

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**ŽIGA HODNIK**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

**Ljubljana, 2009**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA HODNIK

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA  
KOKRISTALOV FLUKONAZOLA**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF  
FLUCONAZOLE COCRYSTALS**

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljal na Oddelku za stabilnost podjetja Krka, d.d., Novo mesto in na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm.. Meritve rentgenske difrakcije na monokristalih in elementne analize so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani. Meritve jedrske magnetne resonance so opravili v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani. Meritve rentgenske praškovne difrakcije so opravili na Oddelku za strukturne raziskave podjetja Krka, d.d., Novo mesto.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Danijelu Kiklju, mag. farm. za pomoč, nasvete in vodenje pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem Jožetu Kastelicu, mag. farm. z Oddelka za stabilnost za pomoč in dragocene nasvete pri eksperimentalnem delu, prof. dr. Ivanu Lebanu in dr. Nini Lah za izvedbo analiz rentgenske difrakcije na monokristalih, prof. dr. Janezu Plavcu in dr. Primožu Šketu za izvedbo analiz NMR v trdnem, Matjažu Pajku, dipl. inž. kem. teh. za izvedbo analiz rentgenske praškovne difrakcije inizr. prof. dr. Odonu Planinšku za izvedbo DSC termičnih analiz.

Posebna zahvala je namenjena moji družini in Ines za podporo in potrpežljivost v času študija.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm..

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT</b> .....	<b>III</b>
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. KOKRISTALI.....	1
1.2. NAČRTOVANJE KOKRISTALOV .....	2
1.3. INTERAKCIJE V KRISTALIH.....	4
1.4. METODE PRIPRAVE KOKRISTALOV .....	6
1.4.1. KOKRISTALIZACIJA IZ TOPILA.....	6
1.4.2. PRIPRAVA KOKRISTALOV Z MLETJEM .....	8
1.4.3. PRIPRAVA KOKRISTALOV IZ SUSPENZIJE .....	10
1.5. UPORABNOST KOKRISTALOV V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI .....	11
1.6. KARAKTERIZACIJA KOKRISTALOV .....	14
1.7. FLUKONAZOL.....	15
1.7.1. DELOVANJE IN UPORABA .....	15
1.7.2. OSNOVNI PODATKI.....	16
1.7.3. FLUKONAZOL KOT UČINKOVINA ZA KOKRISTALIZACIJO.....	17
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>22</b>
3.1. MATERIALI.....	22
3.2. METODE.....	23
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	<b>25</b>
4.1. PRIPRAVA KOKRISTALA FLUKONAZOL : MALEINSKA KISLINA = 1:3.....	25
4.2. PRIPRAVA KOKRISTALA FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA = 2:1 .....	28
4.3. PRIPRAVA KOKRISTALA FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA = 1:1 .....	30
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>33</b>
5.1. KOKRISTAL FLUKONAZOL : MALEINSKA KISLINA = 1:3 .....	33
5.1.1. RENTGENSKA KRISTALNA STRUKTURA .....	33
5.1.2. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (PXRD) .....	36
5.1.3. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA .....	37
5.1.4. DSC TERMIČNA ANALIZA .....	43
5.1.5. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA .....	44
5.2. KOKRISTAL FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA = 2:1 .....	46
5.2.1. RENTGENSKA KRISTALNA STRUKTURA .....	46
5.2.2. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (PXRD) .....	48
5.2.3. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA .....	49
5.2.4. DSC TERMIČNA ANALIZA.....	54
5.2.5. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA .....	55
5.3. KOKRISTAL FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA = 1:1 .....	57
5.3.1. RENTGENSKA KRISTALNA STRUKTURA .....	57
5.3.2. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (PXRD) .....	58
5.3.3. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA .....	59
5.3.4. DSC TERMIČNA ANALIZA.....	64
5.3.5. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA .....	65
5.4. OSTALI POIZKUSI PRIPRAVE KOKRISTALOV FLUKONAZOLA .....	66
<b>6. SKLEP</b> .....	<b>67</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>69</b>

## POVZETEK

Topnostne lastnosti, mehanske lastnosti in stabilnost so lastnosti zdravilne učinkovine, ki imajo pomembno vlogo pri načrtovanju novih farmacevtskih oblik. Obstaja več načinov manipuliranja s temi lastnostmi. Tako je možno zagotoviti željene lastnosti zdravila z uporabo različnih pomožnih snovi, ter z uporabo drugih tehnoloških rešitev. Lahko pa spremenimo lastnosti že sami zdravilni učinkovini. Različne kristalne oblike zdravilne učinkovine so ena od možnih poti, druga možnost je izdelava kokristalov zdravilne učinkovine z različnimi spojinami.

Kokristal je edinstvena kristalinična snov, sestavljena iz dveh ali več različnih komponent, ki so trdne pri sobni temperaturi. Komponente so v kokristalih povezane z medmolekulskimi interakcijami, kot so npr. vodikove vezi, van der Waalsove interakcije,  $\pi$ - $\pi$  interakcije, dipol-dipol interakcije in interakcije med halogeni.

V sklopu diplomske naloge smo na osnovi principov medmolekulskega prepoznavanja in najnovejših dognanj o kokristalih, načrtovali in pripravili 3 nove kokristale flukonazola, ki je v vodi slabo topna protiglivična zdravilna učinkovina. Tako smo z metodo kokristalizacije iz topila pripravili kokristale flukonazol : maleinska kislina = 1:3, flukonazol : fumarna kislina = 2:1 ter flukonazol : glutarna kislina = 1:1. Pri kokristalizaciji smo uporabljali različna organska topila oziroma kombinacije topil, pri čemer smo kokristalizacijo izvajali na osnovi supersaturacije.

Pripravljene kokristale smo nato okarakterizirali z uveljavljenimi metodami za karakterizacijo kokristalov. Tako so v diplomski nalogi predstavljene kristalne strukture vseh treh kokristalov, pridobljene z rentgensko difrakcijo na monokristalih. Poleg tega so v nalogi za dobljene kokristale predstavljeni še rezultati analiz z jedrsko magnetno resonanco v trdnem in v raztopini, rentgenski praškovni difraktogrami, DSC termogrami in rezultati infrardeče spektroskopije.

Pri poizkusih priprave kokristalov flukonazola z dikarboksilnimi kisljinami nismo uspeli pripraviti kokristalov z jabolčno, jantarno in vinsko kislino.

## ABSTRACT

Solubility properties, mechanical properties and stability are important characteristics of active pharmaceutical ingredients in design of new pharmaceutical formulations. There are many ways of manipulating those properties. One possible way includes an application of various technological solutions, e.g. the use of various excipients. Another option includes the manipulation of properties of active pharmaceutical ingredient itself, which comprises preparation of different crystal forms or preparation of cocrystals with different compounds.

Cocrystal is a unique crystalline solid, containing two or more components. Those components must exist as solids at room temperature. Possible interactions in cocrystals usually include hydrogen bonds, van der Waals interactions,  $\pi$ - $\pi$  interactions, dipole-dipole interactions and halogen atom interactions.

Based on principles of intermolecular recognition and on latest achievements in cocrystal design, we have designed and prepared 3 new cocrystals of fluconazole, an antifungal active pharmaceutical ingredient, which is slightly soluble in water. With solution cocrystallization approach we have prepared cocrystals fluconazole : maleic acid = 2:5, fluconazole : fumaric acid = 2:1 and fluconazole : glutaric acid = 1:1. We have used various organic solvents and solvent mixtures to achieve cocrystallization, which was based on supersaturation.

Prepared cocrystals were characterized with established methods for characterization of cocrystals including single crystal X-ray diffraction, solid-state nuclear magnetic resonance, powder X-ray diffraction, differential scanning calorimetry and Fourier transform infrared spectroscopy.

In an attempt to prepare fluconazole cocrystals with dicarboxylic acids we have not managed to produce fluconazole cocrystals with malic, succinic and tartaric acid.

## SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT

$\delta$	- kemijski premik
Å	- Angstrom
A	- proton akceptor
CYP	- citokrom P450
CP	- "proton-to-carbon cross polarisation"
d	- razdalja
D	- proton donor
DSC	- "differential scanning calorimetry"
FLU	- flukonazol
Hz	- hertz
IR	- infrardeče/-a
J	- joule
K	- kelvin
$K_c$	- ravnotežna konstanta
$K_{sp}$	- topnostni produkt
M	- molarna koncentracija (mol/L)
MAS	- "magic-angle spinning"
NMR	- nuklearna magnetna resonanca
P	- porazdelitveni koeficient
ppm	- "parts per million" (ena na milijon)
PDB	- "Protein Data Bank"
PXRD	- "powder X-ray diffraction"
T	- transmitanca
W	- watt

# 1. UVOD

Lastnosti trdne snovi niso odvisne le od molekul, ki jo sestavljajo, temveč tudi od razporeditve molekul v prostoru. Kristalinične snovi imajo atome, molekule ali ione razporejene v urejeno kristalno rešetko, ki se ponavlja v celotnem prostoru kristala. Kristali lahko v kristalni rešetki vsebujejo tudi 2 ali več različnih molekul, povezanih z medmolekulskimi interakcijami. Takšne kristale imenujemo kokristali in imajo drugačne lastnosti kot kristali, grajeni le iz ene vrste gradnikov (1).

## 1.1. KOKRISTALI

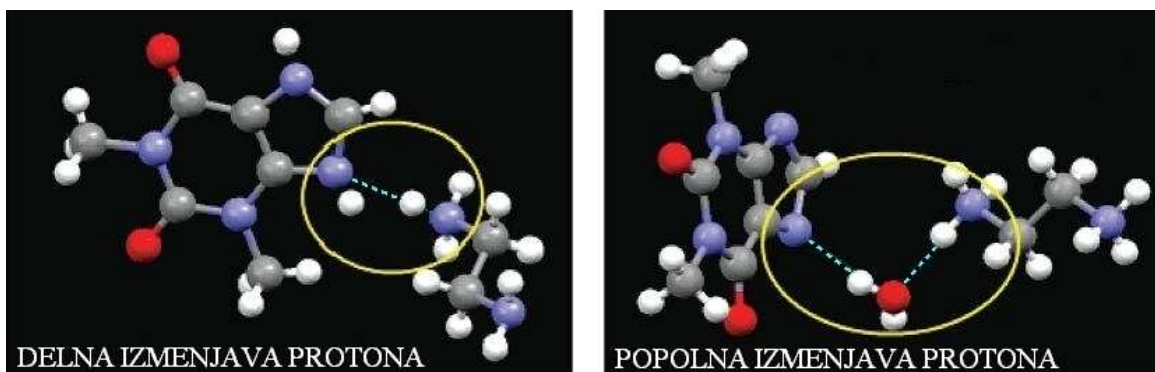
Pojem kokristal zaenkrat še nima enotno opredeljene definicije. Tako naletimo na različne definicije tega pojma, s strani različnih avtorjev. Različne definicije lahko enostavno povzamemo, da je kokristal edinstvena kristalinična snov, sestavljena iz dveh ali več različnih komponent (1).

Zelo široko definicijo pojma ponuja Dunitz, ki opisuje kokristal kot kristal, ki vsebuje dve ali več različnih komponent. Tako pod okrilje pojma kokristal spadajo molekularne zmesi, molekularni kompleksi, hidrati, solvati, inkluzijski kompleksi, klatrati in ostale možne kristalne zmesi (2). S takšno definicijo postane število poznanih kokristalov morda preveliko. Problem predstavljajo predvsem hidrati oz. solvati, ki so široko zastopani v svetu kristalov. Posledično Aakeroy predlaga, da morajo biti kokristali sestavljeni iz komponent, ki so trdne pri sobni temperaturi (3). Poleg tega morajo biti komponente v kokristalu zastopane v stehiometrijskem razmerju. Poleg zgornjih dveh Aakeroy postavlja še tretji pogoj, da morajo biti kokristali sestavljeni iz nevtralnih komponent. Zadnji pogoj tako izloči trdne snovi, ki vsebujejo ione, inkluzijske komplekse ali ione kovin prehoda. Tako lahko kot kokristale razumemo le binarne komplekse donorjev in akceptorjev, ter z vodikovimi vezmi povezane kokristale (3). Slednja definicija se že skoraj sklada s trenutnim razumevanjem pojma kokristala. Ker je raziskovanje kokristalov razmeroma novo področje, se definicija pojma stalno nekoliko spreminja in dopolnjuje. Najbolj nedorečeno področje je verjetno meja med soljo in kokristalom.

Sol je ionska spojina, sestavljena iz več ionov, v kateri je prisotna izmenjava kislih protonov. Mejo med kokristalom in soljo lahko definiramo tako, da je izmenjava protonov



v soli popolna, v kokristalu pa je izmenjava popolnoma odsotna (1). Realni primeri kažejo, da meje ni možno postaviti tako absolutno. Kot primer lahko navedemo aminofilin (zmes, sestavljena iz 2 molov teofilina in 1 mola etilendiamina). Iz 2 različnih kristalnih struktur je razvidno, da je v prvem primeru izmenjava protona le delna, medtem ko je v drugem primeru izmenjava protona popolna ((4), slika 1). Postavitev meje med soljo in kokristalom je tako še predmet prihodnje znanstvene razprave.



**Slika 1.** Kristalni strukturi aminofilina. Leva struktura prikazuje kristalno strukturo brezvodne oblike, kjer je proton dislociran na kislem teofilinskem dušiku in na bazičnem etilendiaminskem dušiku. Desna struktura prikazuje kristalno strukturo monohidrata, kjer se proton nahaja na dušikovem atomu etilendiamina.

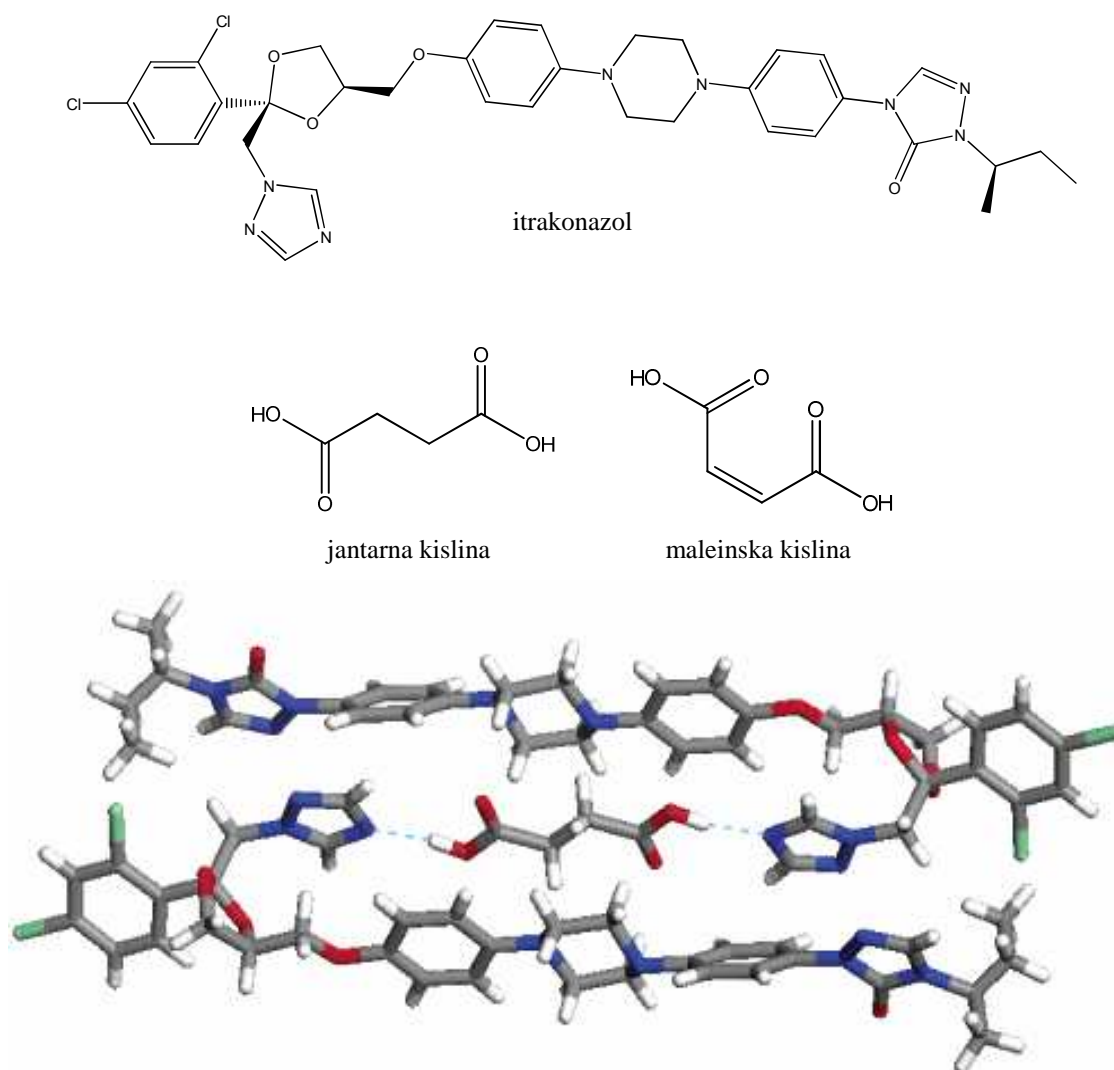
## 1.2. NAČRTOVANJE KOKRISTALOV

Prvi korak pri načrtovanju farmacevtskih kokristalov dane učinkovine je izbira partnerja (pomožne snovi), ki se bo v kristalni rešetki povezal z zdravilno učinkovino. Tu velja omeniti, da je najpogosteje uporabljena kombinacija sestavljena iz molekule, ki vsebuje karboksilno skupino in iz molekule, ki vsebuje dušikov heterocikel (3).

Partnerja v kokristalu navadno izberemo na podlagi naslednjih kriterijev:

1. pomožna snov je že bila uporabljena v farmacevtskih izdelkih in je tako farmacevtsko sprejemljiva (čim večja frekvenca uporabe v farmacevtskih izdelkih, tem bolje),
2. pomožna snov je netoksična,
3. velikost molekule je približno enaka ali sorazmerna velikosti zdravilne učinkovine,
4. med kislino in bazo ne sme biti več kot 2 pKa enoti razlike. V nasprotnem primeru bosta zdravilna učinkovina in pomožna snov tvorili sol, ki je stabilna v vodi (1).

Zadnji kriterij lahko razumemo tudi kot največjo verjetnost za tvorbo vodikove vezi med kislino in bazo, med katerima razlika v pKa vrednostih ne presega 2 enot, hkrati pa je razlika blizu tej vrednosti. Poleg tega pa je zadnji pogoj najmanj absoluten in je vreden premisleka. Praktični primeri namreč kažejo, da ob strogem upoštevanju tega kriterija lahko izpustimo poizkuse, ki bi lahko pripeljali do odkritja novih kokristalov. Takšen primer je poizkus kokristalizacije *cis*-itakonazola (pKa = 3,7) z dikarboksilnimi kisljinami. Itakonazol je namreč tvoril kokristal z jantarno kislino (pKa<sub>1</sub> = 4,2, pKa<sub>2</sub> = 5,6), medtem ko ni tvoril kokristala z maleinsko kislino (pKa<sub>1</sub> = 1,9).



Slika 2. Kokristal itakonazola in jantarne kisline (5).

Maleinska kislina je močnejša kislina med izbranimi pomožnima snovema. Pričakovali bi, da bo kot taka tvorila kokristal ali sol z itakonazolom, vendar poizkus kaže, da temu ni

tako. Na podlagi tega je mogoče trditi, da je prostorsko prileganje pomožne snovi bolj pomembno od kislinsko-baznih zakonitosti (5).

Pri izbiri pomožne snovi je potrebno upoštevati tudi strukturne značilnosti zdravilne učinkovine, t.j. število, prostorsko razporeditev in vrste funkcionalnih skupin, ki lahko sodelujejo v vodikovih vezeh. Pomembna je tudi simetrija in konformacijska fleksibilnost molekule (1). Velika konformacijska fleksibilnost pomeni sposobnost spojine za prilagajanje drugemu gradniku v kristalni rešetki. Molekule z veliko konformacijsko fleksibilnostjo tvorijo polimorfne kristalne oblike. Torej je lahko zmožnost polimorfne obnašanja molekule dober pokazatelj primernosti molekule za načrtovanje kokristalov (3). Zelo dober vir informacij pri izbiri gradnikov kokristalov so tudi morebitne kristalne strukture, pridobljene z rentgensko difrakcijo na monokristalih. Kristalna struktura nam namreč nudi informacije o prostorskem prileganju molekul, o položaju vodikovih vezi v kristalu, sklepamo pa lahko tudi na ostale medmolekulske interakcije. Pri iskanju kristalnih struktur se lahko opremo na podatkovno bazo CSD ("Cambridge Structural Database"), ki predstavlja najpopolnejšo zbirko znanih kristalnih struktur (6).

### 1.3. INTERAKCIJE V KRISTALIH

Interakcije, ki se pojavljajo v kristalih lahko razvrstimo po jakosti, po padanju jakosti z razdaljo in po usmerjenosti (7).

Neusmerjene interakcije so šibke ( $2-10 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Njihova moč hitro pada z razdaljo. K neusmerjenim interakcijam spadajo van der Waalove interakcije (najpogosteje  $\text{C}\cdots\text{C}$ ,  $\text{C}\cdots\text{H}$  in  $\text{H}\cdots\text{H}$  interakcije) in  $\text{CH}\cdots\pi$  (kisel C-H interagira konjugiranim  $\pi$  sistemom) interakcija, katera izkazuje značilnosti van der Waalovih interakcij in vodikovih vezi (7).

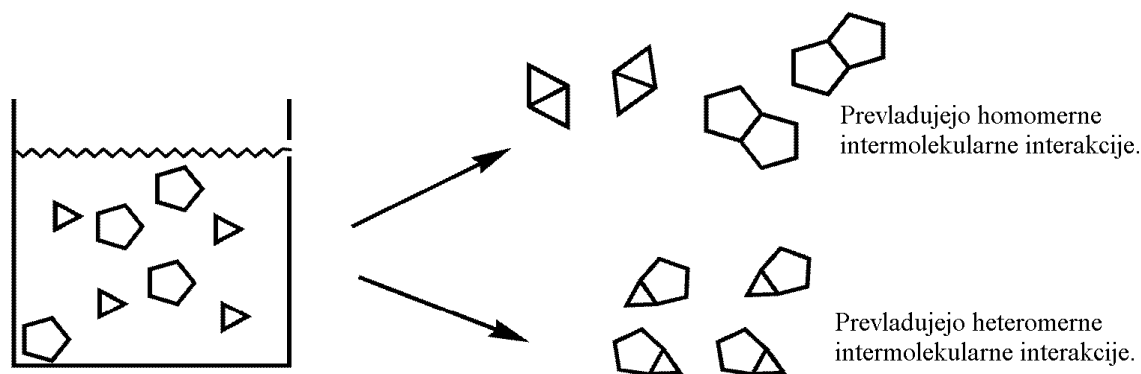
Vodikove vezi, ki so najpomembnejše interakcije v kristalih, so usmerjene. Njihova moč počasi pada z razdaljo. Lahko jih razdelimo na močne vodikove vezi ( $20-40 \text{ kJ mol}^{-1}$ ):  $\text{OH}\cdots\text{O}$ ,  $\text{NH}\cdots\text{O}$  in na šibke vodikove vezi ( $2-20 \text{ kJ mol}^{-1}$ ):  $\text{CH}\cdots\text{O}$ ,  $\text{OH}\cdots\pi$ ,  $\text{CH}\cdots\text{N}$ ,  $\text{NH}\cdots\pi$ ,  $\text{CH}\cdots\text{F}$ ,  $\text{CH}\cdots\text{Se}$  in  $\text{CH}\cdots\text{Cl}$ . Vodikovo vez  $\text{NH}\cdots\text{N}$  uvrščamo nekako vmes, med močne in šibke vezi.  $\text{CH}\cdots\text{O}$  vez se pojavljaja pogosteje, medtem ko so ostale šibke vodikove vezi pojavljajo redkeje. Pri vodikovih vezeh, kjer sodeluje CH, je ključna kislost vodika in bazičnost akceptorja protona. Šibke vodikove vezi so elektrostatske interakcije, vendar je

hitrost padanja njihove moči z razdaljo visoka in jih zato lahko primerjamo tudi z Van der Waalsovimi interakcijami (7).

Interakcije med halogeni so usmerjene, šibke in kratkosežne. Njihova narava je še nerazjasnjena, znano pa je, da pomembno vlogo pri teh interakcijah igra polarizacija udeleženih atomov. Sem spadajo naslednje interakcije:  $\text{Cl}\cdots\text{Cl}$ ,  $\text{Br}\cdots\text{Br}$ ,  $\text{I}\cdots\text{I}$ ,  $\text{I}\cdots\text{Cl}$ ,  $\text{Br}\cdots\text{F}$  in  $\text{I}\cdots\text{F}$  (7).

V kristalih so lahko prisotne tudi  $\pi$ - $\pi$  interakcije, katere so posledica prekrivanja p-orbital aromatskih sistemov in interakcije žvepla (npr.  $\text{S}\cdots\text{N}$ ,  $\text{S}\cdots\text{S}$  in  $\text{S}\cdots\text{Cl}$  interakcije), ki so elektrostatske in usmerjene, zaradi česar jih uvrščamo med dipol-dipol interakcije (7).

Ključni pogoj za nastanek kokristalov so močnejše heteromerne interakcije od homomernih interakcij. To pomeni, da se molekula močnejše povezuje z drugačno molekulo, kot s sebi enako molekulo (3). Te interakcije so najpogosteje vodikove vezi. Ko torej govorimo o močnejših heteromernih interakcijah, to pomeni, da so intermolekularne vodikove vezi med različnimi molekulami močnejše od intermolekularnih vodikovih vezi med enakimi molekulami (8).



**Slika 3.** Prekristalizacija (zgoraj) in kokristalizacija (spodaj).

Pri sklepanju na položaj morebitnih vodikovih vezi v kokristalu si je smiselno pomagati s pravilom, ki ga je oblikoval Donohue: vsi kisli vodiki, ki so na voljo v molekuli, bodo tvorili vodikove vezi v kristalni strukturi (9). Pravilo Donohuea smiselno dopolnjujejo Etter-inina pravila:

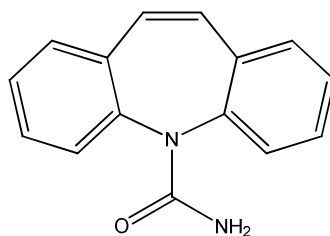
1. vsi dobri proton donorji in akceptorji sodelujejo v vodikovih vezeh,
2. šestčlenske ciklične intramolekularne vodikove vezi nastajajo prednostno pred intermolekularnimi vodikovimi vezmi,
3. najboljši proton donorji in akceptorji, ki ostanejo na voljo po tvorbi intramolekularnih vezi, tvorijo intermolekularne vodikove vezi med seboj (8).

Poleg navodil, navedenih na prejšnji strani, je smiselno upoštevati tudi pKa vrednosti proton donorjev: nižja kot je pKa vrednost, večja je moč proton donorja. Zgoraj navedena pravila so lahko neveljavna, če za vodikove vezi tekmuje več proton donorjev/akceptorjev, če prihaja do steričnih ovir ali če so prisotne kompetitivne dipolne in ionske sile (8).

## 1.4. METODE PRIPRAVE KOKRISTALOV

Kokristale je možno pripraviti s kokristalizacijo iz topila, z mletjem sestavin v krogljčnem mlinu in s kokristalizacijo iz zelo goste suspenzije. Znane so tudi metode kokristalizacije iz taline, pridobivanja kokristalov s sublimacijo sestavin in pridobivanja kokristalov z delikvescenco sestavin pri visoki relativni vlažnosti (10, 11, 12). Slednje tri metode se uporabljajo redkeje in zaradi nepraktičnosti izvedbe trenutno ne predstavljajo večje perspektive v farmacevtski industriji.

Priprava kokristalov je težavna in nepredvidljiva. Za pripravo kokristala ustrezne kakovosti, namenjenega analizi z rentgensko difrakcijo na monokristalih, je lahko potrebno tudi do 6 mesecev raziskav (13). Za pripravo 10 novih kokristalov karbamazepina so bili izvedeni poizkusi s 50 pomožnimi snovmi, kar pomeni 20 odstotni izkoristek (14). Takšni težavnost in nepredvidljivost sta posledici pomembnosti dejavnikov, opisanih v prejšnjih dveh poglavjih.



karbamazepin

### 1.4.1. KOKRISTALIZACIJA IZ TOPILA

Pri kokristalizaciji iz topila se navadno uporabljajo tehnike odparevanja topila, dodajanje netopila\* in hlajenja raztopin. V vseh primerih je pomembna zadostna in primerljiva topnost sestavin v izbranem topilu oziroma zmesi topil. V nasprotnem primeru

---

\* Izraz "netopilo" uporabljamo za topilo, v katerem komponente kokristala niso topne.

bo prišlo do obarjanja manj topne sestavine, zaradi česar se bomo oddaljili od pogojev, ki pripeljejo do rasti kokristalov.

Tehnike se razlikujejo predvsem po nujnosti uporabe ustreznega stehiometrijskega razmerja, v katerem so zastopane sestavine v nastajajočem kokristalu. Pri odparevanju topila, zlasti če pustimo topilo odpareti do suhega, je ustrezno stehiometrijsko razmerje ključno. Če ne uporabimo ustreznega stehiometrijskega razmerja, je potrebno kokristale ločiti od kristalov posameznih sestavin. Pri tehniki hlajenja topila uporaba ustreznega stehiometrijskega razmerja ni nujna, saj načeloma ostaja količina topila nespremenjena, kar omogoča ločbo kokristalov od kristalov posameznih sestavin. Prav tako je ločba kokristalov mogoča tudi pri dodajanju netopila (1).

Poleg zgoraj omenjenih tehnik, ki so najpogostejše, so znane tudi novejšje modifikacije. Tako so Rodriguez-Hornedo in sod. opisali tehniko, pri kateri raztopini sestavin dodajamo eno od sestavin, zaradi česar znižujemo topnost kokristala pod nivo topnosti obeh sestavin. Posledica je obarjanje kokristala iz raztopine. Teoretično osnovo tehnike predstavlja topnostni produkt (enačbe 1, 2 in 3). Pri izbiri topil za to tehniko je pomembna izbira topila, v katerem bomo lahko zagotovili presežno topnost ene sestavine v primerjavi z drugo. V primeru, da takšno topilo ni na voljo, je za enak učinek potrebno dodajati raztopino bolj topne sestavine suspenziji manj topne sestavine. Tak postopek tudi lahko pripelje do koncentracijskega razmerja, ki bo vodilo do pretvorbe neraztopljene snovi v kokristal (15).



$$K_c = \frac{[AB]_{trden}^z}{[A]_{razt.}^x [B]_{razt.}^y} \quad (\text{Enačba 2. Ravnotežna konstanta.})$$

$$K_{sp} = [A]_{razt.}^x [B]_{razt.}^y \quad (\text{Enačba 3. Topnostni produkt.})$$

Glavna prednost priprave kokristalov iz topila je možnost priprave kokristalov ustrezne kakovosti, primernih za analizo z rentgensko difrakcijo na monokristalih, ki predstavlja

najpomembnejšo metodo za strukturno karakterizacijo kokristala. Prav tako pomembna prednost kokristalizacije iz topila je postopek sam, ki predstavlja uveljavljen in učinkovit način čiščenja (16).

