

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANEZ JERMAN

**VPLIV POLARNOSTI TOPIL PRI KRISTALIZACIJI
MODELNE ZDRAVILNE UČINKOVINE K-2605/05 NA
FIZIKALNE LASTNOSTI DELCEV**

**THE INFLUENCE OF SOLVENT POLARITY ON
CRYSTALLIZATION OF MODEL ACTIVE INGREDIENT
K-2605/05 ON PHYSICAL PROPERTIES OF PARTICLES**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljal v Krki, d.d., Novo mesto, v Sektorju za raziskave in razvoj, pod mentorstvom izr. prof. dr. Franca Vrečerja in somentorstvom dr. Silva Zupančiča.

Analize inverzne plinske kromatografije, helijeve piknometrije in določanja stičnega kota so bile izvedene na Fakulteti za Farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo, vrstična elektronska mikroskopija pa je bila izvedena na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Za strokovno vodstvo, nasvete ter pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Francu Vrečerju in somentorju dr. Silvu Zupančiču.

Hvala Odonu, Urški, Daretu, Mateju, Teji, Biserki, Mireli in vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi analiz.

Ob zaključku študija se zahvaljujem tudi staršema in sestri, ki so me potrpežljivo in z veliko podpore spremljali na poti do cilja.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Franca Vrečerja in somentorstvom dr. Silva Zupančiča.

Janez Jerman

Predsednik diplomske komisije:

zasl. prof. dr. Aleš Krbavčič

Član diplomske komisije:

doc. dr. Iztok Grabnar

Ljubljana, 2009

KAZALO

POVZETEK	1
SEZNAM OKRAJŠAV	2
1 UVOD.....	4
1.1 Kristalizacija	4
1.1.1 Termodinamske lastnosti spojin v kristalinični obliki.....	4
1.1.2 Mehanizem kristalizacije.....	5
1.2 Notranja zgradba in zunanji videz kristala.....	9
1.3 Vpliv pogojev kristalizacije na fizikalno-kemijske lastnosti kristalov	11
1.3.1 Hitrost ohlajanja / stopnja prenasíčenja.....	11
1.3.2 Mešanje	11
1.3.3 Kristalizacijsko topilo.....	12
1.4 Površinska energija	13
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 Materiali.....	16
3.2 Metode	17
3.2.1 Rentgenska praškovna difrakcija – XRPD	17
3.2.2 Termoanalizne metode	18
3.2.2.1 Termogravimetrija - TGA	18
3.2.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija – DSC	18
3.2.3 Infrardeča spektroskopija	20
3.2.4 Določanje prave gostote s helijevim piknometrom	21
3.2.5 Vrstična elektronska mikroskopija – SEM.....	22
3.2.6 Močljivost in določanje stíčnega kota	23
3.2.7 Inverzna plinska kromatografija.....	25
3.2.8 Določanje intrinzične hitrosti raztapljanja – IDR.....	29
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	31
4.1 Priprava vzorcev	31
4.2 Analizne metode	32
4.2.1 Rentgenska praškovna analiza.....	32
4.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija.....	32

4.2.3	Termogravimetrična analiza	32
4.2.4	Srednja infrardeča spektroskopija	33
4.2.5	Določanje prave gostote	33
4.2.6	Analiza oblike delcev	33
4.2.7	Analiza porazdelitve velikosti delcev	33
4.2.8	Inverzna plinska kromatografija	33
4.2.9	Merjenje stičnega kota	34
4.2.10	Intrinzična hitrost raztapljanja	34
4.2.11	Kinetična topnost	35
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	36
5.1	Rentgenska praškovna difrakcija	36
5.2	Termična analiza	37
5.2.1	Diferenčna dinamična kalorimetrija	37
5.2.2	Termogravimetrična analiza	40
5.3	Srednja infrardeča spektroskopija	42
5.4	Določanje prave gostote	43
5.5	Analiza oblike delcev	44
5.6	Porazdelitev velikosti delcev	46
5.7	Določanje stičnega kota	48
5.8	Inverzna plinska kromatografija	49
5.9	Intrinzična hitrost raztapljanja	52
5.10	Kinetična topnost	54
6	ZAKLJUČEK	56
7	LITERATURA	58

POVZETEK

Prekristalizacija se pogosto uporablja v farmacevtski industriji za čiščenje in izolacijo zdravilnih učinkovin. Pogoji kristalizacije vplivajo tako na notranjo strukturo, kot tudi na zunanji videz kristalov, vpliv pa se kaže v različnih fizikalno-kemijskih lastnostih, med katerimi je najpomembnejši vpliv na topnost oz. hitrost raztapljanja in s tem posredno na biološko uporabnost zdravilne učinkovine.

