

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KROFLIČ

**PREUČEVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI  
POLIMORFNIH OBLIK KLARITROMICINA**

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF POLYMORPHIC FORMS OF  
CLARITHROMYCIN

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko naloge sem opravljala na Fakulteti za farmacijo in Kemijskem inštitutu pod mentorstvom izr. prof. dr. Odona Planinška in somentorstvom dr. Marjana Beleta. Elektronsko mikroskopijo, rentgensko praškovno difrakcijo in spektroskopske meritve so opravili na Kemijskem inštitutu.

Za pomoč pri delu se zahvaljujem Mojci Rangus iz Laboratorija za anorgansko kemijo in tehnologijo na Kemijskem inštitutu ter vsem iz Laboratorija za elektrokemijo materialov prav tako na Kemijskem inštitutu.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naloge samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Odona Planinška in somentorja dr. Marjana Beleta.

# VSEBINA

|   |    |
|---|----|
| POVZETEK .....  | 5  |
| ABSTRACT .....  | 6  |
| SEZNAM OKRAJŠAV .....   | 7  |
| 1 UVOD .....  | 9  |
| 1.1 Polimorfizem .....  | 9  |
| 1.2 Amorfna oblika trdne snovi .....                                      | 9  |
| 1.3 Poliamorfizem.....  | 10 |
| 1.4 Klaritromicin.....  | 12 |
| 1.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti .....                                  | 13 |
| 1.4.2 Farmakodinamika .....   | 13 |
| 1.4.3 Odpornost bakterij .....  | 14 |
| 1.4.4 Spekter delovanja in terapevtske indikacije.....                    | 14 |
| 1.4.5 Farmakokinetika .....   | 14 |
| 1.4.6 Varnost.....  | 15 |
| 1.5 Polimorfne oblike klaritromicina.....                                 | 16 |
| 1.5.1 Klaritromicin oblika I .....  | 16 |
| 1.5.2 Klaritromicin oblika II .....                                       | 16 |
| 1.5.3 Klaritromicin oblika O .....  | 16 |
| 1.5.4 Amorfen klaritromicin .....   | 17 |
| 2 NAMEN DELA .....  | 18 |
| 3 MATERIALI IN METODE.....  | 20 |
| 3.1 Uporabljeni materiali in oprema .....                                 | 20 |
| 3.1.1 Materiali.....  | 20 |
| 3.1.2 Oprema.....   | 20 |
| 3.2 Priprava vzorcev .....  | 21 |
| 3.2.1 Rekristalizacija nestabilne polimorfne oblike klaritromicina I..... | 21 |
| 3.2.2 Pretvorba v stabilno polimorfno obliko klaritromicina II.....       | 21 |
| 3.2.3 Taljenje s hitrim zamrzovanjem ('Quenching').....                   | 21 |
| 3.2.4 Sušenje z razprševanjem ('Spray-drying').....                       | 22 |
| 3.3 Metode dela in pogoji meritev .....                                   | 22 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3.3.1   | Vrstična elektronska mikroskopija .....               | 22 |
| 3.3.2   | Diferenčna dinamična kalorimetrija .....              | 23 |
| 3.3.3   | Rentgenska praškovna difrakcija .....                 | 23 |
| 3.3.4   | Določanje prave gostote s helijevim piknometrom ..... | 24 |
| 3.3.5   | Merjenje stičnega kota in površinske energije.....    | 25 |
| 3.3.6   | Jedrska magnetna resonanca.....                       | 26 |
| 3.3.6.1 | NMR spektroskopija .....                              | 26 |
| 3.3.6.2 | NMR v trdnem .....                                    | 27 |
| 4       | REZULTATI IN RAZPRAVA.....                            | 30 |
| 4.1     | Polimorfizem .....                                    | 30 |
| 4.1.1   | Vrstična elektronska mikroskopija .....               | 30 |
| 4.1.2   | DSC analiza .....                                     | 31 |
| 4.1.3   | Rentgenska praškovna difrakcija .....                 | 32 |
| 4.1.4   | Prava gostota, močenje in površinska energija .....   | 33 |
| 4.1.5   | NMR analiza raztopine .....                           | 34 |
| 4.1.6   | NMR v trdnem .....                                    | 37 |
| 4.2     | Poliamorfizem.....                                    | 40 |
| 4.2.1   | Vrstična elektronska mikroskopija .....               | 40 |
| 4.2.2   | Rentgenska praškovna difrakcija .....                 | 41 |
| 4.2.3   | NMR v trdnem .....                                    | 42 |
| 5       | SKLEP .....   | 52 |
| 6       | LITERATURA .....                                      | 54 |

## **POVZETEK**

Za kristalne polimorfe so značilni enaka kemijska sestava, različna struktura kristalne rešetke ter različne termodinamske in fizikalno-kemijske lastnosti. V diplomskem delu smo med seboj primerjali kristalni oblici makrolidnega antibiotika klaritromicina I in II, z njima ter med sabo pa smo primerjali še po različnih postopkih pripravljeni amorfni oblici preučevanega antibiotika. Amorfno učinkovino smo pridobili s taljenjem s hitrim zamrzovanjem ('quenching') in s sušenjem z razprševanjem ('spray-drying'), med delom pa smo uporabili naslednje analize: vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM), diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), piknometrično določitev gostote, določitev močenja z metodo sedeče kapljice in določitev površinske energije vzorca, rentgensko praškovno difrakcijo (XRPD) ter jedrsko magnetno resonanco (NMR).

Potrdili smo kristalni oblici klaritromicina (DSC, XRPD) ter ugotovili razlike v njunih površinskih lastnostih. Stabilna oblika antibiotika (oblika II) z večjo gostoto tvori na svoji površini nekoliko močnejše interakcije tako s polarnimi kot nepolarnimi topili, razlike v omenjenih interakcijah pa so predvsem na račun močno spremenjenega razmerja med bazičnimi in kislinskimi prispevki k polarni komponenti površinske energije. Z jedrsko magnetno resonanco v trdnem ('solid-state' NMR) smo podrobno preučili strukturo pripravljenih vzorcev in ugotovili, da obstaja več oblik nereda, torej več različnih amorfnih oblik, kar lahko glede na literurne podatke imenujemo poliamorfizem. Omenjeni pojav lahko pripelje tudi do spremembe fizikalno-kemijskih lastnosti različnih oblik učinkovine, kar pa lahko nadalje vpliva na sam postopek izdelave farmacevtske oblike, njeno stabilnost in biološko uporabnost. Poleg tega odpira poliamorfizem tudi nove možnosti na področju patentiranja polimorfnih oblik učinkovine.

## **ABSTRACT**

Crystalline polymorphs are different forms of the same chemical entity that exhibits distinct crystal structures with unique molecular order and different thermodynamic and physicochemical properties. We compared two crystal forms (I and II) of macrolide antibiotic clarithromycin and an amorphous form of the substance. Two preparation techniques were used to prepare amorphous form: quenching and spray-drying. In order to characterize our samples we used scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), picnometric determination of density, contact-angle method and determination of surface energy, X-ray powder diffraction (XRPD) and nuclear magnetic resonance (NMR).

We confirmed both crystal forms of clarithromycin (DSC, XRPD) and determined the differences in their surface characteristics. The stable polymorphic form of antibiotic (form II) is much denser and interacts stronger with polar and nonpolar liquids on its surface. These differences in interactions are due to differences in the ratio between basic and acid part of polar component of surface energy. Solid-state NMR was used to study the structural properties of the prepared samples in greater detail and the results imply the existence of multiple amorphous forms of clarithromycin (multiple forms of disorder) which, in scientific literature, is known as polyamorphism. This could lead to differences in the physicochemical properties of the different forms of a drug substance and, consequently, affect its manufacturing process, physical stability and in-vivo biological activity. Finally, the availability of multiple amorphous forms would allow more regulatory freedom in the sense of patenting new polymorphic forms of a drug substance.

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

- B<sub>0</sub>... statično zunanje magnetno polje
- B<sub>1</sub>... zunanje magnetno polje, pravokotno na B<sub>0</sub>
- B<sub>1H</sub>... jakost 'spin-locking' magnetnega polja, ki zaklene magnetizacijo <sup>1</sup>H jedra v x-y ravnini
- B<sub>13C</sub>... jakost 'spin-locking' magnetnega polja, ki zaklene magnetizacijo <sup>13</sup>C jedra v x-y ravnini
- CDCl<sub>3</sub>... devteriran kloroform
- <sup>13</sup>C... izotop ogljika z masnim številom 13
- DSC... diferenčna dinamična kalorimetrija ('Differential Scanning Calorimetry')
- KMC I... klaritromicin v polimorfni obliki I
- KMC II... klaritromicin v polimorfni obliki II
- KMC I+II... mešanica kristalnih oblik klaritromicina; oblika I in oblika II v razmerju 1:1
- KMCq... amorfen klaritromicin, pripravljen s taljenjem s hitrim zamrzovanjem
- KMCsd... amorfen klaritromicin, pripravljen s sušenjem z razprševanjem
- M... molska masa klaritromicina
- m<sub>i</sub>... masa vzorca v celici za vzorec He-piknometra
- N<sub>A</sub>... Avogadrovo število
- NMR... jedrska magnetna resonanca ('Nuclear Magnetic Resonance')
- P<sub>a</sub>... začetni tlak He v ekspanzijski celici He-piknometra
- P<sub>1</sub>... začetni tlak He v celici za vzorec He-piknometra
- P<sub>2</sub>... tlak He v celici za vzorec po odprtju ventila
- P<sub>2O<sub>5</sub></sub>... fosforjev pentoksid
- SEM... vrstična elektronska mikroskopija ('Scanning Electron Microscopy')
- SiO<sub>2</sub>... silicijev dioksid, silika
- TMS... tetrametilsilan
- T<sub>1</sub>... spinsko-mrežni relaksacijski čas
- T<sub>2</sub>... spinsko-spinski relaksacijski čas
- UZ-kadička... ultrazvočna kadička
- V<sub>c</sub>... volumen celice za vzorec He-piknometra
- V<sub>e</sub>... volumen ekspanzijske celice He-piknometra
- V<sub>i</sub>... volumen vzorca v celici za vzorec He-piknometra

$V_s$ ... volumen trdnega vzorca v celici za vzorec He-piknometra

$V_1$ ... volumen molekule klaritromicina, ki ga le-ta zavzema v kristalni rešetki vzorca

XRD... rentgenska difrakcija ('X-ray Diffraction')

XRPD... rentgenska praškovna difrakcija ('X-ray Powder Diffraction')

$\alpha_{\text{dijodometan}}$ ... stični kot dijodometana s površino vzorca

$\alpha_{\text{formamid}}$ ... stični kot formamida s površino vzorca

$\alpha_{\text{voda}}$ ... stični kot vode s površino vzorca

$\gamma^{\text{AB}}$ ... polarni prispevek k površinski energiji vzorca

$\gamma^{\text{LW}}$ ... nepolarni prispevek k površinski energiji vzorca

$\gamma^{\text{tot}}$ ... celokupna površinska energija trdne snovi

$\gamma^+$ ... bazična komponenta polarnega prispevka k površinski energiji vzorca

$\gamma^-$ ... kislinska komponenta polarnega prispevka k površinski energiji vzorca

$\gamma_l^{\text{LW}}$ ... nepolarni prispevek k površinski napetosti tekočine

$\gamma_l^{\text{tot}}$ ... celokupna površinska napetost tekočine

$\gamma_l^+$ ... bazična komponenta polarnega prispevka k površinski napetosti tekočine

$\gamma_l^-$ ... kislinska komponenta polarnega prispevka k površinski napetosti tekočine

$\gamma_s^{\text{LW}}$ ... nepolarni prispevek k površinski energiji trdne snovi

$\gamma_s^+$ ... bazična komponenta polarnega prispevka k površinski energiji trdne snovi

$\gamma_s^-$ ... kislinska komponenta polarnega prispevka k površinski energiji trdne snovi

$\gamma_{1H}$ ... giromagnetno razmerje  ${}^1\text{H}$  jedra

$\gamma_{13C}$ ... giromagnetno razmerje  ${}^{13}\text{C}$  jedra

$\delta_c$ ... kemijski premik za ogljikov atom

$\Delta H_f^{\text{KMC I}}$ ... sprememba talilne entalpije pri KMC I

$\Delta H_f^{\text{KMC II}}$ ... sprememba talilne entalpije pri KMC II

$\theta$ ... stični kot topila s trdno snovjo

$\rho$ ... prava gostota vzorca

$\omega_0$ ... Larmorjeva kotna frekvenca

# 1 UVOD

## 1.1 *Polimorfizem*

Mnoge čiste substance obstajajo v trdnem stanju v različnih polimorfnih oblikah. Pri polimorfizmu gre za različne kristalne oblike z enako kemijsko sestavo, vendar drugačno notranjo strukturo kristalne rešetke (1) in drugačnimi termodinamskimi lastnostmi (2). Razlike v kristalni rešetki so lahko odraz spremembe dimenzijski ali oblike osnovne celice, drugačne razporeditve osnovnih celic v kristalu in/ali različnih konformacij molekul znotraj mrežne strukture. Vsaka kristalna polimorfna oblika ima v faznem diagramu točno določeno območje termodinamske stabilnosti, fazne prehode iz ene v drugo polimorfno obliko pa lahko opazujemo s spremenjanjem temperature oziroma tlaka (2). Kot parametra urejenosti atomske strukture polimorfnih oblik se ponavadi uporablja gostota in specifični volumen (2). Polimorfne oblike se med seboj razlikujejo tudi v številnih fizikalno-kemijskih lastnostih, kot so oblika kristalov, gostota, trdnost, temperatura tališča, lomni količnik, topnost in hitrost raztopljanja, spektroskopske lastnosti ter fizikalna in kemijska stabilnost (1).

Med polimorfi so tako razlike tudi v nekaterih za farmacevtsko industrijo pomembnih lastnostih (fizikalno-kemijska stabilnost, topnost in hitrost raztopljanja, permeabilnost, stisljivost), kar daje določeni polimorfni oblici prednost pri njeni uporabi za izdelavo optimalne farmacevtske oblike. Sprememba topnosti pri različnih polimorfnih oblikah lahko na primer pripelje do spremembe biološke uporabnosti učinkovine, še posebno kadar imamo opravka s slabo vodotopnimi zdravilnimi učinkovinami (3, 4), to pa lahko povzroči spremenjen učinek zdravila. Pojav polimorfizma je v farmacevtski industriji ključnega pomena tako z vidika razvoja proizvodnega procesa in specifikacij končnega produkta, kot tudi z vidika patentne zaščite (1, 5).

## 1.2 *Amorfna oblika trdne snovi*

Najvišje energijsko stanje trdne snovi predstavlja amorfna oblika s svojo popolnoma neurejeno strukturo. Amorfnim snovem pravimo tudi stekla. Zaradi večje Gibbs-ove proste energije v primerjavi s kristali imajo amorfni težnjo po kristalizaciji v stabilno kristalno obliko in so tudi kemijsko bolj reaktivni (1). Amorfno snov karakteriziramo na podlagi temperature steklastega prehoda,  $T_g$ , ki je odraz njenih

strukturnih in termodinamskih lastnosti (6). Pod to temperaturo zavzemajo molekule v snovi določeno konformacijo, značilno za stekla, njihova mobilnost pa je precej manjša od mobilnosti molekul v tekočini (1). Nad temperaturo steklastega prehoda izkazujejo amorfne snovi tako konformacijsko gibanje molekul kot tudi pretočne lastnosti, podobne tistim v tekočinah (1). Amorfna snov izkazuje najboljše raztpljanje in biološko uporabnost, v primerjavi s kristaliničnimi oblikami pa ima tudi drugačne mehanske lastnosti (3, 7).

Zaradi ugodnih lastnosti kot so višja topnost in hitrost raztpljanja ter včasih tudi boljša stisljivost je pomen amorfnih snovi v farmaciji zelo velik, čeprav so le-te fizikalno in kemijsko manj stabilne od pripadajočih kristalov (6). V substanci je že zelo majhen delež amorfne oblike (<10%), ki je posledica normalnega proizvodnega procesa, klinično pomemben, saj lahko teoretično povzroči povečanje topnosti za več kot dvakrat (3). Topnost makrolidnih antibiotikov se lahko tako pri pretvorbi v amorfno obliko poveča tudi za desetkrat (3, 8), to pa lahko bistveno vpliva na njihovo biološko uporabnost in posledično tudi na učinek zdravila.

### ***1.3 Poliamorfizem***

Nekateri znanstveniki so v zadnjem času že začeli ugotavljati, da obstaja tudi amoren analog kristaliničnega polimorfizma. Ta pojav so poimenovali amoren polimorfizem (2) ali poliamorfizem (9). Pri poliamorfizmu gre torej za fazne prehode med različnimi amorfnimi oblikami z enako kemijsko sestavo in drugačno molekulske strukturo, ki pa vselej ostaja neurejena. Poliamorfi se med seboj razlikujejo v gostoti kot urejenostnem parametru (10).

Obstajata dve dejstvi, ki govorita v prid poliamorfizmu. Prvo je to, da so eksperimentalno že dokazali, da se nekatere amorfne snovi pojavljajo v več različnih stanjih, ki se med seboj razlikujejo v atomski strukturi in lastnostih znotraj faze ('bulk' lastnosti). Katero amorfno stanje opazujemo, je odvisno od termodinamskih pogojev in načina priprave amorfne snovi. Znano je tudi, da pri mnogih substancah v tekočem stanju obstaja fazni prehod tekoče-tekoče (pri spojinah s tetraedrično strukturo, na primer pri tekočem Si, vodi ter  $\text{SiO}_2$  (9)), pri čemer pride do spremembe gostote tekoče faze, ne pa tudi do spremembe njene sestave. Pojav tega faznega prehoda prvega reda lahko imenujemo 'tekoči polimorfizem'. Ker amorfne snovi pogosto pripravljamo s taljenjem s hitrim zamrzovanjem (tekočino v trenutku ohladimo na temperaturo, ki je nižja od

temperature steklastega prehoda), lahko dobimo z zamrznjenjem različnih tekočih faz z različno gostoto tudi različne trdne amorfne faze (2).

Poliamorfizem so že preučevali pri različnih anorganskih pa tudi organskih substancah, verjetno najbolje pa je ta pojav raziskan prav pri  $H_2O$ . Že leta 1935 so prvič poročali o amorfni obliki  $H_2O$  (2, 11), kasneje pa so ugotovili, da lahko z različnimi postopki pripravimo amorfno snov, ki so jo poimenovali 'nizko-gostoten amorfen' led (LDA – 'low-density amorphous ice'). Ta se pri 77K in povišanem tlaku pretvori v obliko z višjo gostoto ali 'visoko-gostoten amorfen' led (HDA – 'high-density amorphous ice'). Ker pride pri zvišanem tlaku do spremembe gostote, so ta prehod poimenovali 'navidezni fazni prehod prvega reda'. Navidezni zato, ker je fazni prehod ravnotežen proces, amorfna snov pa v primerjavi s podhlajeno tekočino, ko snov stalimo in talino hitro ohladimo, tako da ne pride do njene zamrznitve, in kristalno obliko, ki je resnično ravnotežno stanje, ni v ravnotežju. Zato koncept ravnotežja pri amorfnih snoveh tehnično nima nobenega pomena in se postavlja vprašanje, ali pri opisanem pojavu sploh lahko govorimo o kakršnemkoli faznem prehodu. Kasneje so odkrili še eno podobnost preučevanega procesa s termodinamskim faznim prehodom. HDA led se namreč pri atmosferskem tlaku in segrevanju tudi pretvori nazaj v LDA led, kar pomeni, da lahko eno amorfno obliko ledu v drugo pretvorimo tako s spremjanjem tlaka kot temperature, podobno kot med sabo pretvarjamo kristalne polimorfe (2).