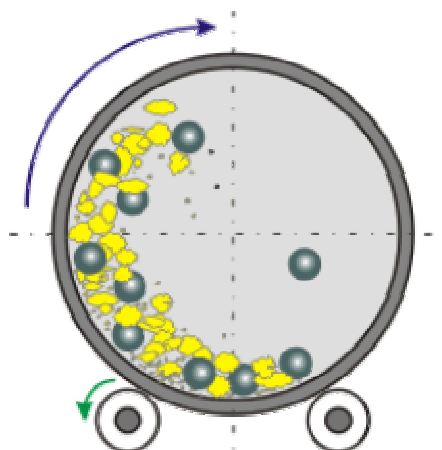
Seveda obstajajo tudi slabosti takšne priprave kokristalov. Tako sta lahko problematični ustrezna in primerljiva topnost obeh sestavin v izbranem topilu. Možna je tudi tvorba solvatov, ki so posledica močnih intermolekularnih interakcij molekul topila s sestavinami v raztopini, kar je še posebej pogosto pri polarnih, protičnih topilih. To je povezano z visoko težnjo tvorbe vodikovih vezi pri takšnih topilih. V primeru, da obstajajo polimorfi kokristalov, je pri kokristalizaciji iz topila možna kinetično usmerjena kokristalizacija, pri kateri lahko nastane metastabilen polimorf (16).

#### **1.4.2. PRIPRAVA KOKRISTALOV Z MLETJEM**

Pri mletju snovi lahko pride do kemijskih sprememb, kar imenujemo mehanokemija. Mletje ustreznih sestavin v zmesi tako lahko privede do nastanka kokristalov. Mletje je zanimiva alternativa tradicionalni metodi priprave kokristalov iz topila, saj prinaša številne prednosti. Pri metodi mletja ni potrebno upoštevati topnosti sestavin, kar močno olajša izvedbo poizkusa. Prav tako se izognemo možnosti nastanka solvatov (16). Za enokomponentne sisteme so znani primeri, ko so z mletjem nastali termodinamsko stabilni polimorfi z visokimi tališči (17). Ker pri tej metodi topil ne uporabljamo, lahko govorimo o ekološkem pristopu (16).

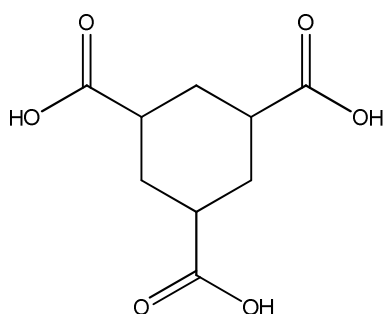
Glavna slabost priprave kokristalov z mletjem je nezmožnost pridobivanja kokristalov, primernih za analizo z rentgensko difrakcijo na monokristalih. Z mletjem namreč zmanjšujemo velikost delcev. Pri mletju prav tako ni prisotne faze čiščenja, ki jo ponuja klasična kokristalizacija iz topila. Poleg tega je možno tudi povečevanje kristalnega nereda, ki je značilno za določene snovi, ter sprememba fizikalnih in kemijskih lastnosti snovi (16).

Pogoj za kokristalizacijo z mletjem je vsaj rahla hlapnost ene od komponent v zmesi. Metodo pa je mogoče izboljšati s segretjem zmesi pred mletjem, pri čemer je temperatura vedno vsaj 50 °C nižja od temperature taljenja (18). Metodo lahko izvajamo na tradicionalen način s trenjem sestavin v terlnici. Boljša je uporaba krogličnega mlina, v katerem so pogoji konstantni in kontrolirani (16).

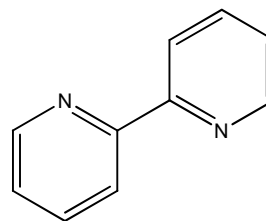


Slika 4. Princip delovanja krogljčnega mlina (19).

Znana je tudi modifikacija metode, pri kateri zmesi dodamo nekaj kapljic ustreznega topila. To metodo imenujemo mletje z dodatkom topila. Topilo mora imeti ustrezno polarnost in mora topiti eno od sestavin, ali pa delno topiti obe sestavini. S to metodo lahko močno povečamo kinetiko procesa kokristalizacije. Tako lahko pri pripravi primerljivo čistega kokristala cikloheksan-1,3,5-trikarboksilne kisline z 2,2'-bipiridinom čas mletja skrajšamo npr. iz 1 ure na 10 minut z dodatkom nekaj kapljic ustreznega topila (20).

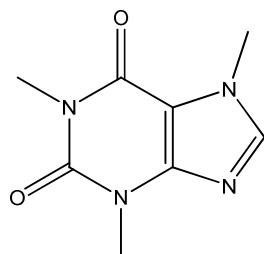


cikloheksan-1,3,5-trikarboksilna kislina

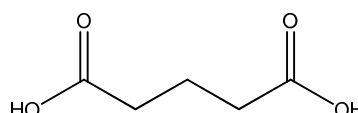


2,2'-bipiridin

Z dodatkom ustreznega topila je mogoča tudi nadzor polimorfizma kokristalov: ob dodatku različnih topil lahko dobimo različne polimorfe kokristalov kofeina z glutarno kislino (21).



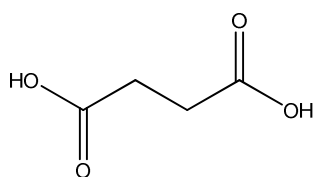
kofein



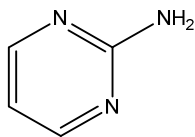
glutarna kislina



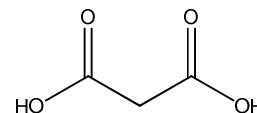
V večini primerov lahko tako z mletjem, kot tudi s kokristalizacijo iz topila, dobimo enake kokristale. Obstajajo pa izjeme tako na eni kot na drugi strani. Primer takšne izjeme je priprava kokristalov 2-aminopirimidina z jantarno in malonsko kislino.



jantarna kislina



2-aminopirimidin



malonska kislina

Kokristale z jantarno kislino je možno pripraviti z mletjem v razmerjih 1:1 in 2:1 (razmerje baza : kislina). Iz topila je možno pripraviti le kokristale v razmerju 1:1. Obratno lahko iz topila pripravimo 2 polimorfa kokristala z malonsko kislino v razmerju 1:1. Z mletjem pa lahko pripravimo le enega od obeh polimorfov kokristala (22).

### 1.4.3. PRIPRAVA KOKRISTALOV IZ SUSPENZIJE

Osnovo te metode predstavlja topnostni produkt (str. 7, enačbe 1, 2 in 3). Poizkus navadno izvedemo tako, da dodamo topilu tako velike količine obeh sestavin kokristala, da nastane izredno gosta suspenzija. Pomembno je, da dodamo sestavine v pravem stehiometrijskem razmerju. Na tak način dosežemo maksimalno nasičenje raztopine z obema sestavinama, kar predstavlja dober pogoj za rast kokristalov. Ko se pričnejo kokristali obarjati, se na osnovi topnostnega produkta lahko raztopijo dodatne količine osnovnih sestavin. Ta proces se nato zvezno ponavlja, dokler obstaja v sistemu nasičena raztopina z obema komponentama, kar omogoča suspenzija. Nato poteka kokristalizacija do konca z odparevanjem topila, enako kot pri klasični metodi kokristalizacije iz topila (23).

Prednost priprave kokristalov iz suspenzije pred klasično metodo priprave iz topila je dejstvo, da skoraj celoten čas poizkusa vzdržujemo nasičenje osnovnih sestavin v raztopini. Ta pogoj, ob upoštevanju stehiometrijskega razmerja, v raztopini ni zagotovljen, saj zaradi običajno različnih topnosti sestavin, raztopina ni nasičena z eno od sestavin. To pomeni, da niso zagotovljeni optimalni pogoji za kokristalizacijo. Poleg tega lahko pride do obarjanja slabše topne sestavine, boljše topna pa ostaja v raztopini (23).

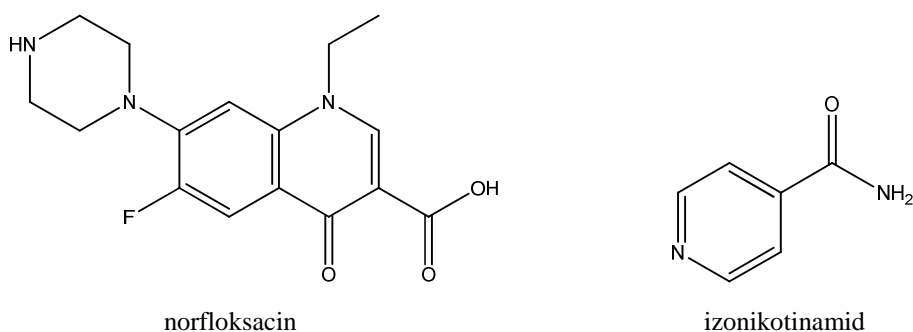
Zhang in sod. so s to metodo poizkušali pripraviti 16 različnih, že prej znanih farmacevtskih kokristalov, pri čemer so bili 100 odstotno uspešni. V večini primerov so se kokristali pojavili v eni uri, za celotno pretvorbo pa je bil potreben čas od 12 ur do 8 dni (23).

## 1.5. UPORABNOST KOKRISTALOV V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI

Nabor prednosti, ki jih prinašajo zdravilne učinkovine v obliki kokristalov, je širok, hkrati pa tudi nepredvidljiv. Tako lahko govorimo o dobrih možnostih za izboljšanje fizikalno – kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine, vendar priprava kokristalov ne predstavlja absolutne garancije za izboljšanje. Raziskave namreč kažejo, da je izboljšanje določenih lastnosti, kot je npr. topnost, možno v veliki meri, ni pa nujno uspešno (24).

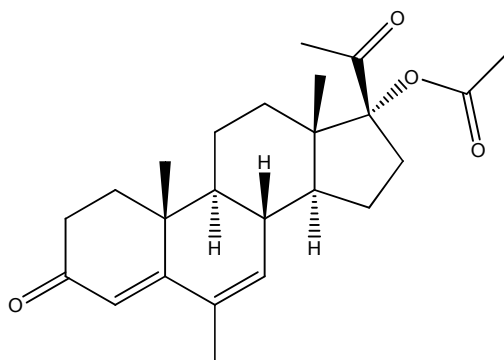
Ne glede na spremenjene lastnosti zdravilnih učinkovin, ki jih prinašajo kokristali, je možnost njihovega patentiranja gotovo zelo atraktivna prednost. Tako lahko vgradnja kokristala zdravilne učinkovine v farmacevtsko obliko prinaša veliko prednost pred konkurenco v farmacevtski industriji. Ob tem pa se je potrebno zavedati širine definicije kokristala, saj je včasih meja med solmi, kokristali in zmesmi težko določljiva (25).

S pripravo kokristalov zdravilne učinkovine je možno izboljšati topnost v vodi. Basavoju in sod. so namreč pokazali, da ima solvat kokristala norfloksacin : izonikotinamid = 1:1 s kloroformom trikrat večjo topnost kot kristaliničen norfloksacin. S solmi z različnimi dikarboksilnimi kislinami so uspeli povečati topnost kar 25- do 40-krat (26).

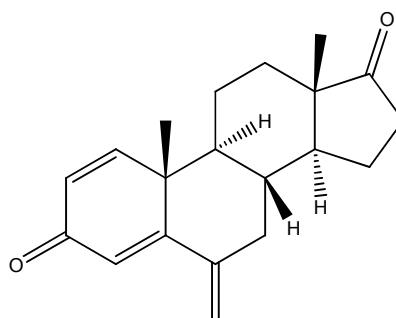


Shiraki in sod. so uspeli povečati intrinzično hitrost raztapljanja megesterolacetata 3- do 4-krat, ko so tvorili kokristal s saharinom. Nasprotno se intrinzična hitrost raztapljanja ni

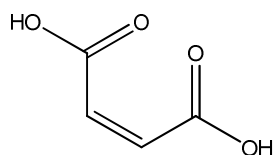
povečala eksemestanu, ko so tvorili kokristal z maleinsko kislino. Oba kokristala sta bila pripravljena v razmerju 1:1 (24).



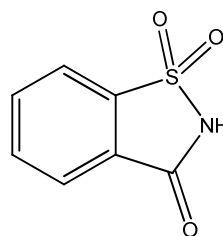
megestrolacetat



eksemestan

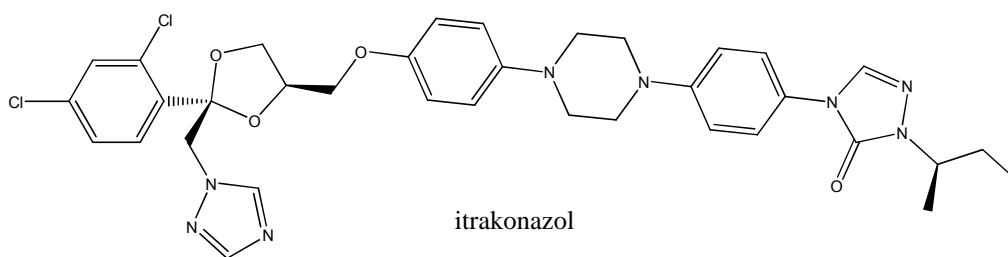


maleinska kislina

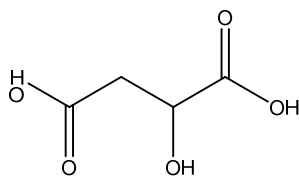


saharin

Remenar in sod. so pokazali, da se je možno s pripravo kokristala itrakonazola in jabolčne kisline skoraj povsem približati profilu raztapljanja farmacevtske oblike, ki vsebuje itrakonazol v amorfni obliki. Pojavila se je tudi supersaturacija (rdeča krivulja na sliki 5, str. 12).

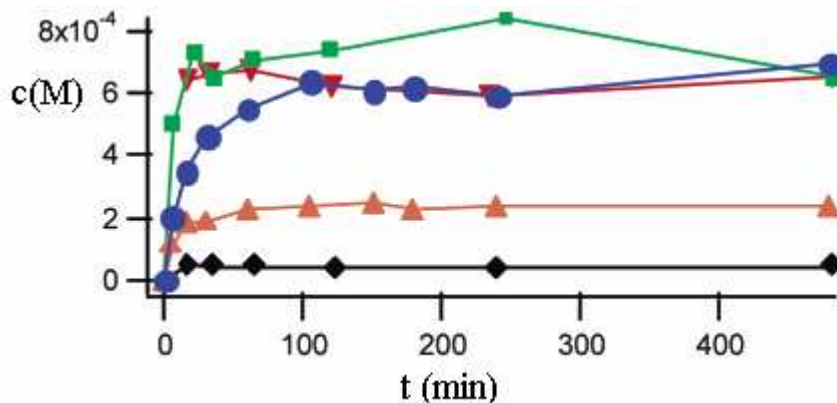


itrakonazol



jabolčna kislina

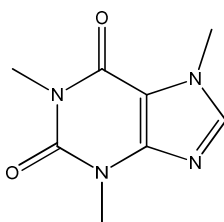
Kokristali z drugimi dikarboksilnimi kisljinami niso izkazali tako ugodnih profilov raztapljanja, vendar so bili njihovi profili raztapljanja še vedno bolj ugodni od profila raztapljanja farmacevtske oblike, ki vsebuje itrakonazol v kristalinični obliki.



**Slika 5.** Graf koncentracije itrakonazola v odvisnosti od časa. Zelena barva predstavlja itrakonazol v amorfni obliki, rdeča kokristal z jabolčno kislino, modra kokristal z vinsko kislino, rožnata kokristal z jantarno kislino in črna itrakonazol v kristalinični obliki. Raztapljanje delcev je potekalo v 0,1 M HCl, pri 25°C (5).

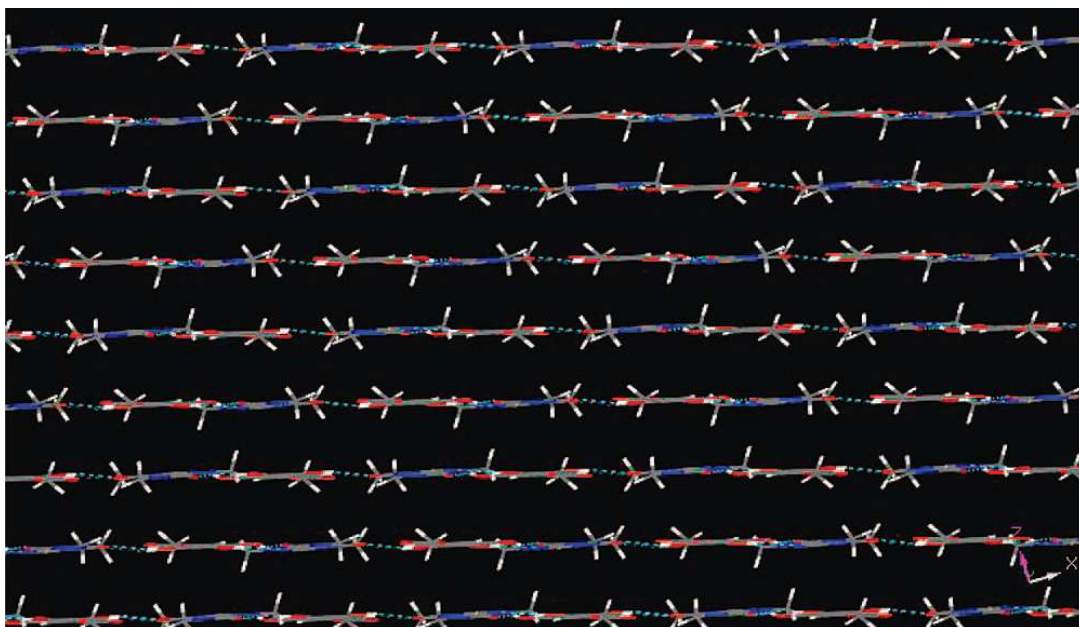
Slednji primer kaže na velik potencial kokristalov za izboljšanje absorpcije in biološke uporabnosti predvsem zdravilnim učinkovinam, ki izkazujejo slabo topnost v vodi in dobro permeabilnost, kar jih po biofarmaceutski klasifikaciji zdravil uvršča v 2. razred zdravilnih učinkovin (5). Pri obravnavanju topnosti kokristalov pa je seveda potrebno upoštevati tudi druge vplive, kot so npr. velikost delcev, pH medija in uporabljene pomožne snovi (24, 27, 28).

S pripravo kokristalov lahko zdravilni učinkovini izboljšamo tudi stabilnost in ob morebitnem povečanju topnosti združimo dobre lastnosti amorfne in kristalinične oblike. Tako so Trask in sod. pokazali, da je možno s pripravo kokristalov kofeina z različnimi dikarboksilnimi kisljinami zmanjšati higroskopskost in tako povečati fizikalno stabilnost. Kofein v obliki kokristalov z dikarboksilnimi kisljinami je namreč v primerjavi z brezvodnim kristaliničnim kofeinom pri 98 odstotni relativni vlažnosti v manjši meri prehajal v kofein hidrat (29).

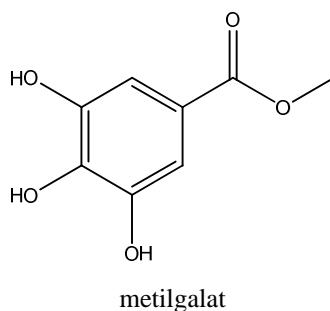


kofein

Kokristali predstavljajo tudi potencial pri izboljšanju mehanskih lastnosti snovi. Tako sta Sun in Hou pokazala, da lahko z izbiro kokristalov, ki v svoji kristalni strukturi izkazujejo slojevitost, izboljšamo stisljivost praškov, kar predstavlja veliko uporabnost pri tabletiranju (30).



Slika 6. Kokristal kofeina in metilgalata vsebuje v svoji kristalni strukturi slojevitost (30).



## 1.6. KARAKTERIZACIJA KOKRISTALOV

Najzmogljivejša analizna metoda za strukturno karakterizacijo kokristalov je zagotovo rentgenska difrakcija na monokristalih. Rezultat te metode je absolutna kristalna struktura, iz katere lahko razberemo razmerje molekul v kokristalu, prostorsko urejenost molekul ter vrsto in položaj interakcij v kokristalu (slike 1, 2 in 5). Za analizo s to metodo potrebujemo monokristale ustrezne velikosti in kakovosti, kar je včasih zelo težavno ali celo nemogoče

doseči. Zato se uporabljajo tudi druge analizne metode, ki ne zahtevajo priprave monokristalov (16).

Jedrska magnetna resonanca jeder  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  in  $^{19}\text{F}$  v trdnem (npr. CP/MAS NMR) predstavlja močno analizno metodo za strukturno karakterizacijo kokristalov. Tako lahko iz oblike spektra in kemijskih premikov ločimo polimorfe kokristalov in razberemo stehiometrijsko razmerje v kokristalu. Iz kemijskih premikov lahko razberemo interakcije v kokristalu. S pomočjo ustreznih računskih pristopov pa je možna tudi določitev strukture kokristala, pri čemer se metoda lahko dobro dopolnjuje z rentgensko praškovo difrakcijo (31).

Rentgenska praškova difrakcija ("powder X-ray diffraction"; PXRD) je analizna metoda, s katero lahko na osnovi oblike spektra in položaja signalov ločimo med seboj različne kristalne oblike, ter kristale od amorfnih snovi. Tako lahko iz spektra razberemo, ali nam je uspelo pripraviti novo kristalno obliko (kokristal), ali pa je naš vzorec le zmes izhodnih sestavin. S pomočjo ustrezne programske opreme pa je možna tudi določitev strukture kokristala (32).

IR spektroskopija omogoča identifikacijo kokristalov na osnovi "fingerprint" območja na IR spektru. Poleg tega lahko na osnovi sprememb položajev ter oblik absorpcijskih trakov funkcionalnih skupin sklepamo na morebitne interakcije na funkcionalnih skupinah. Slednje velja tudi za ramansko spektroskopijo (26).

DSC termična analiza pa je uporabna za natančno določitev talilnega intervala kokristalov in drugih termično pogojenih procesov, kot so razpad, rekristalizacija, izguba topila v primeru solvatov, prehajanje med polimorfnimi modifikacijami idr. (26).

## **1.7. FLUKONAZOL**

### **1.7.1. DELOVANJE IN UPORABA**

Flukonazol je protiglivična zdravilna učinkovina (antimikotik), in je kot tak selektivni kompetativni inhibitor glivične citokrom P450 sterol C-14- $\alpha$ -demetilaze (P450<sub>14DM</sub>, CYP51). V glivah je sterol C-14- $\alpha$ -demetilaza ključni encim v biosintezi ergosterola: katalizira oksidativno demetiliranje 14 $\alpha$ -metilne skupine lanosterola, kar vodi v nastanek  $\Delta^{14,15}$ -nenasičenih intermediatov ergosterola. Selektivna inhibicija CYP51 povzroči

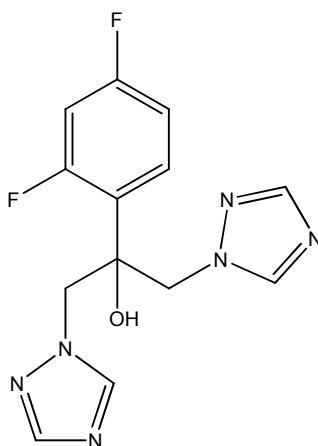
delecijo ergosterola in akumulacijo lanosterola ter ostalih 14-metil sterolov, posledica česar je inhibicija rasti celic gliv (33).

Flukonazol se uporablja pri zdravljenju sistemske kandidoze, mukozne kandidoze, kandidoze nožnice, kriptokoknega meningitisa in dermatomikoze. Tako je med drugim uporaben kot spremljevalna terapija pri bolnikih, ki imajo zmanjšano obrambno sposobnost organizma (oboleli za AIDS-om, rakavi bolniki, ki jemljejo citostatike in bolniki, ki jemljejo imunosupresive). Uporablja se tudi za preprečevanje kandidoze pri bolnikih pred presaditvijo matičnih krvnih celic (34).

### 1.7.2. OSNOVNI PODATKI

IUPAC poimenovanje: 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-di(*1H*-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol.

Strukturna formula:



Molekulska formula:  $C_{13}H_{12}F_2N_6O$ .

Molska masa:  $306,3 \text{ g mol}^{-1}$ .

Opis: Flukonazol je bela, kristalinična snov. Lahko topen je v metanolu, topen v etanolu in acetonu, zmerno topen v kloroformu in izopropanolu, težko topen v vodi in toluenu, ter zelo težko topen v heksanu.

Flukonazol je zelo šibka baza s  $pK_a$  vrednostjo 1,76 pri  $24^\circ\text{C}$ , ki je posledično nedvomno neprotonirana pri pH vrednostih, višjih od 3,5.

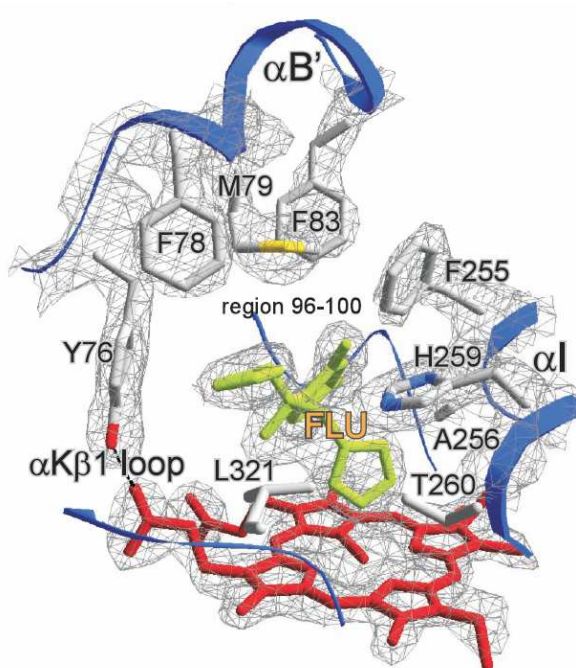
Tališče = pribl.  $140^\circ\text{C}$  (odvisno od polimorfne modifikacije).

Log P = 0,5.

Vir: (34, 35).

### 1.7.3. FLUKONAZOL KOT UČINKOVINA ZA KOKRISTALIZACIJO

Iz znanih kristalnih struktur kompleksov flukonazola in *Mycobacterium tuberculosis* citokrom P450 sterol C-14- $\alpha$ -demetilaz CYP51 (PDB koda 1EA1) in CYP121 (PDB koda 2IJ7) je razvidno, da se flukonazol veže v aktivni mesti obeh encimov preko vodikovih vezi, hidrofobnih interakcij in  $\pi$ - $\pi$  interakcij (36, 37, 38). Tako je na spodnji sliki, ki prikazuje kristalno strukturo kompleksa flukonazola s CYP51, vidna bližina flukonazola in hidrofobnih stranskih verig aminokislin Met-79, Leu-321, Thr-260, Ala-256, Phe-78, Phe-83 in Phe-255, kar nakazuje verjetne hidrofobne interakcije med flukonazolom in omenjenimi aminokislinskimi stranskimi verigami. Neposredna bližina 2,4-difluorofenilne skupine flukonazola in stranske verige Phe-255 pa nakazuje možno  $\pi$ - $\pi$  interakcijo.

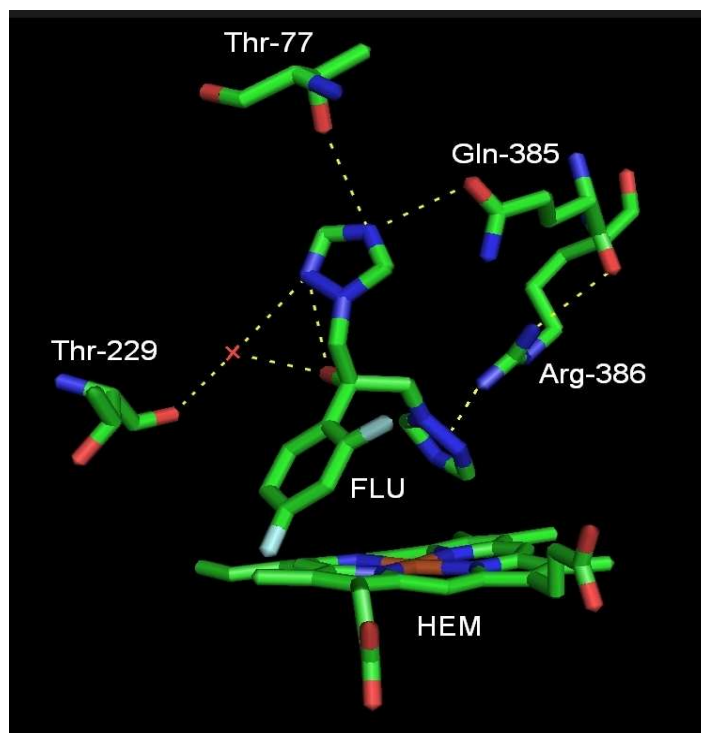


**Slika 7.** Kristalna struktura kompleksa flukonazola (FLU) in CYP51 (36). Na sliki so prikazane aminokislinske stranske verige, ki so od flukonazola oddaljene manj kot 4,1 Å.

Na sliki 8 (str. 18), ki prikazuje kristalno strukturo kompleksa flukonazola s CYP121, so prikazane vodikove vezi flukonazola z vodo in s stranskimi verigami aminokislin. Tako N4 atom 1. triazolskega obroča flukonazola tvori vodikovo vez z amino skupino stranske verige Arg-386, medtem ko N4 atom 2. triazolskega obroča flukonazola tvori vodikovi vezi s hidroksilnima skupinama stranskih verig Thr-77 in Gln-385 (stranska veriga vsebuje amidno skupino, za katero je značilna laktam-laktim tautomerija). Slednji triazolski obroč

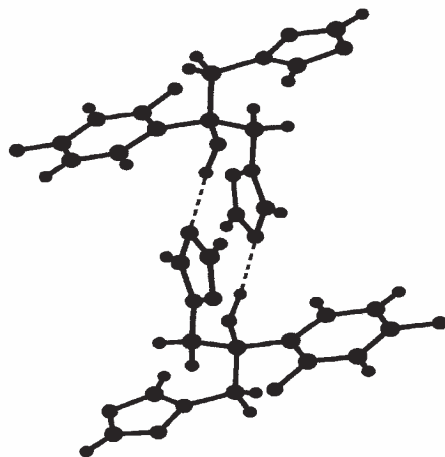


preko N2 atoma tvori intramolekularno vodikovo vez s hidroksilno skupino, obe omenjeni funkcionalni skupini pa preko molekule vode tvorita vodikovo vez s karbonilno skupino glavne verige Thr-229.



**Slika 8.** Kristalna struktura kompleksa flukonazola in CYP121. Molekula vode je prikazana z rdečim križcem. Vodikove vezi so prikazane z rumenimi prekinjenimi črtami.

Iz spodnje slike, ki prikazuje kristalno strukturo flukonazola je razvidno, da so v kristalni rešetki molekule flukonazola povezane v dimere preko vodikovih vezi. Vodikovi vezi sta prisotni med hidroksilnima skupinama in N4 atomoma triazolskih obročev znotraj dveh molekul flukonazola (39).