Namen naloge je bil preučiti vpliv različnih kristalizacijskih topil na izbrane fizikalno-kemijske lastnosti modelne zdravilne učinkovine K-2605/05, pri čemer smo za prekristalizacijo uporabili čista organska topila.

Z rentgensko praškovo difrakcijo, IR spektroskopijo in termičnimi analizami smo ugotavljali pojavnost polimorfizma. Analize vzorcev modelne zdravilne učinkovine, ki naj bi kristalizirala samo v eni kristalni obliki, so pri dveh vzorcih pokazale na novo (v obeh primerih isto) polimorfno obliko. To sta potrdili tudi nekoliko nižji pravi gostoti teh dveh vzorcev.

Z opazovanjem vzorcev modelne zdravilne učinkovine pod optičnim in elektronskim mikroskopom, ter z analizo porazdelitve velikosti delcev smo opazili razlike v zunanjem videzu in velikosti kristalov tako med različnima polimorfnima oblikama, kot tudi razlike med vzorci z identično notranjo strukturo in kažejo vpliv topila na zunanji videz kristalov. Te razlike se odražajo tudi v nekaterih drugih površinskih lastnostih vzorcev.

Z inverzno plinsko kromatografijo smo ugotovili, da višje nepolarne komponente površinske energije izkazujejo vzorci, ki so prekristalizirani iz bolj nepolarnih topil (topila z nižjo dielektrično konstanto).

Pri rezultatih analiz intrinzične hitrosti raztapljanja in kinetične topnosti smo opazili predvsem višje vrednosti pri vzorcih z novo kristalno obliko. Razlike med ostalimi vzorci so sicer bile opazne, vendar jih nismo mogli nedvoumno povezati s polarnostjo prekristalizacijskega topila.

Rezultati kažejo, da različna organska topila pri prekristalizaciji vplivajo na lastnosti zdravilne učinkovine, vendar pa je ta vpliv nepredvidljiv. Samo na podlagi polarnosti oz. nepolarnosti prekristalizacijskih topil ne moremo napovedati fizikalno-kemijskih lastnosti preiskovane modelne zdravilne učinkovine K-2605/05.

SEZNAM OKRAJŠAV

a	površina adsorbirane molekule
AN, AN [*]	elektron akceptorsko število (ang. acceptor number)
C	konstanta, odvisna od izbranega standardnega stanja
DN	elektron donorsko število (ang. donor number)
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
F	volumski pretok nosilnega plina
FID	plamensko ionizacijski detektor (ang. flame ionization detector)
FT-IR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
G	Gibbsova prosta energija
ΔG_a°	sprememba standardne Gibbsove proste energije adsorpcije
ΔG^d	sprememba Gibbsove proste energije, ki se nanaša na disperzijske interakcije
ΔG^{sp}	sprememba Gibbsove proste energije, ki se nanaša na specifične interakcije
h	višina kapljice
H	entalpija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IDR	intrinzična hitrost raztapljanja (ang. intrinsic dissolution rate)
IGC	inverzna plinska kromatografija
j	James-Martinov korekcijski faktor stisljivosti nosilnega plina
K _A	parameter, ki označuje elektron akceptorske (kislinke) lastnosti trdne površine
K _D	parameter, ki označuje elektron donorske (bazične) lastnosti trdne površine
m	masa preiskovane snovi
MS	masna spektrometrija
N _a	Avogadrovo število
n _c	množina helija v celici za vzorec
P ₁	tlak v celici z vzorcem, ko vanjo spustimo znano množino helija
P ₂	ravnotežni tlak, ki nastane po ekspanziji helija
P _a	tlak helija, s katerim je bila preprihana ekspanzijska celica pred meritvijo in je enak tlaku v prostoru (atmosferskemu tlaku)
P _{sg}	standardni tlak plina
r	polmer kapljice

R	splošna plinska konstanta
S	entropija
SEM	vrstični elektronski mikroskop
SD	standardna deviacija
T	temperatura
t_r	retencijski čas adsorptiva
t_o	retencijski čas topila, ki ne vstopa v interakcije z vzorcem (običajno metan)
TCD	toplotno prevodni detektor (ang. thermal conductivity detector)
TGA	termogravimetrična analiza
THF	tetrahidrofuran
V_c	volumen celice za vzorec
V_e	volumen ekspanzijske celice
V_n	retencijski volumen
V_s	neznan volumen vzorca
W_a	adhezijsko delo
W_a^d	adhezijsko delo med nepolarno tekočino in trdno površino, ki vključuje le disperzijske interakcije
XRPD	rentgenska praškovna difrakcija
α	stopnja tveganja
γ	medfazna napetost/energija
γ_{lv}	površinske napetosti tekočine
γ_l^d	nepolarni prispevek k površinski napetosti tekočine
γ_s^d	nepolarni prispevek k površinski energiji trdne snovi
γ_{sl}	medfazna napetost/energija med trdno snovjo in tekočino
γ_{sv}	površinska energija trdne snovi
2θ	uklonski maksimum
θ	stični kot oz. kot močenja
μ	kemični potencial
π_o	standardni površinski tlak adsorbiranega filma
ρ	gostota snovi

