „lag time“. Pokud je odhad parametru T_i v rovnici (5), nenulový (interval spolehlivosti neobsahuje hodnotu 0), disoluční data splňují Weibullův model s „burst efektem“, resp. „lag time“. Záporná hodnota parametru T_i ukazuje na „burst efekt“, kladná hodnota parametru odpovídá „lag time“. V případě, že parametr T_i v rovnici (5) je nevýznamný (interval spolehlivosti zahrnuje hodnotu 0), použijeme rovnici (4), pro Weibullův model bez „burst efektu“ a „lag time“. Po výběru vhodného modelu (rovnice (4) – (5)) vyjádříme regresní charakteristiky a provedeme ověření věrohodnosti modelu. V případě uvolnění téměř veškerého léčiva během zkoušky disoluce by se měl odhad parametru M_∞ blížit hodnotě reprezentující maximální uvolnitelné množství léčiva v lékové formě. Odhad parametru M_∞ může být nižší než očekávaná teoretická hodnota v případě, že zkouška disoluce neproběhla až do uvolnění téměř veškerého léčiva z lékové formy. Jestliže se hodnota parametru β blíží 1, je potvrzeno uvolňování kinetikou I. řádu. Odhady parametrů by se měly uvádět s příslušnými intervaly spolehlivosti tak, aby učiněné závěry byly věrohodné. Jako další pomocný ukazatel pro potvrzení uvolňování kinetikou I. řádu lze využít rychlostní konstanty kinetického modelu I. řádu a Weibullova modelu, které by měly být číselně shodné v případě uvolňování léčiva kinetikou I. řádu. V případě potvrzení „lag time“ lze Weibullův model využít i pro odhad času, kdy se uvolní množství léčiva dle specifikace (např. čas, kdy se uvolní právě 10 % účinné látky), a to včetně příslušného intervalu spolehlivosti.

IV.

Pro odhad mechanismu uvolňování léčiva z lékové formy použijeme Korsmeyerův-Peppasův model – rovnice (6) a (7). Pracujeme pouze s daty, kde uvolněné množství léčiva nepřesáhne 60 %.

Pokud se parametr b dle rovnice (7) významně liší od 0 (interval spolehlivosti neobsahuje hodnotu 0), je prokázán „burst efekt“. Ověříme, zda byl „burst efekt“ prokázán i Weibullovým modelem. Vyjádříme regresní charakteristiky a provedeme ověření věrohodnosti modelu. Pro věrohodné určení mechanismu uvolňování léčiva na základě odhadu parametru n (viz tab. I), je nutné vzít v úvahu i příslušný interval spolehlivosti. V případě přítomnosti „burst efektu“ nepokračujeme dle dalších bodů, protože odhady parametrů i regresní charakteristiky budou ovlivněny přítomným „burst efektem“.

Pokud se parametr b významně neliší od 0 (nebyl prokázán „burst efekt“) nebo výpočet s parametrem b selže, použijeme k odhadu parametru n rovnici (6) a opět provedeme ověření věrohodnosti modelu a odhad parametru n včetně příslušného intervalu spolehlivosti pro určení mechanismu uvolňování léčiva (viz tab. I).

V.

V případě, že hodnota parametru n (Korsmeyerův-Peppasův model) ukazuje na uvolňování léčiva mechanismem difuze, tak při splnění předpokladů pro Higuchiho model (viz 2.5.) můžeme tento model využít pro potvrzení difuzního mechanismu uvolňování. Po vyjádření regresních charakteristik a ověření věrohodnosti modelu je potvrzeno uvolňování léčiva mechanismem difuze.

VI.

V případě, že dochází k postupnému rozpouštění lékové formy (změna povrchu a průměru), můžeme tento mechanismus uvolňování léčivé látky ověřit použitím Hixsonova-Crowellova modelu. Vyjádříme regresní charakteristiky a provedeme ověření věrohodnosti modelu. Pokud model věrohodně prokládá data a odhad parametru M_∞ se blíží hodnotě reprezentující maximální uvolnitelné množství léčiva v lékové formě, jedná se o uvolňování způsobené postupným rozpouštěním lékové formy. Odhad parametru M_∞ může být nižší než očekávaná teoretická hodnota v případě, že zkouška disoluce neproběhla až do uvolnění téměř veškerého léčiva z lékové formy.

V případě, že dochází k erozi lékové formy v průběhu zkoušky disoluce, lze pro popis disoluční křivky použít Hopfenbergův model. Parametr N v rovnici volíme dle geometrie hodnocené lékové formy. Po vyjádření regresních charakteristik a ověření věrohodnosti modelu je potvrzen mechanismus uvolňování léčiva erozí lékové formy.

4. Závěr

Cílem kvantitativního popisu disolučního profilu lékové formulace (přípravku) je nalezení vhodné matematické funkce (modelu) vyjadřující závislost uvolněného

množství účinné látky na čase ($M_t = f(t)$). Klíčovou úlohu při hledání vhodného modelu má volba kritéria pro posouzení shody disolučních dat a matematického modelu. Nejčastěji používaná kritéria jsou R^2 , R^2_{adjusted} , residuální směrodatná odchylka (MSE), střední kvadratická chyba predikce (MEP) a Akaikého informační kritérium (AIC). Cílem při hledání vhodného modelu je minimalizace hodnot AIC, MSE, MEP a dosažení R^2 , resp. R^2_{adjusted} blízké hodnotě 1. Závěry učiněné na základě uvedených regresních charakteristik je vždy vhodné ověřit alespoň grafickým posouzením vhodnosti modelu a grafickou analýzou reziduí. U nalezených odhadů parametrů modelu je vždy vhodné uvádět příslušný interval spolehlivosti a posoudit také jejich fyzikální smysl, tj. zda daný odhad parametru leží v teoreticky předpokládaném intervalu.