**Slika 9.** Kristalna struktura monokristala flukonazola (38). Vodikove vezi so prikazane s prekinjenimi črtami.

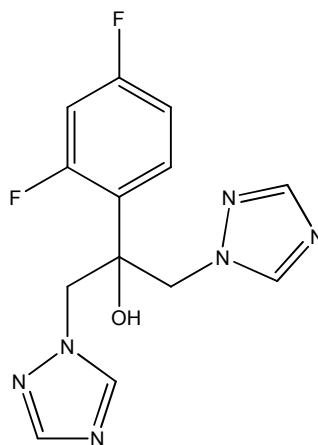
Navedene kristalne strukture monohidrata flukonazola in kompleksov flukonazola s C-14- $\alpha$ -demetilazama kažejo na veliko sposobnost flukonazola za tvorbo intramolekularnih, kot tudi intermolekularnih vodikovih vezi in drugih interakcij. Poleg tega je poznanih tudi več polimorfni modifikacij flukonazola (39). Kot tak je flukonazol primerna učinkovina za pripravo kokristalov. To potrjuje tudi patent McMahona in sod., ki med drugim ščiti kokristal flukonazolijev maleat : maleinska kislina, v katerem pa ni navedenega stehiometrijskega razmerja kokristala (40).

## 2. NAMEN DELA

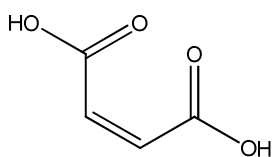
Namen dela obsega pripravo novih kokristalov flukonazola in karakterizacijo tako pridobljenih kokristalov, ki obetajo izboljšanje topnosti, absorpcije, biološke uporabnosti, stabilnosti in mehanskih lastnosti flukonazola.

Flukonazol izkazuje ustrezno strukturo za tvorbo vodikovih vezi in ima znano polimorfno obnašanje. Zaradi svoje relativno enostavne strukture pričakujemo, da bodo kokristali flukonazola relativno enostavni za karakterizacijo z NMR metodami. Ker je slabo topen v vodi, predstavlja perspektivo za izboljšanje topnosti v vodi zaradi kokristalizacije.

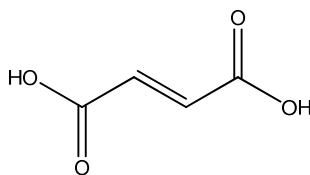
Kot pomožne snovi bomo uporabili različne dikarboksilne kisline, saj je najpogosteje uporabljena kombinacija za tvorbo kokristalov sestavljena iz molekule, ki vsebuje karboksilno skupino in iz molekule, ki vsebuje dušikov heterocikel. Poleg tega so dikarboksilne kisline v vodi na splošno dobro topne, kar pomeni dobre možnosti za izboljšanje topnosti kokristala, v primerjavi s samim flukonazolom. Tako bomo kokristale skušali pripraviti z maleinsko, fumarno, jantarno, jabolčno, vinsko in glutarno kislino.



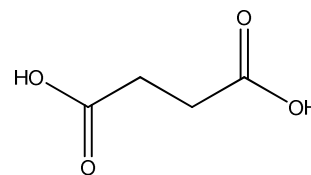
flukonazol



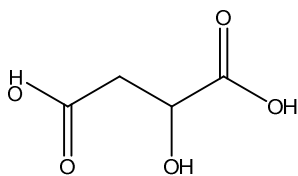
maleinska kislina



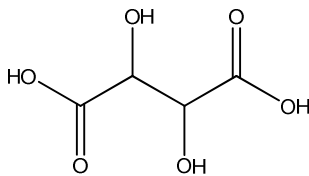
fumarna kislina



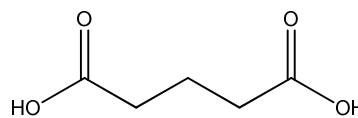
jantarna kislina



jabolčna kislina



vinska kislina



glutarna kislina

Dikarboksilne kisline, ki jih bomo uporabili, so vse razen glutarne kisline sestavljene iz 4 ogljikovih atomov in tako zavzemajo približno enak volumen. Uporabljene dikarboksilne kisline tako prostorsko relativno dobro ustrezajo maleinski kislini, s katero je že bil pripravljen kokristal s flukonazolom.

Kokristale bomo skušali pripraviti z metodo kokristalizacije iz topila. Pri tem bomo poiskali ustrezna topila oz. kombinacije topil, ki bodo zagotavljale zadostno in primerljivo topnost flukonazola in dikarboksilnih kislin. Kokristale bomo poizkušali pripraviti v različnih stehiometrijskih razmerjih, z namenom poiskati ustrezna stehiometrijska razmerja komponent za tvorbo različnih kokristalov istih osnovnih gradnikov.

Tako pripravljene kristale bomo okarakterizirali z metodami rentgenske difrakcije na monokristalih, rentgenske praškovne difrakcije, jedrske magnetne resonance v trdnem, z DSC termično analizo in z IR spektroskopijo.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje spojine:

- flukonazol (Krka)
- fumarna kislina (Kemika)
- glutarna kislina (Merck)
- jabolčna kislina (Kemika)
- jantarna kislina (Fluka)
- maleinska kislina (Riedel-de Haën)
- vinska kislina (Merck)

in topila:

- aceton (Merck, čistota  $\geq 99,9$  %)
- acetonitril (Merck, čistota  $\geq 99,9$  %)
- i-butilmetilketon (Merck, čistota  $\geq 99,0$  %)
- cikloheksan (Merck, čistota  $\geq 99,9$  %)
- deionizirana H<sub>2</sub>O
- 1,4-dioksan (Merck, čistota  $\geq 99,8$  %)
- etanol (Merck, čistota  $\geq 99,9$  %)
- etilacetat (Merck, čistota  $\geq 99,5$  %)
- nitrometan (Merck, čistota  $\geq 98,0$  %)
- n-heksan (Merck, čistota  $\geq 98,0$  %)
- kloroform (Merck, čistota  $\geq 99,8$  %)
- tetrahidrofuran (Merck, čistota  $\geq 99,9$  %)

## 3.2. METODE

### **Rentgenska difrakcija na monokristalih**

Kristalne strukture so bile posnete z difraktometrom Nonius Kappa CCD, opremljenim s kriostatom na tekoči dušik (Oxford Cryostream 700), pri temperaturi 150 K. Meritve so bile izvedene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani.

### **Rentgenska praškovna difrakcija**

Praškovni difraktogrami so bili posneti z difraktometrom Philips X`Pert Pro MPD. Območje snemanja je znašalo  $3 - 31^\circ$ ,  $2\theta$ . Integracijski čas je znašal 100 sekund, korak pa  $0,033^\circ$ . Meritve so bile opravljene v podjetju Krka, d.d., Novo mesto, na Oddelku za strukturne raziskave.

### **Jedrska magnetna resonanca v trdnem**

$^1\text{H}$  MAS NMR spektri so bili posneti z Varian NMR System 600 MHz NMR spektrometrom. Uporabljena je bila 3.2 mm NB Double Resonance HX MAS Solids proba. Hitrost vrtenja vzorcev je znašala 20000 Hz.

$^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektri so bili posneti z Varian Unity Inova 300 MHz NMR spektrometrom. Uporabljena je bila 5 mm MagicAngle VT CP/MAS proba. Hitrost vrtenja vzorcev je znašala 5000 Hz.

Meritve so bile izvedene v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti, na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

### **Jedrska magnetna resonanca v raztopini**

$^1\text{H}$  NMR spektri so bili posneti z Bruker Advance DPX<sub>300</sub> spektrometrom, na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani, ki deluje v okviru Nacionalnega centra za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti. Spektri so bili posneti pri 300 MHz, s TMS kot internim standardom. Kot topilo smo uporabili DMSO- $d_6$ .

**DSC termična analiza**

DSC termogrami so bili posneti z instrumentom Mettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.10. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi (pretok dušika je znašal 40 ml/min). Hitrost segrevanja je znašala 1 K/min oz. 10 K/min.

**IR spektroskopija**

IR spektri vzorcev v obliki KBr diskov so bili posneti s spektrometrom Perkin Elmer Spectrum BX FTIR na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Meritve so potekale pri temperaturi 25°C.

**Elementna analiza**

Vsebnosti elementov C,H,N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani.

**Nomenklatura in risanje spojin**

Za poimenovanje spojin in risanje strukturnih formul smo uporabljali program Chem Draw Ultra 11.0, podjetja CambridgeSoft Corporation, USA.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. PRIPRAVA KOKRISTALA FLUKONAZOL : MALEINSKA KISLINA = 1:3

Flukonazol (100,0 mg, 0,33 mmol) in maleinsko kislino (113,8 mg, 0,99 mmol) smo raztopili v 1,5 ml EtOAc, ob segrevanju na 50°C. Bistro raztopino smo pustili zaprto v hladilniku, dokler niso zrasli kokristali. Nato smo pustili topilo odhlapeti do suhega pri sobni temperaturi. Sušenje je trajalo 96 ur pri sobni temperaturi.

#### Priprava monokristalov za rentgensko difrakcijo

Flukonazol (200,0 mg, 0,66 mmol) in maleinsko kislino (227,5 mg, 1,98 mmol) smo raztopili v 3 ml EtOAc, ob segrevanju na 50°C. Bistro raztopino smo zaprto pustili v hladilniku, dokler niso zrasli prvi kokristali. Nato smo pustili topilo zelo počasi odhlapovati pri sobni temperaturi, dokler niso zrasli monokristali ustrezne velikosti in kakovosti.

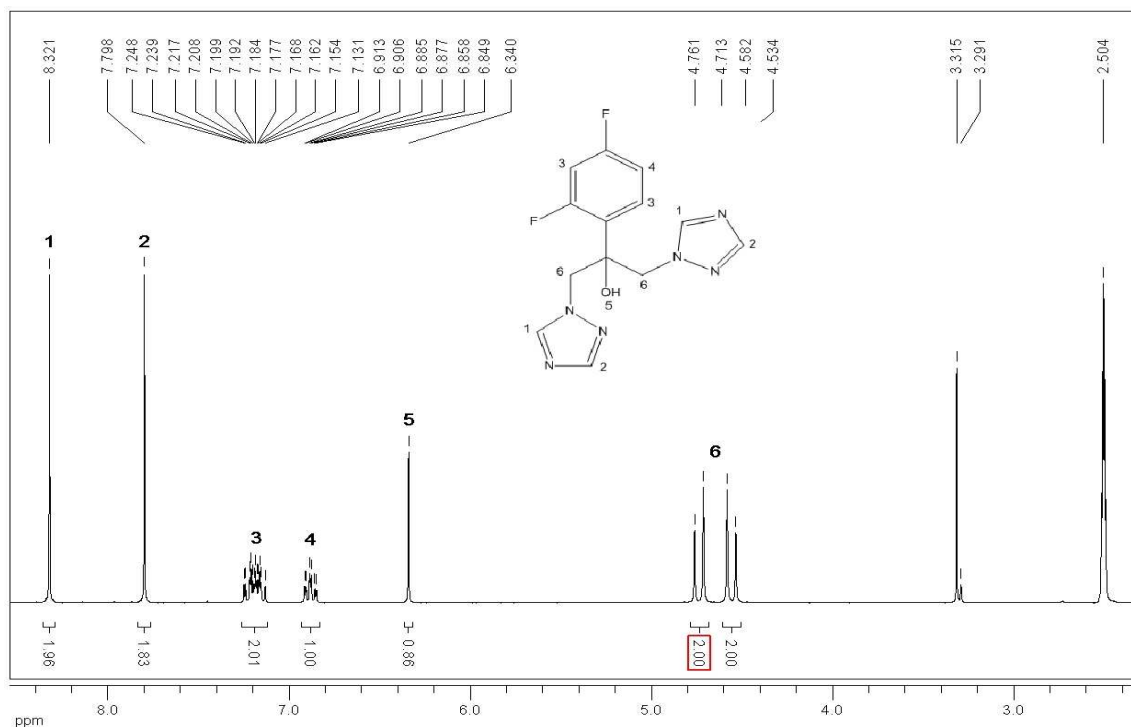
**IR (KBr):** 3497, 3361, 3132, 3072, 2765, 2572, 1890, 1718, 1704, 1624, 1560, 1456, 1426, 1380, 1349, 1298, 1276, 1246, 1222, 1179, 1151, 1115, 1088, 1058, 990, 968, 930, 904, 872, 861, 832, 816, 792, 737, 666, 638, 632, 593, 569, 462 cm<sup>-1</sup>.

**Tališče:** 96 °C.

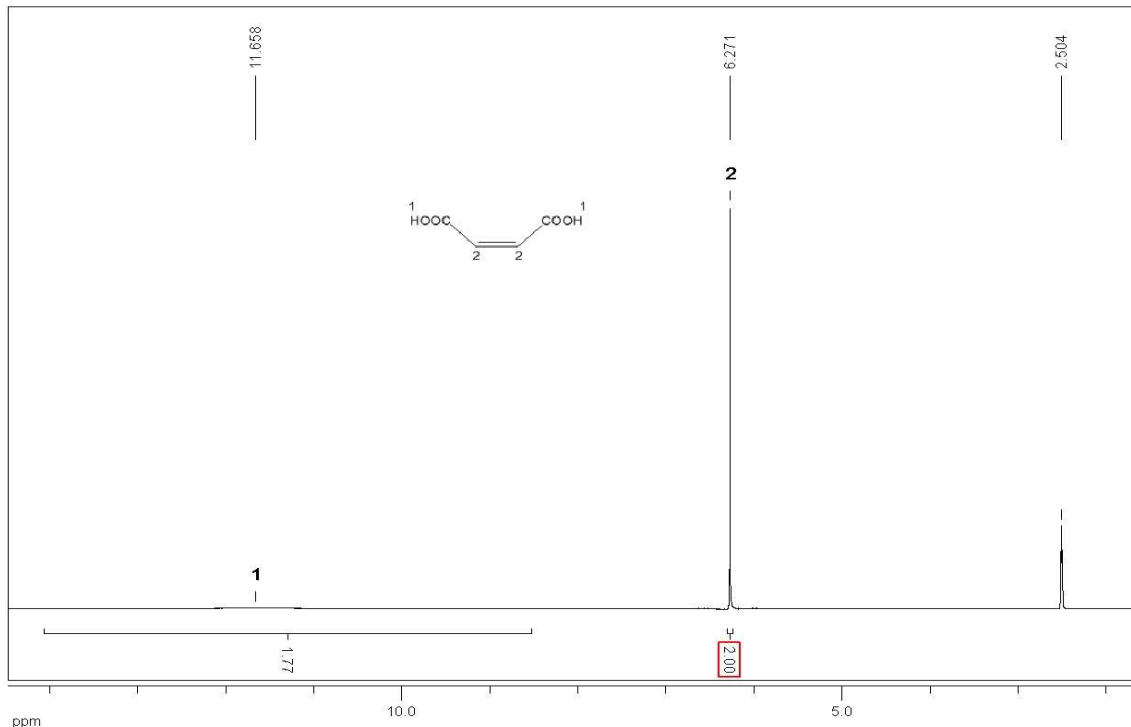
#### Stehiometrijsko razmerje

Razmerje obeh komponent v kokristalu smo preverili z <sup>1</sup>H NMR v DMSO-d<sub>6</sub>, pri čemer je bila ključna pravilna izbira referenčne integrirane vrednosti v spektru kokristala, saj je mogoče med seboj primerjati le integrirane vrednosti signalov, ki pripadajo protonom s primerljivimi relaksacijskimi časi. Tako smo stehiometrijsko razmerje določili iz spektra kokristala (str. 27, slika 12), s primerjavo intenzitet signala flukonazola F2 in signala maleinske kisline M2.

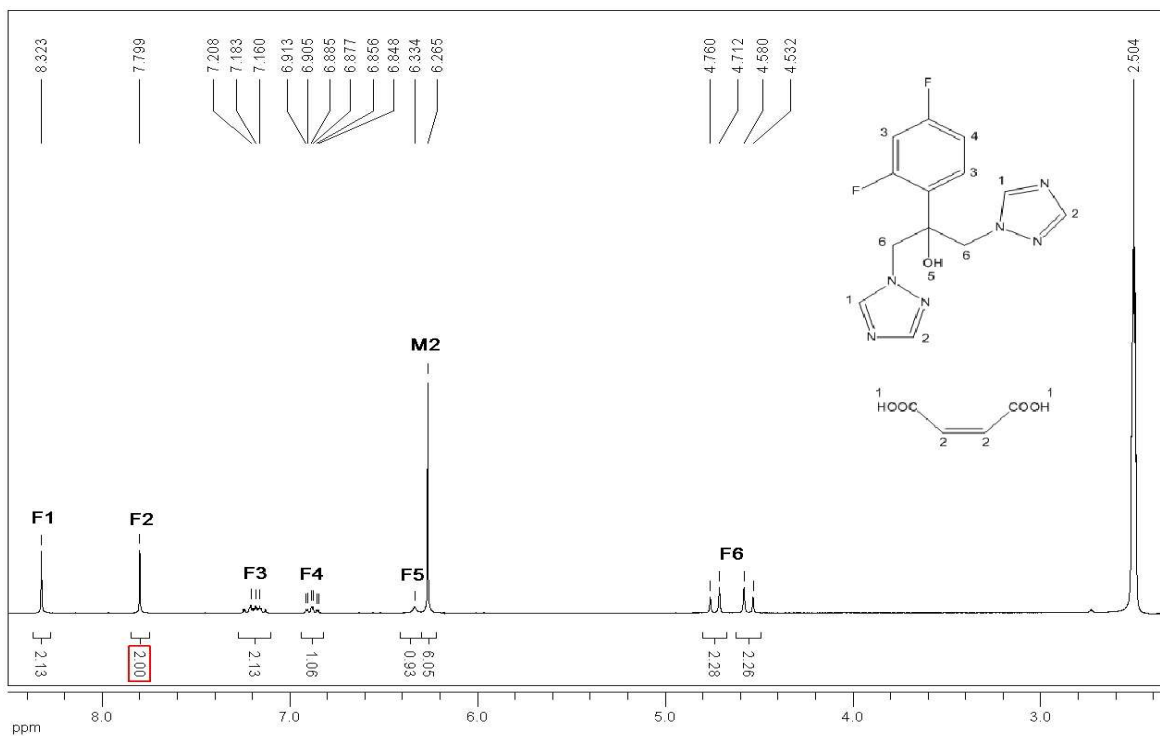




**Slika 10.**  $^1\text{H}$  NMR spekter flukonazola, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signali, ki pripadajo protonom flukonazola so označeni s števkami od 1 do 6, na strukturi formuli pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.



**Slika 11.**  $^1\text{H}$  NMR spekter maleinske kisline, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signala, ki pripadata protonom maleinske kisline sta označena s števkama 1 in 2, na strukturi formuli pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.



**Slika 12.**  $^1\text{H}$  NMR spekter kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signala, ki pripadajo protonom maleinske kisline sta označena kot M1 in M2. Signali, ki pripadajo protonom flukonazola so označeni od F1 do F6. Na strukturnih formulah pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.

### Elementna analiza za $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{13}$ (654,49):

	C (%)	H (%)	N (%)
Izračunane vrednosti:	45,88	3,70	12,84
Izmerjene vrednosti: <sup>†</sup>	46,46	3,88	13,02

<sup>†</sup> Za analizo je bilo na voljo manj vzorca, kot je običajno potrebno.

## 4.2. PRIPRAVA KOKRISTALA FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA = 2:1

Flukonazol (200,0 mg, 0,66 mmol) in fumarno kislino (37,9 mg, 0,33 mmol) smo raztopili v 1,8 ml EtOH, ob vrenju. Bistvo raztopino smo počasi ohladili na sobno temperaturo in nato pustili topilo zelo počasi odhlapevati do suhega. Sušenje je trajalo 96 ur pri sobni temperaturi.

### Priprava monokristalov za rentgensko difrakcijo

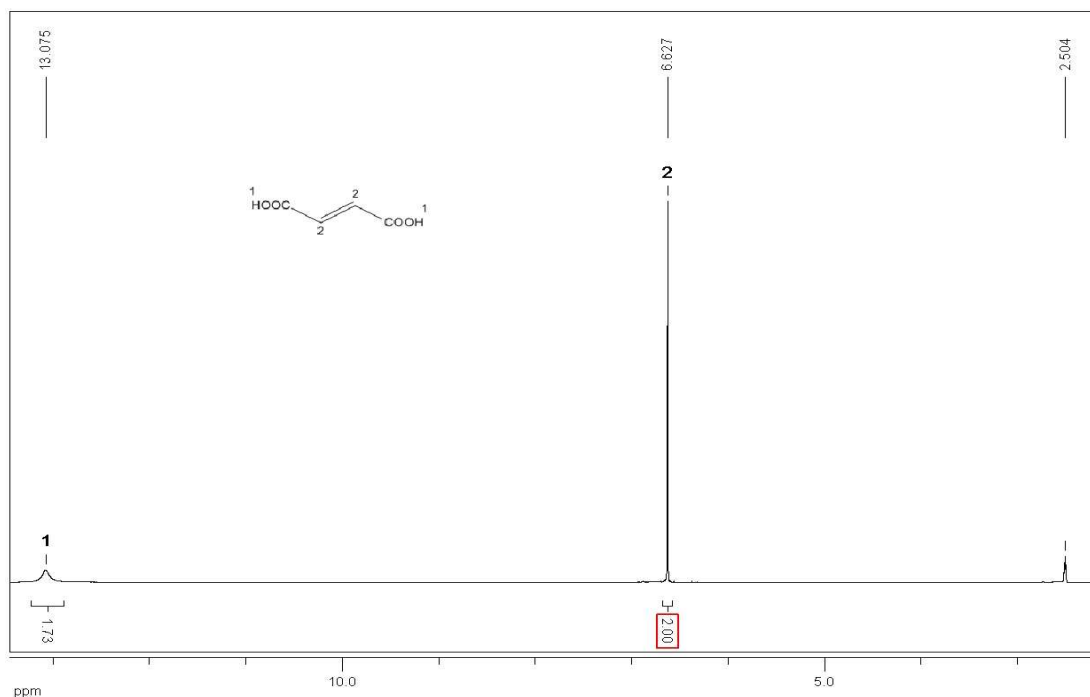
Flukonazol (200,0 mg, 0,66 mmol) in fumarno kislino (37,9 mg, 0,33 mmol) smo raztopili v 1 ml EtOH, ob vrenju. Bistri raztopini smo dodali nekaj predhodno pridobljenih kokristalov, pripravljenih po zgoraj navedenem postopku. Zmes smo nato počasi ohladili na sobno temperaturo in pustili topilo zelo počasi odhlapevati, dokler niso zrasli monokristali ustrezne velikosti in kakovosti.

**IR (KBr):** 3412, 3118, 2671, 2544, 2365, 1924, 1708, 1693, 1654, 1619, 1560, 1517, 1503, 1473, 1423, 1369, 1343, 1316, 1298, 1277, 1250, 1208, 1194, 1140, 1112, 1094, 1084, 1021, 1014, 991, 968, 916, 898, 875, 853, 834, 783, 765, 736, 695, 680, 654, 617, 587, 571, 530, 515  $\text{cm}^{-1}$ .

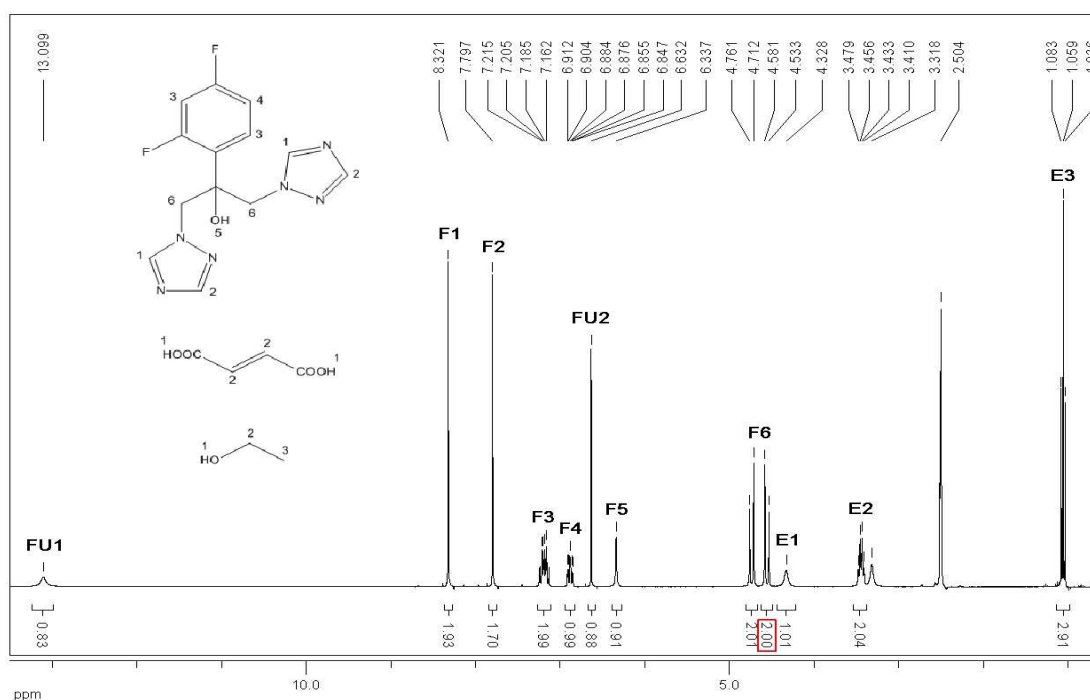
**Tališče:** 131°C.

### Stehiometrijsko razmerje

Razmerje obeh komponent v kokristalu smo preverili z  $^1\text{H}$  NMR v DMSO- $d_6$ , pri čemer je bila ključna pravilna izbira referenčne integrirane vrednosti v spektru kokristala, saj je mogoče med seboj primerjati le integrirane vrednosti signalov, ki pripadajo protonom s primerljivimi relaksacijskimi časi. Tako smo stehiometrijsko razmerje 2:1 določili iz spektra kokristala (str. 29, slika 14), s primerjavo intenzitet signala flukonazola F6 in signala fumarne kisline FU2. V spektru kokristala je vidna tudi prisotnost etanola kot topila v stehiometrijskem razmerju 2:1:1, kar pa je obrazloženo v poglavju 5.2..



**Slika 13.**  $^1\text{H}$  NMR spekter fumarne kisline, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signala, ki pripadata protonom fumarne kisline sta označena s številčkama 1 in 2, na strukturi pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.



**Slika 14.**  $^1\text{H}$  NMR spekter kokristala flukonazol : fumarna kisline = 2:1, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signala, ki pripadata protonom fumarne kisline sta označena kot FU1 in FU2. Signali, ki pripadajo protonom flukonazola so označeni od F1 do F6. Signali, ki pripadajo protonom etanola so označeni od E1 do E3. Na strukturi pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.

**Elementna analiza za C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>F<sub>4</sub>N<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (728,61):**

	C (%)	H (%)	N (%)
Izračunane vrednosti:	49,45	3,87	23,07
Izmerjene vrednosti:	49,57	3,77	23,17

**4.3. PRIPRAVA KOKRISTALA FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA = 1:1**

Flukonazol (100,0 mg, 0,33 mmol) in glutarno kislino (43,1 mg, 0,33 mmol) smo raztopili v 1 ml CH<sub>3</sub>CN, ob segrevanju na 50°C. Bistro raztopino smo počasi ohladili na sobno temperaturo in nato pustili topilo odhlapeti do prozornega filma, iz katerega so v roku 72 ur zrasli kokristali. Kokristale smo posušili pri sobni temperaturi. Sušenje je trajalo 72 ur pri sobni temperaturi.

**Priprava monokristalov za rentgensko difrakcijo**

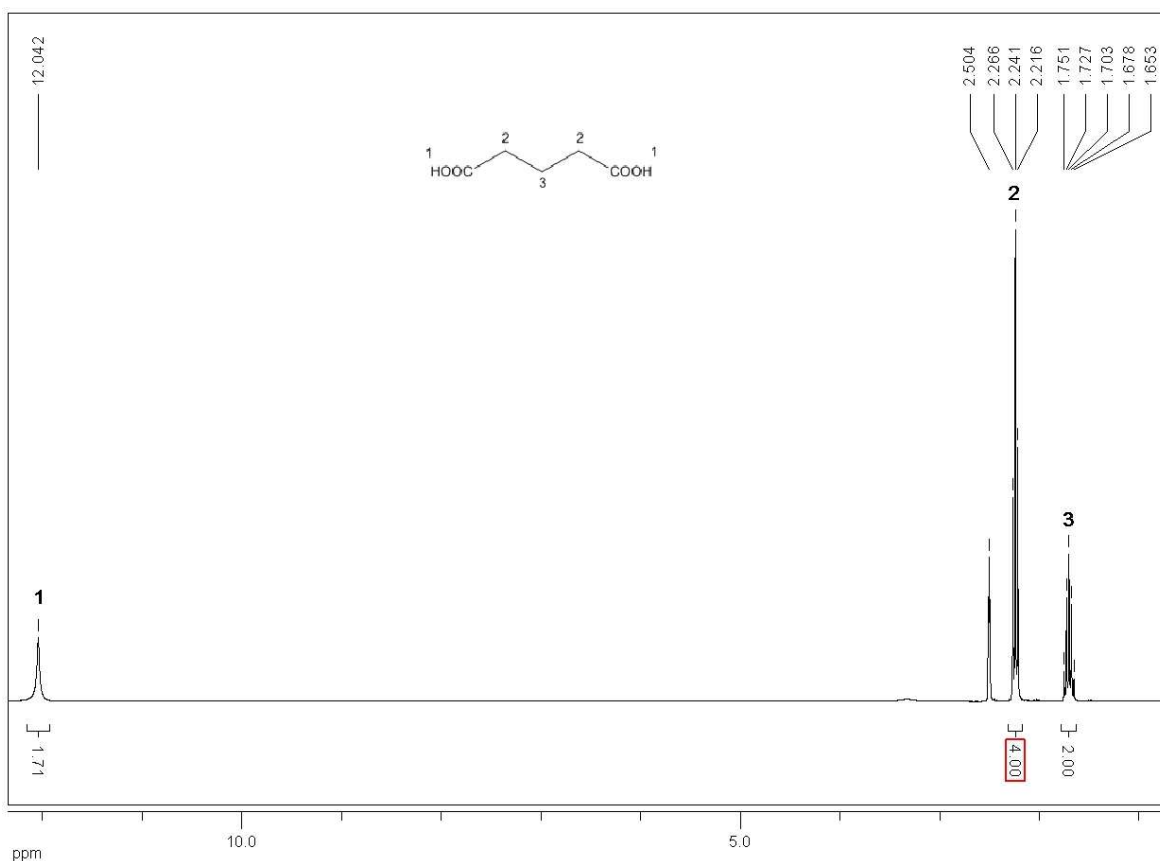
Flukonazol (100,0 mg, 0,33 mmol) in glutarno kislino (43,1 mg, 0,33 mmol) smo raztopili v mešanici 0,5 ml CH<sub>3</sub>CN in 0,75 ml heksana, ob segrevanju na 50°C. Bistri raztopini smo dodali nekaj predhodno pridobljenih kokristalov, pripravljenih po zgoraj navedenem postopku. Zmes smo nato počasi ohladili na sobno temperaturo in pustili topilo zelo počasi odhlapevati, dokler niso zrasli monokristali ustrezne velikosti in kakovosti.

**IR (KBr):** 3420, 3129, 3078, 3060, 3026, 2948, 2696, 2542, 1722, 1620, 1560, 1512, 1447, 1417, 1360, 1317, 1291, 1279, 1213, 1188, 1155, 1141, 1132, 1112, 1079, 998, 971, 919, 877, 863, 820, 792, 768, 676, 654, 618, 575, 525, 516, 475 cm<sup>-1</sup>.