1 UVOD

1.1 KRISTALIZACIJA

Kristalizacija je nastanek in rast kristalov spojine iz nasičene raztopine (1). Večino trdnih snovi v naravi poznamo v kristalni obliki. Za spojine v kristalinični obliki je značilen pravilen in periodičen razpored gradnikov, ki so lahko atomi, ioni ali molekule, za razliko od amorfnih spojin, kjer je urejenost naključna, podobno kot v tekočinah. V kristalu so gradniki med seboj enako oddaljeni, obkrožajo jih identično razporejeni sosednji gradniki. Urejena notranja struktura se kaže s pravilno zunanjo obliko – ravne, gladke površine (2). Zdravilne učinkovine so kot substance organskega izvora večinoma molekulski kristali, katerih gradnike povezujejo nekovalentne vezi, vključno z vodikovo (3).

1.1.1 TERMODINAMSKE LASTNOSTI SPOJIN V KRISTALINIČNI OBLIKI

S termodinamskega vidika je kristalizacija proces, pri katerem pride do fazne spremembe tekoče v trdno. Ob fazni spremembi se spremeni predvsem strukturna zgradba snovi in posledično notranja energija snovi (2).

Med kristalizacijo se molekule razvrščajo na določena mesta v kristalno mrežo. Med seboj se povezujejo z molekulskimi vezmi. Trdna snov dobi lastno obliko. Molekule niso več prosto gibljive in lahko le oscilirajo okrog določenih ravnovesnih leg v kristalni mreži. Molekulam se zmanjša kinetična energija, prebitek energije pa oddajo v obliki toplote v okolico (entalpija kristalizacije H_{krist}). V splošnem je kristalizacija eksotermen proces (2). Za opisovanje faznih sprememb v odprtih sistemih običajno uporabljamo funkcijo stanja G - Gibbsovo prosto energijo (skrajšano prosto energijo). Sprememba Gibbsove proste energije (ΔG) pove, kolikšno je maksimalno delo, ki ga sistem opravi med fazno spremembo (2).

Gibbsova prosta energija (G) je definirana kot:

$$G = H - T \cdot S \quad /1/$$

kjer je H entalpija, T absolutna temperatura in S entropija (4). V sistemu je termodinamsko stabilna tista faza, ki ima najmanjšo vrednost proste energije (G). Da kristalizacija poteče, je potrebno doseči ravnotežni pogoj $\Delta G < 0$ (2).

Ko se molekule v tekoči fazi med seboj povezujejo v kristalno mrežo, pride do povečane ureditve sistema in s tem do padca entropije (S) ter posledično do porasta proste energije. Z

medsebojnim povezovanjem molekul (tvorba molekulskih vezi) pa hkrati pride do zmanjšanja sistemske entalpije (H) in s tem do zmanjšanja proste energije. Ali kristalizacija poteče je odvisno od tega ali prevlada vpliv sistemske entropije (kristalizacija ne poteče) ali entalpije (kristalizacija poteče) (4).

1.1.2 MEHANIZEM KRISTALIZACIJE

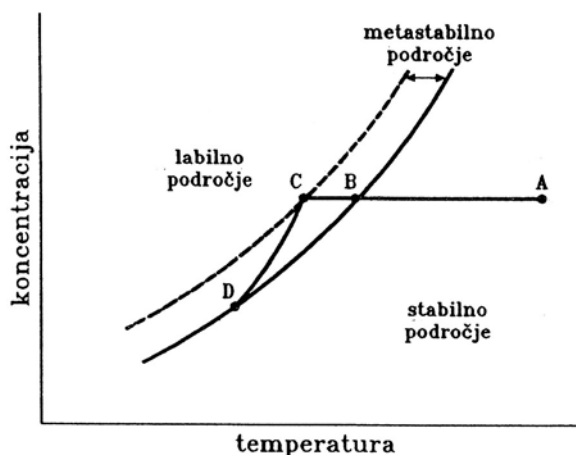
Za kristalizacijo je potrebno doseči tri osnovne pogoje: prenasičenje sistema, nastanek kristalizacijskih jeder (nukleacija) in rast kristalov (5).