Kvantitativní analýza disolučních dat na základě matematického popisu disolučního profilu léčiva umožňuje určit mechanismus uvolňování léčiva a získat kinetické parametry uvolňování léčiva v podmínkách *in vitro*, které mohou být využity např. pro predikci mechanismu a rychlosti uvolňování léčiva v podmínkách *in vivo*.

Autoři děkují za finanční podporu firmě SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o.

LITERATURA

- Phillips D. J., Pygall S. R., Cooper V. B., Mann J. C.: J. Pharm. Pharmacol. 64, 1549 (2012).
- FDA. Dissolution methods. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm, staženo 2. 10. 2018.
- Costa P.: Int. J. Pharmaceut. 220, 77 (2001).
- Avachat A., Kotwal V.: AAPS PharmSciTech 8, 88 (2007).
- Samani S. M., Montaseri H., Kazemi A.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 55, 351 (2003).
- Sood A., Panchagnula R.: Int. J. Pharmaceut. 175, 95 (1998).
- Meloun M., Militký J.: *Interaktivní statistická analýza dat*, 4. vyd. Karolinum, Praha 2012.
- Hezaveh H., Muhamad I. I.: Chem. Eng. Res. Des. 91, 508 (2013).
- Moodley K., Pillay V., Choonara Y. E., du Toit L. C., Ndesendo V. M., Kumar P., Cooppan S., Bawa P.: Int. J. Mol. Sci. 13,18 (2012).
- Huang X., Brazel C. S.: J. Control. Rel. 73(2-3),121 (2001).
- Langenbucher F.: J. Pharm. Pharmacol. 24, 979 (1972).
- FDA. Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Guidance for Industry. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070237.pdf>, staženo 14. 4. 2019.
- Simionato L. D., Petrone L., Baldut M., Bonafede S. L., Segall A.: Saudi Pharm. J. 26, 578 (2018).
- Al-Zoubi S., Malamataris J.: Drug Del. Sci. Tech. 18, 431 (2008).

15. Gumieniczek A., Mączka P., Komsta Ł., Pietraś R.: *Acta Pharm.* 65, 235 (2015).
16. Korsmeyer R.W., Gurny R., Doelker E., Buri P., Peppas N.A.: *Int. J. Pharm.* 15, 25 (1983).
17. Peppas N. A.: *Pharm. Acta Helv.* 60, 110 (1985).
18. Ritger P. L., Peppas N. A.: *J. Control. Release* 5, 23 (1987).
19. Ritger P. L., Peppas N. A.: *J. Control. Release* 5, 37 (1987).
20. Siepmann J., Siepmann F.: *J. Control. Release* 161, 351 (2012).
21. Higuchi T.: *J. Pharm. Sci.* 50, 874 (1961).
22. Higuchi T.: *J. Pharm. Sci.* 52, 1145 (1963).
23. Desai S. J., Simonelli A. P., Higuchi W. I.: *J. Pharm. Sci.* 54, 1459 (1965).
24. Desai S. J., Singh P., Simonelli A. P., Higuchi W. I.: *J. Pharm. Sci.* 55, 1224 (1966).
25. Lapidus H., Lordi N. G.: *J. Pharm. Sci.* 55, 840 (1966).
26. Lapidus H., Lordi N. G.: *J. Pharm. Sci.* 57, 1292 (1968).
27. Siepmann J., Peppas N. A.: *Int. J. Pharm.* 418, 6 (2011).
28. Siepmann J., Peppas, N. A.: *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 163 (2012).
29. Hixson A.W., Crowell J. H. : *Ind. Eng. Chem.* 23, 923 (1931).
30. Hopfenberg H. B., v knize: *Controlled Release Polymeric Formulations*. (Paul D. R., Harris F. W., ed.), str. 26–31. ACS Symposium Series 33. American Chemical Society, Washington DC 1976.

J. Muselík^a, A. Komeršová^b, V. Lochař^b, and K. Kubová^a (^a*Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*, ^b*Department of Physical Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*): **Regression Analysis of the Drug Dissolution Profile and Estimation of The Drug Release Mechanism**

A drug dissolution profile is one of the most important characteristics of the dosage form with controlled drug release. Obtained dissolution data can be used for evaluation of a drug release rate and mechanism of its release from the dosage form. Nowadays various mathematical models can be used for this purpose. An accordance with a particular mathematical model is determined by regression characteristics and by the relevance of the regression model parameter estimation. Since the dissolution curves are not linear with the exception of the zero-order kinetics, the transformation of dependencies into a linear form is often performed. However, linearization is connected with a change in the deviation magnitudes and the resulting function does not minimize squared deviations. The main aim of this manuscript was to show an overview of basic mathematical models in a form suitable for nonlinear regression which work with original experimental data and to summarize basic steps for determining the drug release mechanism and rate constants.

Keywords: dissolution, mathematical model, nonlinear regression analysis