Pri preučevanju poliamorfizma pri  $H_2O$  so opazovali kar spremembo volumna pri spremembi tlaka oziroma temperature, kasneje pa so se znanstveniki odločili bolj natančno preučiti spremembo strukture snovi pri prehodu iz ene v drugo amorfno obliko. Spremembo gostote so pri tekočem  $SiO_2$  okarakterizirali z radialno porazdelitveno funkcijo  $g(r)$ , tako da je  $4\pi r^2 g(r)dr$  verjetnost, da najdemo  $Si$  atom na razdalji med  $r$  in  $r+dr$  od opazovanega  $Si$  atoma v sistemu. Radialno porazdelitveno funkcijo so nato zapisali kot vsoto posameznih prispevkov sosednjih  $Si$  atomov  $g(r)=\sum g_i(r)$  in iskali razlike v lokalni gostoti na primeru poliamorfizma pri  $SiO_2$ . Ugotovili so, da so pri manj kompaktni obliki z nižjo gostoto atomi bolj oddaljeni kot pri obliki z višjo gostoto. Kadar obstajata v tekočini obe fazi, pa dobimo bimodalno porazdelitev, saj se porazdelitvi obeh faz dovolj razlikujeta (12).

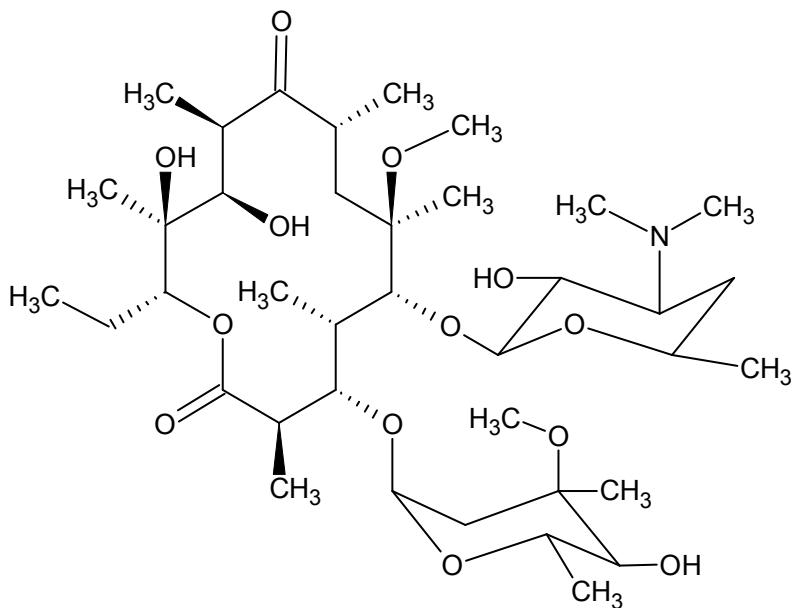
Razliko v atomski in elektronski strukturi kovinskega stekla  $Ce_{55}Al_{45}$  pri prehodu iz ene v drugo amorfno obliko so opazovali s pomočjo *in situ* rentgenske difrakcije pri povečanem tlaku. Z višanjem tlaka je prišlo do premika difrakcijskega vrha k višjim

vrednostim  $\text{\AA}^{-1}$  in obratno. Ko so prevedli difraktograme v odvisnost specifičnega volumna od tlaka, so opazili hitro znižanje povprečnega atomskega volumna pri povečanju tlaka. Vendar pa to znižanje volumna ni sledilo predpostavljeni enačbi stanja, ki podaja zvezo med temperaturo, tlakom in prostornino za amorfen  $\text{Ce}_{55}\text{Al}_{45}$ , ko je cerijev elektron v f-orbitali lokaliziran. Kasneje so ugotovili, da prvi del krivulje sovpada z omenjeno enačbo stanja, drugi del krivulje pa se enačbi bolj približa, če predpostavimo, da je cerijev elektron v f-orbitali delokaliziran. Nadaljevali so z analizo strukturnih faktorjev, ki je pokazala, da so si pri obliki z visoko gostoto sosednji Ce-atomi veliko bliže kot pri obliki z nizko gostoto. Vse ugotovitve so povezali še z dejstvom, da je pri kristaliničnem Ce ravno 4f-lokaliziran elektron odgovoren za polimorfizem, in prišli do naslednje rešitve problema. Povišan tlak zbliža Ce atome in hkrati povzroči delokalizacijo elektronov v f-orbitali, kar poveča povezave med elektroni in tako pride še do zmanjšanja medatomskih razdalj oziroma skrajšanja Ce-Ce vezi. Sprememba v elektronskih interakcijah je torej ključna za tako veliko zmanjšanje volumna pri povečanem tlaku (10).

Očitno sta fazni prehod tekoče-tekoče in poliamorfizem pojava, ki ju lahko opazujemo. S še bolj poglobljenimi raziskavami v širšem temperaturnem območju in širšem območju tlaka bodo verjetno odkrili še druge spojine, ki izkazujejo opisane lastnosti. Tako bi morda lahko pridobivali nove uporabne amorfne substance, ki bi bile sicer kemično identične že znanim substancam, a bi imele drugačne termodinamske, reološke in druge fizikalne lastnosti (9).

#### **1.4 Klaritromicin**

Klaritromicin, 6-O-metileritromicin A, je polsintežni derivat eritromicina s protimikrobnim delovanjem in ga uvrščamo v skupino makrolidnih antibiotikov (13). Zanje je značilen makrociklični laktonski obroč, na katerega so z glikozidnimi vezmi vezane sladkorne komponente (14). Klaritromicin uporabljam peroralno za sistemsko zdravljenje bakterijskih infekcij (15).



**Slika 1:** Strukturna formula klaritromicina.

#### 1.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Klaritromicin je šibka baza z molekulsko formulo C<sub>38</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>13</sub> in molekulsko maso 747,95 (13). Je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek, praktično netopen v vodi, topen v acetonu in etilenkloridu ter slabo topen v metanolu in etanolu (16). Njegova topnost se povečuje z nižanjem pH vodnih raztopin. Zaradi dobre permeabilnosti in slabe topnosti v vodi ga uvrščamo v razred II po biofarmacevtski klasifikaciji (17). S prekristalizacijo klaritromicina iz etanola dobimo kristale s temperaturo tališča 222-225°C (13).

#### 1.4.2 Farmakodinamika

Preko vezave na P-mesto 50S podenote ribosomov zavira sintezo bakterijskih beljakovin in tako onemogoča normalno delovanje bakterijskih celic (18). Majhna toksičnost pri človeku je verjetno posledica bistveno drugačne strukture ribosomov humanih celic, zaradi česar ne pride do vezave učinkovine na njihovo 50S podenoto (15). Klaritromicin deluje bakteriostatično še preko zaviranja delovanja ribosomalne peptidiltransferaze, na nekatere bakterije pa deluje tudi baktericidno (15). Pri nekaterih bakterijah pride do antagonističnega delovanja makrolidov, kloramfenikola in linkozamidov, saj se vsi vežejo na isto tarčno mesto.

#### **1.4.3 Odpornost bakterij**

Pridobljena odpornost mikroorganizmov na delovanje makrolidnih antibiotikov temelji na treh mehanizmih, prenaša pa se preko kromosomov ali plazmidov (19). Bakterije, odporne na delovanje makrolidnih antibiotikov, tvorijo encime za metiliranje adenina na ribosomalni RNA in tako preprečijo vezavo protimikrobnega zdravila na spremenjeno tarčno mesto, klaritromicin pa poleg tega velja še za močnega induktorja omenjenih encimov (19). Odpornost mikroorganizmov na makrolide je lahko tudi posledica inaktivacije samega antibiotika (15), ali pa spremembe transportnih mehanizmov in aktivnega izčrpavanja učinkovine iz celic (19).

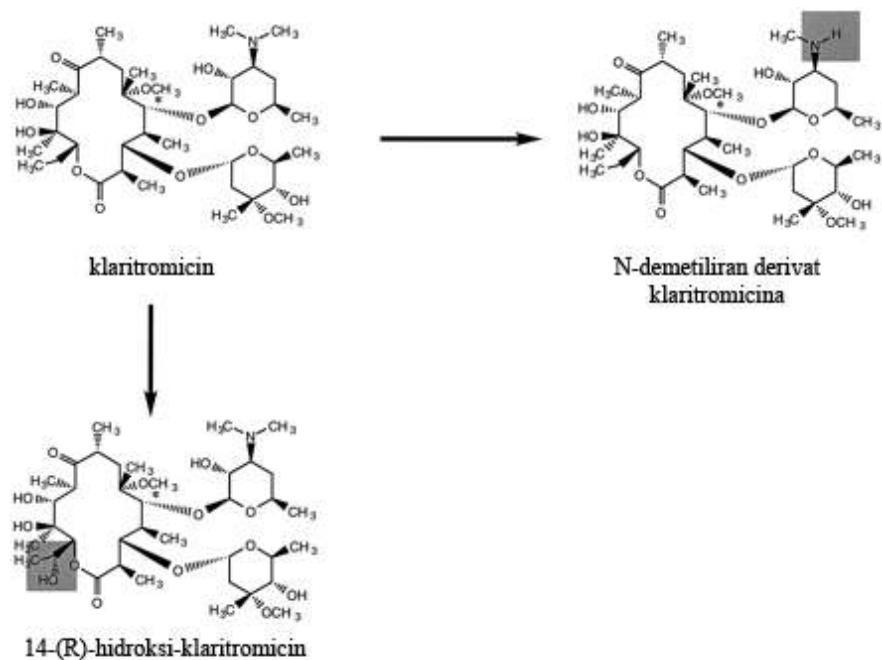
#### **1.4.4 Spekter delovanja in terapevtske indikacije**

Klaritromicin je močan, učinkovit antibiotik s širokim spektrom delovanja na po Grammu pozitivne in negativne aerobne, anaerobne ali fakultativno anaerobne bakterije, deluje pa tudi na druge bakterije (klamidije, mikoplazme, ureaplastme, mikobakterije) in atipične mikobakterije (18). Makrolidni antibiotiki so nasploh indicirani pri infekcijah s po Grammu pozitivnimi bakterijami pri bolnikih, ki so odporni na penicilinske antibiotike ali tetracikline in pri pacientih, ki so alergični na penicilinske antibiotike (14). Klaritromicin je indiciran pri okužbah zgornjih (tonzilofaringitis, sinusitis) in spodnjih (bronhitis, pljučnica) dihal, pri okužbah z mikobakterijami, uporabljamo pa ga tudi pri zmernih okužbah kože in podkožja (20). V kombinaciji z zaviralci izločanja želodčne kisline (npr. omeprazol) ga pri bolnikih s peptično razjedo želodca ali dvanajstnika uporabljamo kot najučinkovitejši način odstranitve *Helicobacter pylori* (19). Klaritromicin je v kombinaciji s pirimetaminom uporaben pri akutnem encefalitisu s *Toxoplasma gondii* pri obolelih za AIDS-om (14), zaradi njegovega *in vitro* delovanja proti *Bacillus anthracis* pa naj bi se po smernicah Centrov za kontrolo in preventivo bolezni v ZDA uporabljal tudi pri terapiji antraksa v kombinaciji s ciprofloksacinom ali doksiciklinom (21).

#### **1.4.5 Farmakokinetika**

Klaritromicin je stabilen v prisotnosti želodčne kisline po peroralni aplikaciji ter se hitro in dobro absorbira iz prebavil (predvsem iz jejunuma). Zaradi velikega predsistemskega metabolizma, ki je predvsem posledica metabolizma v jetrih, je njegova biološka uporabnost približno 50%. Hrana ne vpliva na obseg absorpcije, jo pa nekoliko upočasni. Zaradi majhne stopnje ionizacije se klaritromicin dobro porazdeljuje v tkiva,

približno 80% pa se ga reverzibilno veže na plazemske beljakovine. Presnova učinkovine v jetrih je hitra in intenzivna ter poteka z N-dealkiliranjem, oksidacijo s citokromom P450 in položajno specifično hidroksilacijo na mestu C<sub>14</sub>. Poznanih je vsaj 7 metabolitov, 14-(R)-hidroksiklaritromicin pa ima tako kot izhodna učinkovina protimikrobnno delovanje. Njegova minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je dvakrat večja od MIK klaritromicina, kar pa ne velja pri bakteriji *Haemophilus Influenzae*, saj je v tem primeru presnovek dvakrat bolj učinkovit od izhodne učinkovine. Farmakokinetika zaradi nasičenja jetrnih encimov pri visokih odmerkih ni linearна. Klaritromicin se v večji meri izloča iz telesa s sečem, nekaj pa se ga izloči tudi z blatom (19).



Slika 2: Glavna metabolita klaritromicina (22).

#### 1.4.6 Varnost

Predklinične študije na živalih so pokazale, da je toksično delovanje klaritromicina odvisno od odmerka in trajanja zdravljenja, da so toksični odmerki bistveno večji od priporočenih odmerkov klaritromicina za zdravljenje in da so jetra primarni tarčni organ, ki je prizadet pri vseh toksičnih odmerkih, pri čemer se je stanje po prenehanju jemanja zdravila normaliziralo. Toksično delovanje se je pokazalo tudi na želodcu, priželjcu in ostalih limfatičnih tkivih ter na ledvicah (19). *In vitro* in *in vivo* raziskave so pokazale, da klaritromicin ni genotoksičen in mutagen (18). Prav tako niso dokazali toksičnega delovanja na zarodek (19).

## **1.5 Polimorfne oblike klaritromicina**

Klaritromicin obstaja v trdni obliki v treh znanih kristaliničnih oblikah; I, II ter O. Farmacevtske oblike na tržišču vsebujejo klaritromicin v polimorfni obliki II, saj je le-ta termodinamsko najbolj stabilna (23).

### **1.5.1 Klaritromicin oblika I**

Kinetično stabilnejšo kristalinično obliko klaritromicina I pripravimo na spodaj opisan način.

- I. Klaritromicin rekristaliziramo iz topila (npr. etanol) ter produkt v obliki I sušimo pod znižanim tlakom (23).

### **1.5.2 Klaritromicin oblika II**

Najbolj termodinamsko stabilno kristalinično obliko klaritromicina II pa lahko pripravimo na več načinov.

- I. Kristalinično obliko klaritromicina I pretvorimo v obliko II s segrevanjem v vakuumskem sušilniku pri temperaturi višji od 80°C (23).
- II. Suspenzijo klaritromicina v nepolarnem topilu (npr. aceton, heptan) segrevamo pri refluksu 15 minut, še vročo raztopino filtriramo ter ponovno segrevamo pri refluksu, nato pa raztopino ohlajamo pri sobni temperaturi ter kasneje še na ledeni kopeli, tako da se oborijo kristali klaritromicina v obliki II. Nastalo suspenzijo prefiltriramo in kristale učinkovine sušimo v vakuumskem sušilniku (23).
- III. Klaritromicin lahko pri sobni temperaturi pretvorimo v polimorfno obliko II z močnim mešanjem suspenzije učinkovine v vodi ali v zmesi vode in organskega topila, ki se ne meša z vodo in v katerem je klaritromicin praktično netopen (služi le za raztopljanje morebitnih organskih nečistot v izhodnem materialu), nato pa suspenzijo prefiltriramo in kristale učinkovine čez noč sušimo v vakuumskem sušilniku pri 60°C. Tako lahko na enostaven način in po nizki ceni učinkovito pridobivamo zelo čist produkt brez ostanka organskih topil (24).

### **1.5.3 Klaritromicin oblika O**

Klaritromicin v obliki O združuje vse solvate učinkovine, ko molekulo klaritromicina solvatirajo molekule naslednjih topil: etanol, izopropilacetat, izopropanol ali

tetrahidrofuran (23, 25). Ker gre pri solvatih za psevdopolimorfizem, to pomeni, da so molekule topila del kristalne rešetke, in ne za pravi polimorfizem, pri našem delu nismo preučevali fizikalno-kemijskih lastnosti te oblike klaritromicina.

#### ***1.5.4 Amorfen klaritromicin***

Z namenom izboljšanja raztopljanja in biološke uporabnosti v vodi praktično netopnega klaritromicina so se lotili tudi priprave amorfne oblike učinkovine po različnih postopkih.

- I. Klaritromicin z mletjem pretvorimo v amorfno obliko (26, 27).
- II. Klaritromicin raztopimo v topilu (npr. metanol (26) ali aceton (27)), nato pa topilo odstranimo s sušenjem z razprševanjem ter tako dobimo amorfne delce učinkovine.

## **2 NAMEN DELA**

V sklopu diplomske naloge bomo preučili fizikalno-kemijske lastnosti (predvsem strukturne lastnosti) obeh polimorfnih oblik makrolidnega antibiotika klaritromicina, poleg tega bomo poskusili ugotoviti, ali obstaja klaritromicin v več amorfnih oblikah. Pri različnih polimorfnih oblikah praškaste učinkovine so namreč spremembe fizikalno-kemijskih lastnosti ključnega pomena za sam proizvodni proces izdelave farmacevtske oblike, ki naj bi za doseganje želenega učinka zdravila izkazovala ustrezne karakteristike.

Manipulacija z učinkovino je prav pri preučevanem antibiotiku ključnega pomena, saj je potrebno v končnem pripravku prikriti grenak okus klaritromicina. To pa potegne za sabo celo vrsto tehnoloških postopkov, kot so oblaganje in podobno, ki lahko predstavljajo veliko oviro pri proizvodnji kakovostne farmacevtske oblike.

Morebiten obstoj poliamorfizma ni pomemben le z vidika optimalnih fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovine, ki jo vgrajujemo v farmacevtsko obliko, ampak lahko nekoč postane ključnega pomena tudi z vidika patentne zaštite. Vendar pa zaenkrat še velja dejstvo, da za amorfne veljajo prav vse oblike substance, ki s trenutno priznanimi metodami (XRD, DSC) ne izkazujejo lastnosti kristalov. Še več, velja celo, da je amorfna oblika učinkovine ena sama in da ni odvisna od načina priprave ter da obstaja le različna stopnja podhlajenosti amorfne snovi.

Izbira modelne substance tudi z vidika preučevanja poliamorfizma ni naključna. Amorfna oblika klaritromicina je namreč precej stabilna in je zato ta pojav pri njej sploh smiselno preučevati, saj lahko le stabilna amorfna substanca prestane dolgotrajen proizvodni proces farmacevtske oblike in kasnejše obdobje do uporabe zdravila. Nestabilna amorfna snov bi namreč kristalizirala v termodinamsko bolj ugodno obliko že pred samo uporabo zdravila in bi se tako njene ugodne lastnosti spremenile, še preden bi dosegla svoj cilj. Poleg vsega pa bo tudi rokovanje s pripravljenimi vzorci veliko lažje kot bi bilo, če le-ti ne bi bili stabilni.