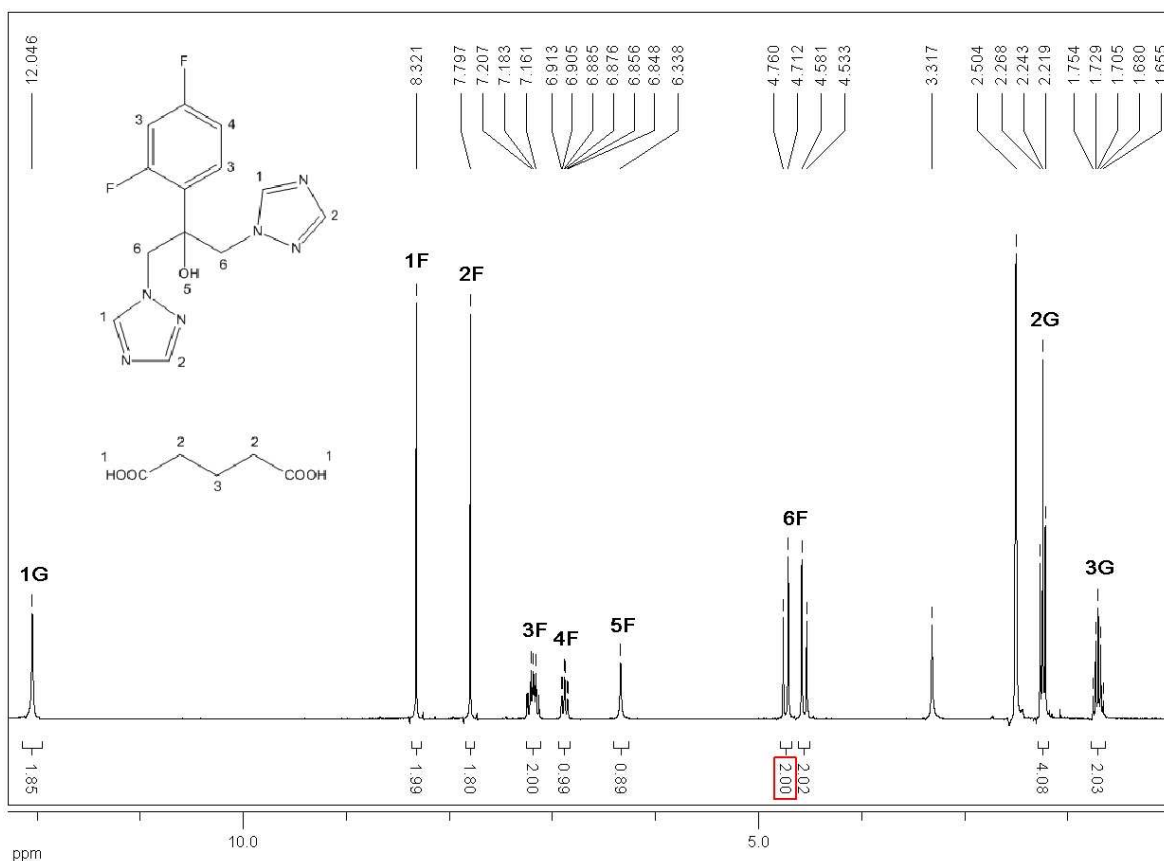
**Tališče:** 97°C.

## Stehiometrijsko razmerje

Razmerje obeh komponent v kokristalu smo preverili z  $^1\text{H}$  NMR v  $\text{DMSO-d}_6$ , pri čemer je bila ključna pravilna izbira referenčne integrirane vrednosti v spektru kokristala, saj je mogoče med seboj primerjati le integrirane vrednosti signalov, ki pripadajo protonom s primerljivimi relaksacijskimi časi. Tako smo stehiometrijsko razmerje 1:1 določili iz spektra kokristala (str. 32, slika 16), s primerjavo intenzitet signala flukonazola 6F in signala glutarne kisline 3G.



**Slika 15.**  $^1\text{H}$  NMR spekter fumarne kisline, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signali, ki pripadajo protonom glutarne kisline so označeni s številkami od 1 do 3, na strukturi pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.



**Slika 16.**  $^1\text{H}$  NMR spekter kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ . Signali, ki pripadajo protonom glutarne kisline so označeni od 1G do 3G. Signali, ki pripadajo protonom flukonazola so označeni od 1F do 6F. Na strukturnih formulah pa so označeni položaji pripadajočih protonov. Referenčna integrirana vrednost je označena z rdečo barvo.

#### Elementna analiza za $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_5$ (438,39):

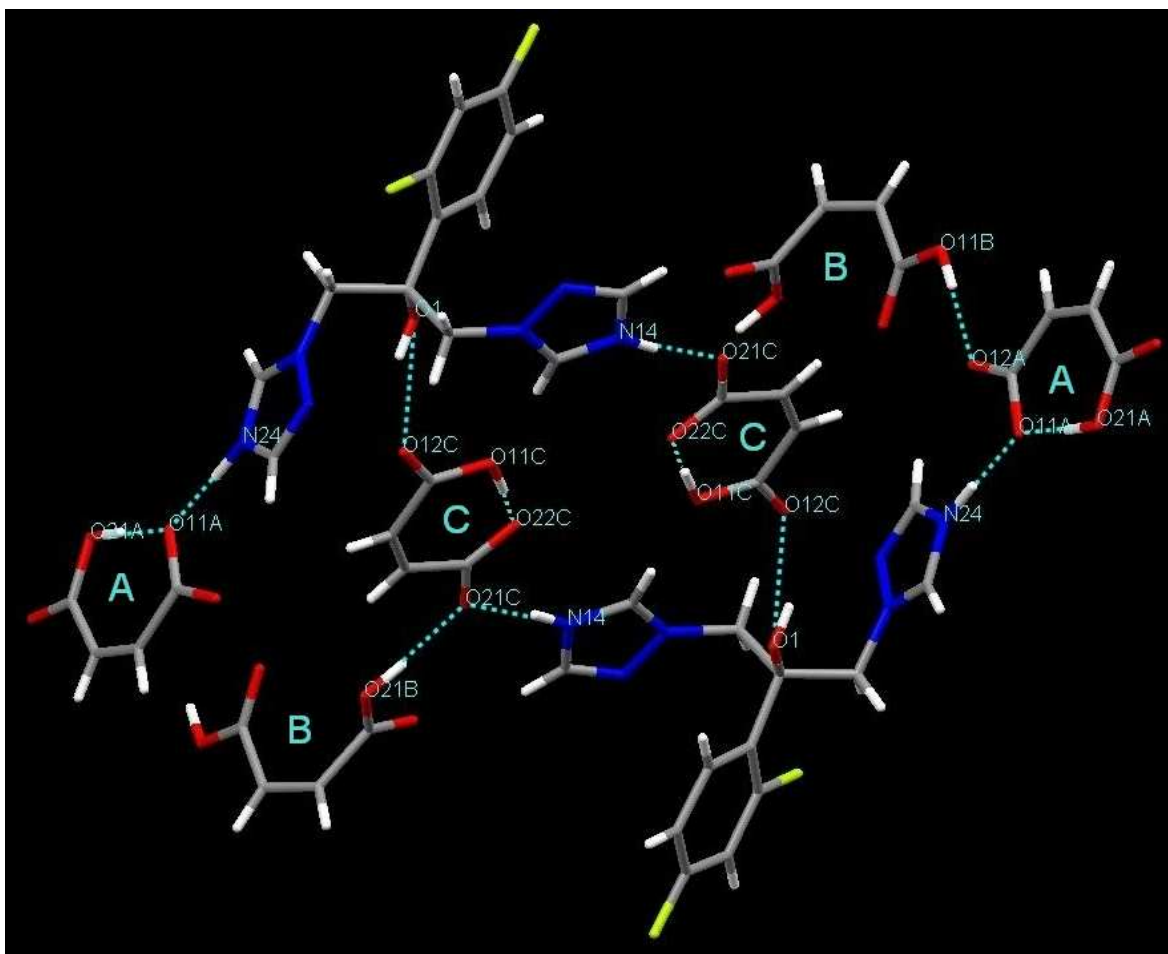
	C (%)	H (%)	N (%)
Izračunane vrednosti:	49,32	4,60	19,17
Izmerjene vrednosti:	49,54	4,55	19,23

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. KOKRISTAL FLUKONAZOL : MALEINSKA KISLINA = 1:3

#### 5.1.1. RENTGENSKA KRISTALNA STRUKTURA

Na sliki 17 je prikazana kristalna struktura kokristala flukonazola z maleinsko kislino, pripravljenega po metodi 4.1.:



**Slika 17.** Kristalna struktura kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3, pridobljena z rentgensko difrakcijo na monokristalih. S sivo barvo so prikazani ogljikovi atomi, z belo barvo vodikovi atomi, z rdečo barvo kisikovi atomi, z modro barvo dušikovi atomi in z rumeno barvo fluorovi atomi. Vodikove vezi so označene s svetlo modrimi prekinjenimi črtami. Molekule maleinskih kislin so označene s črkami A, B in C. Slika je bila izdelana s programom Mercury 2.2 (CCDC, Velika Britanija).

**Preglednica I.** Podatki o triklnem kokristalu flukonazol : maleinska kislina = 1:3.

dolžina stranice (Å)	kot (°)
a = 5,4983(10)	$\alpha$ = 98,062(10)
b = 13,8723(5)	$\beta$ = 91,748(2)
c = 18,4331(5)	$\gamma$ = 95,479(2)



**Preglednica II.** Vodikove vezi v kokristalu flukonazol : maleinska kislina = 1:3 (D=donor, A=akceptor in d=razdalja v Å).

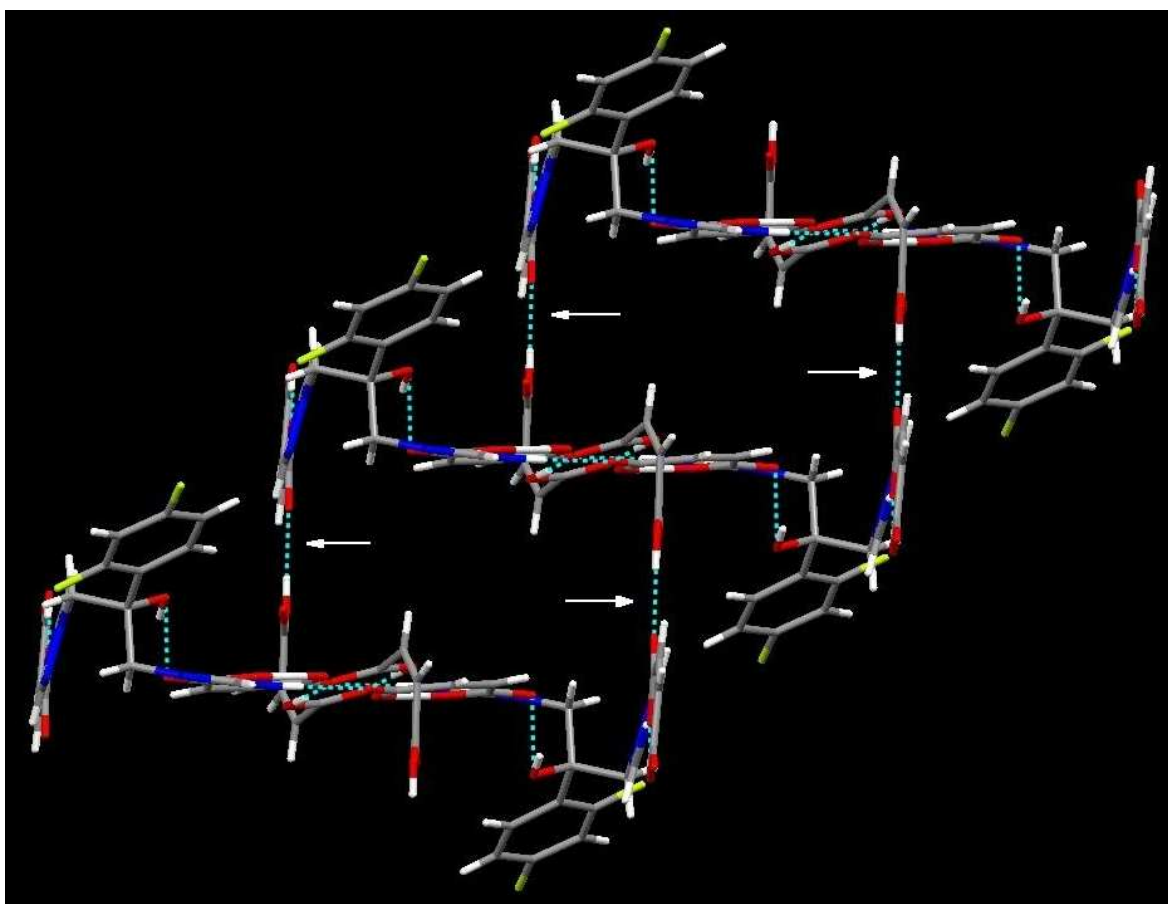
Zap. št. vezi	D-H	d(D-H)	d(H <sup>⋯</sup> A)	d(D <sup>⋯</sup> A)	A
1	O1-H1	0,820	1,897	2,665	O12C
2	O21A-H1A	0,972	1,484	2,454	O11A
3	O21B-H1B	0,950	1,741	2,684	O21C
4	O11C-H1C	1,091	1,342	2,433	O22C
5	O11B-H2B	0,840	1,813	2,652	O12A
6	N14-H14	0,928	1,725	2,648	O21C
7	N24-H24	1,043	1,618	2,658	O11A

Iz kristalne strukture je vidno, da je omenjeni kokristal dejansko kokristal soli. Prišlo je do izmenjave protonov med maleinsko kislino in flukonazolom. Vsaka molekula flukonazola je sprejela 2 protona od dveh molekul maleinske kisline. V obeh triazolovih obročih sta namreč dušika, označena kot N14 in N24, sprejela protona. Tako se ob vsakem od teh dušikovih atomov nahaja po ena molekula maleinske kisline (molekuli A in C), ki s COO<sup>-</sup> skupinama tvorita vodikovi vezi z NH<sup>+</sup> skupinama (vodikovi vezi št. 6 in 7). Ena od obeh delno deprotoniranih maleinskih kislin (molekula C) preko karbonilnega kisikovega atoma preostale COOH skupine tvori vodikovo vez s hidroksilno skupino druge molekule flukonazola (vodikova vez št. 1). Tu torej nastane vodikova vez brez izmenjave protona. Karboksilatna skupina molekule maleinske kisline C tvori vodikovo vez št. 3 z molekulo maleinske kisline B, ki je v neionizirani obliki. Druga ionizirana maleinska kislina (molekula A) pa preko karbonilnega kisikovega atoma COOH skupine tvori vodikovo vez št. 5 z drugo neionizirano molekulo maleinske kisline B. Prisotnost vseh 3 zgoraj omenjenih vodikovih vezi brez izmenjave protona, pomeni, da je nastal kokristal. Preostali 2 vodikovi vezi (H-vezi št. 2 in št. 4), ki se pojavljata v kokristalu, sta intramolekularni vodikovi vezi znotraj obeh ioniziranih maleinskih kislin.

Zaradi kompleksnosti sistema vodikovih vezi, ki se pojavljajo v tem kokristalu, težko govorimo o prevladujočih homomernih ali heteromernih interakcijah. Kljub temu si glede na jakost vodikove vezi sledijo v logičnem zaporedju. Tako sta intramolekularni vodikovi vezi v ioniziranih maleinskih kislinah najkrajši ( $d_2=1,484$  in  $d_4=1,342$ ), in zato najmočnejši v kokristalu. Sledita intermolekularni vodikovi vezi med COO<sup>-</sup> in NH<sup>+</sup> skupinama ( $d_6=1,725$  in  $d_7=1,618$ ), nato intermolekularni vodikovi vezi št. 3 in 5 (obe med COOH in COO<sup>-</sup> skupinama maleinskih kislin;  $d_3=1,741$  in  $d_5=1,813$ ). Najšibkejša pa je vodikova vez

št. 1 ( $d_1=1,897$ ), ki povezuje OH skupino flukonazola in COOH skupino maleinske kisline. Pri razvrstitvi dolžin vezi smo upoštevali razdalje med protonom in akceptorjem ( $d(H^{\cdots}A)$ ).

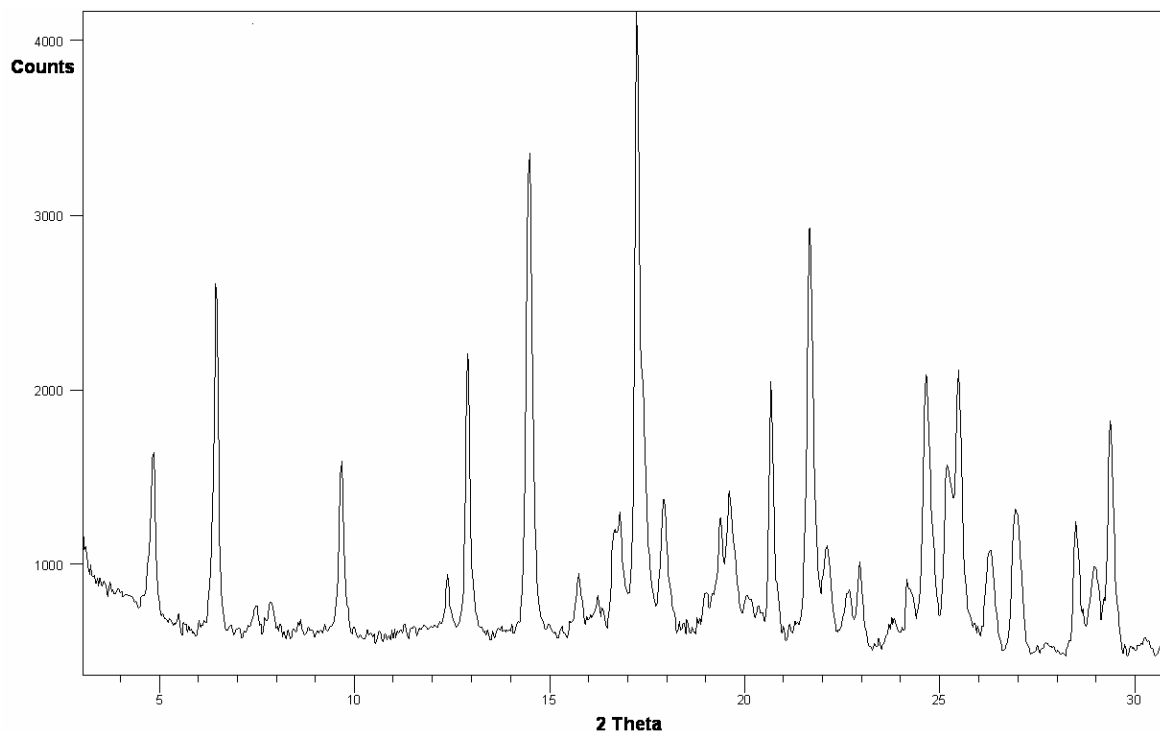
Osnovni vzorec, ki se ponavlja v celotnem monokristalu, je tako sestavljen iz 2 protoniranih molekul flukonazola, 4 delno deprotoniranih molekul maleinske kisline in 2 neioniziranih molekul maleinske kisline, pri čemer so tako opisane plasti med seboj povezane z vodikovimi vezmi (H-vez št. 5) med neioniziranimi molekulami maleinske kisline B in ioniziranimi molekulami maleinske kisline A (slika 18). Tako opisan kokristal soli lahko opredelimo kot flukonazol : maleinska kislina = 1:3.



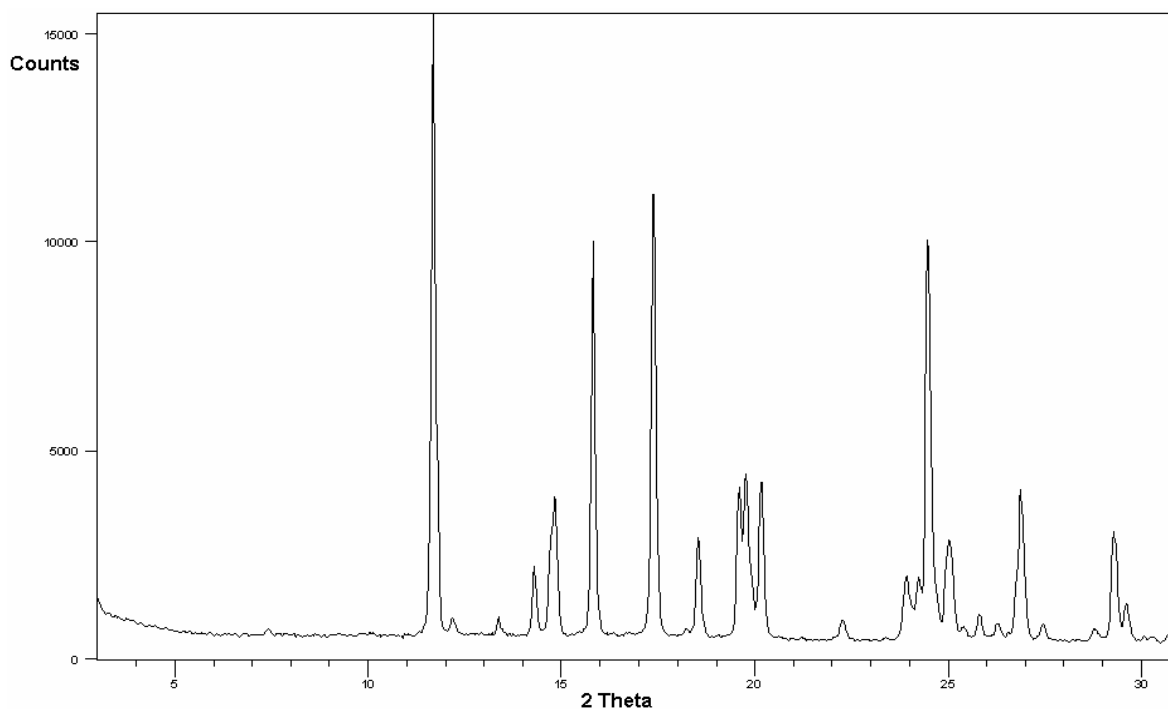
**Slika 18.** Kristalna struktura kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3, pridobljena z rentgensko difrakcijo na monokristalih. Na sliki so prikazane 3 plasti, ki so med seboj povezane z vodikovimi vezmi med neioniziranimi in ioniziranimi molekulami maleinske kisline (vezi označene s puščicami; vodikova vez št. 5). Slika je bila izdelana s programom Mercury 2.2 (CCDC, Velika Britanija).

### 5.1.2. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (PXRD)

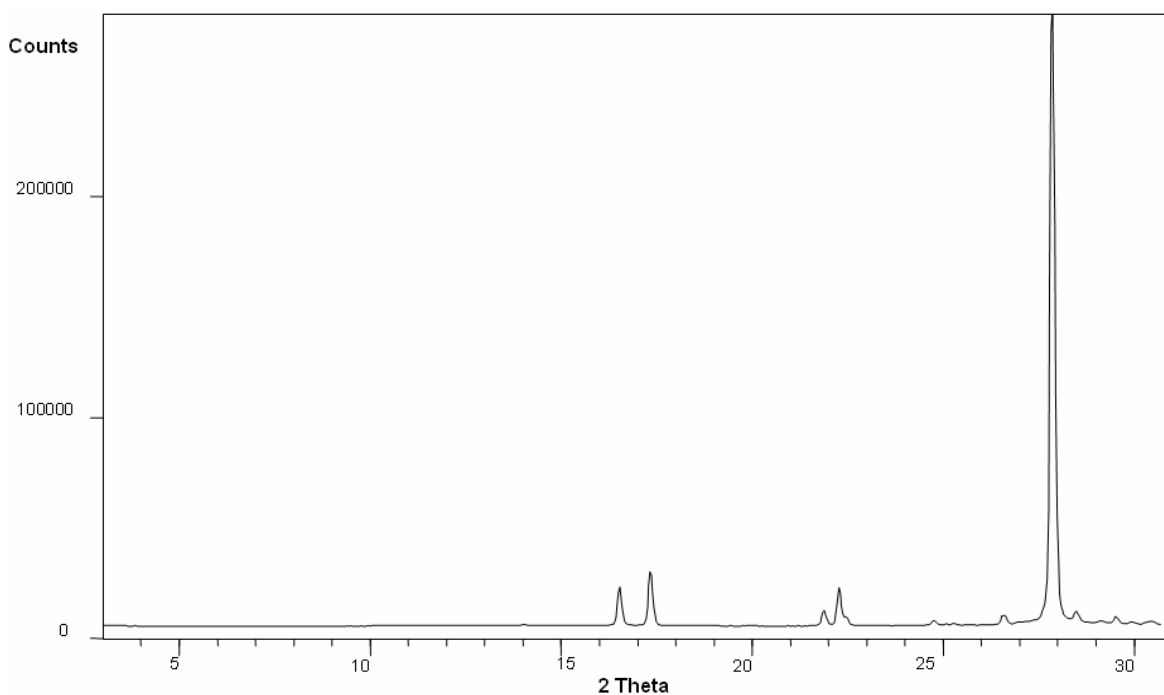
Iz difraktogramov flukonazola, maleinske kisline in kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3 je razvidno, da se difraktogram kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3 razlikuje od superpozicije difraktogramov flukonazola in maleinske kisline. To potrjuje, da je pri poizkusu kokristalizacije nastala nova kristalna oblika.



**Slika 19.** Praškovni difraktogram kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3.



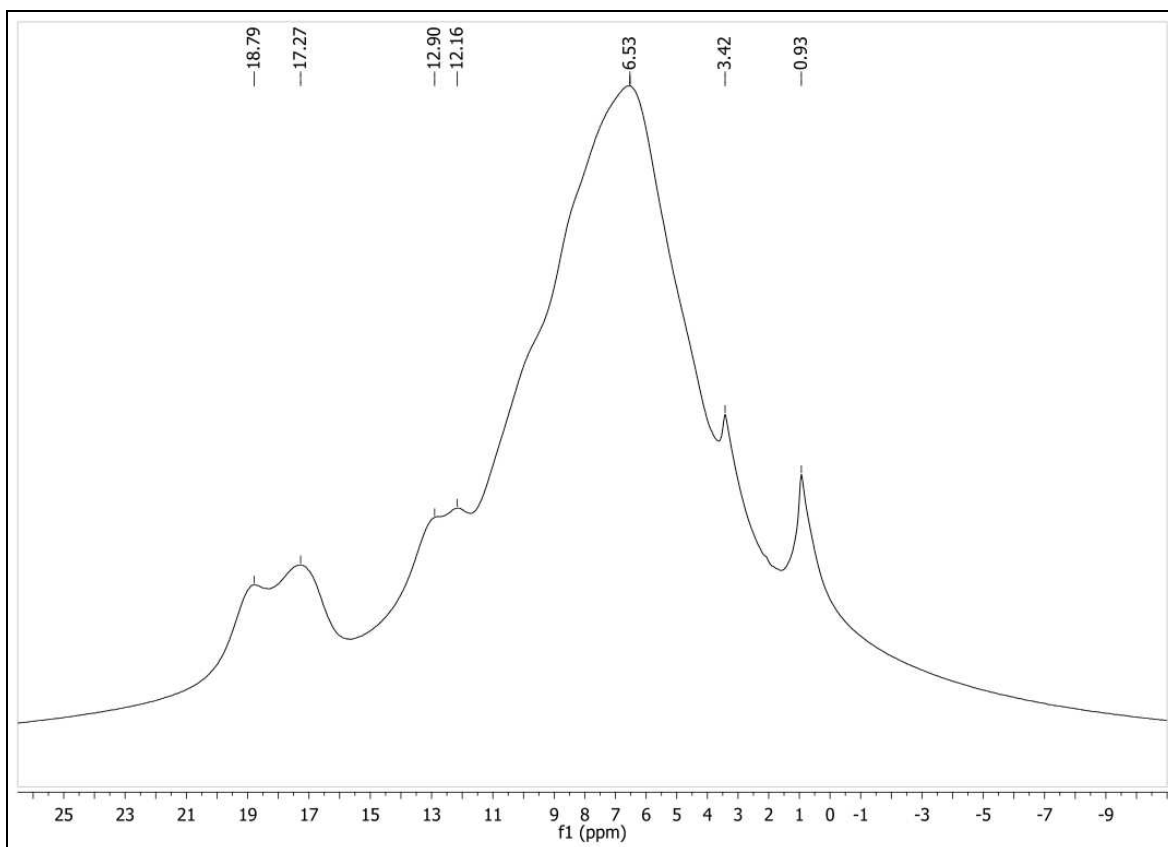
Slika 20. Praškovni difraktogram flukonazola (polimorfna modifikacija št. 2 (41)).



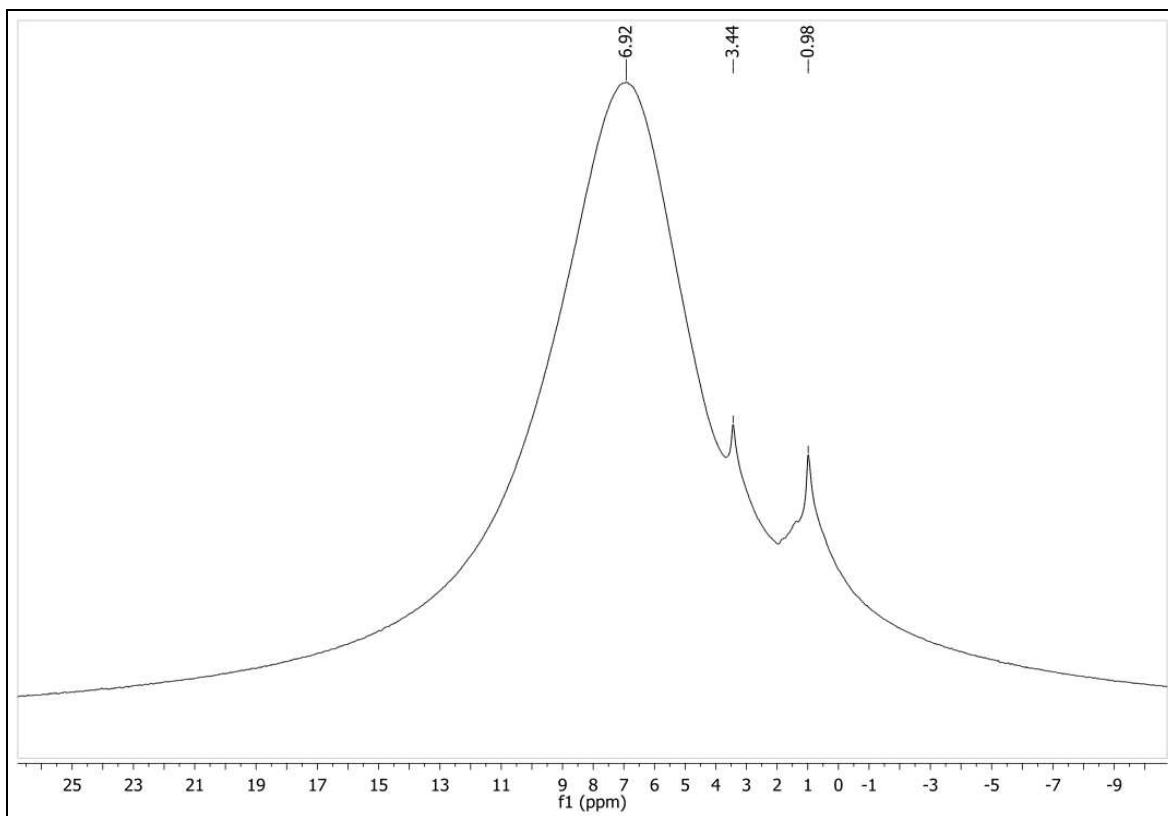
Slika 21. Praškovni difraktogram maleinske kisline.