Primerjali bomo morfologijo delcev obeh polimorfnih oblik makrolidnega antibiotika oblika I in oblika II, njuno termodinamsko stabilnost, gostoto in površinske ter strukturne lastnosti. Pri delu bomo uporabili naslednje analize: vrstična elektronska mikroskopija (SEM), diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC), piknometrična določitev gostote, določitev močenja z metodo sedeče kapljice in določitev površinske energije vzorca, rentgenska praškovna difrakcija (XRPD) ter jedrska magnetna resonanca (NMR).

Amorfno obliko učinkovine bomo poskusili pripraviti na dva različna načina; s taljenjem s hitrim zamrzovanjem in s sušenjem z razprševanjem. S pomočjo XRPD, prave gostote in jedrske magnetne resonance v trdnem ('solid-state' NMR) bomo skušali ugotoviti, ali se pripravljeni oblici med seboj razlikujeta v strukturnih lastnostih.

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### ***3.1 Uporabljeni materiali in oprema***

##### ***3.1.1 Materiali***

- klaritromicin: SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Nemčija
- etanol 96% ( $C_2H_5OH$ ): KEFO, Slovenija
- destilirana voda
- tekoči dušik ( $N_2$ )
- fosforjev pentoksid ( $P_2O_5$ ): Fluka, Švica
- aceton ( $C_3H_6O$ ): Merck KGaA, Nemčija
- silikagel

##### ***3.1.2 Oprema***

- precizna tehnicka: Exacta 2200 EB, Tehnica Železniki, Slovenija
- ultrazvočna kadička: Sonis 4, Iskra, Slovenija
- rotavapor: Rotavapor R-114, BÜCHI, Švica; vodna kopel Waterbath B-480, BÜCHI, Švica; vakumska črpalka Vac® V-500, BÜCHI, Švica; merilec vakuma Vacuum Controller B-721, BÜCHI, Švica
- filter papir: 388, Sartorius, Nemčija
- sušilnik: NET-ELMED SE 02, Elektromedicina, Slovenija
- magnetno mešalo: ROTAMIX MMH 550, Tehnica Železniki, Slovenija
- vrstični elektronski mikroskop: SUPRA 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija
- analitska tehnicka: AG245, Mettler Toledo, Švica
- diferenčni dinamični kalorimeter: Pyris 1, Perkin Elmer, ZDA
- rentgenski praškovni difraktometer: D-5000, Siemens, Nemčija
- analitska tehnicka za določanje prave gostote: A-150-SX, COBOS, Nemčija
- He-piknometer: AccuPyc 1330, Micromeritics, ZDA
- naprava za merjenje stičnega kota: Drop Shape Analyzer 100, KRÜSS, Nemčija; računalniška podpora OPTILEX GX620, DELL, ZDA
- NMR spektrofotometer za NMR analizo raztopine: Varian-Unity Plus 300 76 MHz NMR spectrometer, Varian, Inc., ZDA

- NMR spektrofotometer za NMR analize v trdnem: Varian NMR System 600 MHz NMR spectrometer, Varian, Inc., ZDA; proba 3,2 mm NB Double Resonance HX MAS Solids Probe
- grelec: MM-540, Tehnica Železniki, Slovenija; termočlen za uravnavanje temperature, YOKOGAWA
- eksikator
- naprava za sušenje z razprševanjem: Mini Spray Dryer B-290, BÜCHI, Švica; naprava za vzdrževanje inertne atmosfere Inert Loop B-295, BÜCHI, Švica; razvlaževalec zraka Dehumidifier B-296, BÜCHI, Švica

### **3.2 Priprava vzorcev**

#### ***3.2.1 Rekristalizacija nestabilne polimorfne oblike klaritromicina I***

Klaritromicin smo suspendirali v 96% etanolu v masnem razmerju klaritromicin:etanol 96% = 10:400 in ga pri 40°C raztopili s pomočjo UZ-kadičke. Nato smo na rotavaporju Büchi R-114 pri temperaturi 50°C odparevali topilo pod znižanim tlakom 165 mbar, dokler nismo dobili mlečnate usedline (odparili smo približno 90% topila). Dobljeno suspenzijo smo prefiltrirali z odsesavanjem skozi grob filter papir in zrasle kristale klaritromicina v obliki I približno pol ure sušili v sušilniku pri temperaturi 60°C. Vzorec smo do analiz hranili v zamrzovalniku (23).

#### ***3.2.2 Pretvorba v stabilno polimorfno obliko klaritromicina II***

Klaritromicin v obliki I smo suspendirali v vodi v razmerju klaritromicin:voda = 10:50, dodali magnetek in suspenzijo 3 ure močno mešali na magnetnem mešalu s 1200rpm pri sobni temperaturi. Nato smo suspenzijo prefiltrirali z odsesavanjem skozi grob filter papir in kristale klaritromicina v obliki II čez noč sušili v sušilniku pri temperaturi 60°C. Praškast produkt smo homogenizirali v keramični terilnici. Vzorec smo do analiz hranili v zamrzovalniku (24).

#### ***3.2.3 Taljenje s hitrim zamrzovanjem ('Quenching')***

Klaritromicin v obliki I smo na objektnem stekelcu segrevali na grelcu s konstantno temperaturo 229°C (temperatura na objektnem stekelcu je bila nekoliko nižja od nastavitev temperature grelca), da so se kristali učinkovine popolnoma stalili. Talino smo s stekelcem vred vrgli v posodo s tekočim dušikom, tako da je učinkovina v trenutku

zamrznila, vse skupaj pa smo nato prenesli v eksikator z močnim sušilnim sredstvom  $P_2O_5$ , da na stekelcu zaradi velike temperaturne razlike ni prišlo do kondenzacije vode iz zraka, ki bi lahko povzročila kristalizacijo pripravljenega vzorca. Amorfen klaritromicin smo kasneje postrgali iz objektnega stekelca in ga še sušili v eksikatorju. Vzorec smo do analiz hranili v zamrzovalniku.

### ***3.2.4 Sušenje z razprševanjem ('Spray-drying')***

Klaritromicin smo raztopili v acetonu v masno/volumskem razmerju klaritromicin:aceton = 5g:120 mL, tako da smo suspenzijo greli pod tekočo vročo vodo, dokler nismo dobili bistre raztopine, ki smo jo nato sušili z razprševanjem v aparaturi Büchi Mini Spray Dryer B-290 z inertno  $N_2$  atmosfero. Pretok dušika za sušenje z vstopno temperaturo 100°C je bil 38 m<sup>3</sup>/h, pretok dušika za razprševanje 670 L/h, pretok raztopine za razprševanje 6,25 mL/min, izstopna temperatura produkta pa 56°C. Amorfen klaritromicin smo takoj prenesli v eksikator s silikagelom kot sušilnim sredstvom, da ne bi prišlo do vezave vlage in posledične kristalizacije produkta. Vzorec smo do analiz hranili v zamrzovalniku (27).

## ***3.3 Metode dela in pogoji meritev***

### ***3.3.1 Vrstična elektronska mikroskopija***

Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) daje informacije o topografiji in morfologiji površine trdnih nehlapnih vzorcev z ločljivostjo <3 nm, z njeno pomočjo pa lahko določimo tudi njihovo kemijsko sestavo (28).

Pri SEM uporabljamo za opazovanje strukture vzorca fokusiran snop elektronov. Med pospešenim koherentnim primarnim snopom elektronov majhnega preseka in atomi vzorca prihaja do interakcij, zaradi česar pride do emisije sekundarnih in odbitih elektronov s površine vzorca, le-te pa nato s pomočjo detektorjev zaznamo in prevedemo v sliko. Ker sta smer in intenziteta nizkoenergijskih sekundarnih elektronov odvisni od topografije vzorca, vidimo različno orientirane ploskve na zaslonu kontrastno, to pa nam daje globinsko ostrino in realno sliko površine. Z detekcijo emitiranih Augerjevih elektronov in rentgenske svetlobe lahko pridobimo tudi informacije o kemijski sestavi vzorcev (28).

Praškaste vzorce smo pred opazovanjem pod vrstičnim elektronskim mikroskopom Carl Zeiss SUPRA 35 VP nanesli na dvostranski lepilni trak z delci ogljika, ki smo ga pritrrdili na medeninaste nosilce.

### ***3.3.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija***

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je destruktivna metoda, ki jo uvrščamo med termične analize, z njeno pomočjo pa lahko opazujemo fizikalno-kemijske spremembe trdnih snovi kot so taljenje, izparevanje, polimorfni prehodi, steklast prehod, desolvatacija in različne kemijske reakcije. Uporabljam jo predvsem za določanje kristaliničnosti, pomembna pa je tudi z vidika identifikacije in kvantifikacije trdnih snovi. Poleg tega lahko z DSC analizo določimo tudi hitrost kemijskih reakcij in njihovo kinetiko ter spremljamo stabilnost trdnih vzorcev (29).

Ko trdno snov izpostavimo kontinuiranemu segrevanju, merimo količino topote, ki jo le-ta medtem porabi ali sprosti, tako pa vrednotimo endotermne in eksotermne procese, ki potekajo v vzorcu med analizo. Pri DSC analizi je površina pod krivuljo premo sorazmerna z oddano oziroma prejeto topoto ob termičnem dogodku (30).

DSC analize smo opravili na Perkin Elmer Pyris 1 instrumentu v dušikovi atmosferi na temperturnem območju od 0-240°C s hitrostjo segrevanja 10°C/min. Približno 5 mg vzorca smo analizirali v Al-lončkih, pretok N<sub>2</sub> pa je bil 20 mL/min.

### ***3.3.3 Rentgenska praškovna difrakcija***

Rentgenska difrakcija (X-ray difrakcija, XRD) je nedestruktivna metoda za analizo trdnih snovi. Uporabljam jo predvsem za spremjanje kristaliničnosti in preučevanje polimorfnih oblik substanc, čeprav je primerna tudi za kvantitativno analizo snovi. Poleg tega primerjava z difraktogrami iz baze podatkov omogoča tudi identifikacijo neznanih vzorcev (31).

Pri obsevanju kristalinične snovi z monokromatsko rentgensko svetlobo (X-žarki) pride na vzorcu do uklona elektromagnetnega valovanja oziroma do sisanja žarkov, ki pa ni v vse smeri enako. Zaradi periodičnosti kristala prihaja med sianimi žarki do interference, kar še dodatno oslabi ali ojača interferenčne vrhove v difraktogramu in jih posledično zoži.

Uklonska slika monokristala je odvisna od njegove orientacije, vendar ostajajo uklonski koti ves čas enaki. Pri rentgenski praškovni difrakciji (XRPD) pa s primarnim

rentgenskim žarkom osvetljujemo prašek, torej več monokristalov, ki so različno orientirani, zato vsak od njih prispeva svojo uklonsko sliko (kot bi sukali monokristal in bi vse uklonske slike združili v eno). Pri pripravi teh vzorcev je pomembno, da so delci razporejeni v naključnih smereh in da nobena orientacija ne prevladuje. Struktura amorfnih snovi pa je neurejena, zato prihaja pri teh vzorcih v vseh smereh do približno enakega sisanja žarkov, na difraktogramu pa vidimo le enega ali več zelo razširjenih vrhov in identifikacija takšnih vzorcev ni mogoča (32).

XRPD analize smo opravili na rentgenskem praškovnem difraktometru Siemens D-5000 z uporabo bakrove K1 linije.

### **3.3.4 Določanje prave gostote s helijevim piknometrom**

S helijevim piknometrom določamo pravi volumen praškastega vzorca, ki izključuje vse pore in meddelčne ('interpartikularne') prostore, preko podatka o masi merjenega vzorca pa lahko naprava izračuna tudi njegovo pravo gostoto. Piknometer deluje na osnovi plinskega zakona in meri tlak v ekspanzijski celici in v celici za vzorec po tem, ko v sistem izpustimo znano množino helija. Pravi volumen trdnega vzorca lahko izračunamo po naslednji enačbi:

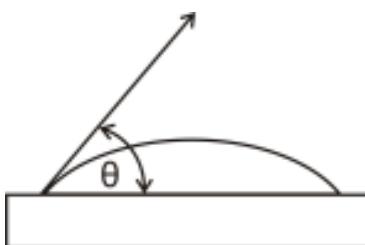
$$V_s = V_c - \frac{V_e}{\frac{(P_1 - P_a)}{(P_2 - P_a)} - 1} \quad (1),$$

kjer sta  $V_c$  in  $V_e$  volumen celice za vzorec ter volumen ekspanzijske celice,  $P_1$  in  $P_a$  začetna tlaka He v celici za vzorec ter v ekspanzijski celici,  $P_2$  pa tlak He v celici za vzorec po odprtju ventila. Helij je zaradi vsaj dveh ugodnih lastnosti primeren plin za omenjeno analizo; zaradi njegove inertnosti namreč ne prihaja do adsorpcije na trdne površine, velikost atoma ( $r = 0,318 \text{ \AA}$ ) pa omogoča vstop tudi v najmanjše pore vzorca (33).

Pravo gostoto pripravljenih vzorcev smo določali s helijevem piknometrom Micromeritics AccuPyc 1330, tlak He v jeklenki je bil 2,5 bar. Vsako meritev smo ponovili trikrat.

### 3.3.5 Merjenje stičnega kota in površinske energije

Z metodo sedeče kapljice lahko neposredno izmerimo stični kot tekočine s trdnim vzorcem s pomočjo mikroskopa z vgrajeno merilno skalo ('Contact angle' meter), pri čemer je potrebno praškaste snovi najprej stisniti v ploščice, saj le tako zagotovimo ravno, gladko površino vzorca. Ko s pomočjo mikrobirete na ploščico kanemo kapljico tekočine ( $<10 \mu\text{m}$ ), izmerimo kot med osnovno ploskvijo in tangento kapljice (33).



Slika 3: Neposredno merjenje stičnega kota.

Iz stičnih kotov kapljic treh tekočin z znanimi parametri polarnih komponent lahko po 'Acid-base' metodi izračunamo površinsko energijo ( $\gamma^{tot}$ ) kot vsoto nepolarnih ( $\gamma^{LW}$ ) in kislinskih ( $\gamma^-$ ) ter bazičnih ( $\gamma^+$ ) prispevkov, ki pa niso aditivni:

$$\gamma^{tot} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (2)$$

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad (3)$$

$$(1 + \cos \theta) \gamma_l^{tot} = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad (4),$$

kjer je  $\gamma^{AB}$  polarna komponenta površinske energije, indeksa  $l$  in  $s$  pa se nanašata na tekočino ter trdni vzorec (33).

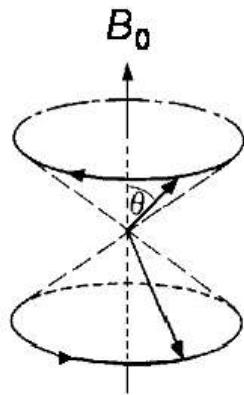
Močenje in površinsko energijo polimorfnih oblik klaritromicina smo določali na napravi Krüss Drop Shape Analyzer 100 s pomočjo računalniške podpore DELL Optilex GX620. Približno 200 mg praškastega vzorca smo predhodno stisnili v ploščice s silo, ki ustreza 5 T, nanjo pa smo s pomočjo mikrobirete kapljali 0,5  $\mu\text{l}$  kapljice. Vsako meritev smo ponovili trikrat.

### 3.3.6 Jedrska magnetna resonanca

#### 3.3.6.1 NMR spektroskopija

Jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance – NMR) je ena od vodilnih metod za identifikacijo in študije kemijskih struktur neznanih snovi, uporabna pa je tudi za spremeljanje dinamičnih procesov in določanje kinetike reakcij. Z 2D ali 3D eksperimenti lahko rešujemo strukture bolj zapletenih organskih spojin in celo določamo prostorsko strukturo bioloških makromolekul (proteini, DNA), vendar pa se je potrebno zavedati, da imamo pri NMR spektroskopiji opravka z raztopljenimi vzorci, zato ta metoda tudi ni primerna za preučevanje kristalnih struktur oziroma polimorfizma (34).

Z NMR metodo lahko opazujemo jedra atomov s spinom, ki imajo magnetni moment. Le-ta se namreč v zunanjem magnetnem polju  $B_0$  orientirajo paralelno oziroma antiparalelno in precesirajo okrog z osi statičnega magnetnega polja z Larmorjevo frekvenco  $\omega_0$ .



Slika 4: Shematski prikaz precesije za obe energetski stanji – paralelna in antiparalelna orientacija.

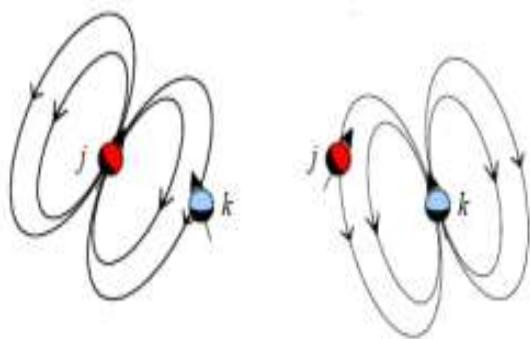
Ker imajo različna jedra različno fazo, je v ravnotežju torej neto magnetizacija v smeri z osi. Z uporabo pulzirajočega magnetnega polja  $B_1$  pravokotno na  $B_0$ , ki rotira v x-y ravnini s kotno frekvenco, ki ustreza  $\omega_0$ , pa zasučemo neto magnetizacijo v x-y ravnino. Spinsko-mrežni relaksacijski čas ( $T_1$ ) predstavlja čas, ki je potreben, da se po aplikaciji elektromagnetnega pulza z komponenta magnetizacije spremeni za faktor  $e$ , spinsko-spinski relaksacijski čas ( $T_2$ ) pa predstavlja eksponenten upad x-y magnetizacije s časom proti vrednosti 0. Prav ta pojav nato merimo s tuljavo, dobljeni signal pa matematično s Fourierjevo transformacijo pretvorimo iz časovno v frekvenčno odvisnega (35).

$^{13}\text{C}$  NMR spekter raztopine klaritromicina v  $\text{CDCl}_3$  ( $t$ ; 77,0 ppm) smo posneli na NMR spektrometu Varian-Unity Plus 300 pri 76 MHz, za standard pa smo uporabili signal TMS (0,0 ppm). Spekter smo asignirali s pomočjo podatkov, ki jih v članku navajajo Awan in drugi (36).

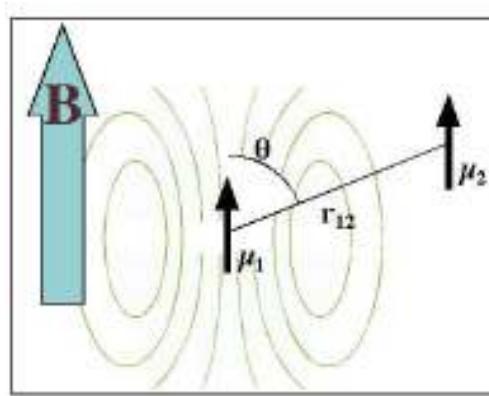
### 3.3.6.2 NMR v trdnem

Jedrska magnetna resonanca v trdnem (solid-state NMR) je nedestruktivna spektroskopska metoda, ki ima pomembno vlogo pri karakterizaciji, razlikovanju, ločevanju in kvantifikaciji polimorfov ter psevdopolimorfov. Poleg tega omogoča določitev inter- ter intramolekulskih konformacij z visoko ločljivostjo, pridobimo pa lahko tudi podatke o vodikovih vezeh v preučevani snovi. Z njeno pomočjo lahko celo spremljamo spremjanje polimorfizma trdne snovi s časom ali temperaturo, kar nam pomaga pri določevanju pogojev shranjevanja (35).

Tako kot pri snemanju NMR spektrov raztopin detektiramo tudi pri NMR v trdnem neto magnetizacijo v x-y ravnini po aplikaciji radiofrekvenčnega magnetnega pulza  $B_1$  pravokotno na zunanje statično magnetno polje  $B_0$ . Vendar pa dobimo z opremo za snemanje spektrov raztopin v primeru trdnega vzorca širok zabrisan spekter zaradi dipolnih interakcij in anizotropije kemijskega premika. Dipolna interakcija predstavlja direktno sklopitev dveh jeder v prostoru (slika 5) in je odvisna od razdalje med jedromi ter njenega kota glede na  $B_0$  (slika 6).

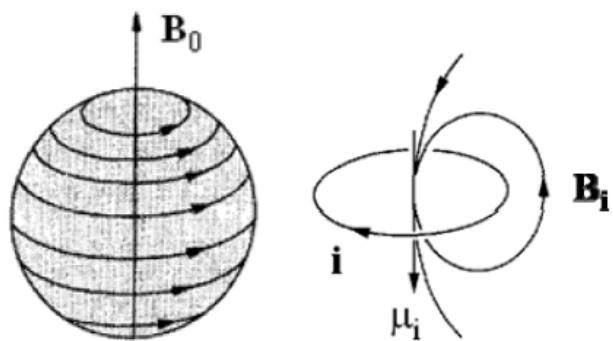


Slika 5: Shematski prikaz dipolne interakcije.



Slika 6: Dipolna sklopitev je odvisna od razdalje in kota glede na  $B_0$ .

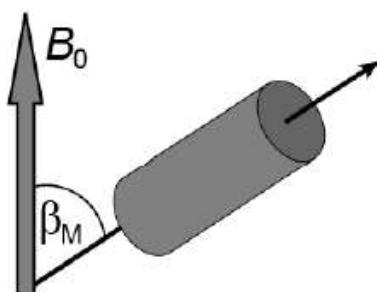
Anizotropija kemijskega premika pa predstavlja interakcijo jedra z elektroni v njegovi neposredni okolini in je odvisna od orientacije funkcionalne skupine glede na  $B_0$  (slika 7).



Slika 7: Elektroni spremenijo magnetno polje, ki ga občuti jedro.

V raztopini zaradi hitrih reorientacij molekul dipolna interakcija močno oslabi, saj se izpovpreči po vseh kotih, zaradi izotropnega gibanja molekul pa vidimo kar povprečje orientacij opazovanega jedra. V trdnem stanju pa so molekule fiksirane glede na  $B_0$ , zato je porazdelitev vseh orientacij molekul v polikristaliničnem vzorcu naključna in se odraža v anizotropiji kemijskega premika, dipolne interakcije pa so prisotne v širokem frekvenčnem območju, kar dodatno prispeva k širitvi signalov v spektrih (34-35, 37).

Oba opisana pojava pa izgineta pri kotu  $54,74^\circ$ , ki ga imenujemo magični kot. To je osnovna lastnost, ki nam omogoča izboljšanje ločljivosti spektrov analiz NMR v trdnem. V trdnem stanju fiksiranih molekul ne moremo vseh naenkrat usmeriti pod magičnim kotom, lahko pa odpravimo širitve signalov zaradi dipolne sklopite in anizotropije kemijskega premika z vrtenjem vzorca pod tem kotom (slika 8) s frekvenco, ki je večja od obsega anizotropije kemijskega premika, to je nekaj deset kHz. Tehniko imenujemo vrtenje pod magičnim kotom ('magic angle spinning' – MAS).



Slika 8: Shematski prikaz MAS eksperimenta.

Na ta način dosežemo, da je časovno povprečna orientacija molekul približno enaka magičnemu kotu, kar bistveno zoži signale v MAS NMR spektrih in s tem omogoča njihovo interpretacijo (34-35, 37).

Z vrtenjem vzorca pod magičnim kotom sicer nekoliko izboljšamo ločljivost spektrov, vendar v primerjavi z raztopljenimi vzorci še vedno ostajata rezidualno anizotropno širjenje in krajši  $T_2$ , ki ne le širita signale, ampak tudi signifikantno zmanjšata razmerje signal/šum v spektrih. Dodaten problem v primerjavi z raztopljenimi vzorci predstavlja v primeru  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  in  $^{31}\text{P}$  jeder še daljši  $T_1$ , ki omogoča manj ponovitev v danem času. Tako lahko s tehniko navzkrižna polarizacija ('cross polarization' – CP) še izboljšamo resolucijo in razmerje signal/šum v MAS NMR spektrih, vendar le, če je frekvenca vrtenja vzorca manjša od anizotropne interakcije. Pri CP eksperimentu gre namreč za prenos polarizacije s pogostih ( $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) na redke ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) spine. Uporaba 'spin-locking' magnetnih polj (periodične pulzne sekvence, ki zaklenejo magnetizacijo v x-y ravnini) omogoča, da ostaneta magnetizaciji spinov obej v x-y ravnini. Ko je izpolnjen Hartmann-Hahnov pogoj:

$$\gamma_{^{13}\text{C}} B_{^{13}\text{C}} = \gamma_{^1\text{H}} B_{^1\text{H}} \quad (5),$$

obe jedri precesirata okrog svojih spin-locking magnetnih polj ( $B_{^1\text{H}}$ ,  $B_{^{13}\text{C}}$ ) z enako kotno frekvenco, kar pa omogoča prenos polarizacije iz pogostega na redek spin. Maksimalno resolucijo spektrov dobimo običajno z metodo CP MAS (34-35, 37).

Pri amorfnih snoveh pa pride do širjenja signalov že zaradi širše porazdelitve orientacij ali pa konformacij molekul v primerjavi s kristaliničnimi oblikami (v amorfni snovi so molekule namreč bolj konformacijsko gibljive kot v kristalinični), zato ostanejo signali razširjeni tudi po vrtenju vzorca pod magičnim kotom in navzkrižni polarizaciji, kar nam omogoča identifikacijo amorfne faze pa tudi kvantifikacijo vsebnosti amorfne komponente v binarni zmesi (34-35, 37).

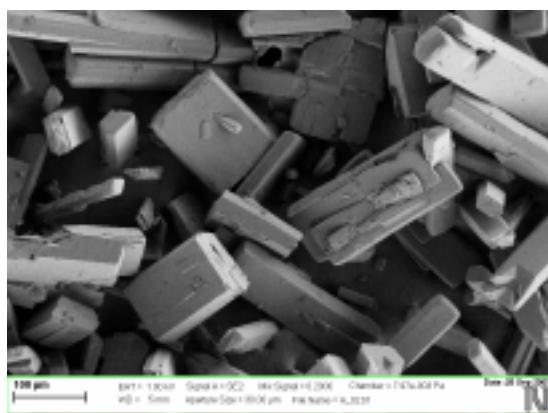
Spektroskopske analize praškastih vzorcev smo opravili na NMR spektrometru Varian NMR System 600 MHz NMR spectrometer s statičnim magnetnim poljem  $B_0 = 14.1$  T in probo 3,2 mm NB Double Resonance HX MAS Solids Probe.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

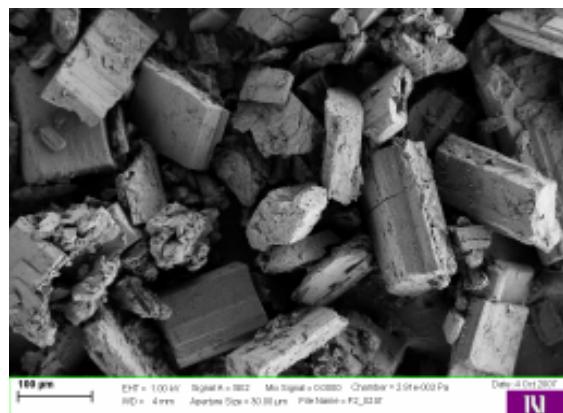
### 4.1 Polimorfizem

Najprej smo izdelali kristalinični polimorfni obliki klaritromicina I (KMC I) in II (KMC II) po zgoraj opisanih postopkih ter preučili njune fizikalno-kemijske lastnosti.

#### 4.1.1 Vrstična elektronska mikroskopija

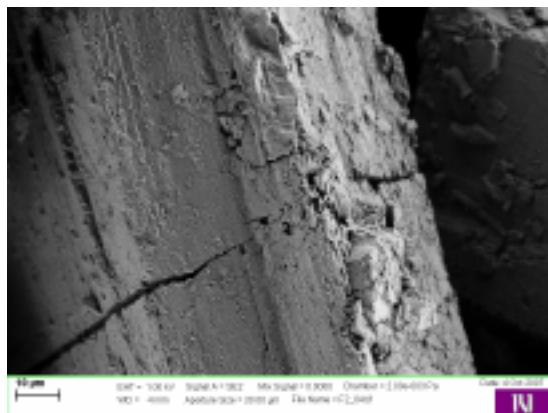


Slika 9: Kristali klaritromicina KMC I pod elektronskim mikroskopom.



Slika 10: Kristali klaritromicina KMC II pod elektronskim mikroskopom.

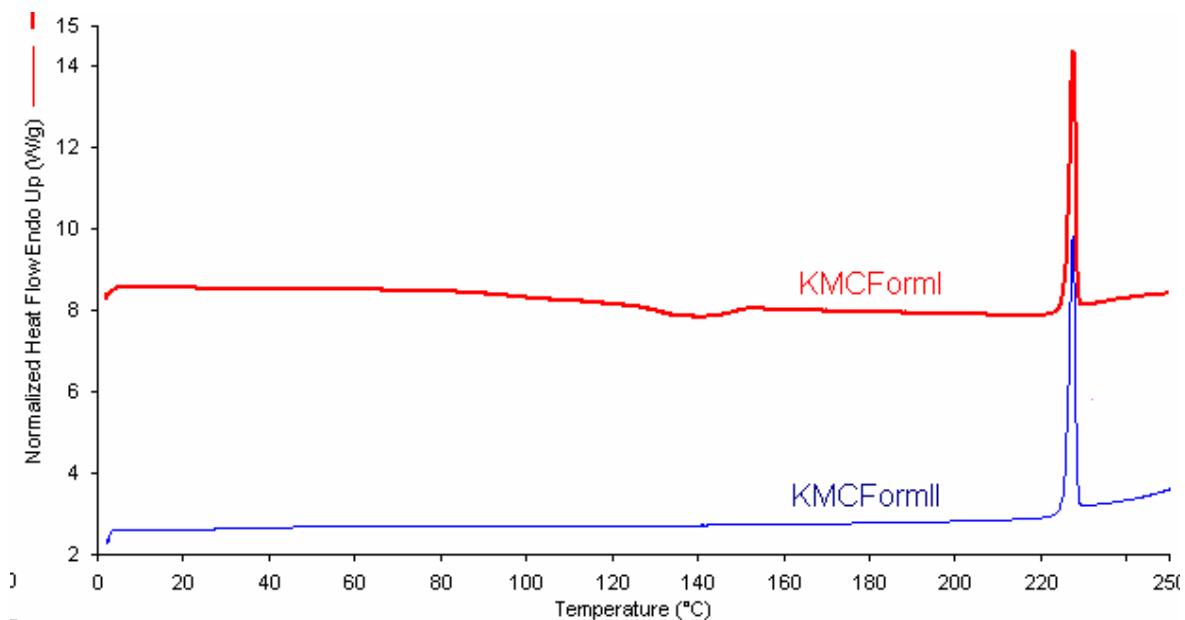
Na slikah 9, 10 so kristali obeh kristalnih oblik klaritromicina pod elektronskim mikroskopom. Velikost delcev ostaja po rekristalizaciji iz polimorfne oblike I v polimorfno obliko II enaka in znaša približno 100  $\mu\text{m}$ .



Slika 11: Površina kristala KMC II pod elektronskim mikroskopom.

Na sliki 11 je prikazana površina kristalov KMC II, ki je v primerjavi s popolnoma ravno površino kristalov KMC I precej nagubana in govori v prid spremembri kristalne strukture po rekristalizaciji iz KMC I v KMC II, saj je nagubanost posledica gibanja molekul na površini kristala KMC I zaradi njihove povečane mobilnosti med močnim mešanjem v vodi.

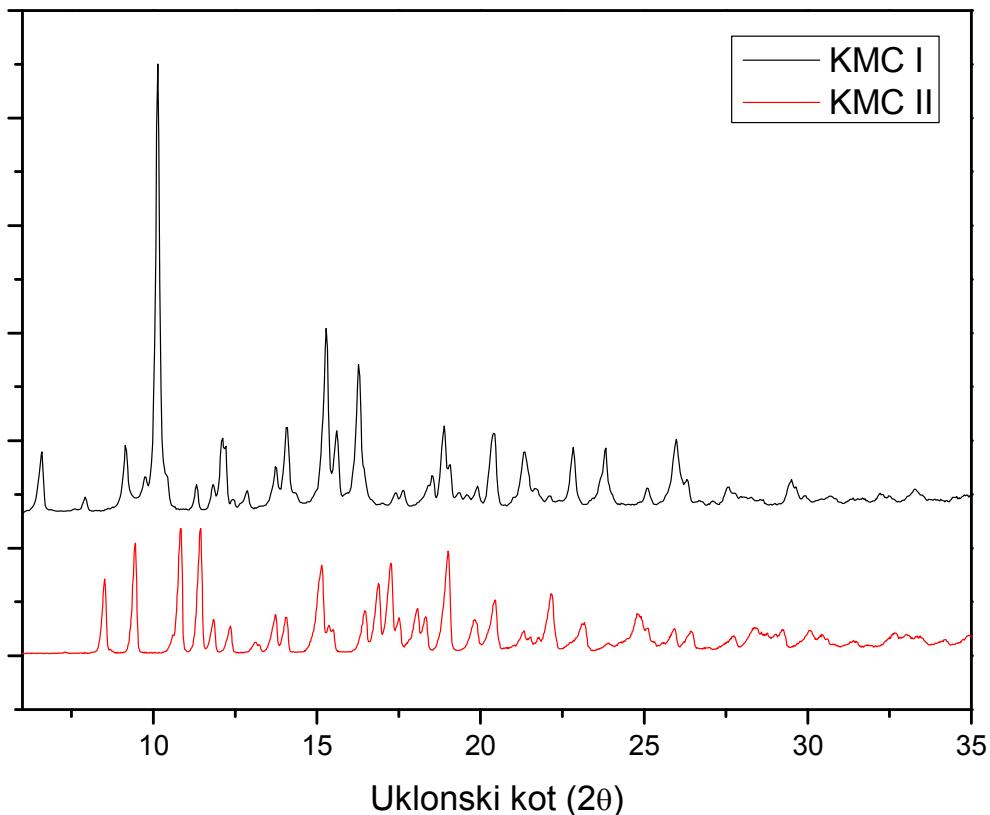
#### 4.1.2 DSC analiza



**Slika 12:** Grafični prikaz DSC analize KMC I (zgoraj) in KMC II (spodaj).

Na sliki 12 sta prikazani DSC krivulji kristalnih oblik klaritromicina. Položaja ostrih endotermnih vrhov, ki predstavlja taljenje vzorcev, se ujemata, saj smo imeli v obeh primerih opravka z isto kemijsko entiteto. Temperatura taljenja je tako pri obeh vzorcih 227,5°C, spremembi talilne entalpije pa se tudi ne razlikujeta signifikantno, in sicer znašata  $\Delta H_f^{\text{KMC I}} = 67,51 \text{ J/g}$  ter  $\Delta H_f^{\text{KMC II}} = 66,72 \text{ J/g}$ . Ker sta pripravljena vzorca polimorfni oblici – metastabilna oblika antibiotika I in termodinamsko najbolj stabilna oblika klaritromicina II – lahko opazimo pri KMC I še širok eksotermen vrh pri nekoliko nižji temperaturi, ki predstavlja polimorfno transformacijo trdno-trdno ('solid-solid' transformacija), pri kateri pride do pretvorbe tega vzorca v termodinamsko ugodnejšo obliko KMC II. DSC termograma smo primerjali tudi s termogrami, ki sta jih posnela Sohn (23) ter Yonemochi (26) s sodelavci, in ugotovili, da se z njimi ujemata.

#### 4.1.3 Rentgenska praškovna difrakcija



Slika 13: Rentgenska praškovna difraktograma KMC I in KMC II.

Rentgenska praškovna difraktograma kristalnih oblik klaritromicina na sliki 13 se signifikantno razlikujeta, saj sta vzorca polimorfni oblik z razlicnima kristalnima strukturama. Difraktograma smo primerjali tudi z difraktogramoma obeh kristalnih oblik v patentni prijavi WO 00/77017 (27) in ugotovili, da se z njima ujemata.

Prvi vrh na difraktogramu KMC I na spodnjem difraktogramu KMC II izgine, kar pomeni, da smo z rekristalizacijo KMC I popolnoma pretvorili v KMC II in da nimamo opravka z mešanico obeh polimorfov.

#### 4.1.4 Prava gostota, močenje in površinska energija

Iz podatkov za določanje prave gostote vzorcev smo izračunali še povprečni volumen molekule v posamezni kristalni obliki klaritromicina po naslednji enačbi:

$$V_1 = \frac{V_i \cdot M}{m_i \cdot N_A} \quad (6),$$

kjer je  $V_1$  volumen molekule, ki ga le-ta zavzema v kristalni rešetki vzorca,  $V_i$  volumen vzorca,  $M$  molska masa klaritromicina,  $m_i$  masa vzorca in  $N_A$  Avogadrovo število ( $6,023 \cdot 10^{23}$ /mol).

**Tabela I:** Prava gostota in povprečni volumen molekule v kristalih KMC I in KMC II.

|        | $\rho$ (g/cm <sup>3</sup> ) | $V_1$ (*10 <sup>-9</sup> nm <sup>3</sup> ) |
|--------|-----------------------------|--|
| KMC I  | $1,1656 \pm 0,0021$         | $1,0654 \pm 0,0024$                        |
| KMC II | $1,1809 \pm 0,0013$         | $1,0516 \pm 0,0017$                        |

Iz tabele I je razvidno, da ima KMC I v primerjavi s termodinamsko ugodnejšim KMC II nižjo gostoto ter nekoliko večji molekulski volumen.