### 5.1.3. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA

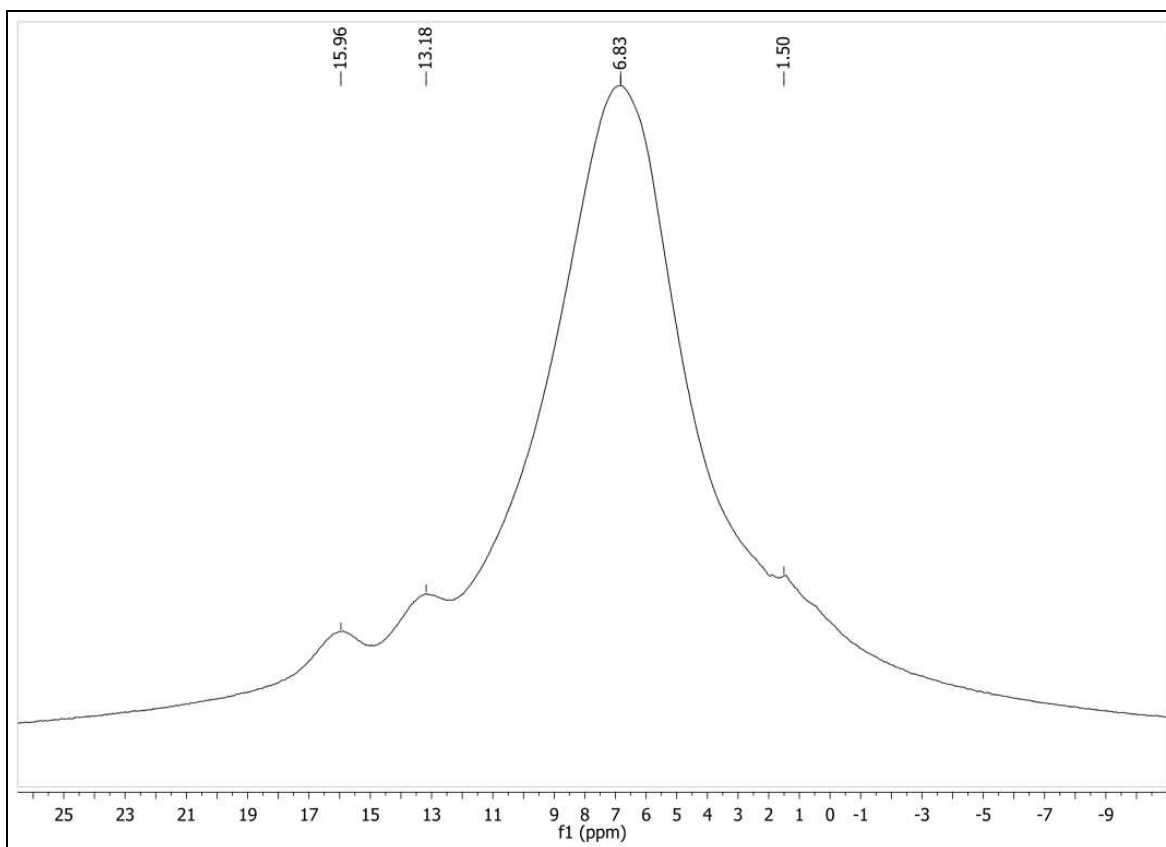
$^1\text{H}$  NMR spekter kokristala flukonazol : maleinska kislina, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ , je pokazal, da je razmerje v kokristalu 1:3 (podrobnejši podatki o analizi so navedeni v poglavju 4.1.). Ta podatek se sklada z rentgensko kristalno strukturo.



**Slika 22.**  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3.



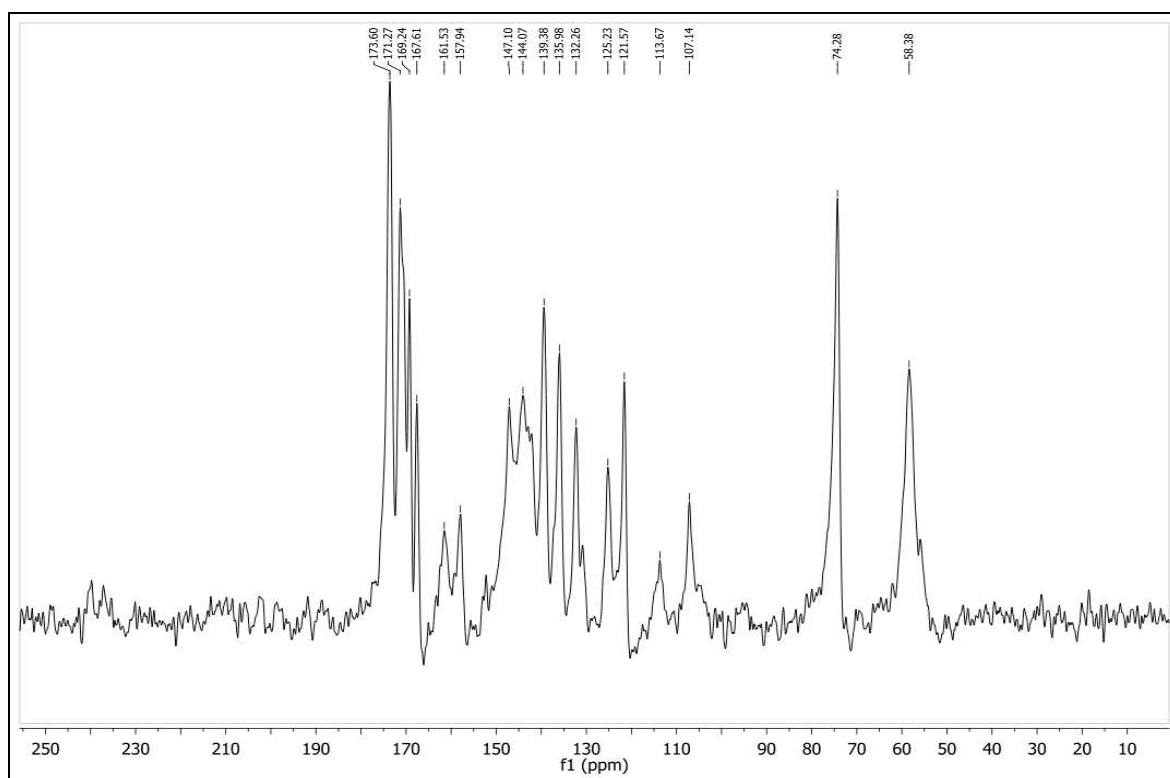
**Slika 23.**  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter flukonazola.



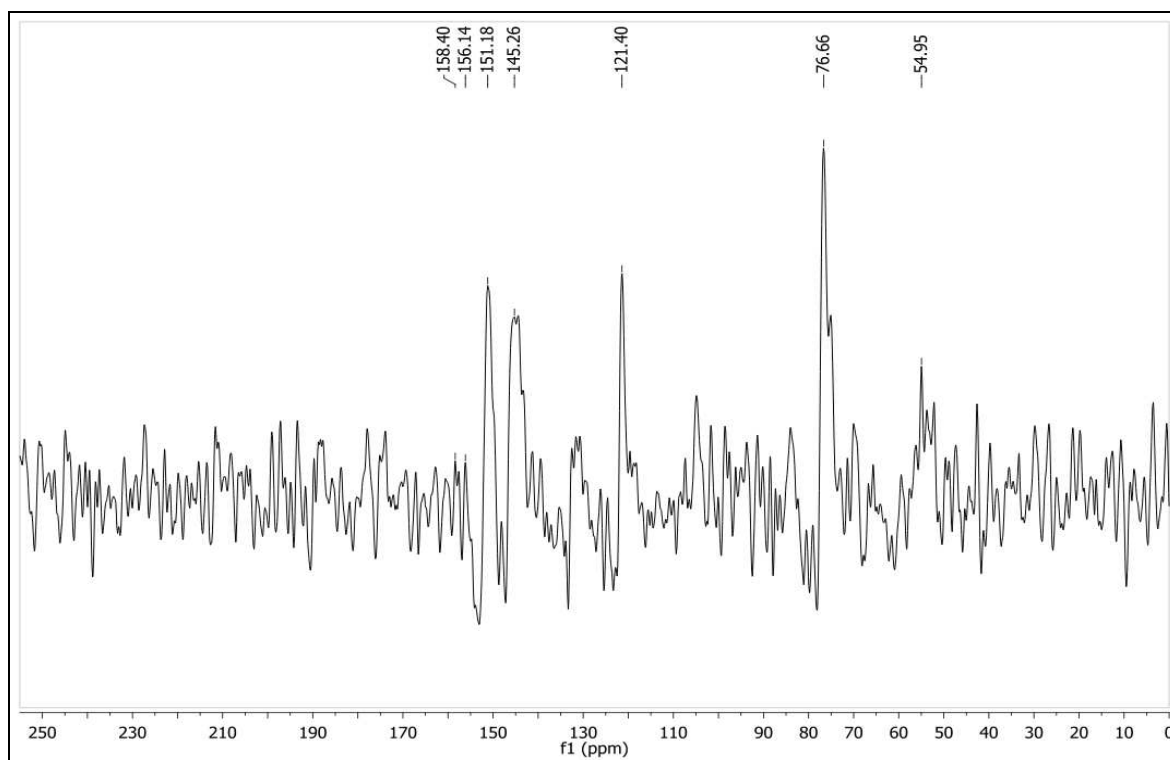
**Slika 24.**  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter maleinske kisline.

$^1\text{H}$  MAS NMR spekter je pokazal prisotnost 4 različnih vodikovih vezi v kokristalu (signali pri 18.79, 17.27, 12.90 in 12.16 ppm).  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter maleinske kisline vsebuje signala za vodikovi vezi pri 15.96 (intramolekularna vez, močnejša) in 13.18 ppm (intermolekularna vez, šibkejša). V  $^1\text{H}$  MAS NMR spektru flukonazola ni prisotnih signalov, ki bi lahko pomenili prisotnost vodikovih vezi. Iz tega lahko sklepamo, da so se v kokristalu tvorile 4 vrste vodikovih vezi, ki se razlikujejo od vodikovih vezi, ki sta prisotni v kristalu maleinske kisline. Menimo, da signal pri 18.79 ppm pripada najmočnejši interakciji v kokristalu: intramolekularnima vodikovima vezema v molekulah maleinske kisline. Signal pri 17.27 ppm pripada vodikovima vezema med  $\text{COO}^-$  skupinama maleinske kisline in  $\text{NH}^+$  skupinama flukonazola. Signal pri 12.90 ppm pripada intermolekularnima vodikovima vezema med  $\text{COOH}$  in  $\text{COO}^-$  skupinama maleinske kisline. Najšibkejšo vodikovo vez v kokristalu predstavlja signal pri 12.16 ppm: vez med  $\text{COOH}$  skupino maleinske kisline in  $\text{OH}$  skupino flukonazola. V  $^1\text{H}$  MAS NMR spektru so namreč močnejše vodikove vezi vidne pri višjih vrednostih ppm, šibkejše pa pri nižjih. Ostali signali v spektru pa pripadajo vodikovim atomom v kokristalu, ki niso udeleženi v vodikovih vezeh. Zgoraj navedeni podatki in ugotovitve se skladajo z rentgensko kristalno

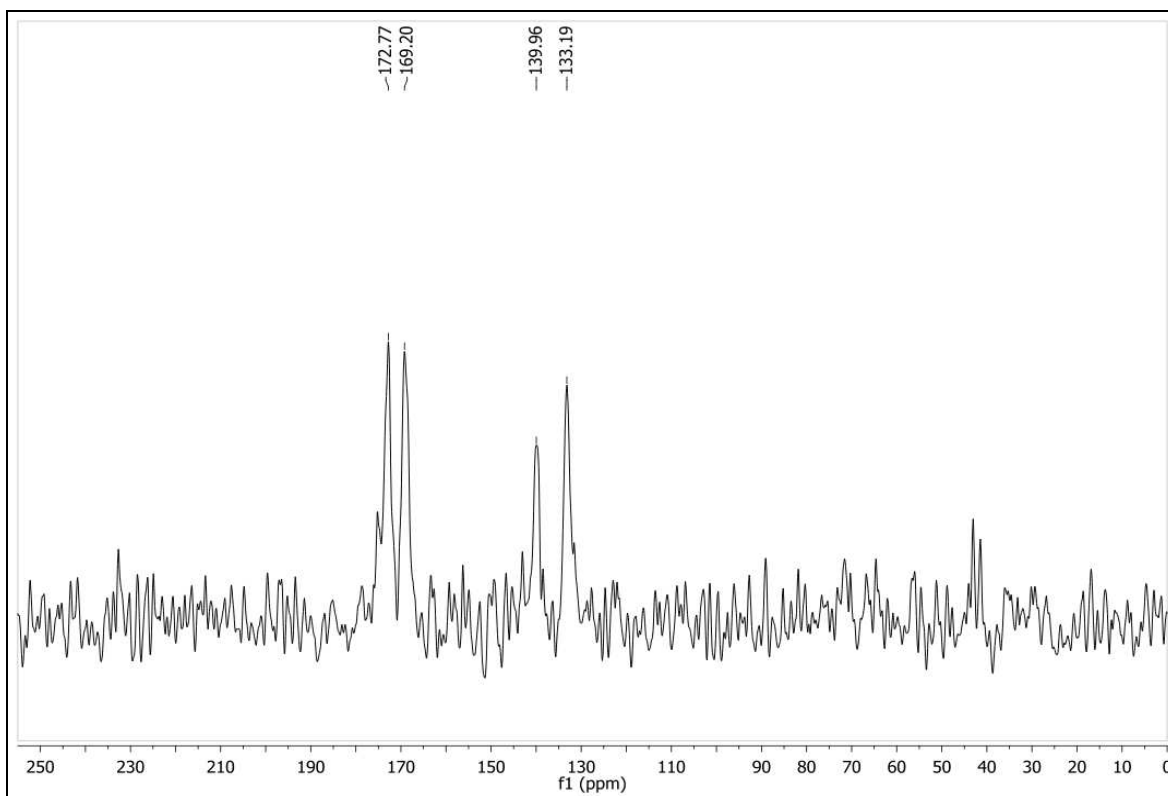
strukturo kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3, v kateri je prisotnih 7 različnih vodikovih vezi, ki jih je glede na jakost mogoče razdeliti v 4 skupine.



Slika 25.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3.



Slika 26.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter flukonazola (polimorfna modifikacija št. 2 (41)).

Slika 27.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter maleinske kisline.Preglednica III. Kemijski premiki v  $\text{C}^{13}$  CP/MAS NMR spektrih.

C-ATOM	KOKRISTAL: $\delta$ (ppm)	FLUKONAZOL: $\delta$ (ppm)	MALEINSKA K.: $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
$\text{HOOC}-\underline{\text{C}}-\text{CH}-\text{CH}-\underline{\text{C}}-\text{COOH}$	173,6 / 171,3		172,8	0,8 / -1,5
$\text{HOOC}-\underline{\text{C}}-\text{CH}-\text{CH}-\underline{\text{C}}-\text{COOH}$	169,2 / 167,6		169,2	0 / -1,6
$\underline{\text{C}}-\text{F}$ (2,4-difluorofenil)	161,5			/
$\underline{\text{C}}-\text{F}$ (2,4-difluorofenil)	157,9			/
$\underline{\text{C}}\text{H}$ (triazol)	147,1	151,2		-4,8
$\underline{\text{C}}\text{H}$ (triazol)	144,1	145,3		-1,2
$\text{HOOC}-\underline{\text{C}}\text{H}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$	139,4		140,0	-0,6
$\text{HOOC}-\underline{\text{C}}\text{H}-\underline{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$	136,0 / 132,3		133,2	2,8 / -0,9
$\underline{\text{C}}$ (2,4-difluorofenil)	125,2 / 121,6	121,4		3,8 / 0,2
$\underline{\text{C}}\text{H}$ (2,4-difluorofenil)	113,7			/
$\underline{\text{C}}\text{H}$ (2,4-difluorofenil)	107,1			/
$\underline{\text{C}}-\text{OH}$	74,3	76,7		-2,4
$-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$	58,4	55,0		3,4

Iz  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektra kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3 in iz preglednice III je razvidno, da je v kokristalu prisotnih 5, v različna okolja umeščenih karboksilnih C-atomov, s kemijskimi premiki 173.6, 171.3 (rahlo razcepljen), 169.2 in



167.6 ppm. Vsak od teh signalov predstavlja po en, v različno okolje umeščen karboksilni C-atom maleinske kisline. Primerjava teh ugotovitev s kristalno strukturo je težko izvedljiva zaradi kompleksnosti kristalne strukture in posledičnega težkega vrednotenja okolij, v katerih se nahajajo karboksilni C-atomi. Hkrati pa lahko pozitivno spremembo kemijskega premika pri 172.8 ppm za +0.8 ppm pripišemo prisotnosti delno deprotoniranih molekul maleinske kisline v vzorcu, kar se sklada s kristalno strukturo. Deprotonirana karboksilna skupina namreč vsebuje manj zasenčen C-atom glede na neionizirano karboksilno skupino, kateri je posledično viden pri višjih vrednostih ppm. Negativne spremembe kemijskih premikov signalov pri 172.8 in 169.2 ppm, za -1.5 in -1.6 ppm, pa so zelo verjetno posledica tvorbe vodikovih vezi s karboksilnimi skupinami v kokristalu, kar je razvidno tudi iz kristalne strukture. Neposredna bližina vodikovega atoma namreč povzroči povečanje zasenčenosti karboksilnega C-atoma, zaradi česar je ta viden pri nižjih vrednostih ppm.

Triazolska C-atoma sta vidna v  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektru flukonazola kot signala pri 151.2 in 145.3 ppm. Negativni spremembi kemijskih premikov teh signalov v spektru kokristala za -4.8 in -1.2 ppm pomenita, da se oba N4-atoma nahajata v protonirani obliki v kokristalu. Signal pri 144.1 ppm (-1.2 ppm) je razcepljen na 3 dele, kar nakazuje na prisotnost dodatnih dveh, še bolj zasenčenih triazolskih C-atomov. Torej se v kokristalu nahajajo 4, v različna okolja umeščeni triazolski C-atomi, kar je vidno tudi iz kristalne strukture. Bolj izrazita sprememba kemijskega premika za -4.8 ppm je posledica manjše zasenčenosti enega od štirih triazolskih C-atomov zaradi drugačnega okolja, v katerem se nahaja. Iz kristalne strukture je razvidno, da k temu verjetno v največji meri prispevajo razlike v neposredni bližini karboksilnih skupin in 2,4-difluorofenilnega obroča.

Hidroksilna skupina flukonazola prav tako omogoča tvorbo vodikove vezi z drugimi funkcionalnimi skupinami. Negativna sprememba kemijskega premika pri 76.7 ppm, za -2.4 ppm, kaže na nastanek vodikove vezi na hidroksilni skupini, zaradi česar se signal za C-atom, vezan na hidroksilno skupino, pomakne k nižjim vrednostim ppm. To potrjuje tudi kristalna struktura, v kateri je vidna vodikova vez med hidroksilno skupino flukonazola in neionizirano karboksilno skupino maleinske kisline.

Vse zgoraj navedene ugotovitve glede prisotnosti vodikovih vezi v kokristalu se skladajo s podatki o vodikovih vezeh, ki smo jih razbrali iz  $^1\text{H}$  MAS NMR spektra.

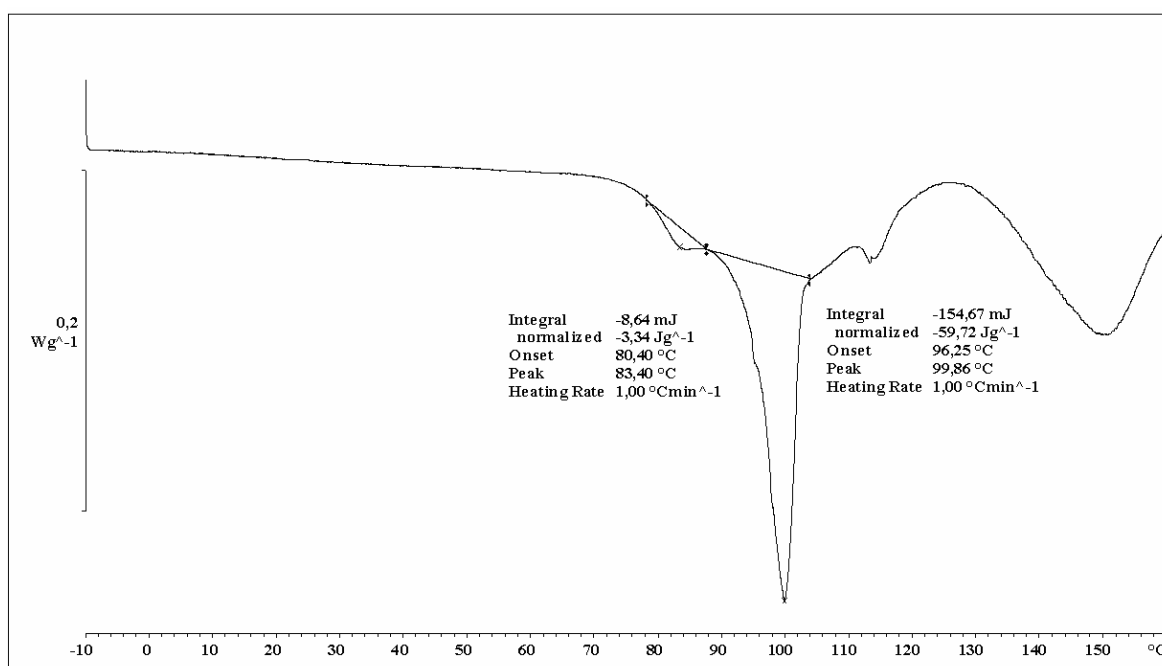
Razcepljenost enega od signalov v spektru kokristala, ki pripadata C2- in C3-atomoma maleinske kisline, kaže na to, da se eden od omenjenih ogljikovih atomov nahaja v dveh

različnih okoljih, kar lahko potrdimo s kristalno strukturo. Različnih okolij je glede na kristalno strukturo dejansko več, vendar so razlike med njimi očitno premajhne, da bi bile vidne v  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektru. Podobno velja za razcepljenost signala pri 125.2/121.6 ppm, ki pripada C1-atomu 2,4-difluorofenilnega obroča.

Ostale spremembe kemijskih premikov signalov v spektru kokristala, ki so navedene v preglednici III, je mogoče razložiti kot posledico interakcij na bližnjih funkcionalnih skupinah in kot posledico splošno drugačnega okolja, v katerem se nahajajo C-atom v kokristalu, glede na kristale osnovnih gradnikov.

#### 5.1.4. DSC TERMIČNA ANALIZA

Na spodnjem termogramu kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3 so vidni 4 endotermni vrhovi. Najbolj izrazit vrh predstavlja tališče kokristala, ki tako znaša 96,25°C. Tališče je ozko in se razlikuje od tališč flukonazola (pribl. 139°C) in maleinske kisline (pribl. 134°C), zaradi česar lahko potrdimo, da vzorec predstavlja novo kristalno obliko.



Slika 28. DSC termogram kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3.

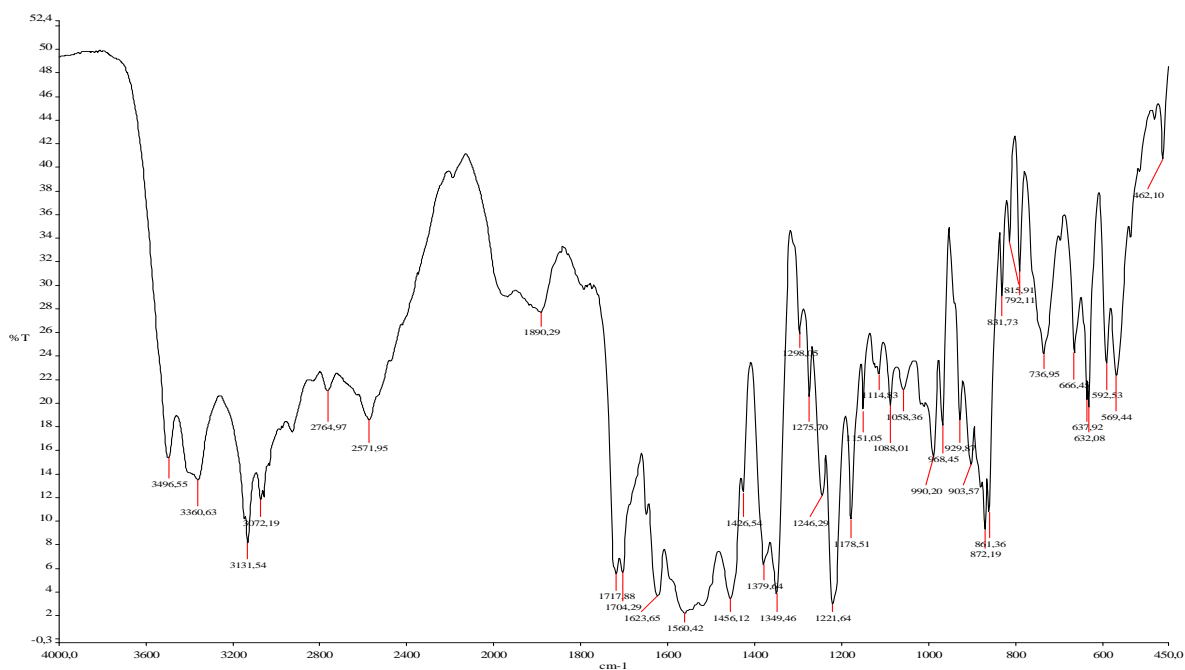
V patentu McMahona in sod. je navedeno tališče za kokristal flukonazolijev maleat : maleinska kislina, ki znaša pribl. 84°C (hitrost segrevanja v patentu ni navedena). Torej gre v tem primeru nedvomno za novo obliko kokristala flukonazola in maleinske kisline, saj

sta tališči obeh kokristalov nedvoumno različni. Manjši vrh pri 80,40°C pa verjetno kaže na prisotnost kokristala, opisanega v patentu McMahona in sod., ki se je pojavil v našem kokristalu kot nečistota.

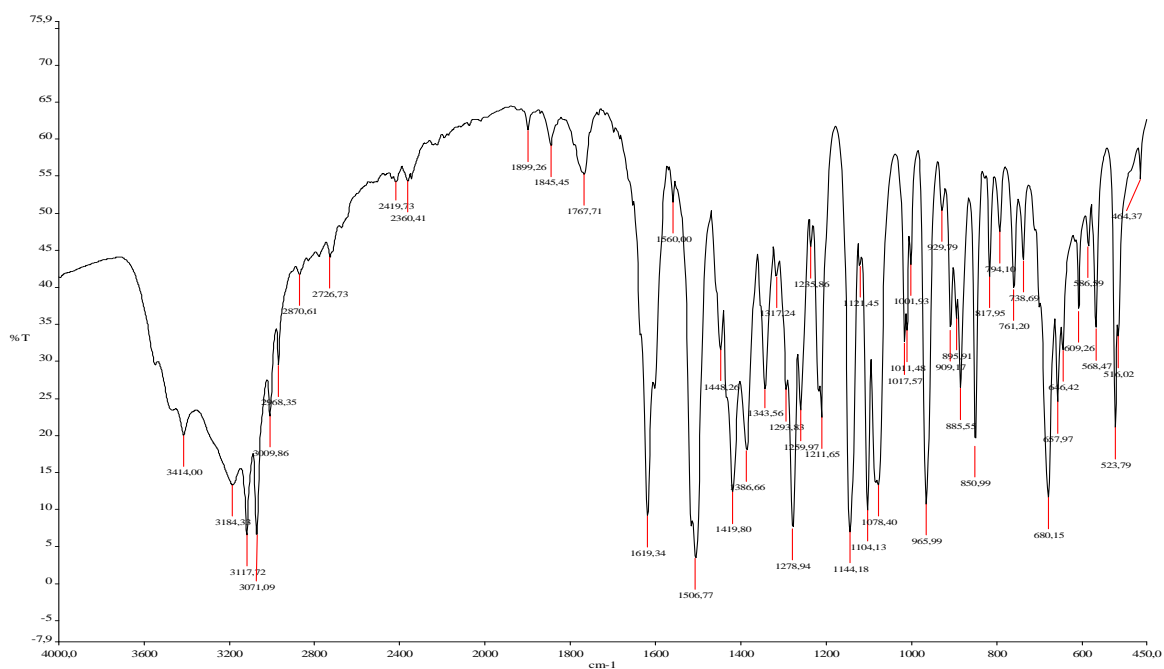
Iz obstoječih analiznih podatkov je nemogoče določiti pomen vrha pri pribl. 115°C. Endotermen odklon krivulje, ki se začne pri pribl. 130°C in doseže vrh pri pribl. 150°C pa predstavlja razpad kokristala.

### 5.1.5. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

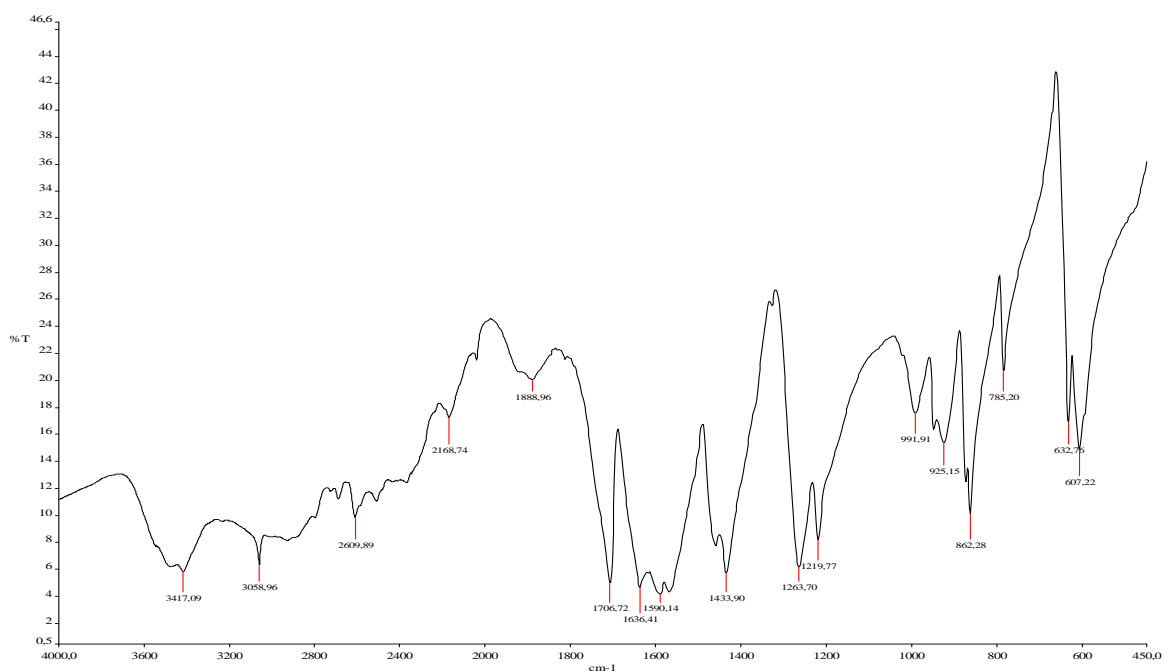
IR spekter kokristala se razlikuje od spektrov flukonazola in maleinske kisline. Da ne gre le za zmes, temveč za kokristal, potrjujejo spremembe oblik, intenzitet in položajev večine absorpcijskih trakov v spektru kokristala:



Slika 29. IR spekter kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3.



Slika 30. IR spekter flukonazola.



Slika 31. IR spekter maleinske kisline.