**Tabela II:** Močenje KMC I in KMC II.

|        | $\alpha_{\text{voda}}$ (°) | $\alpha_{\text{formamid}}$ (°) | $\alpha_{\text{dijodometan}}$ (°) |
|--------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| KMC I  | $63,1 \pm 0,9$             | $20,0 \pm 1,1$                 | $28,1 \pm 2,4$                    |
| KMC II | $57,6 \pm 1,0$             | $27,7 \pm 2,0$                 | $20,1 \pm 2,8$                    |

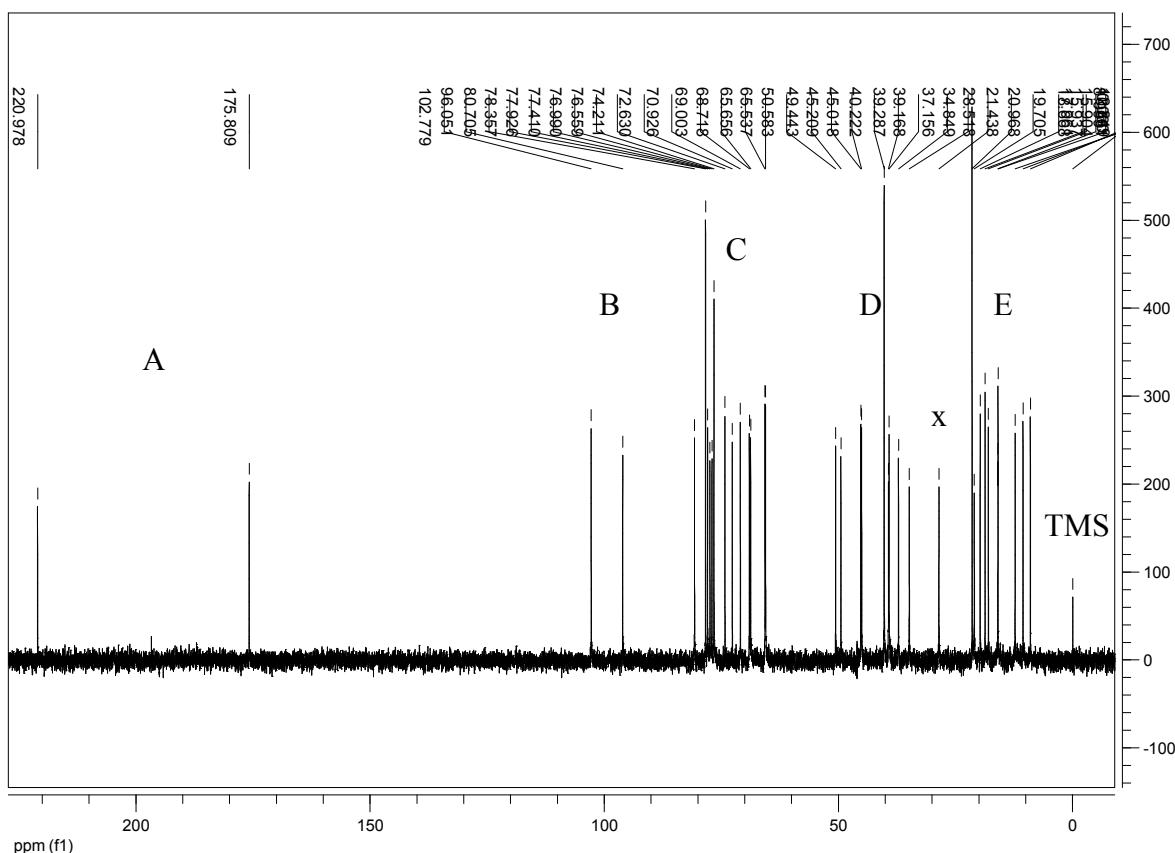
V tabeli II so prikazani stični koti vode, formamida in dijodometana z vzorcema KMC I in KMC II. Stična kota vode in nepolarnega dijodometana sta pri KMC II nekoliko manjša kot pri KMC I, kar pomeni, da tvori KMC II močnejše interakcije tako s polarnimi kot nepolarnimi topili. Stični kot elektronakceptorskega formamida pa je pri KMC II večji kot pri KMC I.

**Tabela III:** Površinska energija KMC I in KMC II po 'Acid-Base' metodi.

|        | $\gamma^{\text{tot}}$ (mN/m) | $\gamma^{\text{LW}}$ (mN/m) | $\gamma^{\text{AB}}$ (mN/m) | $\gamma^-$ (mN/m) | $\gamma^+$ (mN/m) | $\gamma^+/\gamma^-$ |
|--------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| KMC I  | 53,64                        | 45,00                       | 8,64                        | 2,72              | 6,85              | 2,52                |
| KMC II | 54,72                        | 47,77                       | 6,95                        | 0,86              | 14,07             | 16,36               |

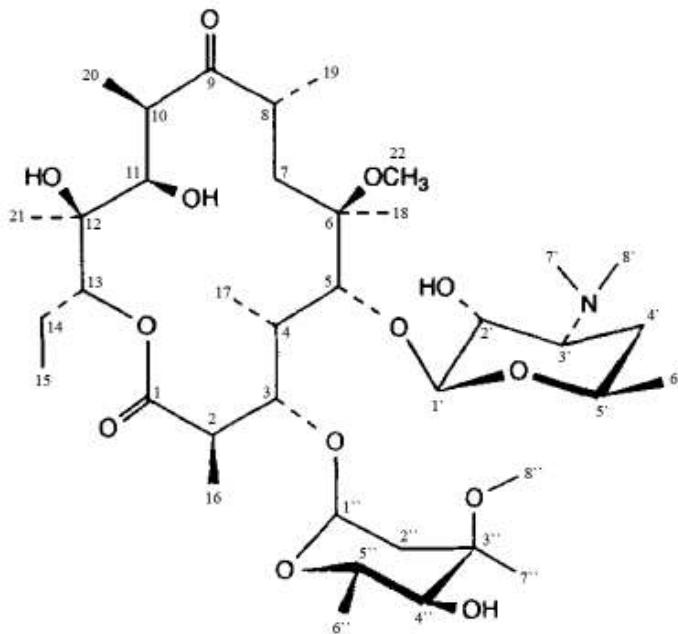
Celokupna površinska energija je po 'Acid-Base' metodi, katere rezultati so predstavljeni v tabeli III, pri obeh polimorfnih oblikah podobna, enako velja tudi za polarno in nepolarno komponento. Razlike v interakcijah so očitno predvsem na račun močno spremenjenega razmerja med bazičnimi in kislinskimi prispevki k polarni komponenti površinske energije. To dejstvo govori v prid spremembi konformacije molekul v kristalu pri pretvorbi v drugo polimorfno obliko, saj se s tem v kristalu spremeni elektronska gostota, to pa vodi v spremembo kislinskih ter bazičnih interakcij na njegovi površini.

#### 4.1.5 NMR analiza raztopine



**Slika 14:**  $^{13}\text{C}$  NMR spekter klaritromicina v  $\text{CDCl}_3$ .

$^{13}\text{C}$  NMR spekter klaritromicina v  $\text{CDCl}_3$  na sliki 14 smo zaradi lažje interpretacije razdelili na 5 sklopov vrhov, ki smo jih označili s črkami A, B, C, D in E. Vrh pri 28,518 ppm smo pri grupiranju podatkov izpustili, saj ga težko uvrstimo v kateregakoli od označenih sklopov. Zaradi lažje razlage ga bomo poimenovali vrh x.



Slika 15: Oštevilčenje molekule klaritromicina (36).

Tabela IV: Asignacija  $^{13}\text{C}$  NMR spektra klaritromicina v  $\text{CDCl}_3$ .

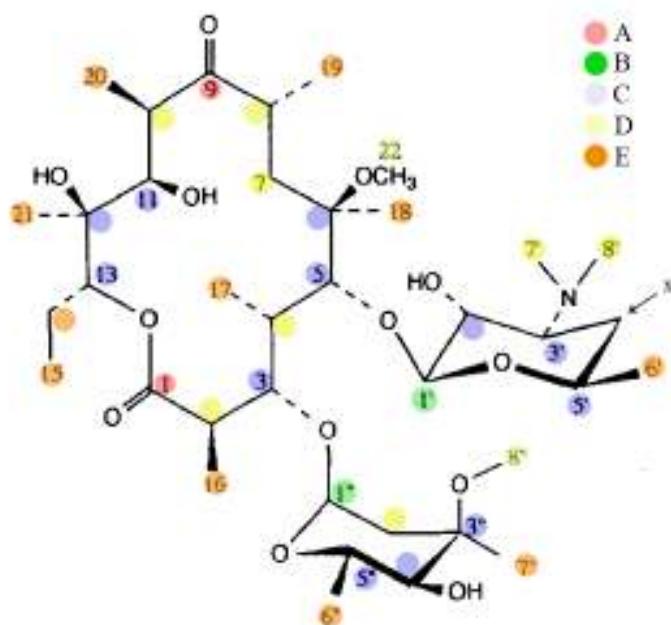
|   | $\delta_c$ (ppm) | mesto |   | $\delta_c$ (ppm) | mesto  |   | $\delta_c$ (ppm) | mesto  |
|---|------------------|-------|---|------------------|--------|---|------------------|--------|
| A | 220,978          | 9     | C | 68,718           | 5'     | x | 28,518           | 4'     |
|   | 175,809          | 1     |   | 65,656           | 5"     |   | 21,438           | 7", 6' |
| B | 102,779          | 1'    |   | 65,537           | 3'     | E | 20,968           | 14     |
|   | 96,051           | 1"    |   | 50,583           | 22     |   | 19,705           | 18     |
| C | 80,705           | 5     | D | 49,440           | 8"     |   | 18,668           | 6"     |
|   | 78,357           | 3, 6  |   | 45,209           | 8      |   | 17,961           | 19     |
|   | 77,926           | 4"    |   | 45,018           | 2      |   | 15,937           | 21     |
|   | 76,559           | 13    |   | 40,222           | 7', 8' |   | 15,904           | 16     |
|   | 74,211           | 12    |   | 39,287           | 7      |   | 12,249           | 20     |
|   | 72,630           | 3"    |   | 39,168           | 4      |   | 10,561           | 15     |
|   | 70,926           | 2'    |   | 37,156           | 10     |   | 8,999            | 17     |
|   | 69,003           | 11    |   | 34,849           | 2"     |   |                  |        |

V sklop A sodita vrhova karbonilnih C-atomov v laktonskem obroču klaritromicina ( $\text{C}_9$  in  $\text{C}_1$ ), v sklop B pa vrhova ogljikovih atomov sladkornih komponent, ki tvorita z makrocikličnim obročem glikozidni vezi ( $\text{C}_{1'}$  in  $\text{C}_{1''}$ ). Ravno ti širje ogljikovi atomi so ključnega pomena za nadaljnja sklepanja o strukturi polimorfnih oblik klaritromicina, saj so zaradi elektronegativnosti atomov, na katere so vezani s kar dvema vezema, dovolj

odsenčeni, da jih lahko brez težav identificiramo tudi na spektri NMR v trdnem, hkrati pa lahko spektre različnih polimorfnih oblik na tem delu brez težav primerjamo med sabo. Ostali ogljikovi atomi imajo namreč preveč podobno lokalno okolje, zato prihaja v NMR spektri do prekrivanja vrhov, to pa onemogoča njihovih asignacijo.

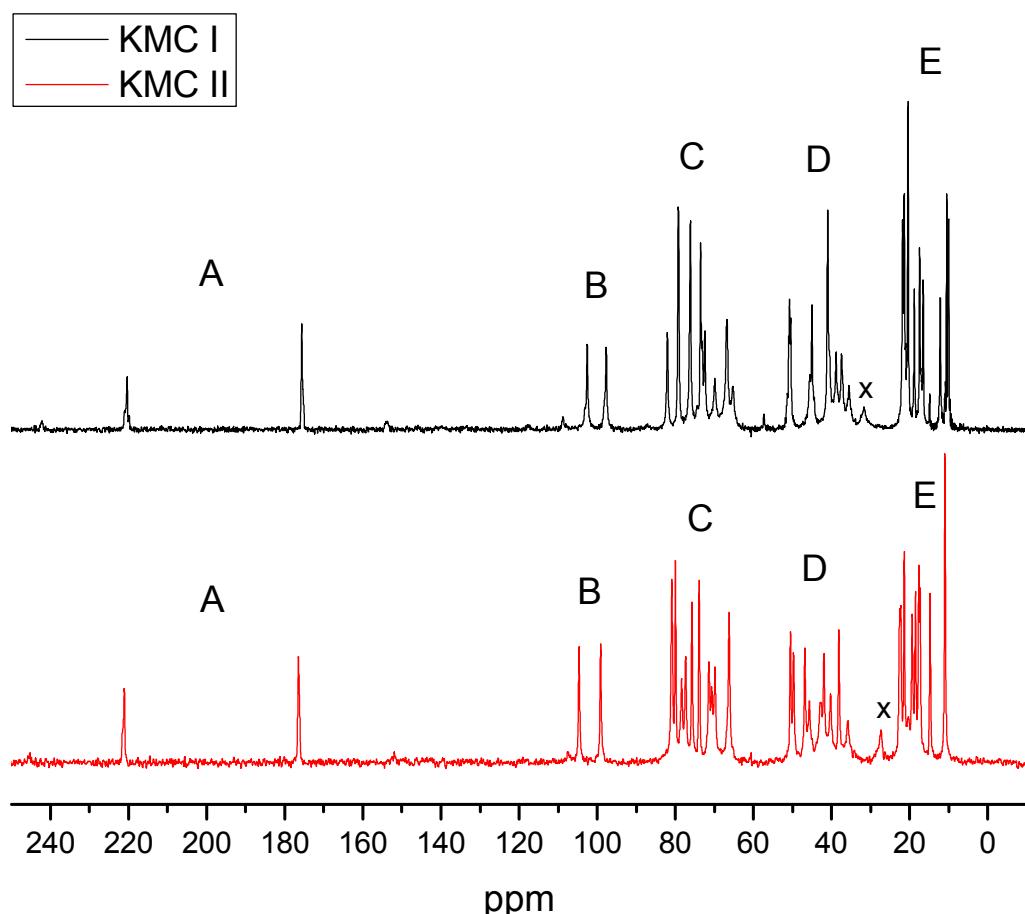
V sklopu C so zajeti vrhovi ogljikovih atomov laktonskega obroča in slatkornih komponent klaritromicina, ki so vezani na elektronegativne elemente (O, N) in so zato v primerjavi z ostalimi C-atomi nekoliko bolj odsenčeni ter premaknjeni k malo višim kemijskim premikom ( $C_5$ ,  $C_3$ ,  $C_6$ ,  $C_{4''}$ ,  $C_{13}$ ,  $C_{12}$ ,  $C_{3''}$ ,  $C_{2'}$ ,  $C_{11}$ ,  $C_5'$ ,  $C_{5''}$  in  $C_{3'}$ ). V sklop D sodijo vrhovi ogljikov etrskih ter aminskih metilnih skupin, vrhovi ogljikovih atomov makrocikličnega obroča, ki niso vezani na elektronegativne elemente, pa tudi vrh enega izmed ogljikov sladkorne komponente klaritromicina ( $C_{22}$ ,  $C_{8''}$ ,  $C_8$ ,  $C_2$ ,  $C_7$ ,  $C_8$ ,  $C_7$ ,  $C_4$ ,  $C_{10}$  in  $C_{2''}$ ). Med sklopoma D in E je vrh x pri 28,518 ppm, ki pripada enemu izmed ogljikov sladkorne komponente klaritromicina ( $C_4$ ), sklop E pa predstavljajo predvsem vrhovi ogljikovih atomov metilnih skupin, vezanih na makrocikličen laktinski obroč in sladkorne komponente, ki v svoji lokalni okolici nimajo elektronegativnih elementov in so zato najbolj zasenčeni ter imajo najmanjši kemijski premik ( $C_7''$ ,  $C_6'$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{18}$ ,  $C_{6''}$ ,  $C_{19}$ ,  $C_{21}$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{20}$ ,  $C_{15}$  in  $C_{17}$ ).

Na NMR spektru sta prisotna še vrhova s kemijskima premikoma 76,990 ppm in 77,410 ppm, ki verjetno pripadata topilu in sta del njegovega tripleta.



**Slika 16:** Sklopi vrhov, ponazorjeni na molekuli klaritromicina.

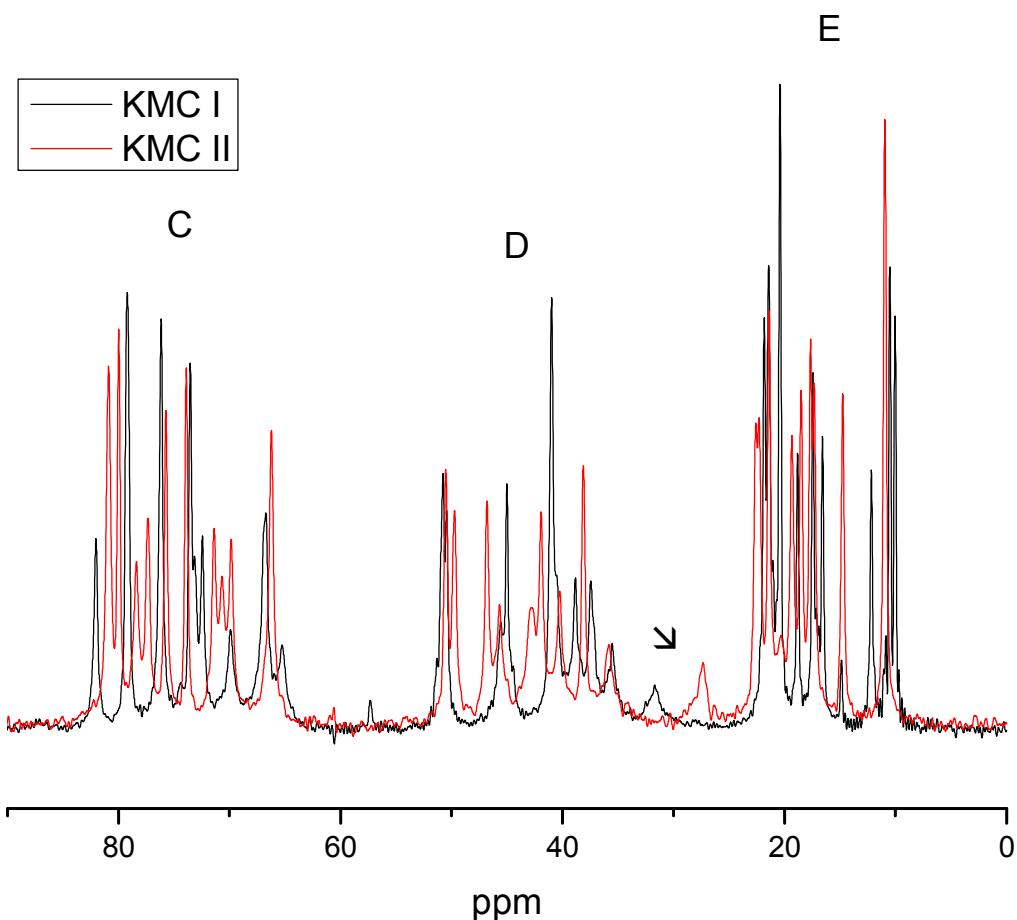
#### 4.1.6 NMR v trdnem



Slika 17:  $^{13}\text{C}$  NMR spektra kristalnih oblik klaritromicina KMC I in KMC II.

Tako kot na spektru raztopljenega klaritromicina lahko tudi na obeh NMR spektrih kristalnih oblik učinkovine na sliki 17 prepoznamo 5 sklopov vrhov A, B, C, D in E ter vrh med sklopoma D in E, kjer gre tudi verjetno za vrh enega izmed ogljikovih atomov sladkorne komponente, ki smo ga na NMR spektru klaritromicina v  $\text{CDCl}_3$  označili z vrh x.

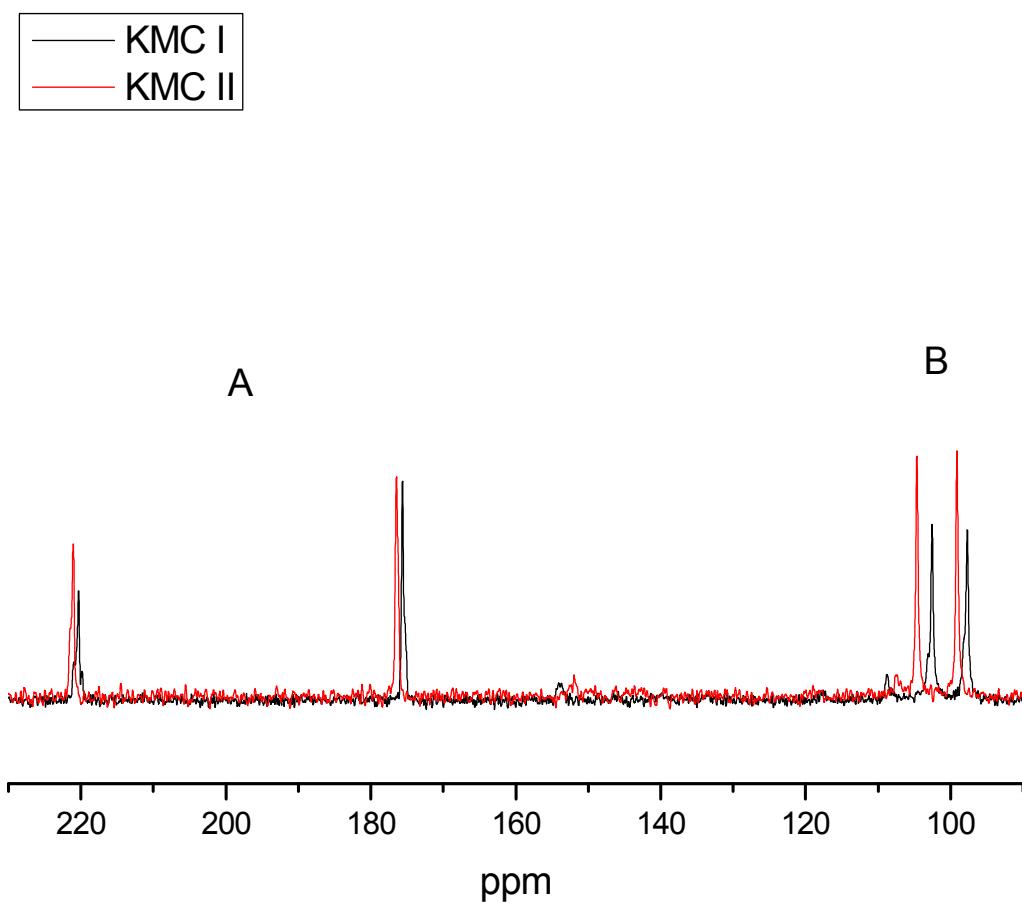
Pri sklopih C, D in E je med NMR spektri kristalnih oblik klaritromicina precejšnja razlika, opazna pa je tudi bistvena sprememba položaja vrha x med sklopoma D in E, ki smo ga na sliki 18 označili s puščico.



**Slika 18:** Sklopi C, D in E  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov KMC I in KMC II.

KMC I in KMC II se očitno razlikujeta v svoji kristalni strukturi, najsi gre tu za spremembo oblike osnovne celice, spremembo dimenzij kristalne rešetke in/ali za spremembo konformacije molekul klaritromicina znotraj kristala.

Če na preučevanih spektrih podrobnejše primerjamo sklopa A in B, lahko na spektru KMC II opazimo premik k nekoliko višjim kemijskim premikom (slika 19).



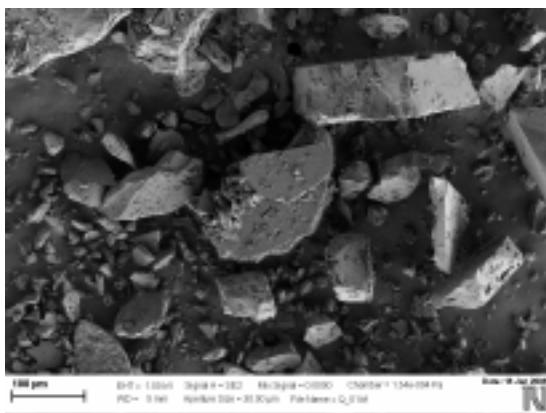
**Slika 19:** Sklopa A in B  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov KMC I in KMC II.

Primerjava prave gostote preučevanih vzorcev kaže, da ima KMC II večjo gostoto v primerjavi s KMC I, kar pomeni, da so v polimorfni obliki II molekule klaritromicina bolj tesno skupaj, zato pa je tudi njihov vpliv na jedra sosednjih molekul večji. Torej je pri KMC II vpliv elektronegativnih atomov sosednjih molekul na odsenčenje opazovanih jader večji kot pri KMC I, kar povzroči premik vrhov k nekoliko višjim kemijskim premikom. Še vedno pa ni nujno, da gre dejansko le za spremembo dimenzij osnovne celice kristala, ampak gre lahko tudi za konformacijski preklop molekule klaritromicina, zaradi česar pride do približanja elektronegativnih skupin opazovanim jedrom.

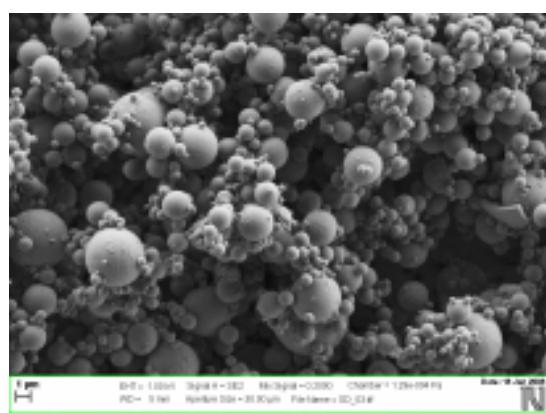
## 4.2 Poliamorfizem

Amorfno obliko klaritromicina smo pripravili na dva načina po zgoraj opisanih postopkih, in sicer s taljenjem s hitrim zamrzovanjem (KMCq) ter s sušenjem z razprševanjem (KMCsd), in primerjali njune strukturne lastnosti tudi v primerjavi z obema kristalnima oblikama.

### 4.2.1 Vrstična elektronska mikroskopija



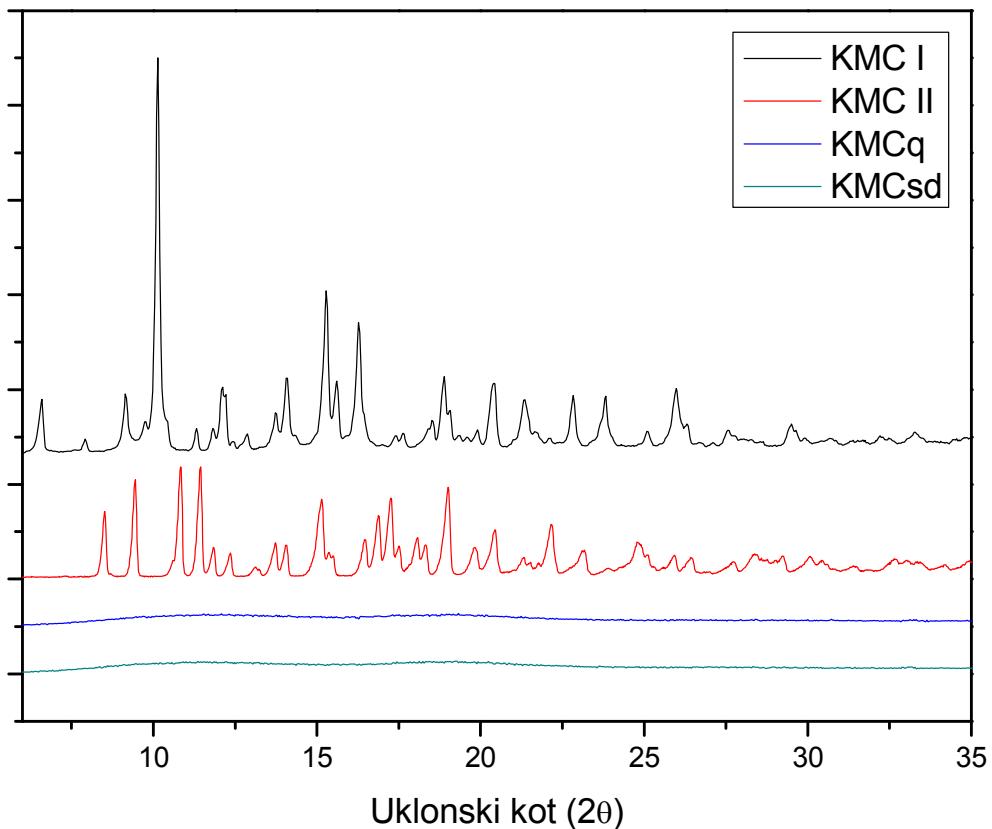
Slika 20: Amorfen klaritromicin KMCq pod elektronskim mikroskopom.



Slika 21: Amorfen klaritromicin KMCsd pod elektronskim mikroskopom.

Na slikah 20 in 21 so amorfni delci klaritromicina pod elektronskim mikroskopom. Pri KMCq so delci zelo različnih oblik in velikosti, saj smo pri pripravi vzorca drobili strjen film učinkovine na objektnem stekelcu. Robovi delcev niso ravni tako kot pri kristalnih oblikah (slike 9, 10), saj se kristali lomijo po kristalnih ravninah, ki jih v amorfnih delcih zaradi njihove neurejene strukture ni. KMCsd pa predstavljajo majhni sferični delci, veliki nekaj  $\mu\text{m}$ , saj je šlo pri pripravi tega vzorca za hitro sušenje razpršenih kapljic raztopljene učinkovine in je zato končni produkt ohranil njihovo obliko.

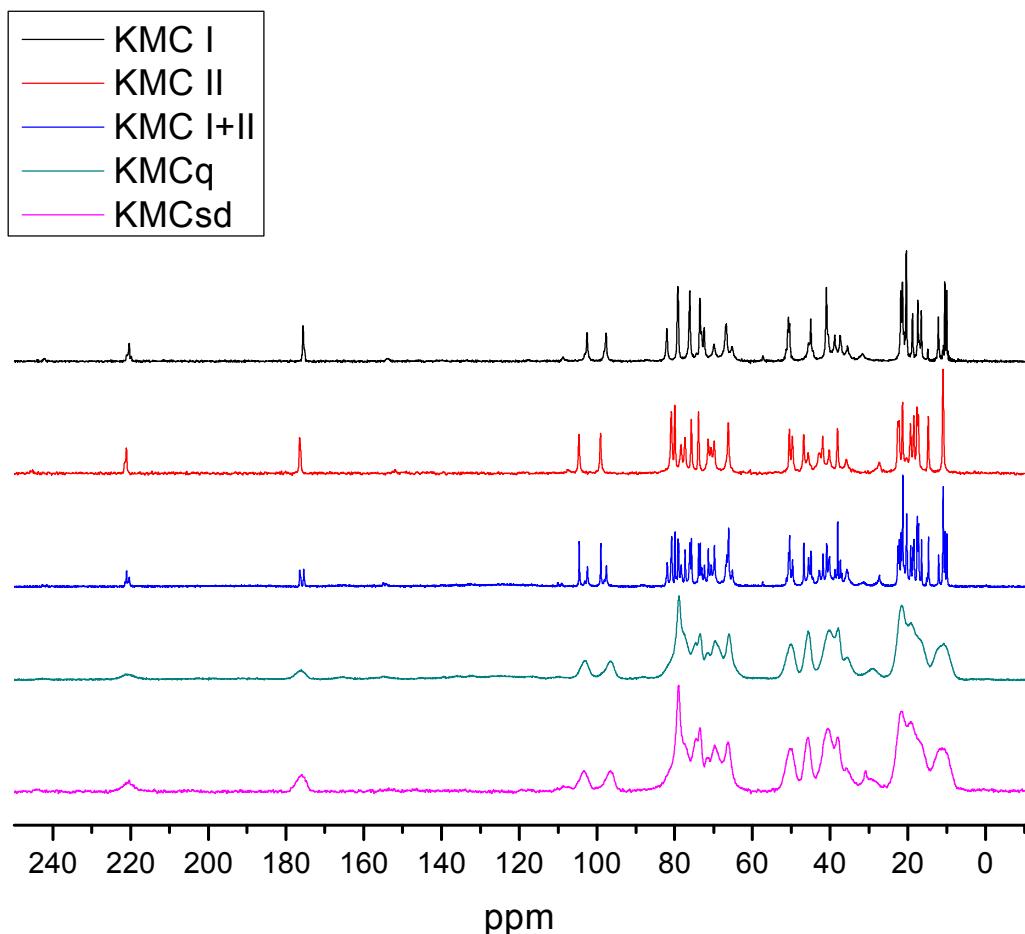
#### 4.2.2 Rentgenska praškovna difrakcija



**Slika 22:** Rentgenski praškovni difraktogrami KMC I, KMC II, KMCq in KMCsd.

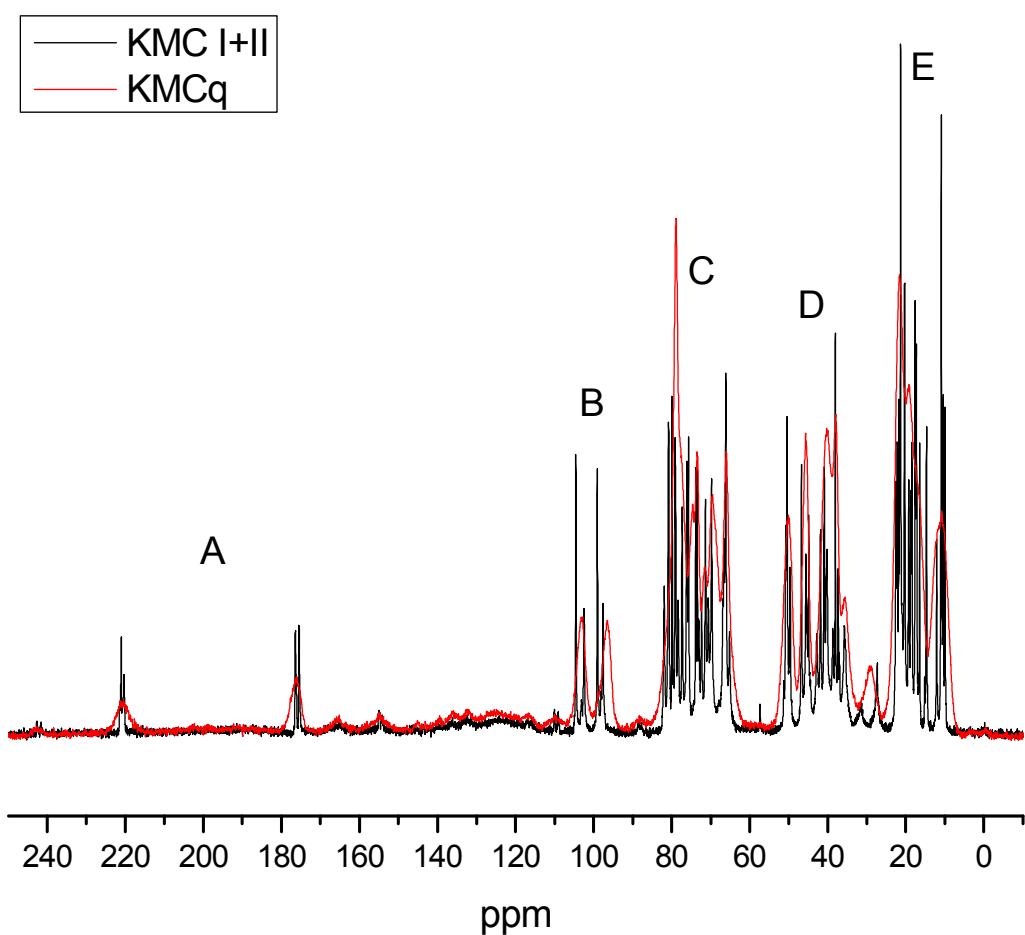
Na rentgenskih praškovnih difraktogramih KMCq in KMCsd na sliki 22 sta le dva zelo razširjena dviga in nobenih izrazitih vrhov tako kot na difraktogramih KMC I in KMC II, saj imamo opravka z amornima substancama z neurejeno strukturo, ki sipa rentgenske žarke v vse smeri približno enako. Omenjena dviga sta posledica neke karakteristične razdalje, ki se v vzorcu ponavlja (verjetno gre za dolžino vezi).

#### 4.2.3 NMR v trdnem

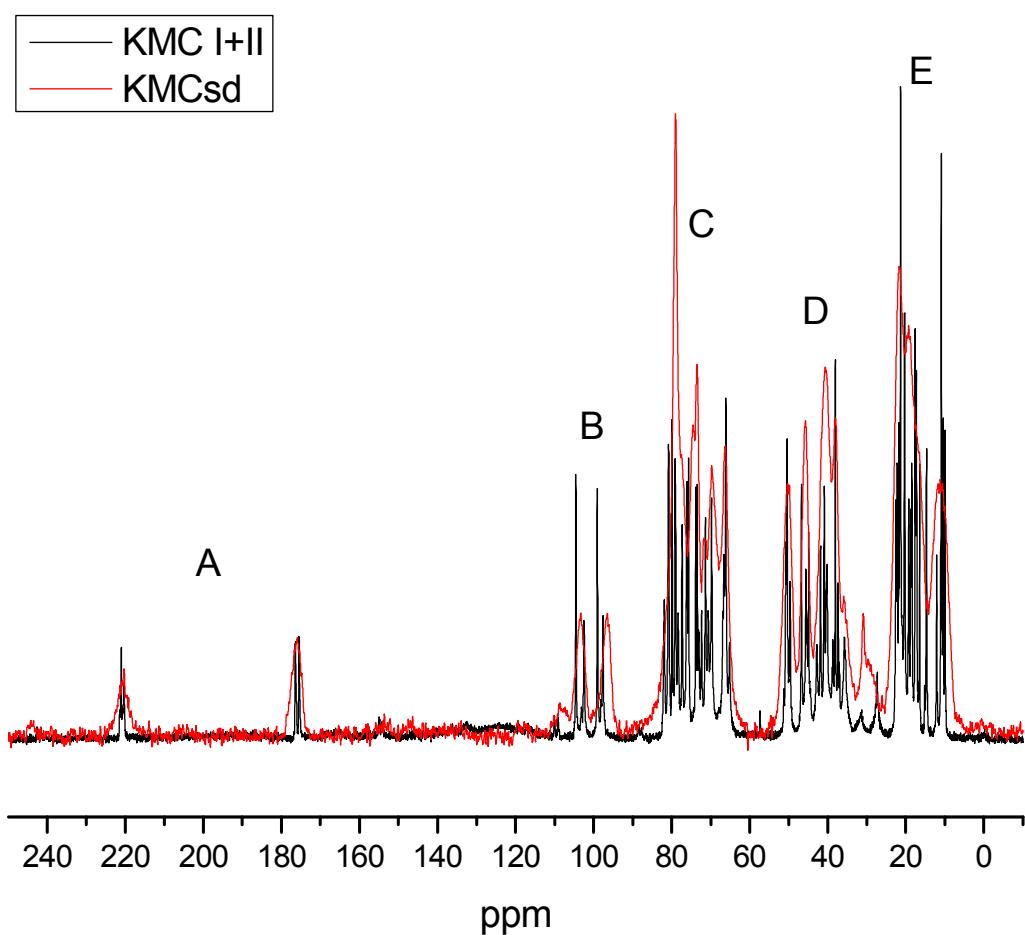


**Slika 23:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektri kristalnih oblik klaritromicina KMC I in KMC II, njune mešanice v razmerju 1:1 KMC I+II ter amorfnih oblik učinkovine KMCq in KMCsd.