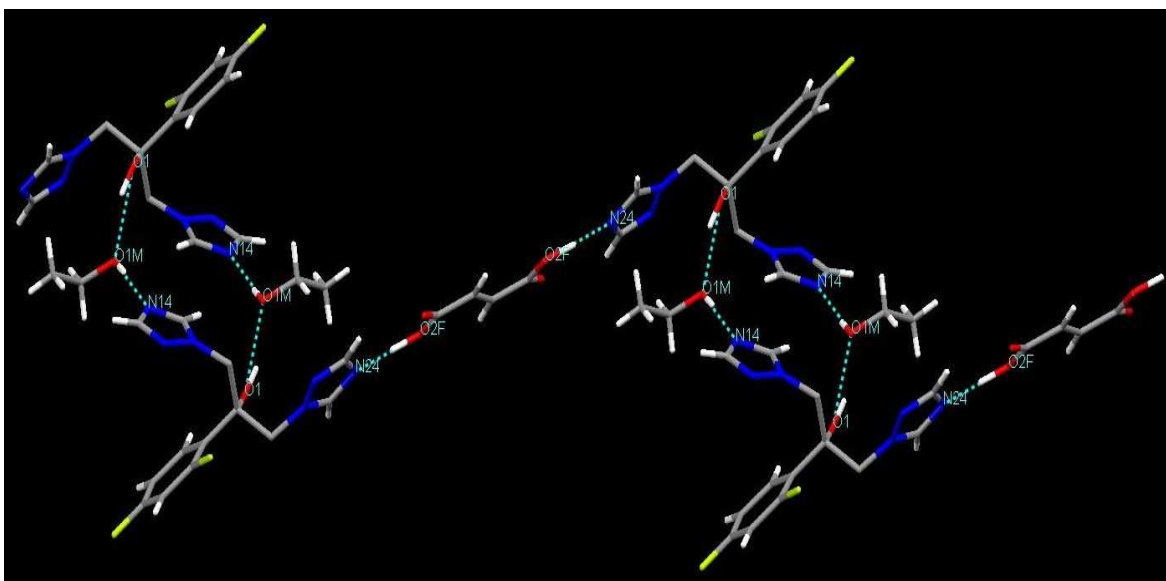
V IR spektru kokristala je vidnih več razširjenih absorpcijskih trakov, ki lahko nakazujejo nastanek vodikovih vezi (42, 43). Tako so vidni razširjeni absorpcijski trakovi pri 3361, 2572 in 1890  $\text{cm}^{-1}$ . Položaji teh absorpcijskih trakov se ne skladajo s položaji razširjenih absorpcijskih trakov v spektrih flukonazola in maleinske kisline, kar si je

mogoče razlagati, da je prišlo do tvorbe drugačnih vodikovih vezi kot v obeh čistih komponentah. Izjema je absorpcijski trak pri  $1890\text{ cm}^{-1}$ , ki je viden tudi v spektru maleinske kisline. Na spektru kokristala je vidna tudi razširitev absorpcijskih trakov na območju med  $1800$  in  $500\text{ cm}^{-1}$ , kar nakazuje na obstoj intramolekularnih  $\text{OH}\cdots\text{O}$  vodikovih vezi v molekulah maleinske kisline in je v skladu s kristalno strukturo (44). Vsi ti podatki nakazujejo nastanek kokristala.

## 5.2. KOKRISTAL FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA = 2:1

### 5.2.1. RENTGENSKA KRISTALNA STRUKTURA

Na sliki 32 je prikazana kristalna struktura kokristala flukonazola s fumarno kislino, pripravljene po metodi 4.2.:



**Slika 32.** Kristalna struktura solvata kokristala flukonazol : fumarna kislina : etanol = 2:1:2, pridobljena z rentgensko difrakcijo na monokristalih. S sivo barvo so prikazani ogljikovi atomi, z belo barvo vodikovi atomi, z rdečo barvo kisikovi atomi, z modro barvo dušikovi atomi in z rumeno barvo fluorovi atomi. Vodikove vezi so označene s svetlo modrimi prekinjenimi črtami. Slika je bila izdelana s programom Mercury 2.2 (CCDC, Velika Britanija).

**Preglednica IV.** Podatki o triklnskem solvatu kokristala flukonazol : fumarna kislina : etanol = 2:1:2.

dolžina stranice (Å)	kot (°)
a = 5,5989(10)	$\alpha = 78,098(10)$
b = 11,9864(3)	$\beta = 83,743(2)$
c = 15,7100(4)	$\gamma = 88,824(2)$

**Preglednica V.** Vodikove vezi v solvatu kokristala flukonazol : fumarna kislina : etanol = 2:1:2 (D=donor, A=akceptor in d=razdalja v Å).

Zap. št. vezi	D-H	d(D-H)	d(H $\cdots$ A)	d(D $\cdots$ A)	A
1	O1-H1	0,820	1,941	2,712	O1M
2	O1M-H1M	0,820	2,020	2,831	N14
3	O2F-H1F	1,149	1,565	2,713	N24

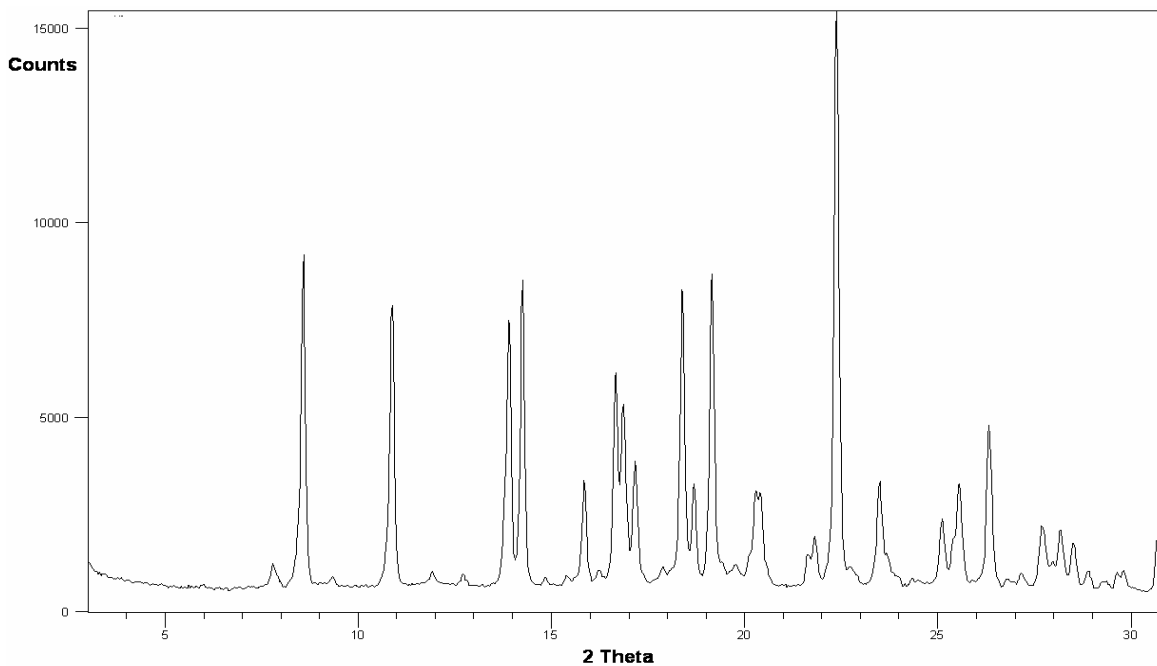
Iz kristalne strukture je razvidno, da je nastal kokristal brez izmenjave protonov. Flukonazol in fumarna kislina sta se povezala preko triazolskega obroča in COOH skupine (vodikova vez št. 3), kar se sklada z najpogosteje zastopano kombinacijo v kokristalih, t.j. s povezavo karboksilne skupine in dušikovega heterocikla (3). Flukonazol in fumarna kislina tako tvorita v eni ravnini verigo v razmerju 2:1, dve molekuli flukonazola pa med seboj povezujeta dve molekuli etanola, prav tako preko vodikovih vezi. Posledično sta v solvatu kokristala prisotni še vodikovi vezi št. 1 in 2. Vodikova vez št. 1 povezuje hidroksilni skupini flukonazola in etanola, pri čemer ima flukonazol vlogo proton donorja. Vodikova vez št. 2 pa povezuje N14 dušikov atom flukonazolovega triazolskega obroča in hidroksilno skupino etanola. V opisanem kokristalu torej hidroksilna skupina etanola nastopa tako v vlogi proton akceptorja, kot tudi v vlogi proton donorja.

V solvatu kokristala so nastale le heteromerne intermolekularne interakcije. Če primerjamo dolžine vodikovih vezi ( $d(\text{H}\cdots\text{A})$ ), je razvidno, da je najmočnejša vodikova vez prisotna med molekulami flukonazola in fumarne kisline. Jakosti vodikovih vezi med molekulami flukonazola in etanola sta primerljivi. Podatki o jakosti vodikovih vezi potrjujejo naša opažanja, da se solvat kokristala s časom pretvarja v kokristal, zaradi odpuščanja molekul etanola iz kristalne rešetke. Tako v  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektru ni vidnih signalov, ki bi lahko pripadali etanolu. Na DSC termogramu pa je etanol viden le še v majhnih količinah.

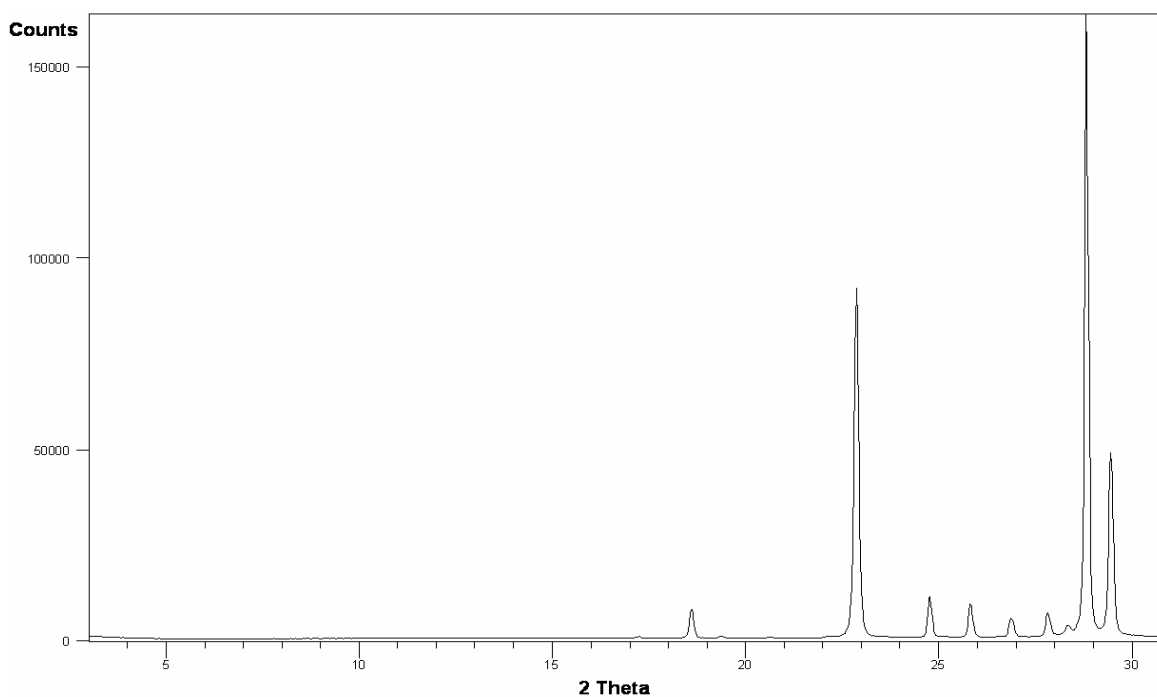
Vključitev etanola v kristalno rešetko preko vodikovih vezi se sklada z že znanimi opažanji, da v primeru priprave kokristalov iz polarnega, protičnega topila obstaja velika verjetnost tvorbe solvata, kar je posledica visoke težnje tvorjenja vodikovih vezi pri takšnih topilih (16).

### 5.2.2. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (PXRD)

Iz difraktogramov flukonazola (str. 37, slika 20), fumarne kisline in kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1 je razvidno, da se difraktogram kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1 razlikuje od superpozicije difraktogramov flukonazola in fumarne kisline. To potrjuje, da je pri poizkusu kokristalizacije nastala nova kristalna oblika.



Slika 33. Praškovni difraktogram kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1.

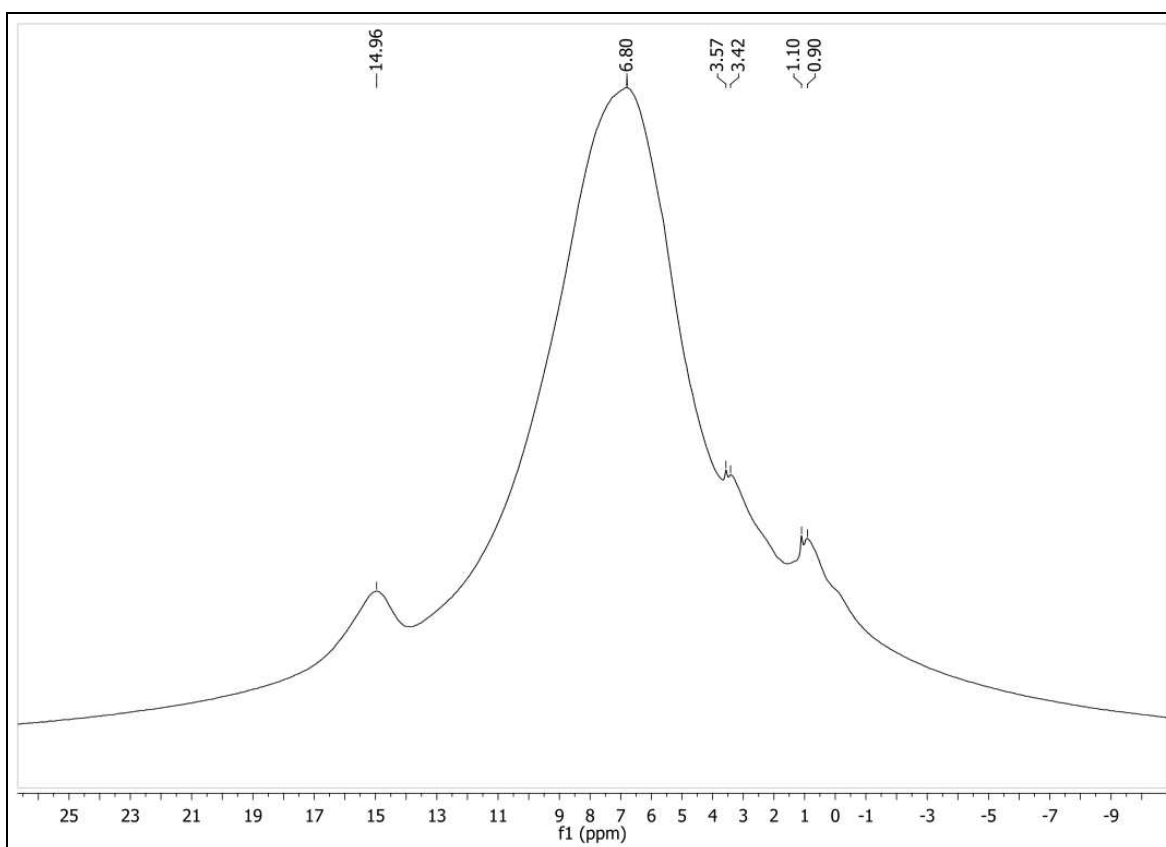


Slika 34. Praškovni difraktogram fumarne kisline.

Ko smo posneli praškovna difraktograma kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1 14 dni in 45 dni starih vzorcev, ki sta bila ta čas sušena pri sobnih pogojih, se praškovna difraktograma med seboj nista razlikovala. Oba difraktograma predstavlja slika 33. Iz tega sklepamo, da etanol najkasneje v 14 dneh izstopi iz kristalne rešetke.

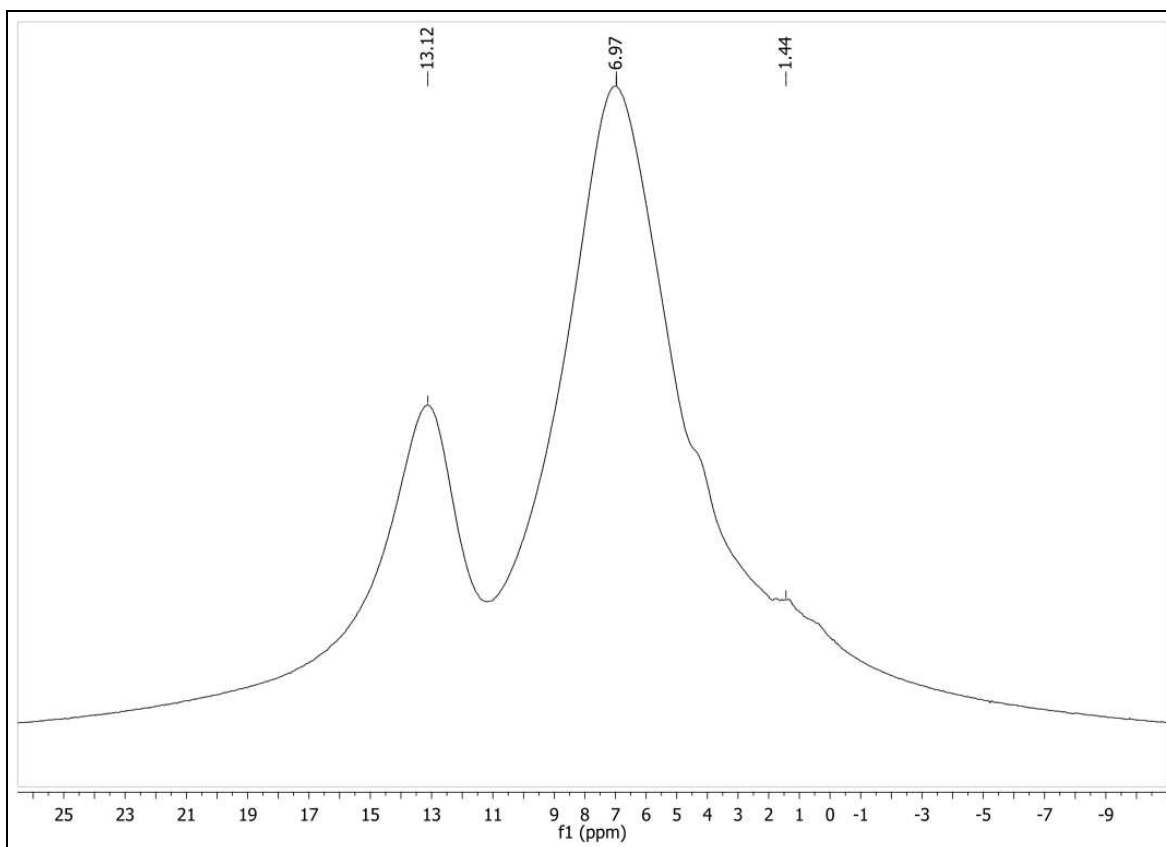
### 5.2.3. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA

$^1\text{H}$  NMR spekter, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ , je pokazal, da je razmerje med komponentama v kokristalu 2:1 v prid flukonazola (podrobnejši podatki o analizi so navedeni v poglavju 4.2.). Ta podatek se sklada z rentgensko kristalno strukturo. V  $^1\text{H}$  NMR spektru je vidna tudi prisotnost etanola v stehiometrijskem razmerju 2:1:1, kar pa se ne sklada kristalno strukturo. Vzorec smo analizirali z jedrsko magnetno resonanco po petih dneh sušenja pri sobnih pogojih. To potrjuje naša opažanja, da kokristal s časom odpušča etanol iz svoje strukture.



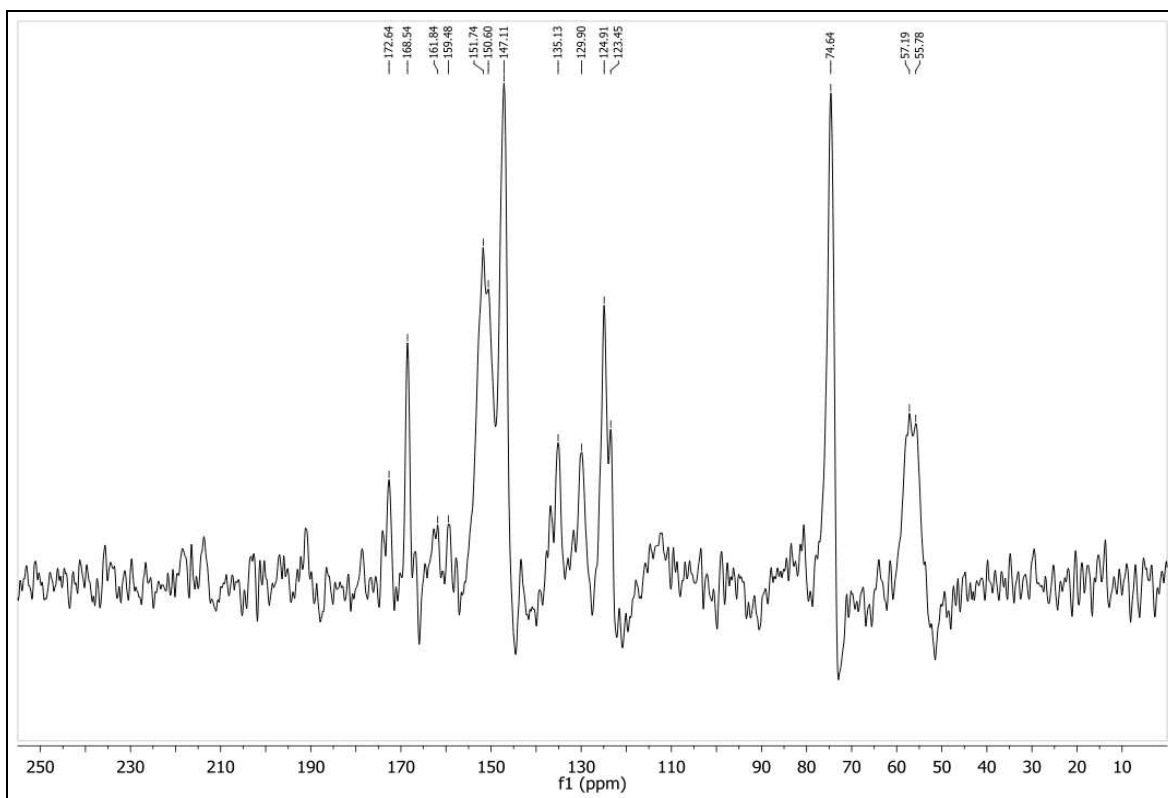
Slika 35.  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1.



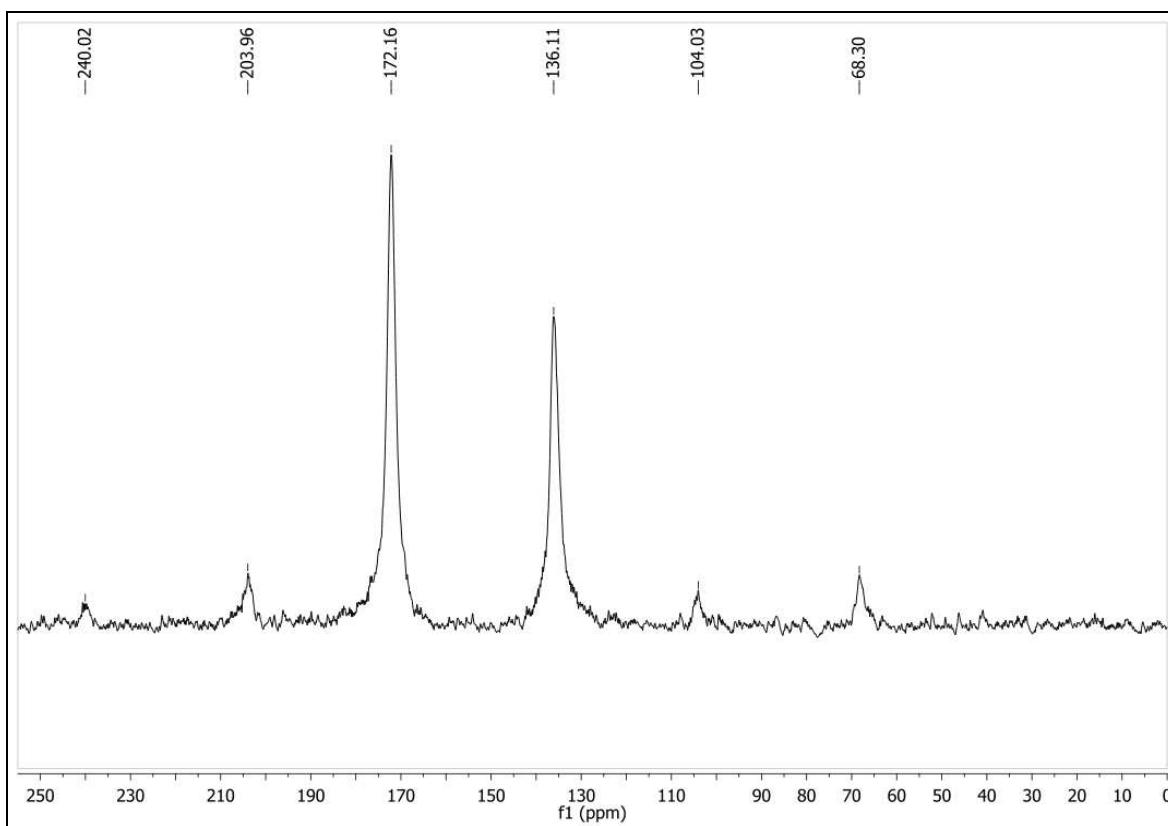


Slika 36.  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter fumarne kisline.

$^1\text{H}$  MAS NMR spekter kokristala je pokazal prisotnost 1 vodikove vezi (signal pri 14.96 ppm).  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter fumarne kisline vsebuje signal za vodikovo vez pri 13.12 ppm, ki predstavlja intermolekularno vodikovo vez med karboksilnimi skupinami fumarnih kislin. V spektru flukonazola (str. 38, slika 23) ni vidnih signalov, ki bi lahko kazali na prisotnost vodikovih vezi. Iz tega lahko sklepamo, da se je v kokristalu flukonazol : fumarna kislina = 2:1 tvorila nova vodikova vez, ki je močnejša od vodikove vezi, prisotne v kristalu fumarne kisline. To se le delno sklada s podatki iz kristalne strukture, saj je iz te razvidno, da so se tvorile 3 različne vodikove vezi. Menimo, da signal pri 14.96 ppm pripada najmočnejši vodikovi vezi v kokristalu, in sicer vezi med COOH skupino fumarne kisline in N4 dušikovim atomom triazolskega obroča flukonazola. Vodikove vezi med etanolom in flukonazolom niso več vidne, saj v veliki meri niso več prisotne zaradi opaženega odpuščanja etanola iz kristalne rešetke v odvisnosti od časa (vzorec smo analizirali po 45 dneh sušenja pri sobnih pogojih). Ostali signali v spektru pripadajo vodikovim atomom v kokristalu, ki niso udeleženi v vodikovih vezeh.



Slika 37.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1.



Slika 38.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter fumarne kisline.

Preglednica VI. kemijski premiki v  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektrih.

C-ATOM	KOKRISTAL: $\delta$ (ppm)	FLUKONAZOL: $\delta$ (ppm)	FUMARNA K.: $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
HOOC-CH-CH-COOH	172,6 / 168,5		172,2	0,5 / -3,6
C-F (2,4-difluorofenil)	161,8			/
C-F (2,4-difluorofenil)	159,5			/
CH (triazol)	151,7 / 150,6	151,2		0,6 / -0,6
CH (triazol)	147,1	145,3		1,9
HOOC-CH-CH-COOH	135,1		136,1	-1,0
C6-H (2,4-difluorofenil)	129,9			/
C (2,4-difluorofenil)	124,9 / 123,5	121,4		3,5 / 2,1
C-OH	74,6	76,7		-2,0
-CH <sub>2</sub> -	57,2 / 55,8	55,0		2,2 / 0,8

Iz  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektra kokristala in iz preglednice IX je razvidno, da karboksilni skupini fumarne kisline nista ionizirani, temveč tvorita vodikovi vezi, kar dokazuje nekoliko večja negativna sprememba (-3.6 ppm) kemijskega premika signala karboksilnih C-atomov pri 168.5 ppm. Večjo negativno spremembo kemijskega premika signala karboksilnih C-atomov namreč lahko pripišemo nastanku vodikovih vezi. Enoten signal pa pomeni, da se oba C-atomata nahajata v enakem okolju, kar je razvidno tudi iz kristalne strukture kokristala (str. 46, slika 32). Hkrati pa je na  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektru kokristala viden manjši signal pri 172.6 ppm, ki ga prav tako lahko pripišemo karboksilnima C-atomoma fumarne kisline. Kemijski premik tega signala se sklada s kemijskim premikom pripadajočega signala v spektru kristala fumarne kisline. Tako obstaja verjetnost, da je bilo v analiziranemu vzorcu prisotne nekaj fumarne kisline kot nečistote. To ni razvidno iz ostalih analiz, izjema pa je DSC termična naliza, ki nakazuje na to možnost.

Večje spremembe kemijskih premikov signalov, ki pripadajo triazolskim C-atomom, niso vidne. Ker se signal pri 151.2 ppm ni premaknil k nižjim vrednostim ppm, pa lahko sklepamo, da N4-atom ni sprejel protona. To potrjuje tudi kristalna struktura. Ker je v tem primeru prišlo do pozitivne spremembe kemijskega premika signala pri 145.3 ppm za +1.9 ppm, bi to lahko pomenilo nastanek vodikove vezi, česar pa samo na osnovi  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektrov flukonazola (str. 40, slika 26) in kokristala ne moremo trditi zagotovo. Ko ta opažanja primerjamo s kristalno strukturo kokristala, lahko potrdimo, da sta se na N4-atomih dveh različnih molekul flukonazola tvorili vodikovi vezi. Omenjeni kemijski

premik torej res pomeni nastanek vodikove vezi med N4-atomom triazola in karboksilno skupino fumarne kisline. Pričakovali smo tudi pozitivno spremembo kemijskega premika signala pri 151.2 ppm, ki bi lahko pomenila nastanek vodikove vezi med N4-atomom flukonazola in hidroksilno skupino etanola, ki je vidna v kristalni strukturi. Omenjene spremembe kemijskega premika nismo opazili. Razlago za to vidimo v dejstvu, da na  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektru kokristala ni vidnih signalov, ki bi lahko pripadali etanolu. Etanol v tem vzorcu skoraj ni bil več prisoten, saj smo opazili, da etanol s časom izstopa iz kokristala. Vzorec smo namreč analizirali po 45 dneh sušenja pri sobnih pogojih. Prisotnost manjših količin etanola je bila po tem času sicer vidna na DSC termogramu kokristala, vendar je ta očitno prisoten v premajhnih količinah, da bi se signali, ki pripadajo etanolu, ločili od šuma na  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektru, ter da bi bile v spremembah kemijskih premikov signalov vidne še morebitne vodikove vezi, ki pripadajo triazolskim C-atomom. Ta opažanja pa se skladajo tudi s  $^1\text{H}$  MAS NMR spektrom, kjer je viden le signal pri 14.96 ppm, ki zelo verjetno pripada vodikovi vezi med N4-atomom triazola in karboksilno skupino fumarne kisline.