NMR spektra amorfnih oblik klaritromicina na sliki 23 imata precej širše vrhove kot spektri kristalne učinkovine. Razširitve vrhov so posledica širše porazdelitve orientacij molekul v vzorcu ter njihove večje gibljivosti v amorfni obliki snovi, ki pripelje do več rotacij in reorientacij funkcionalnih skupin, večjega napenjanja makrocikličnega obroča ter s tem širše porazdelitve konformacij v amornem vzorcu.

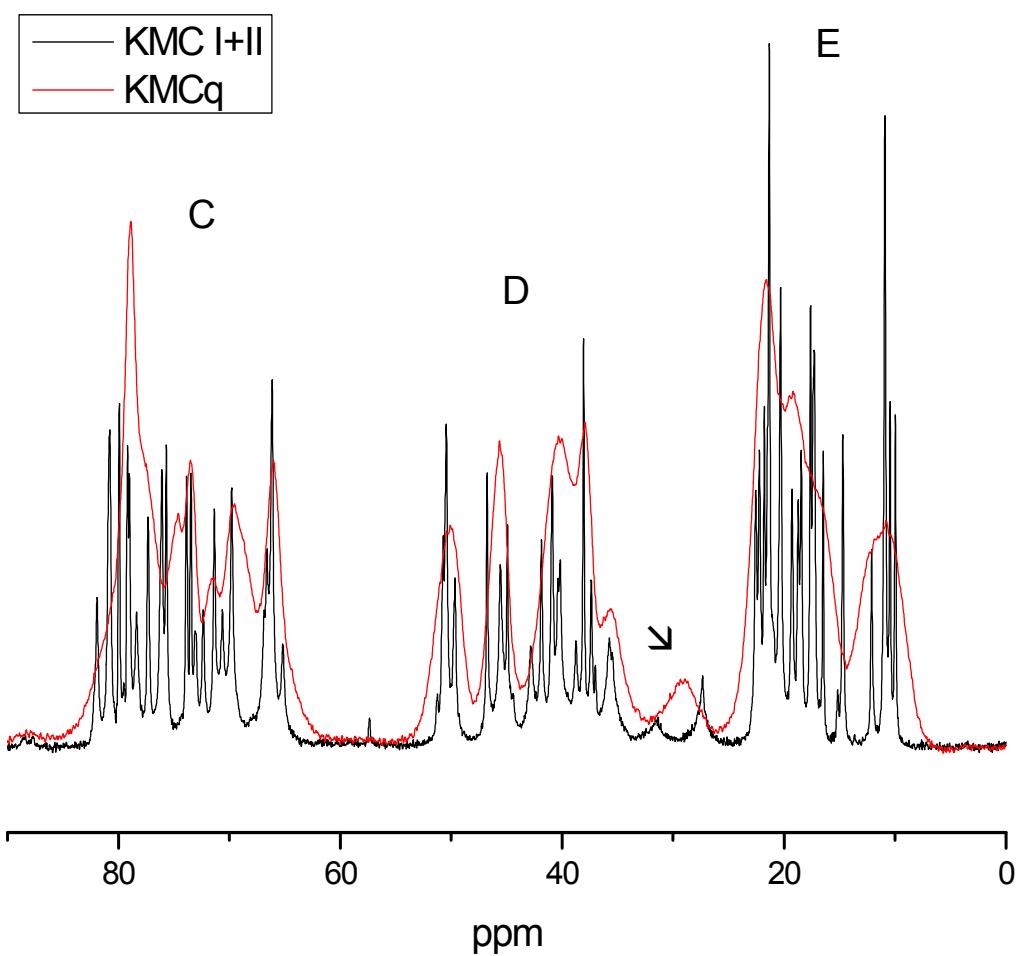


**Slika 24:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektra mešanice obeh kristalnih oblik klaritromicina v razmerju 1:1 KMC I+ II ter amorfnega klaritromicina KMCq.

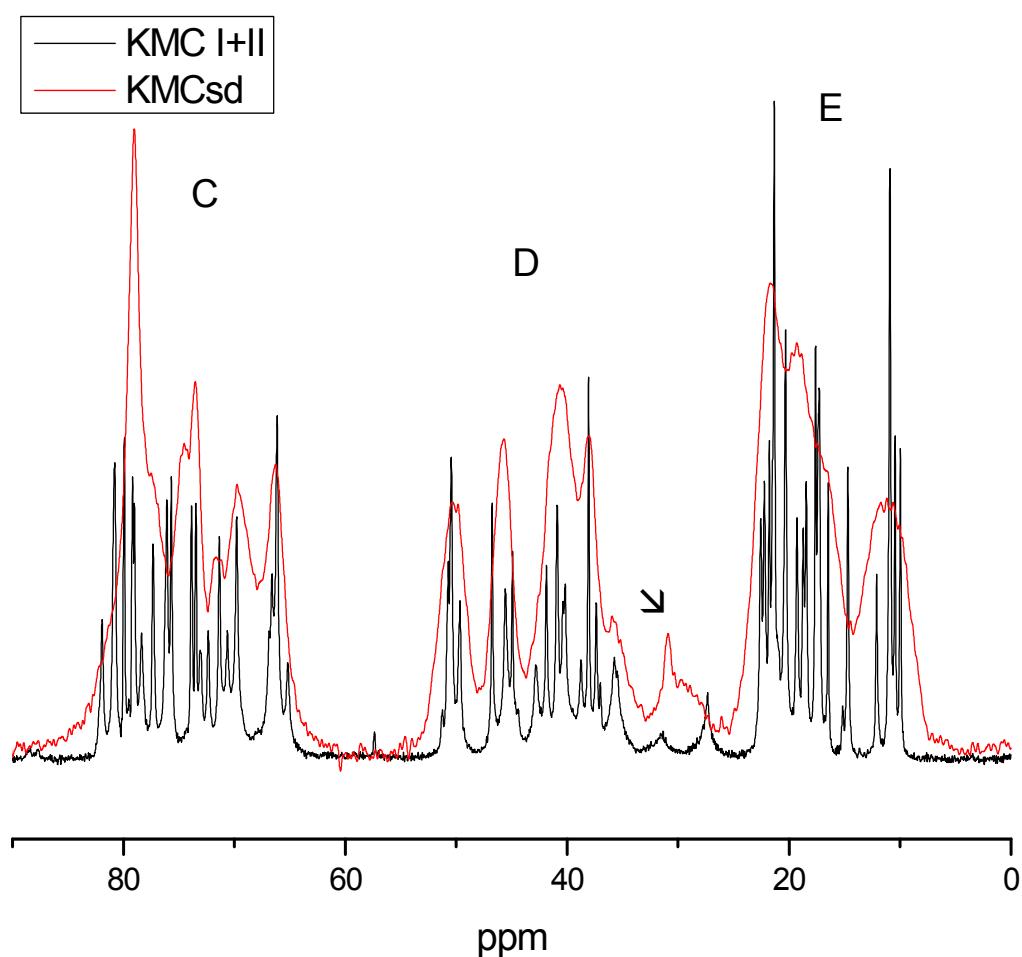


**Slika 25:** <sup>13</sup>C NMR spektra mešanice obeh kristalnih oblik klaritromicina v razmerju 1:1 KMC I+II ter amorfnega klaritromicina KMCsd.

Spektra amornih oblik antibiotika na slikah 24, 25 imata mnogo širšo porazdelitev vrhov kot spekter mešanice obeh kristalnih oblik klaritromicina, kar je, kot smo že omenili zgoraj, verjetno posledica širše porazdelitve orientacij ter večje gibljivosti molekul v amornem stanju snovi. Vendar pa se nekateri vrhovi na spektrih amornega in kristalnega klaritromicina zelo lepo ujemajo, drugi pa se pri kristalnih oblikah pojavljajo prav na mestih, kjer so na spektrih amornih oblik popolne oslabitve, in obratno (slika 26, 27).

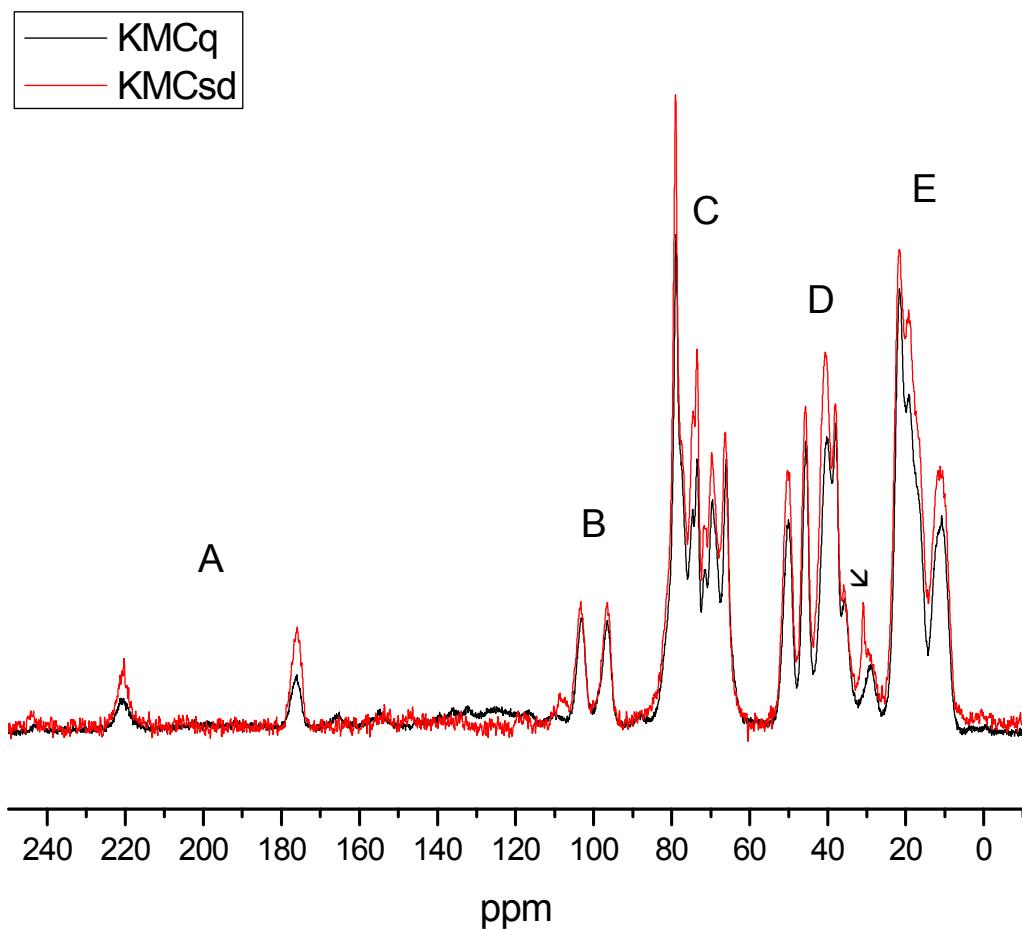


**Slika 26:** Sklopi C, D in E  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov KM I+II ter KMCq.



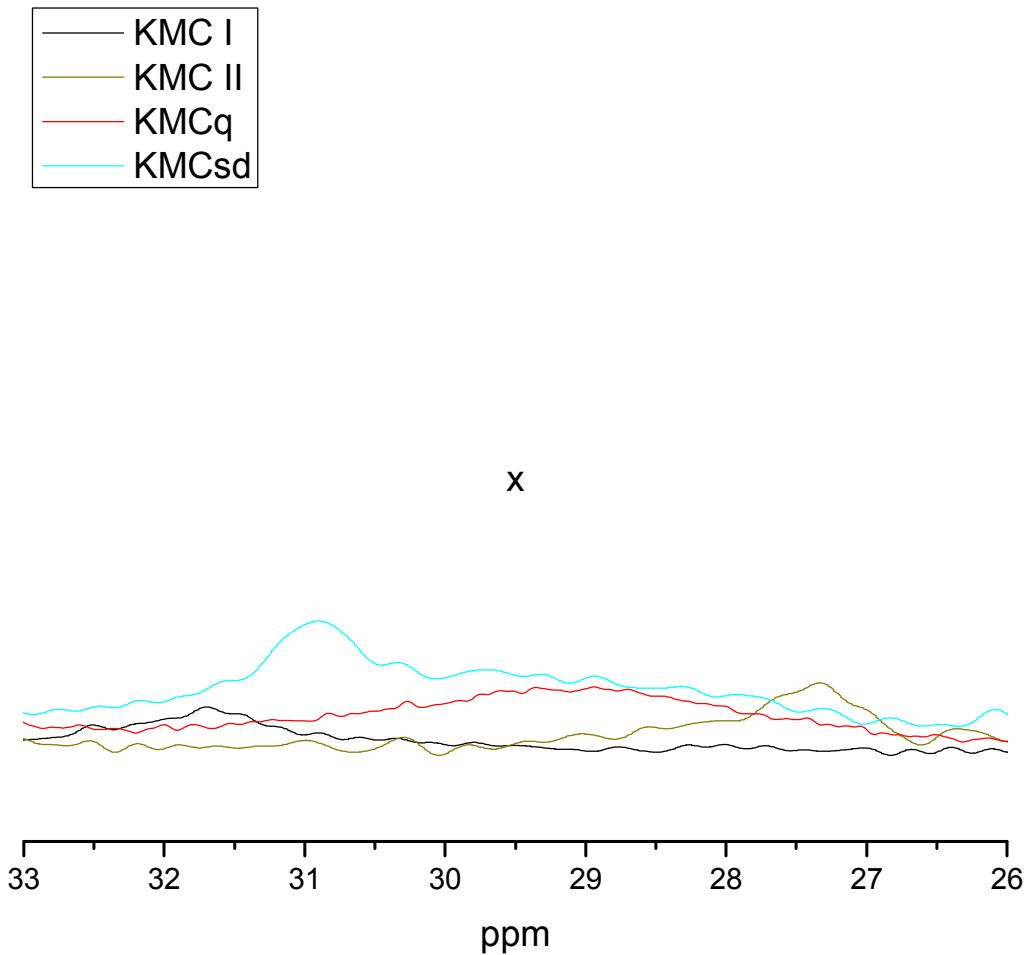
**Slika 27:** Sklopi C, D in E  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov KMC I+II ter KMCsd.

To kaže na različno naravo ogljikovih atomov v molekuli klaritromicina. Nekateri C-atomi so zelo gibljivi, zato pride na spektru amorfnega vzorca do premika njihovih vrhov v primerjavi s kristalno obliko, drugi pa so praktično negibljivi, zato se spektra kristalne in amorfne oblike na mestih njihovih vrhov ujemata.



**Slika 28:**  $^{13}\text{C}$  NMR spektra amorfnih oblik klaritromicina KMCq in KMCsd.

Na prvi pogled sta si NMR spektra amorfnih oblik klaritromicina na sliki 28 zelo podobna. S puščico smo označili vrh x med sklopoma D in E, pri katerem je na spektru KMCsd viden premik k nekoliko višjim kemijskim premikom v primerjavi s spektrom KMCq. Če si označena vrhova pogledamo še v primerjavi z NMR spektri KMC I+II (sliki 26, 27) ter KMC I in KMC II (slika 29), lahko ugotovimo naslednje.

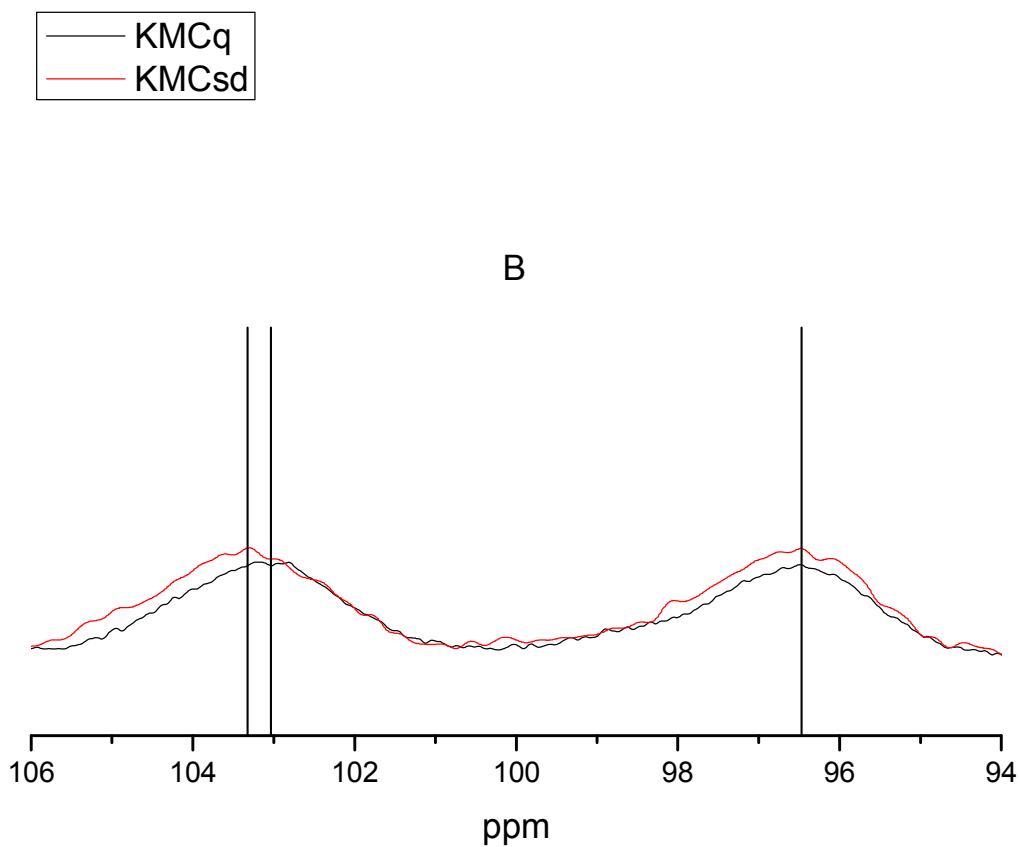


**Slika 29:** Vrh x  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov preučevanih oblik klaritromicina KMC I, KMC II, KMCq in KMCsd.

Opazovani vrh x je pri KMCq povprečje položajev tega vrha pri obeh kristalnih oblikah antibiotika, medtem ko je pri KMCsd le-ta nekoliko bolj premaknjen v smer položaja vrha pri KMC I. Omenjena sprememba položaja vrha x na NMR spektrih amornega klaritromicina je najverjetneje posledica priprave preučevanih vzorcev. KMCq smo namreč pripravili tako, da smo učinkovino najprej stalili pri povišani temperaturi in ji s tem vnesli ogromno energije za molekulsko gibanje. Nato smo talino v trenutku ohladili, da se je strdila, zato molekule niso imele dovolj časa za prerazporejanje in orientacijo. Pri KMCsd pa traja sušenje kapljic raztopljljene učinkovine nekoliko dlje, tako da imajo molekule na voljo nekaj časa za orientacijo v kinetično ugodnejšo obliko, ki je v našem primeru KMC I. Zato se vrh x pri KMCsd tudi pomakne proti položaju tega vrha na spektru kristalnega

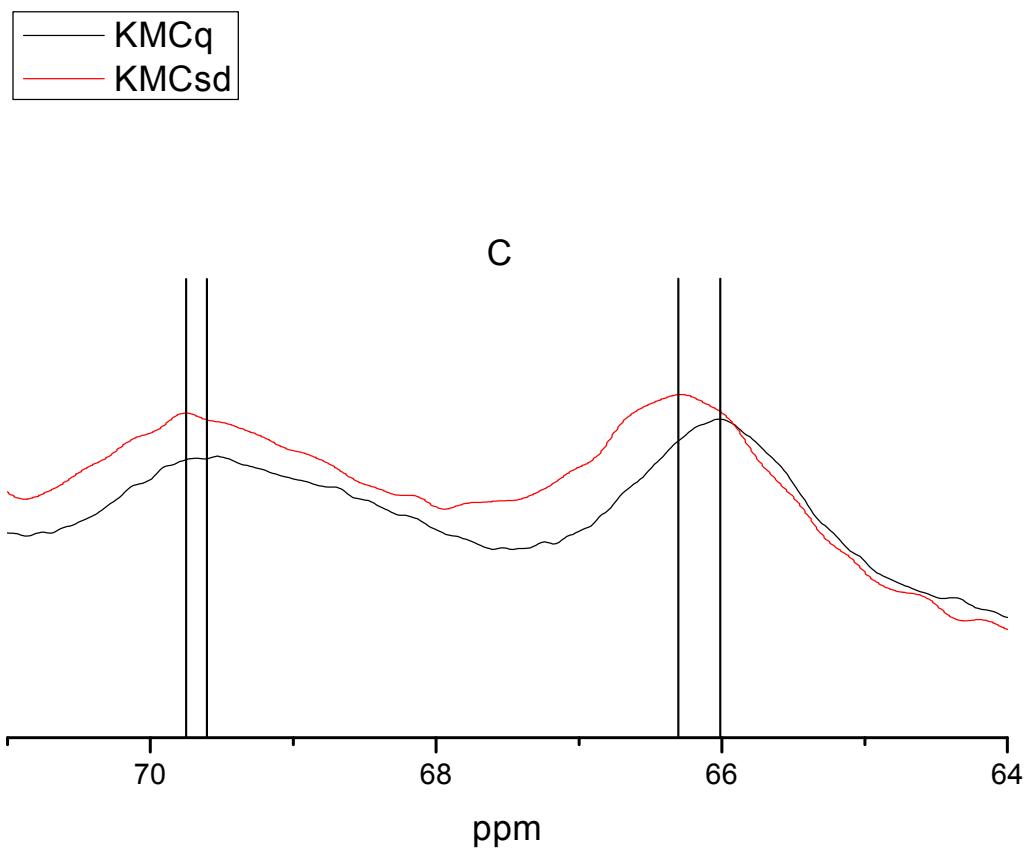
KMC I. Vendar pa ostaja porazdelitev tega vrha na spektru KMCsd še vedno široka, takšna kot je značilna za amorfne vzorce (slika 23).

Če si podrobnejše pogledamo še nekatere dele preučevanih spektrov, lahko ponekod opazimo manjše vendar signifikantne premike posameznih vrhov (slika 30, 31, 32).



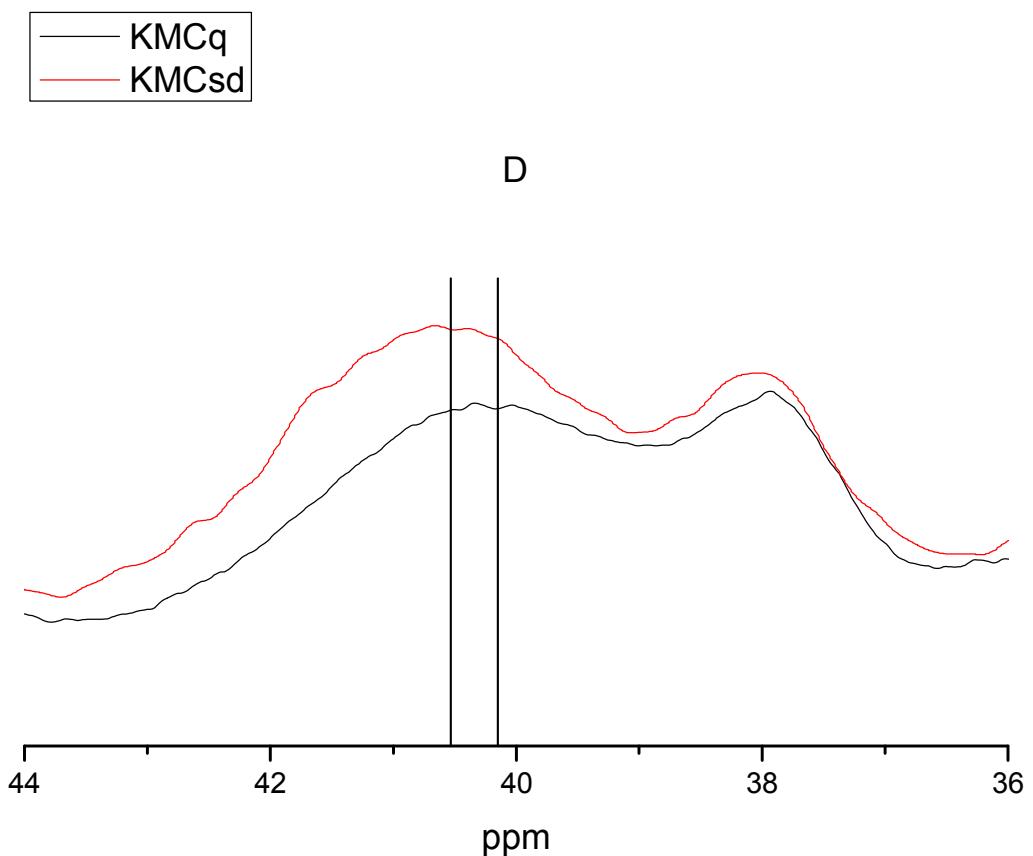
**Slika 30:** Sklop B  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov amorfnih oblik klaritromicina KMCq in KMCsd.

Vrh enega izmed ogljikovih atomov sladkorne komponente, ki tvori glikozidno vez, je pri KMCsd premaknjen k nekoliko višjim kemijskim premikom, medtem ko se vrhova za drugi glikozidni C-atom na obeh spektrih popolnoma ujemata (slika 30).



**Slika 31:** Del sklopa C  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov amorfnih oblik klaritromicina KMCq in KMCsd.

Podobno lahko opazimo tudi pri vrhu s kemijskim premikom 66,0 ppm, saj je tudi tu vrh na spektru KMCsd v primerjavi s KMCq pomaknjen proti višjim kemijskim premikom, ter pri vrhu s kemijskim premikom 69,5 ppm, kjer je ta premik nekoliko manjši (slika 31).



**Slika 32:** Del sklopa D  $^{13}\text{C}$  NMR spektrov amorfnih oblik klaritromicina KMCq in KMCsd.

Tudi vrh s kemijskim premikom 40,0 ppm je pri KMCsd pomaknjen k višjim kemijskim premikom, medtem ko se vrhovi preostalih ogljikovih atomov na obeh spektrih ujemajo (slika 32).

Ker oba spektra izkazujeta široko porazdelitev, ki je ohranjena tudi na vseh mestih njenih razlik, lahko zaključimo, da smo imeli opravka z dvema različnima amorfними обликами klaritromicina, torej da pri preučevanem antibiotiku obstaja pojav poliamorfizma.

## 5 SKLEP

Kristalni polimorfni oblici klaritromicina I in II izkazujeta različne fizikalno-kemijske lastnosti. Pri pretvorbi kinetično stabilnejše kristalne oblike I v termodinamsko ugodnejšo polimorfno obliko II pride namreč do povečanja gostote, nekoliko pa se spremenijo tudi površinske lastnosti trdne učinkovine. Celokupna površinska energija ostaja sicer pri obeh polimorfnih oblikah približno enaka, vendar pa tvori KMC II v primerjavi s KMC I na svoji površini nekoliko močnejše interakcije s polarnimi in nepolarnimi topili, malo šibkejše interakcije pa z elektronakceptorskim formamidom. Iz podatkov, ki smo jih dobili po 'Acid-Base' metodi, lahko zaključimo, da so razlike v interakcijah posledica predvsem močno spremenjenega razmerja med bazičnimi in kislinskimi prispevki k polarni komponenti površinske energije. Med polimorfoma je očitna tudi razlika v kristalni strukturi antibiotika. Sama razlika v gostoti že govori o spremembah dimenzij kristalne rešetke, dejansko pa gre lahko za spremembo oblike osnovne celice, za spremembo ureditve osnovnih celic v kristalu in/ali za spremembo konformacije molekul klaritromicina v kristalni mreži, na kar nakazuje že sama sprememba kislinsko-bazičnih lastnosti površine kristala.

Tako kot že sama mikroskopska slika, so najverjetneje tudi strukturne lastnosti amorfnih oblik klaritromicina odraz postopka njune priprave. Pri vzorcu, pripravljenem s sušenjem z razprševanjem, je na NMR spektrih v trdnem opaziti nekoliko večjo orientacijo enega izmed atomov v primerjavi z vzorcem, ki smo ga pripravili s taljenjem s hitrim zamrzovanjem. Razlika nastane verjetno zaradi nekoliko nižje hitrosti sušenja tega vzorca v primerjavi z ohladitvijo drugega. Na spektru amornega vzorca KMCsd lahko na nekaterih mestih opazimo še premike posameznih vrhov k nekoliko višjim kemijskim premikom v primerjavi z vzorcem KMCq, medtem ko ostajajo ostali vrhovi na istih mestih, kar ponovno kaže na razlike v orientaciji posameznih ogljikovih atomov v molekuli. Vendar pa obe oblici kljub spremembam v strukturi ohranjata lastnosti amorfne snovi. Zato lahko rečemo, da naše delo govori v prid poliamorfizmu pri preučevanem antibiotiku, saj se pripravljena vzorca v svoji strukturi razlikujeta, hkrati pa oba izkazujeta lastnosti amorfne snovi.

Kljub temu, da je doslej veljalo, da obstaja le ena neurejena amorfna oblika, ki s farmakopejskimi tehnikami kot sta rentgenska difrakcija in diferenčna dinamična kalorimetrija ne izkazuje lastnosti kristalov, lahko zaključimo, da molekule v amorfнем

stanju niso rigidne in da kljub vsemu obstaja več oblik nereda, ki se lahko razlikujejo tako v svoji porazdelitvi konformacij kot tudi v medmolekulskih razdaljah. Zato bi bilo smiselno, da bi se za preverjanje strukture amorfnih snovi uveljavila tudi jedrska magnetna resonanca v trdnem, saj bi lahko tako razlikovali med različnimi amorfnimi oblikami. Ker struktura kristalnih polimorfov vpliva na njihove ostale fizikalno-kemijske lastnosti, lahko pričakujemo, da imajo tudi poliamorfi z različnimi neurejenimi strukturami različne fizikalno-kemijske lastnosti, kar pa lahko bistveno vpliva na proces izdelave farmacevtske oblike, njeno stabilnost ter biološko uporabnost učinkovine po aplikaciji zdravila. Seveda pa lahko na tem mestu omenimo tudi na novo odprte možnosti na področju patentiranja, saj bi se z uveljavitvijo pojma poliamorfizma na široko odprla vrata za nove patentne prijave, ki bi se nanašale na različne poliamorfne oblike.

Zaradi vsega naštetega bi bilo smiselno nadaljevati s preučevanjem še drugih fizikalno-kemijskih lastnosti makrolidnega antibiotika klaritromicina, pri čemer bi morda lahko amorfno obliko pripravili po še več različnih postopkih (z mletjem, liofilizacijo itn.).

## **6 LITERATURA**

1. Tong H H Y, Chow A H L: Control of Physical Forms of Drug Particles for Pulmonary Delivery by Spray Drying and Supercritical Fluid Processing. *KONA*, 2006; 24: 27-40.
2. Poole P H, Grande T, Amorphous P, Sciortino F, Stanley H E, Angell C A: Amorphous Polymorphism. *Computational Material Science*, 1995; 4: 373-382.
3. Hancock B C, Parks M: What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals?. *Pharmaceutical Research*, 2000; 17: 397-404.
4. Brittain H G (ed.): *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. Marcel Dekker, New York, USA, 1999.
5. Byrn S R, Pfeiffer R R, Stephenson G, Grant D J W, Gleason W B: Solid State Pharmaceutical Chemistry. *Chemistry of Materials*, 1996; 6: 1148-1158.
6. Yu L: Amorphous Pharmaceutical Solids: Preparation, Characterization and Stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001; 48: 27-42.
7. Hancock B C, Zografi G: Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997; 86: 1-12.
8. Sato T, Okada A, Sekiguchi K, Tsuda Y: Difference in Physico-pharmaceutical Properties Between Crystalline and Non-crystalline 9,3"-diacetylmidecamycin. *Chem Pharm Bull*, 1981; 29: 2675-2682.
9. Poole P H, Grande T, Angell C A, McMillan P F: Polymorphic Phase Transitions in Liquids and Glasses. *Science*, 1997; 275: 322-323.
10. Sheng H W, Liu H Z, Cheng Y Q, Wen J, Lee P L, Luo W K, Shastri S D, Ma E: Polyamorphism in a Metallic Glass. *Nature Materials*, 2007; 6: 192-197.
11. Burton E F, Oliver W F: *Nature*, 1935; 135, 505.
12. Saika-Voivod I, Sciortino F, Poole P H: Fragile-to-strong Crossover and Polyamorphism in Liquid Silica: Changes in Liquid Structure. *Philosophical Magazine*, 2004; 84: 1437-1445.
13. The Merck Index, 13<sup>th</sup> Edition. Merck & Company Incorporated, Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2001.
14. Mutschler E: *Arzneimittelwirkungen*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1997; 682-684, 695.

15. SmPC CLAROGEN 500 mg tablete. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
16. European Pharmacopoeia 5th Edition, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France, 2005; 2: 1309-1311.
17. Zhang X, Wang Y, Wang J, Wang Y, Li S: Effect of Pore Former on the Properties of Coated Film Prepared from Blends of Eudragit® NE 30 D and Eudragit® L 30 D-55. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007; 55: 1261-1263.
18. SmPC FROMILID filmsko obložene tablete 500 mg. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
19. SmPC Clarosip 250 mg zrnca za peroralno suspenzijo. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
20. SmPC Lekoklar 500 mg filmsko obložene tablete. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
21. Brook I: The Prophylaxis and Treatment of Anthrax. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002; 20: 320-325.
22. Rodrigues A D, Roberts E M, Mulford D J, Yao Y, Ouellet D: Oxidative Metabolism of Clarithromycin in the Presence of Human Liver Microsomes: Major Role for the Cytochrome P4503A (CYP3A) Subfamily. Drug Metabolism and Disposition, 1997; 25: 623-630.
23. Sohn Y T, Rhee J K, Im W B: Polymorphism of Clarithromycin. Archives of Pharmacal Research, 2000; 23: 81-384.
24. Lee T S, Lee J C, Lee K I, Lee G S, Kim W J: Method of Preparing Form II Crystals of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/14099 A1, Mar. 16, 2000.
25. Spanton S G, Henry R F, Riley D A, Liu J H: Crystal FormO of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 98/31699, 1998.
26. Yonemochi E, Kitahara S, Maeda S, Yamamura S, Oguchi T, Yamamoto K: Physicochemical Properties of Amorphous Clarithromycin Obtained by Grinding and Spray Drying. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999; 7: 331-338.

27. Kumar N, Salman M, Gangakhedkar K K: Novel Amorphous Form of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/77017 A1, Dec. 21, 2000.
28. Goldstein J I, Newbury D E, Echlin P, Joy D C, Fiori C, Lifshin E: Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum Press, New York, 1984: 479-483.
29. [http://www.farma-drustvo.si/gradivo\\_p/Instrumentalna%20farmacevtska%20analiza/predavanja/Termicna%20analiza.ppt#451,1](http://www.farma-drustvo.si/gradivo_p/Instrumentalna%20farmacevtska%20analiza/predavanja/Termicna%20analiza.ppt#451,1), TERMIČNA ANALIZA, html
30. Giron D: Thermal Analysis and Calorimetric Methods in the Characterization of Polymorphs and Solvates. Thermochimica Acta, 1995; 248:1-59.
31. Suryanarayanan R: X-ray powder diffractometry, v Brittain H G: Physical Characterisation of Pharmaceutical Solids, 1<sup>st</sup> Edition, Marcel Dekker Inc., New York, 1995: 187-221.
32. Marjan Bele: Acetato-hidroksidni postopek za pripravo superprevodnih spojin v sistemu Y-Ba-Cu-O po sol-gel metodi, magistrsko delo, samozaložba, Ljubljana, 1994: 31-33.
33. Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu fizikalna farmacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2003: 1-38.
34. [http://www.ki.si/fileadmin/user\\_upload/datoteke-L10/Aljaz\\_Godec-Uros\\_Maver-Solid\\_State\\_NMR.pdf](http://www.ki.si/fileadmin/user_upload/datoteke-L10/Aljaz_Godec-Uros_Maver-Solid_State_NMR.pdf), html
35. Lewitt M H: Spin Dynamics – Basics of Nuclear Magnetic Resonance. JOHN WILLEY & SONS, Chichester UK, 2002.
36. Awan A, Barber J, Brennan R J, Parkinson J A: Structural Studies on Clarithromycin (6-O-Methylerythromycin A): Assignments of the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Spectra in Organic and Aqueous Solutions. Magnetic Resonance in Chemistry, 1992; 30: 1241-1246.
37. Bugay D E: Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, v Ohannesian L, Streeter A J: Handbook of Pharmaceutical Analysis, Marcel Dekker Inc., New York, 2002.