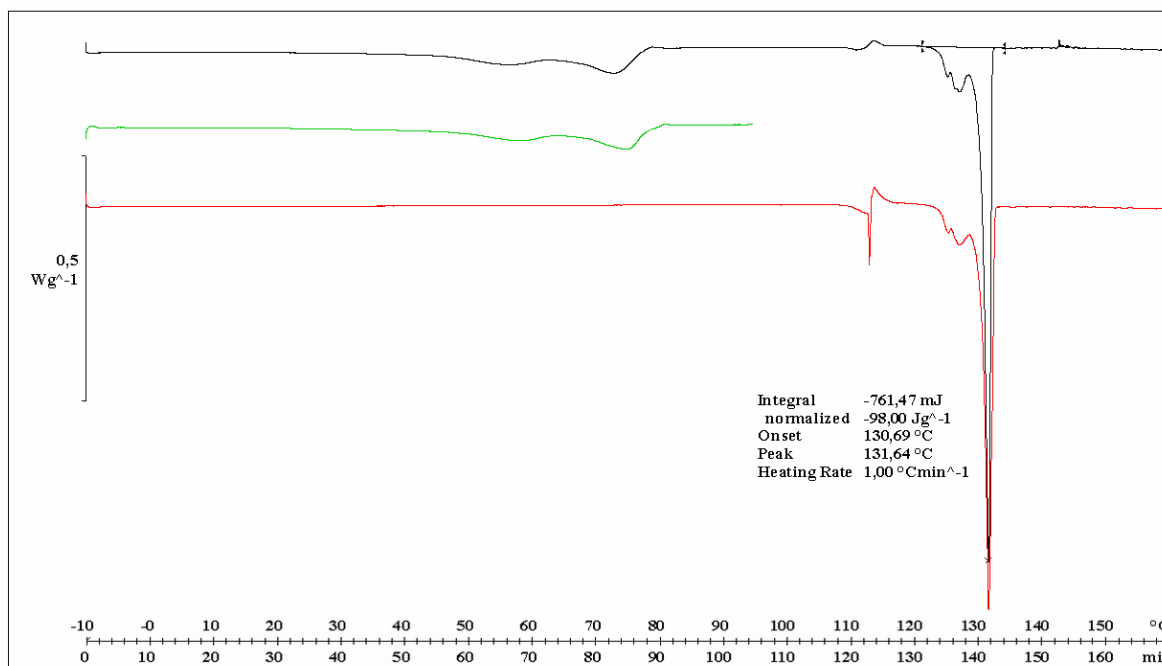
Hidroksilna skupina flukonazola prav tako omogoča tvorbo vodikove vezi z drugimi funkcionalnimi skupinami. Na podlagi negativne spremembe kemijskega premika signala ogljika  $\underline{\text{C}}\text{-OH}$  pri 76.7 ppm, za -2.0 ppm, bi bilo to mogoče potrditi, vendar je to v nasprotju z zgoraj opisanimi ugotovitvami. Najverjetnejša se zdi razlaga, da je ta premik posledica splošno drugačnega okolja, v katerem se v kokristalu nahaja C-atom, vezan na hidroksilno skupino, glede na kristal flukonazola.

Razcepljenost signala pri 57.2/55.8 ppm na spektru kokristala, ki pripada verižnima C-atomoma flukonazola, kaže na to, da se omenjena ogljikova atoma nahajata v različnih okoljih, kar je v skladu s kristalno strukturo.

Ostale spremembe kemijskih premikov signalov v spektru kokristala, ki so navedene v preglednici VI, je mogoče razložiti kot posledico interakcij na bližnjih funkcionalnih skupinah in kot posledico splošno drugačnega okolja, v katerem se nahajajo C-atomi v kokristalu, glede na kristale osnovnih gradnikov. Signali, ki so označeni na sliki 38, a niso navedeni v preglednici IX, so pomnožitve ostalih signalov (angl. "spinning sidebands") in so posledica vrtenja vzorca med analizo.

## 5.2.4. DSC TERMIČNA ANALIZA

Na spodnjem termogramu je viden endotermen vrh, ki predstavlja tališče kokristala. Tališče kokristala tako znaša  $130,69^{\circ}\text{C}$ , je ozko in se razlikuje od tališč flukonazola (pribl.  $139^{\circ}\text{C}$ ) in fumarne kisline (pribl.  $294^{\circ}\text{C}$ ). Zato lahko potrdimo, da vzorec predstavlja novo kristalno obliko.



**Slika 39.** DSC termogram kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1. S črno barvo je prikazano segrevanje vzorca brez predhodnega segrevanja. Z zeleno barvo je prikazano predhodno segrevanje vzorca do  $95^{\circ}\text{C}$ . Z rdečo barvo je prikazano segrevanje vzorca po predhodnem segrevanju do  $95^{\circ}\text{C}$ .

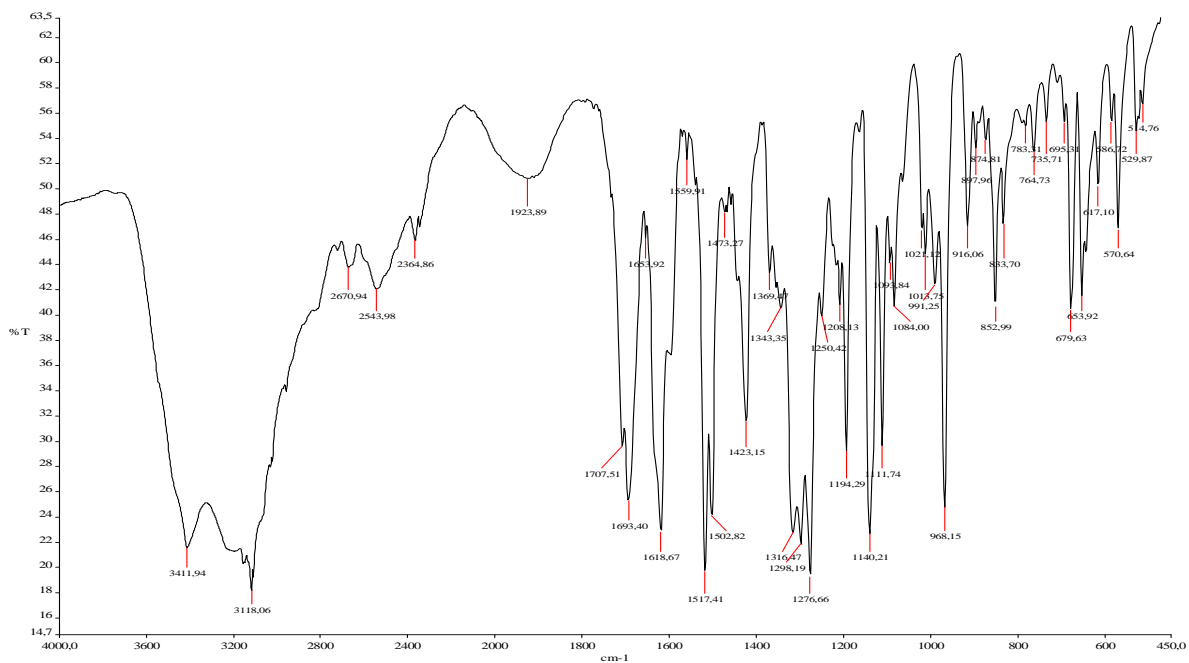
Poleg najizrazitejšega odklona krivulje je vidnih še več manjših odklonov. Manj izrazita endotermna vrhova pri pribl.  $55^{\circ}\text{C}$  in pribl.  $75^{\circ}\text{C}$  tako pripadata odpuščanju etanola iz vzorca. To smo potrdili z naslednjim poizkusom (slika 24): vzorec smo segreli na  $95^{\circ}\text{C}$  (zeleno krivulja), nato smo ga ohladili na  $-10^{\circ}\text{C}$  in ponovno segreli na  $160^{\circ}\text{C}$  (rdeča krivulja). Pri zadnjem segrevanju sta izginila endotermna vrhova pri pribl.  $55^{\circ}\text{C}$  in pribl.  $75^{\circ}\text{C}$ . Zaradi relativne majhnosti endotermnih vrhov pri pribl.  $55^{\circ}\text{C}$  in pribl.  $75^{\circ}\text{C}$ , menimo, da je bila količina preostalega etanola v vzorcu majhna, kar potrjuje naša opažanja o izstopanju etanola iz kristalne rešetke v odvisnosti od časa (vzorec smo analizirali po 45 dneh sušenja pri sobnih pogojih).

Po drugem segrevanju je postal bolj izrazit prevoj krivulje pri pribl.  $110^{\circ}\text{C}$ . Prav tako se je nekoliko spremenila oblika endotermnega odklona krivulje pred talilnim vrhom. Iz

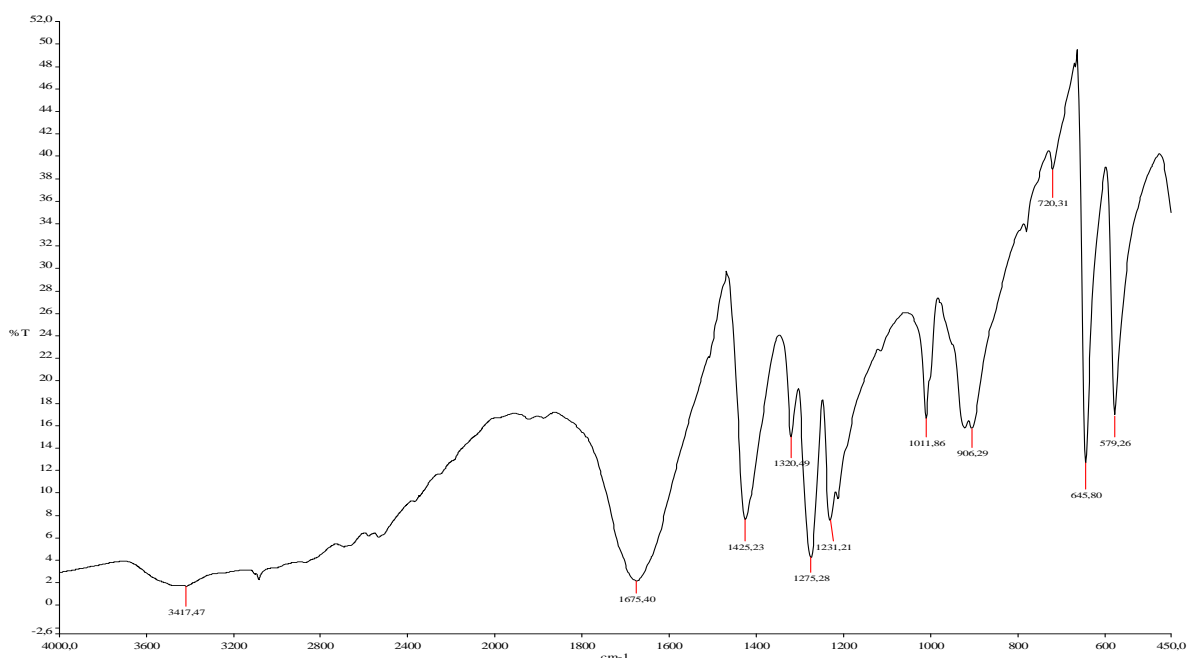
opravljenih analiz je nemogoče sklepati, čemu pripadata zadnja 2 endotermna odklona krivulje. Menimo, da bi odklona lahko predstavljala prisotnost nečistot v vzorcu, kar se sklada s  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektrom, kjer je nakazana možnost prisotnosti fumarne kisline kot nečistote v kokristalu. Vendar tega ne moremo zagotovo trditi, saj bi bile za dokaz naših predvidevanj potrebne dodatne analize.

### 5.2.5. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

IR spekter kokristala se razlikuje od spektrov flukonazola (str. 45, slika 30) in fumarne kisline. Da ne gre le za zmes, temveč za kokristal, potrjujejo spremembe oblik, intenzitet in položajev večine absorpcijskih trakov v spektru kokristala:



Slika 40. IR spekter kokristala flukonazol : fumarna kislina = 2:1.



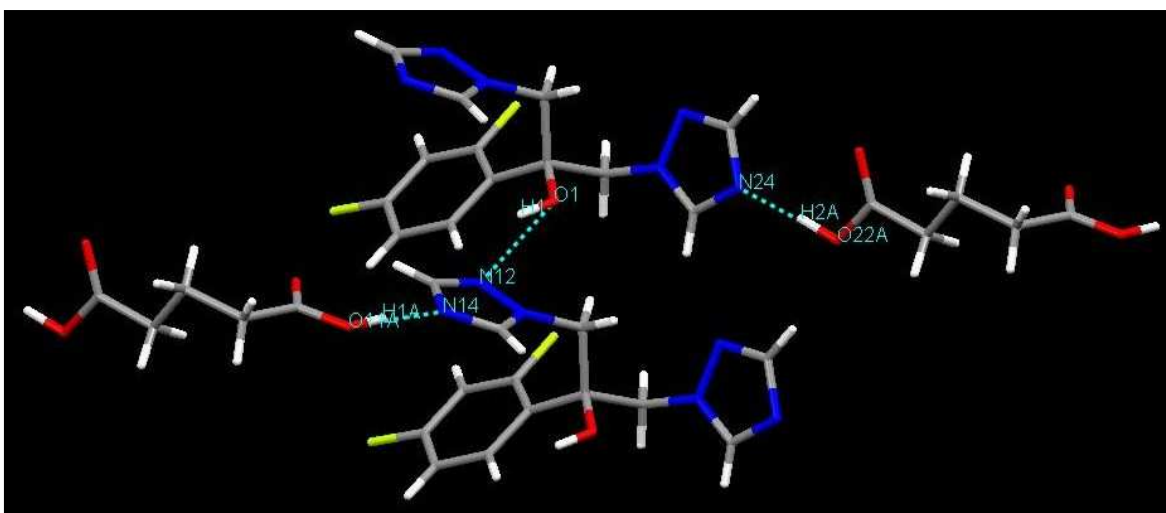
Slika 41. IR spekter fumarne kisline.

V IR spektru kokristala sta vidna tudi razširjena absorpcijska trakova pri 2544 in 1924  $\text{cm}^{-1}$ , ki lahko nakazujeta nastanek vodikovih vezi (43). Njuna položaja se ne skladata s položaji razširjenih absorpcijskih trakov v spektrih flukonazola in fumarne kisline, kar si je mogoče razlagati, da je v kokristalu prišlo do tvorbe drugačnih vodikovih vezi. Na spektru kokristala ni vidnih razširitev absorpcijskih trakov na območju med 1800 in 500  $\text{cm}^{-1}$ , ki so vidne v spektru fumarne kisline, kar nakazuje na odsotnost intermolekularnih  $\text{OH}\cdots\text{O}$  vodikovih vezi med molekulami fumarne kisline, kar prav tako nakazuje nastanek kokristala.

## 5.3. KOKRISTAL FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA = 1:1

### 5.3.1. RENTGENSKA KRISTALNA STRUKTURA

Na sliki 42 je prikazana kristalna struktura kokristala flukonazola z glutarno kislino, pripravljene po metodi 4.3.:



**Slika 42.** Kristalna struktura kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1, pridobljena z rentgensko difrakcijo na monokristalih. S sivo barvo so prikazani ogljikovi atomi, z belo barvo vodikovi atomi, z rdečo barvo kisikovi atomi, z modro barvo dušikovi atomi in z rumeno barvo fluorovi atomi. Vodikove vezi so označene s svetlo modrimi prekinjenimi črtami. Slika je bila izdelana s programom Mercury 2.2 (CCDC, Velika Britanija).

**Preglednica VII.** Podatki o triklnskem kokristalu flukonazol : glutarna kislina = 1:1.

dolžina stranice (Å)	kot (°)
a = 5,6897(2)	$\alpha$ = 72,909(2)
b = 10,6590(3)	$\beta$ = 84,453(2)
c = 17,0635(5)	$\gamma$ = 80,863(2)

**Preglednica VIII.** Vodikove vezi v kokristalu flukonazol : glutarna kislina = 1:1 (D=donor, A=akceptor in d=razdalja v Å).

Zap. št. vezi	D-H	d(D-H)	d(H $\cdots$ A)	d(D $\cdots$ A)	A
1	O22A-H2A	1,008	1,728	2,729	N24
2	O1-H1	0,851	2,185	2,916	N12
3	O11A-H1A	0,975	1,729	2,701	N14

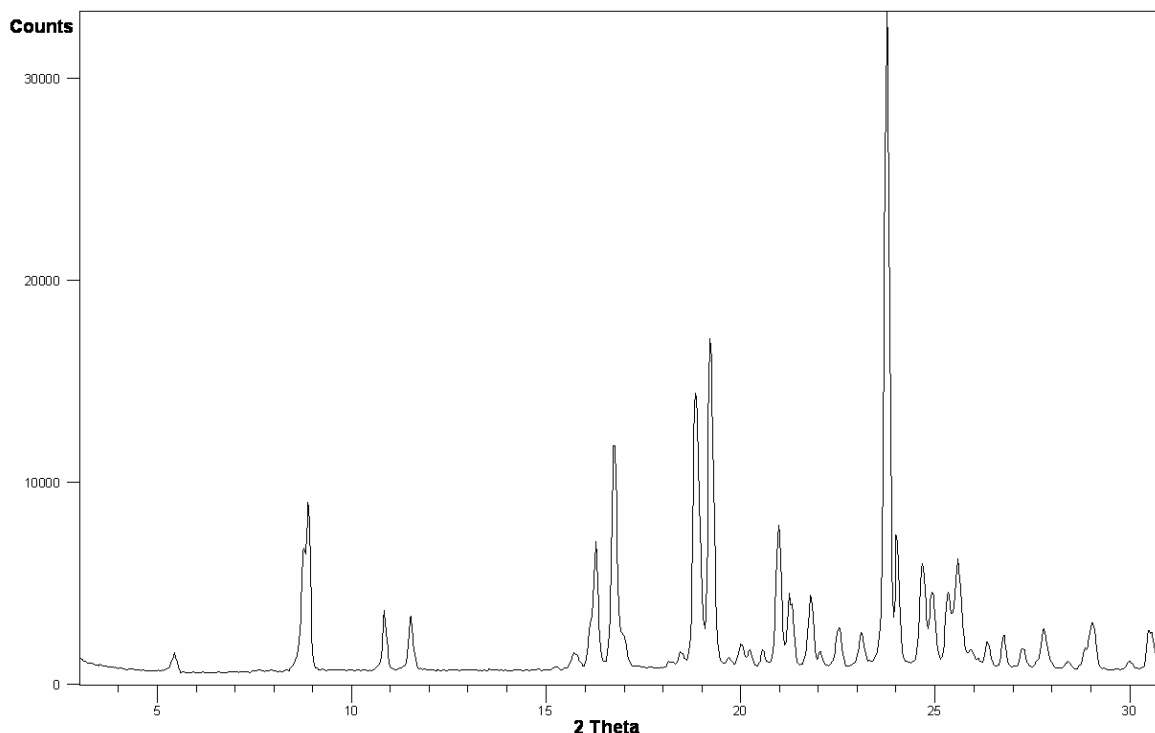
Iz kristalne strukture je vidno, da je nastal kokristal brez izmenjave protonov. Flukonazol in glutarna kislina sta se povezala preko triazolskega obroča in COOH skupine



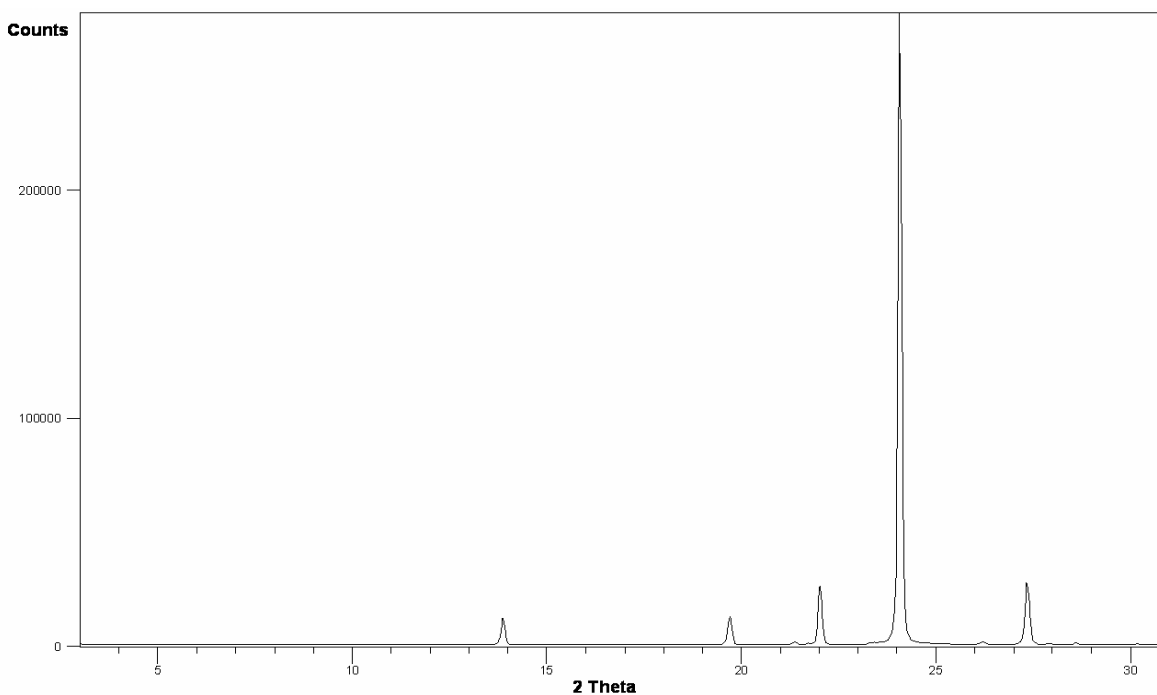
(vodikovi vezi št. 1 in 3), kar se sklada z najpogosteje zastopano kombinacijo v kokristalih, t.j. s povezavo karboksilne skupine in dušikovega heterocikla (3). Tako molekuli flukonazola in fumarne kisline tvorita verigo v razmerju 1:1. Posamezne verige pa med seboj povezujejo molekule flukonazola, prav tako preko intermolekularnih vodikovih vezi (H-vez št. 2), in sicer med OH skupino in N12-atomom triazolskega obroča. Torej so v kokristalu nastale homomerne in heteromerne intermolekularne interakcije. Heteromerne interakcije, ki so nastale, so krajše in zato močnejše, kar pa je pogoj za nastanek kokristala. Vodikova vez, ki povezuje med seboj molekule flukonazola, je namreč daljša od obeh vodikovih vezi, ki povezujeta molekule flukonazola in glutarne kisline. Pri razvrstitvi dolžin vezi smo upoštevali razdalje med protonom in akceptorjem ( $d(H^{\cdots}A)$ ).

### 5.3.2. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (PXRD)

Iz difraktogramov flukonazola (str. 37, slika 20), glutarne kisline in kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1 je razvidno, da se difraktogram kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1 razlikuje od superpozicije difraktogramov flukonazola in glutarne kisline. To potrjuje, da je pri poizkusu kokristalizacije nastala nova kristalna oblika.



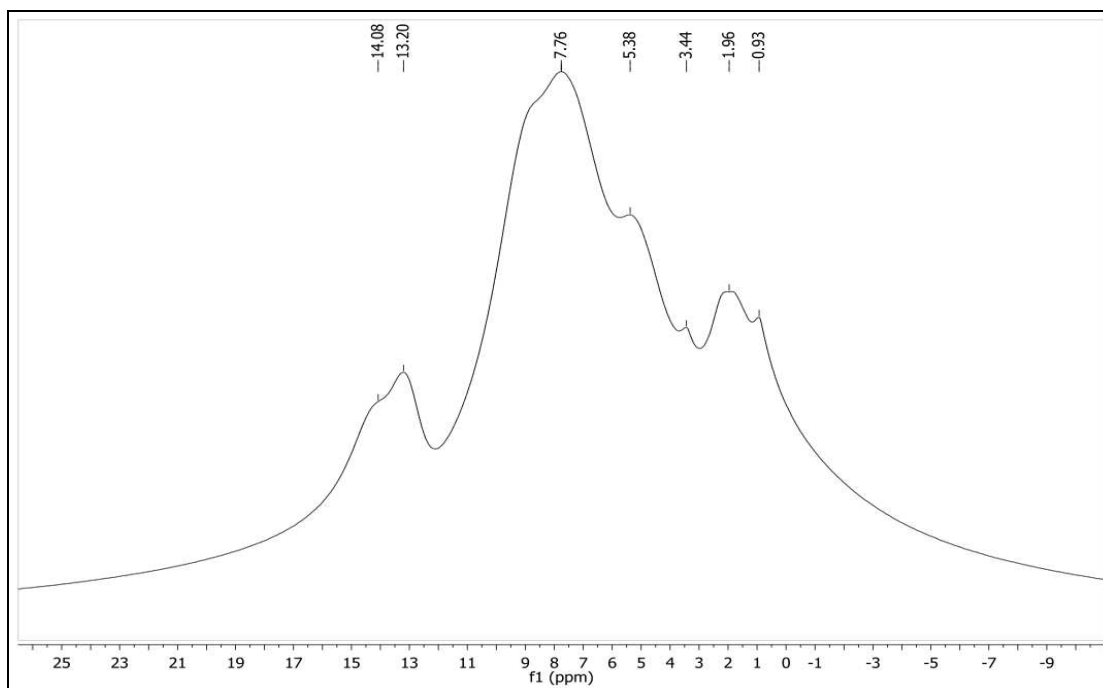
Slika 43. Praškovni difraktogram kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1.



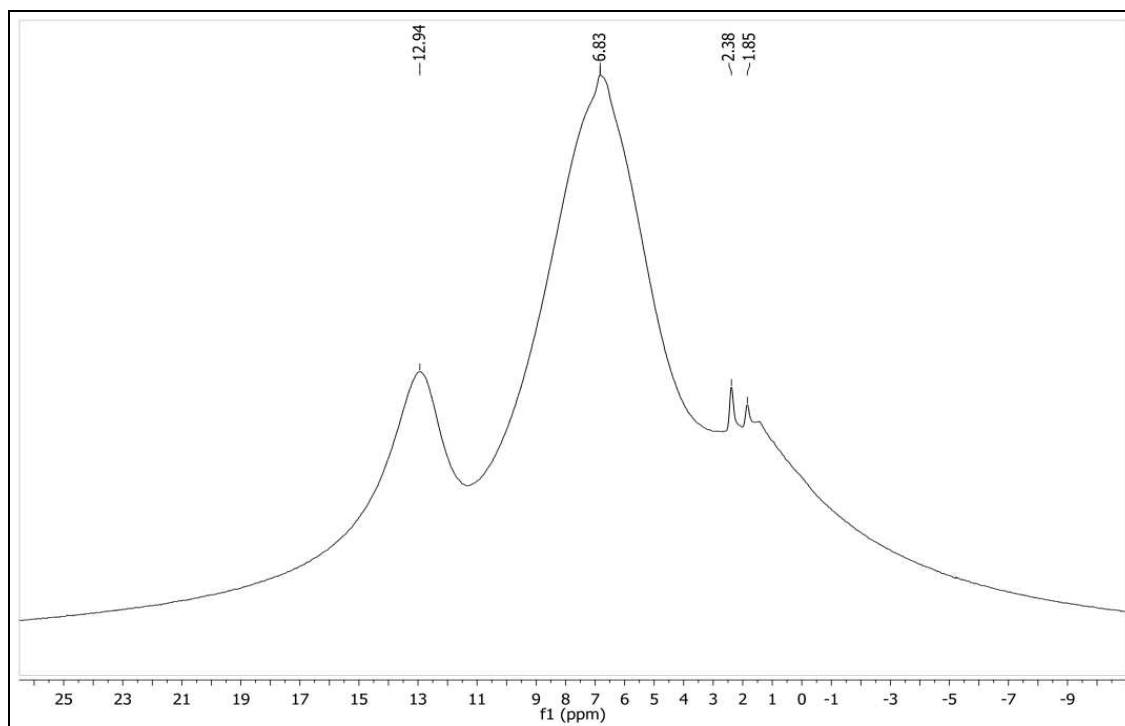
Slika 44. Praškovni difraktogram glutarne kisline.

### 5.3.3. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA

$^1\text{H}$  NMR spekter kokristala flukonazol : glutarna kislina, posnet v  $\text{DMSO-d}_6$ , je pokazal, da je razmerje v kokristalu 1:1 (podrobnejši podatki o analizi so navedeni v poglavju 4.3.). Ta podatek se sklada z rentgensko kristalno strukturo.

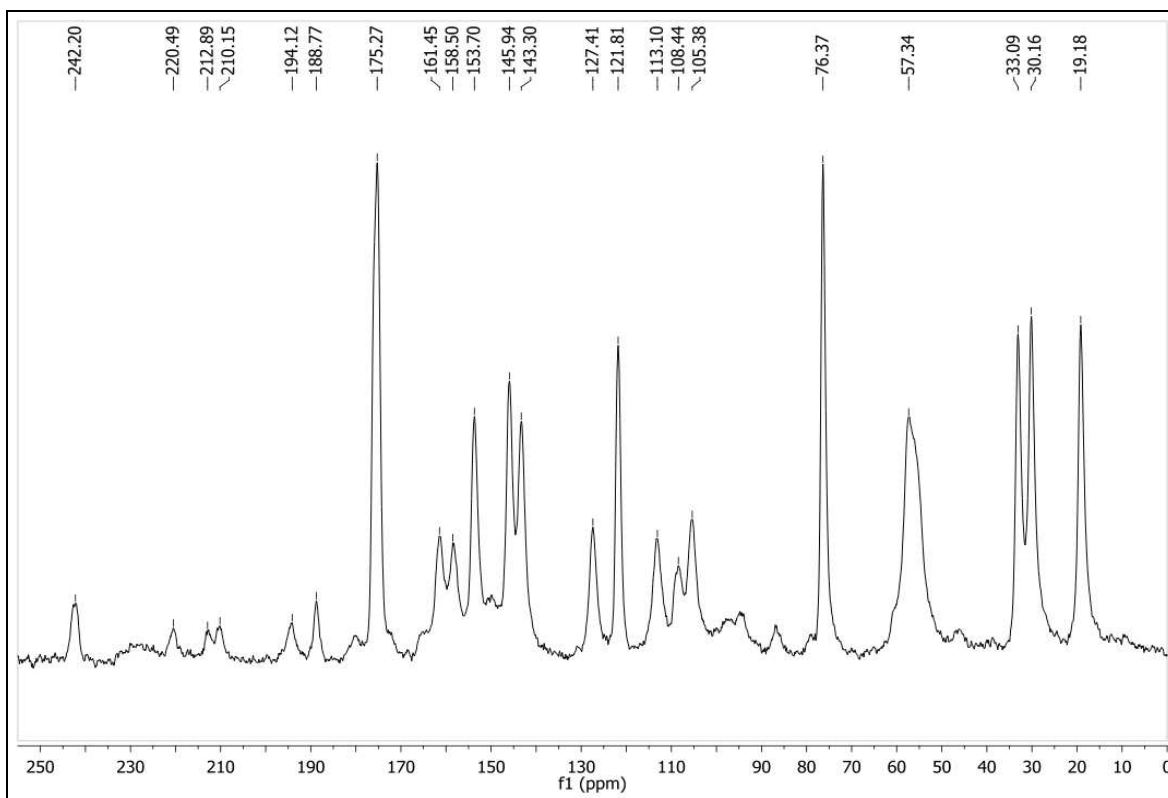


Slika 45.  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1.

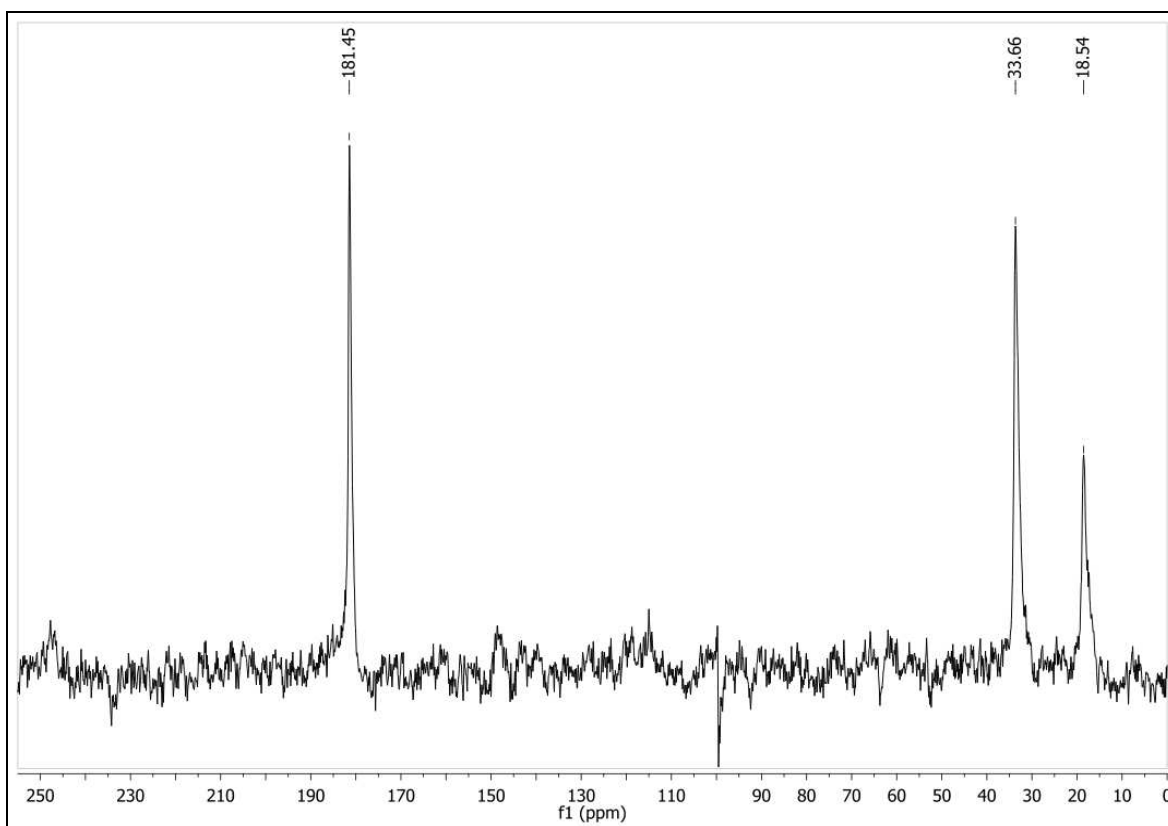


**Slika 46.**  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter glutarne kisline.

$^1\text{H}$  MAS NMR spekter kokristala je pokazal prisotnost 2 različnih vodikovih vezi (signala pri 14.08 in 13.20 ppm).  $^1\text{H}$  MAS NMR spekter glutarne kisline vsebuje signal za vodikovo vez pri 12.94 ppm, ki predstavlja intermolekularno vodikovo vez med karboksilnimi skupinami glutarnih kislin. V spektru flukonazola (str. 38, slika 23) ni prisotnih signalov, ki bi lahko kazali na prisotnost vodikovih vezi. Iz tega lahko sklepamo, da sta se v kokristalu tvorili 2 vrsti vodikovih vezi, ki sta močnejši od vodikove vezi v kristalu glutarne kisline. Menimo, da signal pri 14.08 ppm pripada močnejši vodikovi vezi med COOH skupino glutarne kisline in N4 dušikovim atomom triazolskega obroča flukonazola. Signal pri 13.20 ppm pa pripada šibkejši vodikovi vezi med OH skupino in N2 dušikovim atomom triazolskega obroča, katera povezuje 2 molekuli flukonazola. Signale vodikovih vezi v kokristalu smo asignirali upoštevaje pravilo, da morajo biti heteromerne intermolekularne interakcije močnejše od homomernih intermolekularnih interakcij (3). Ostali signali v spektru pripadajo vodikovim atomom v kokristalu, ki niso udeleženi v vodikovih vezeh. Zgoraj navedeni podatki in ugotovitve se skladajo s kristalno strukturo kokristala.



Slika 47.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1.



Slika 48.  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spekter glutarne kisline.

Preglednica IX. kemijski premiki v  $C^{13}$  CP/MAS spektrih.

C-ATOM	KOKRISTAL: $\delta$ (ppm)	FLUKONAZOL: $\delta$ (ppm)	GLUTARNA K.: $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	175,3		181,5	-6,3
C-F (2,4-difluorofenil)	161,5			/
C-F (2,4-difluorofenil)	158,5			/
CH (triazol)	153,7	151,2		2,5
CH (triazol)	145,9 / 143,3	145,3		0,7 / -2,0
C6-H (2,4-difluorofenil)	127,4			/
C1 (2,4-difluorofenil)	121,8	121,4		0,4
C3-H (2,4-difluorofenil)	113,1			/
C5-H (2,4-difluorofenil)	105,4			/
C-OH	76,4	76,7		-0,3
-CH <sub>2</sub> -	57,3	55,0		2,4
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	33,1 / 30,2		33,7	-0,6 / -3,5
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	19,2		18,5	0,6

Iz  $^{13}C$  CP/MAS NMR spektra kokristala in iz preglednice IX je razvidno, da karboksilni skupini glutarne kisline nista ionizirani, temveč tvorita vodikovi vezi, kar dokazuje negativna sprememba (-6.3 ppm) kemijskega premika signala karboksilnih C-atomov pri 175.3 ppm. Veliko negativno spremembo kemijskega premika signala karboksilnih C-atomov namreč lahko pripišemo nastanku vodikovih vezi. Enoten signal pa pomeni, da se oba karboksilna C-atoma nahajata v enakem okolju. Zgornje ugotovitve se skladajo s kristalno strukturo.

Večji premiki signalov triazolskih C-atomov flukonazola niso vidni. Ker se signal pri 151.2 ppm ni pomaknil k nižjim vrednostim ppm, lahko sklepamo, da N4-atom ni sprejel protona. To potrjuje tudi kristalna struktura. Ker je v tem primeru prišlo do pozitivne spremembe kemijskega premika za +2.5 ppm, bi lahko to pomenilo nastanek vodikove vezi, česar pa samo na osnovi  $^{13}C$  CP/MAS NMR spektrov flukonazola (str. 40, slika 26) in kokristala ne moremo trditi zagotovo. Ko ta opažanja primerjamo s kristalno strukturo kokristala, lahko potrdimo, da se je na triazolskem N4-atomu tvorila vodikova vez. Omenjena sprememba kemijskega premika torej res pomeni nastanek vodikove vezi. Ostalih signalov, ki pripadajo triazolskima C-atomoma, ni mogoče natančneje komentirati.

Hidroksilna skupina flukonazola prav tako omogoča tvorbo vodikove vezi z drugimi funkcionalnimi skupinami. Na podlagi negativne spremembe kemijskega premika signala ogljika C-OH pri 76.7 ppm, za -0.3 ppm, tega ni mogoče trditi, oz. je možno sklepati le na

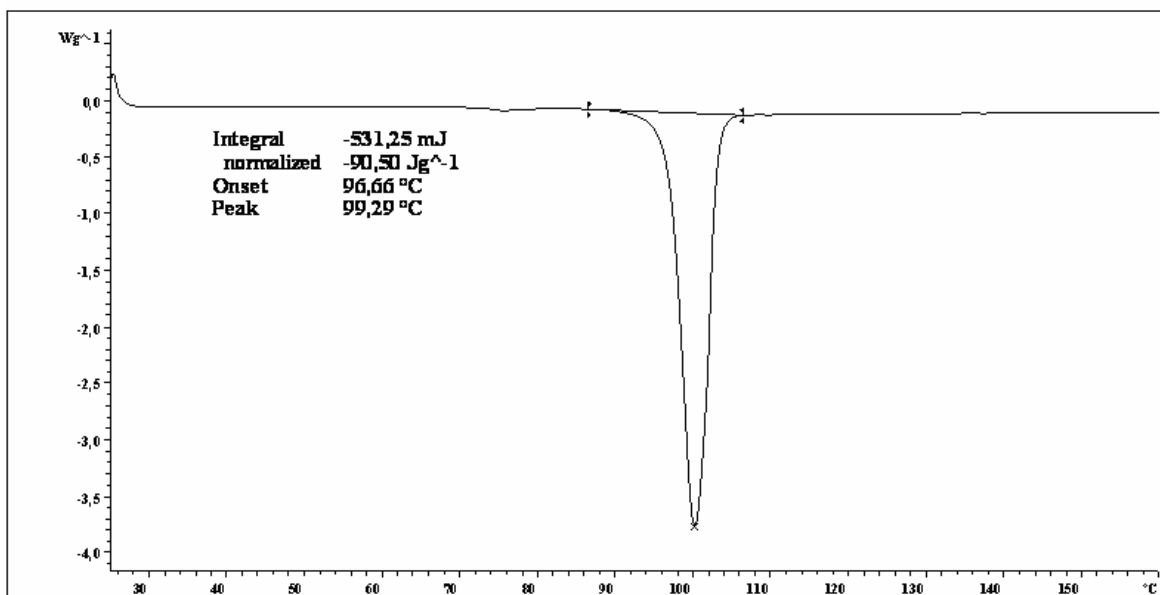
nastanek šibkejšje vodikove vezi. Nastanek močnejše vodikove vezi bi bil namreč viden kot bolj izrazita negativna sprememba kemijskega premika signala, ki pripada C-atomu, vezanemu na hidroksilno skupino. Iz kristalne strukture je razvidno, da je nastala vodikova vez med hidroksilno skupino ene molekule flukonazola in N2-triazolskim atomom druge molekule flukonazola. Glede na dolžino te vodikove vezi lahko trdimo, da je šibkejšja od ostalih vodikovih vezi v kokristalu, kar potrjuje tudi signal pri 13.20 ppm na  $^1\text{H}$  MAS NMR spektru kokristala.

Razcepljenost signala pri 31.3/30.2 ppm v spektru kokristala, ki pripada C2- in C4-atomoma glutarne kisline, kaže na to, da se omenjena ogljikova atoma nahajata v različnih okoljih, kar je v skladu s kristalno strukturo. Glavni razlog je verjetno v različnih pozicijah 2,4-difluorofenilnih obročev flukonazola in v dodatni vodikovi vezi na enem od triazolskih obročev flukonazola.

Ostale spremembe kemijskih premikov signalov v spektru kokristala, ki so navedene v preglednici IX, je mogoče razložiti kot posledico interakcij na bližnjih funkcionalnih skupinah in kot posledico splošno drugačnega okolja, v katerem se nahajajo C-atomi v kokristalu, glede na kristale osnovnih gradnikov. Signali, ki so označeni na sliki 47, a niso navedeni v preglednici IX, so pomnožitve ostalih signalov (angl. "spinning sidebands") in so posledica vrtenja vzorca med analizo.

### 5.3.4. DSC TERMIČNA ANALIZA

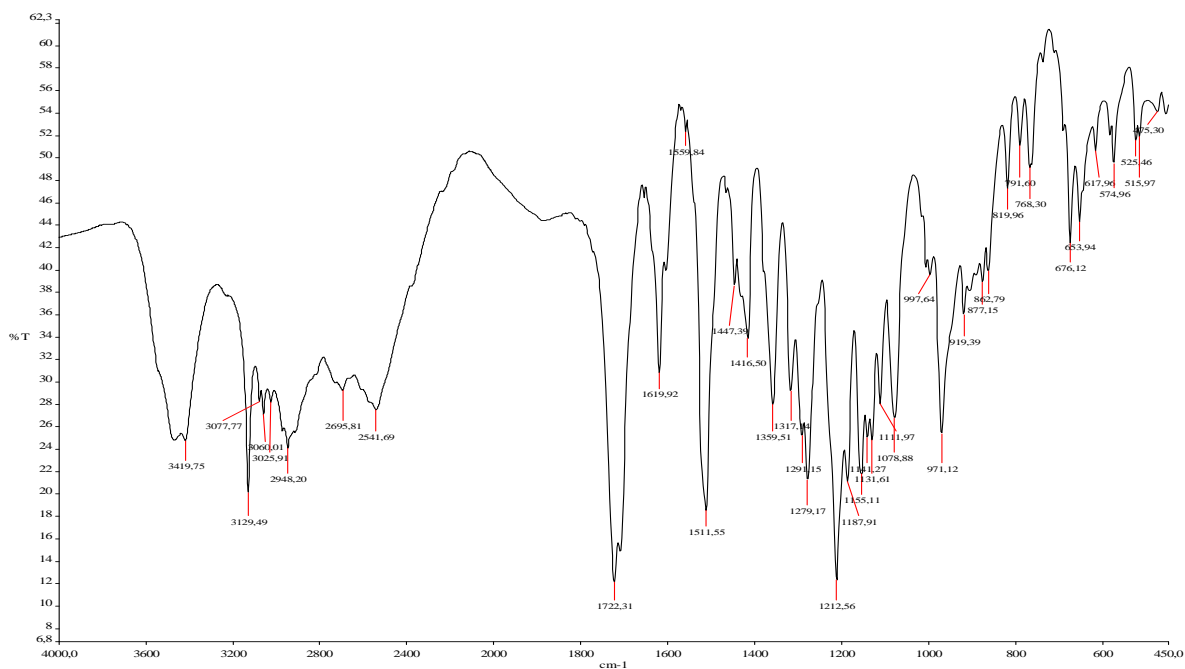
Na spodnjem termogramu je viden endotermen vrh, ki predstavlja tališče kokristala. Tališče kokristala tako znaša  $96,66^{\circ}\text{C}$ , je ozko in se razlikuje od tališča flukonazola (pribl.  $139^{\circ}\text{C}$ ). Tališče kokristala se sklada s tališčem glutarne kisline (pribl.  $99^{\circ}\text{C}$ ), vendar je na DSC termogramu kokristala viden samo en talilni vrh, zaradi česar lahko potrdimo, da vzorec predstavlja novo kristalno obliko.



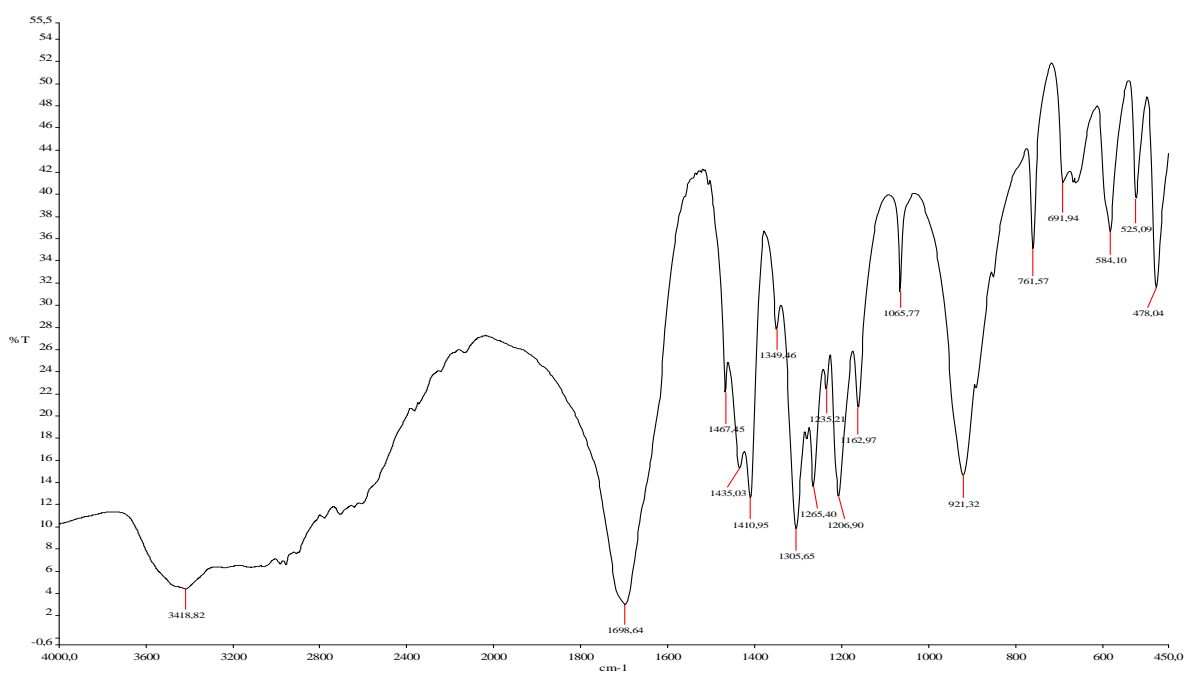
Slika 49. DSC termogram kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1. Hitrost segrevanja je znašala 10 K/min.

### 5.3.5. IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

IR spekter kokristala se razlikuje od spektrov flukonazola (str. 45, slika 30) in glutarne kisline. Da ne gre le za zmes, temveč za kokristal, potrjujejo spremembe oblik, intenzitet in položajev večine absorpcijskih trakov v spektru kokristala:



Slika 50. IR spekter kokristala flukonazol : glutarna kislina = 1:1.



Slika 51. IR spekter glutarne kisline.



V IR spektru kokristala je vidnih tudi več razširjenih absorpcijskih trakov, ki lahko nakazujejo nastanek vodikovih vezi (43). Najbolj izrazita sta absorpcijska trakova pri 3420 in 2542  $\text{cm}^{-1}$ . Položaj slednjega absorpcijskega traku se ne sklada s položaji razširjenih absorpcijskih trakov v spektrih flukonazola in glutarne kisline, kar si je mogoče razlagati, da je v kokristalu prišlo do tvorbe drugačne vodikove vezi. Položaj absorpcijskega traku pri 3420  $\text{cm}^{-1}$  se sklada s položajem podobnega absorpcijskega traku v spektru glutarne kisline, vendar sta oblika in intenziteta različni. Na podlagi kristalne strukture lahko trdimo, da omenjeni absorpcijski trak ne pripada intermolekularnim vodikovim vezem med molekulami glutarne kisline, kar potrjuje tudi naslednja ugotovitev: na spektru kokristala ni vidnih razširitev absorpcijskih trakov na območju med 1800 in 500  $\text{cm}^{-1}$ , ki so vidne v spektru glutarne kisline, kar nakazuje na odsotnost intermolekularnih  $\text{OH}\cdots\text{O}$  vodikovih vezi med molekulami glutarne kisline. Vsa ta opažanja pa dokazujejo nastanek kokristala.

#### **5.4. OSTALI POIZKUSI PRIPRAVE KOKRISTALOV FLUKONAZOLA**

Vsi poizkusi priprave kokristalov so temeljili na uporabi treh stehiometrijskih razmerij, in sicer 1:1, 2:1 in 1:2. Na osnovi rezultatov  $^1\text{H}$  NMR, rentgenske praškovne difrakcije in določenih tališč, smo izbrali ustrezna stehiometrijska razmerja, ki so obetala najboljše rezultate. Rezultat takšnega pristopa so v prejšnjih podpoglavjih opisani kokristali flukonazola z maleinsko, fumarno in glutarno kislino. Ostale uporabljene dikarboksilne kisline (jabolčna, jantarna in vinska kislina) niso dale željenih rezultatov. Pri zgoraj opisanem rešetanju smo kokristale poizkušali pripraviti iz različnih topil (aceton, acetonitril, i-butilmetilketon, deionizirana  $\text{H}_2\text{O}$ , 1,4-dioksan, etanol, etilacetat, n-heksan, nitrometan in tetrahidrofuran) oz. kombinacije topil (acetonitril/cikloheksan, acetonitril/n-heksan, tetrahidrofuran/cikloheksan in tetrahidrofuran/kloroform), ki smo jih izbrali na osnovi zadostnih in primerljivih topnosti osnovnih gradnikov kokristalov.

## 6. SKLEP

Osnovni namen naloge je bila priprava in karakterizacija kokristalov flukonazola, kar nam je tudi uspelo. Tako smo uspeli pripraviti in okarakterizirati 3 nove, doslej še neobjavljene kokristale flukonazola, in sicer **kokristal flukonazol : maleinska kislina = 1:3**, **kokristal flukonazol : fumarna kislina = 2:1** in **kokristal flukonazol : glutarna kislina = 1:1**.

Dosedanja dognanja o kokristalih so pokazala, da je povezava karboksilne skupine in dušikovega heterocikla najpogosteje zastopana kombinacija v kokristalih. Poleg tega je bil do sedaj že znan 1 kokristal flukonazola z maleinsko kislino. Zaradi teh dejstev smo poizkušali pripraviti kokristale flukonazola z dikarboksilnimi kisljinami, kar se je izkazalo kot učinkovit pristop. Kokristale smo namreč poizkušali pripraviti s šestimi dikarboksilnimi kisljinami, pri čemer smo bili uspešni s tremi dikarboksilnimi kisljinami.

Pri načrtovanju kokristalov smo upoštevali tudi pKa vrednosti osnovnih gradnikov, kar se je v našem primeru izkazalo kot nezanesljiv pristop. Flukonazol ( $pK_a = 1,8$ ) je namreč tvoril kokristal soli z maleinsko kislino ( $pK_{a1} = 1,5$ ,  $pK_{a2} = 4,5$ ), kar se ne sklada s potrebno razliko najmanj 2 pKa enot za tvorbo soli. Tako v našem primeru nismo pričakovali izmenjave protona med maleinsko kislino in flukonazolom. Glede na delno vprašljivost smiselnosti upoštevanja pKa vrednosti pri načrtovanju kokristalov, se zdita prostorsko prileganje molekul in upoštevanje zmožnosti tvorbe vodikovih vezi najzanesljivejša kriterija.

Priprava kokristalov iz topila se je izkazala kot ustrezna metoda za raziskave kokristalov v laboratorijskem merilu. Slabosti metode, ki smo jih opazili med našim delom, kot sta npr. izbira ustreznega topila oz. kombinacije topil in možnost nastanka solvatov, po našem mnenju ne prevladajo nad glavno prednostjo metode, katera je gotovo možnost priprave kokristalov v obliki monokristalov, ki so primerni za analizo z rentgensko difrakcijo na monokristalih. Pri pripravi monokristalov ustreznih velikosti in kakovosti smo bili namreč uspešni pri vseh treh novih kokristalih.

Rentgenska difrakcija na monokristalih se je izkazala kot najmočnejša metoda za karakterizacijo kokristalov, ob predpostavki, da je mogoče pripraviti monokristale ustreznih kakovosti in velikosti. V nasprotnem primeru pa NMR v trdnem v kombinaciji z rentgensko praškovo difrakcijo, NMR v raztopini, DSC termično analizo in IR spektroskopijo predstavljajo ustrezno alternativo.

Logično nadaljevanje raziskovalnega dela bi obsegalo optimizacijo priprave kokristalov flukonazola z maleinsko in fumarno kislino. Prav tako bi bilo potrebno natančneje raziskati proces odpuščanja etanola iz solvata kokristala flukonazola in fumarne kisline. Zatem pa bi sledilo ovrednotenje topnostnih lastnosti, stabilnosti in mehanskih lastnosti pripravljenih kokristalov.

## 7. LITERATURA

- (1) Stahly G P: Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. *Crystal Growth & Design* 2007; 7: 1007-26.
- (2) Dunitz J D: Crystal and Co-crystal: a Second Opinion. *CrystEngComm* 2003; 5: 506.
- (3) Aakeroy C B, Salmon D J: Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. *CrystEngComm* 2005; 7: 439-48.
- (4) Childs S L, Stahly G P, Park A: The Salt-Cocrystal Continuum: The Influence of Crystal Structure on Ionization State. *Molecular Pharmaceutics* 2007; 4: 323-38.
- (5) Remenar J F, Morisette S L, Peterson M L, Moulton B, MacPhee J M, Guzman H R, Almarsson O: Crystal Engineering of Novel Cocrystals of a Triazole Drug with 1,4-Dicarboxylic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 8456-7.
- (6) Allen F H, Bellard S, Brice M D, Cartwright B A, Doubleday A, Higgs H, Hummelink T, Hummelink-Peters B G, Kennard O, Motherwell W D S, Rodgers J R, Watson D G: The Cambridge Crystallographic Data Centre: computer-based search, retrieval, analysis and display of information. *Acta Crystallogr.* 1979; B35: 2331-9.
- (7) Desiraju G R: Supramolecular Synthons in Crystal Engineering – A New Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995; 34: 2311-27.
- (8) Etter M C: Hydrogen Bonds as Design Elements in Organic Chemistry. *The Journal of Physical Chemistry* 1991; 95: 4601-10.
- (9) Donohue J: The Hydrogen Bond in Organic Crystals. *J. Phys. Chem.* 1952; 56: 502-10.
- (10) Seefeldt K, Miller J, Alvarez-Nunez F, Rodriguez-Hornedo N: Crystallization Pathways and Kinetics of Carbamazepine-Nicotinamide Cocrystals From the Amorphous State by *In Situ* Thermomicroscopy, Spectroscopy and Calorimetry Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 96: 1147-57.
- (11) Blagden N, de Matas M, Gavan P T, York P: Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2007; 59: 617-30.

- (12) Jayasankar A, Good D J, Rodriguez-Hornedo: Mechanisms by Which Moisture Generates Cocrystals. *Molecular Pharmaceutics* 2007; 4: 360-72.
- (13) Portalone G, Colapietro M: First example of cocrystals of polymorphic maleic hydrazide. *J. Chem. Crystallogr.* 2004; 34: 609-12.
- (14) Fleischman S G, Kuduva S S, McMahon J A, Moulton B, Walsh R D B, Rodriguez-Hornedo, Zaworotko M J: Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases: multiple-component crystalline solids involving carbamazepine. *Cryst. Growth Des.* 2003; 3: 909-19.
- (15) Rodriguez-Hornedo N, Nehm S J, Seefeldt K F, Pagan-Torres Y, Falkiewicz C J: Reaction Crystallization of Pharmaceutical Molecular Complexes. *Mol. Pharm.* 2006; 3: 362-7.
- (16) Trask A V, Jones W: Crystal Engineering of Organic Cocrystals by the Solid-State Grinding Approach. *Top Curr. Chem.* 2005; 254: 41-70.
- (17) Chan H K, Doelker E: Polymorphic Transformation of Some Drugs Under Compression. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1985; 11: 315-32.
- (18) Etter M C, Frankenbach G M, Adsmund D A: Using hydrogen bonds to design acentric organic materials for nonlinear optical users. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1990; 187: 25-39.
- (19) [http://www.ktf-split.hr/glossary/no\\_en\\_o.php?def=ball%20mill](http://www.ktf-split.hr/glossary/no_en_o.php?def=ball%20mill)
- (20) Shan N, Toda F, Jones W: Mechanochemistry and cocrystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chem. Comm.* 2002; 2372-3.
- (21) Trask A V, Motherwell W D S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem. Comm.* 2004; 890-91.
- (22) Etter M C, Adsmund D A: The use of cocrystallization as a method of studying hydrogen bond preferences of 2-aminopyrimidine. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1990; 589-581.
- (23) Zhang G G Z, Henry R F, Borchardt T B, Lou X: Efficient Co-crystal Screening Using Solution-Mediated Phase Transformation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2007; 96: 990-5.
- (24) Shiraki K, Takata N, Takano R, Hayashi Y, Terada K: Dissolution Improvement and the Mechanism of the Improvement from Cocrystallization of Poorly Water-soluble Compounds. *Pharmaceutical Research* 2008; 25: 2581-92.

- (25) Lara-Ochoa F, Espinosa-Perez G: Crystals and Patents. *Crystal Growth & Design* 2007; 7: 1213-15.
- (26) Basavoju S, Bostrm D, Velaga S P: Pharmaceutical Cocrystal and Salts of Norfloxacin. *Crystal Growth & Design* 2006; 6: 2699-708.
- (27) Reddy L S, Bethune S J, Kampf J W, Rodriguez-Hornedo N: Cocrystals and Salts of Gabapentin: pH Dependent Cocrystal Stability and Solubility. *Crystal Growth & Design* 2009; 9: 378-85.
- (28) Remenar J F, Peterson M L, Stephens P W, Zhang Z, Zimenkov Y, Hickey M B: Celecoxib:Nicotinamide Dissociation: Using Excipients To Capture the Cocrystal's Potential. *Molecular Pharmaceutics* 2007; 4: 386-400.
- (29) Trask A V, Motherwell W D S, Jones W: Pharmaceutical Cocrystallization: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. *Crystal Growth & Design* 2005; 5: 1013-21.
- (30) Sun C C, Hou H: Improving Mechanical Properties of Caffeine and Methyl Gallate Crystals by Cocrystallization. *Crystal Growth & Design* 2008; 8: 1575-9.
- (31) Harris R K: NMR studies of organic polymorphs & solvates. *Analyst* 2006; 131: 351-73.
- (32) Karki S, Fabian L, Friščić T, Jones W: Powder X-ray Diffraction as an emerging Method to Structurally Characterize Organic Solids. *Organic Letters* 2007; 9: 3133-6.
- (33) Sheng C, Zhang W, Ji H, Zhang M, Song Y, Xu H, Zhu J, Miao Z, Jiang Q, Yao J, Zhou Y, Zhu J, Lue J: Structure-Based Optimization of Azole Antifungal Agents by CoMFA, CoMSIA, and Molecular Docking. *J. Med. Chem.* 2006; 49: 2512-25.
- (34) Sweetman S C: Martindale: The complete drug reference, 35th edition, Pharmaceutical Press, London, 2007, 479-81.
- (35) Product Monograph: Diflucan (fluconazole); Pfizer Canada Inc. 2004.
- (36) Podust L M, Poulos T L, Waterman M R: Crystal Structure of Cytochrome P450 14 $\alpha$ -Sterol Demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in Complex with Azole Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 3068.
- (37) Seward H E, Roujeinikova A, McLean K J, Munro A W, Leys D: Crystal Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* P450 CYP121-Fluconazole Complex Reveals New Azole Drug-P450 Binding Mode. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 39437-43.

- (38) Matsuura K, Yoshioka S, Tosha T, Hori H, Ishimori K, Kitagawa T, Morishima I, Kagawa N, Waterman M R: Structural Diversities of Active Site in Clinical Azole-bound Forms between Sterol 14 $\alpha$ -Demethylases (CYP51s) from Human and *Mycobacterium Tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 9088-96.
- (39) Caira M R, Alkhamis K A, Obaidat R M: Preparation and Crystal Characterization of a Polymorph, a Monohydrate, and a Ethyl Acetate Solvate of the Antifungal Fluconazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 93: 601-11.
- (40) McMahon J, Peterson M, Zaworotko M J, Shattock T, Hickey M B: Pharmaceutical Co-crystal Compositions and Related Methods of Use. International Patent, Patent number WO 2006/007448 A2, date of patent 19 Jan. 2006.
- (41) Kreidl J, Czibula L, Szantay C, Farkas J, Deutschne-Juchasz I, Hegedus I, Werkne-Papp E, Nagyne-Bagdy J, Piller A: Process for preparing fluconazole and its crystal modifications. International Patent, Patent number WO02/076955 A1, date of patent 3 Oct. 2002.
- (42) Cry T D, Dawson B A, Neville G A, Shurvell H F: Spectral characterization of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1996; 14: 247-55.
- (43) Ilczyszyn M, Godzisz D, Ilczyszyn M M: Sarcosine – maleic acid (1:1) crystal: structure, <sup>13</sup>C NMR and vibrational properties, protonation character. *Spectrochimica Acta Part A* 2003; 59: 1815-28.
- (44) Karpowicz R J, Sergio S T, Brill T B:  $\beta$ -Polymorph of Hexahydro-1,3,5-trinitro-*s*-triazine. A Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of an Energetic Material. *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 1983; 22: 363-5.