Prenasičenje sistema

Raztopina je prenasičena takrat, ko je kemični potencial (μ) trdne faze v raztopini nižji od kemičnega potenciala raztopljene komponente pri določenih pogojih (tlak, temperatura). Gonilna sila nukleacije in rasti kristalov je torej razlika v kemičnem potencialu topjenca v prenasičeni raztopini (μ_1), in v nasičeni raztopini (μ_{eq}) /2/:

$$\Delta\mu = (\mu_1 - \mu_{eq}) \quad /2/$$

Prenasičenje lahko dosežemo na več načinov: z izparevanjem topila, ohlajevanjem, dodatkom tretje komponente, ki zmanjšuje topnost topjenca ali kemično reakcijo v topilu, katere rezultat je produkt z majhno topnostjo (5). Mierjev diagram (slika 1) prikazuje regije z različno termodinamsko stabilnostjo raztopine kot funkcijo temperature.



Slika 1: Mierjev diagram (2).

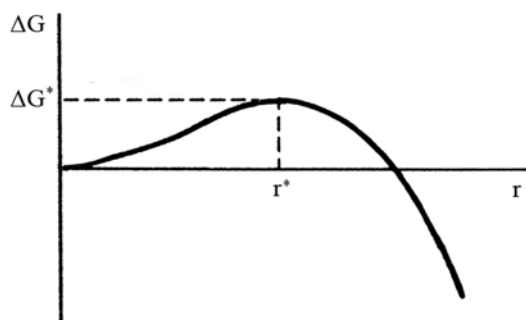
Sistem je v točki A nenasičen. Če raztopino ohlajamo, le-ta postane nasičena v točki B in preide v metastabilno tekočo fazo. Spontana kristalizacija se prične šele ko prečkamo

metastabilno področje v točki C in poteka dokler se ne vzpostavi novo ravnotežno stanje (točka D). V raztopini v metastabilnem stanju hitreje poteka rast kristalov kot nukleacija (4).

Nastanek kristalizacijskih jeder (nukleacija)

Nukleacija je proces, v katerem pride do nastanka površine, na kateri nato poteka rast kristala (6). Nukleacijo delimo na primarno in sekundarno. V primeru primarne nukleacije gre za tvorbo kristalizacijskih jeder v odsotnosti trdnih delcev snovi, ki jo kristaliziramo. Sekundarna nukleacija pa zahteva prisotnost cepitvenih kristalov željene snovi. Primarno nukleacijo lahko nadalje razdelimo na homogeno in heterogeno (2, 7).

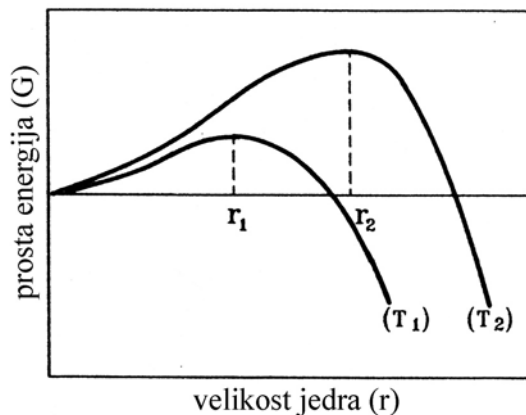
Do primarne homogene nukleacije pride, ko ni na voljo nobenih alternativnih nukleacijskih mest in pri koncentracijah nad ravnotežno topnostjo spojine pri določeni temperaturi. Pri primarni homogeni nukleaciji gre za tvorbo jedra z agregacijo molekul topljenca v klastre, ki so predstopnja kristalizacijskih jeder (protonukleus). Ko ti dosežejo določeno kritično velikost, postanejo kritična jedra kristalizacijska jedra, ki so sposobna sprožiti makroskopsko spremembo. Kritična velikost predstavlja točko, pri kateri hitrost rasti kristala presega hitrost raztapljanja zelo majhnih delcev (topljenca). Prosta energija takih kritičnih jeder je višja od proste energije raztopljenega topljenca (2).



Slika 2: Sprememba Gibbsove proste energije (ΔG) v odvisnosti od velikosti (r) kristalizacijskega jedra (2).

Na sliki 2 sprememba Gibbsove proste energije ΔG^* predstavlja aktivacijsko energijo za nastanek kristalizacijskega jedra kritične velikosti r^* . Obnašanje novonastalega kristalnega jedra v prenasajenem sistemu je odvisno od njegove velikosti. Pri zametkih kristalov, ko je velikost delcev manjša od r^* se le-ti raztapljajo, ker je ta proces energijsko ugodnejši, iz večjih zametkov ($r > r^*$) pa nastanejo stabilna kristalizacijska jedra, na katerih poteče

nadaljna rast in nastanek večjih kristalov (7). Kritična velikost kristalizacijskih jeder (r^*) in sprememba proste energije (ΔG^*) je odvisna od temperature kristalizacije (slika 3) oz. od stopnje prenasíčenja. Nižje temperature oz. višje stopnje prenasíčenja so ugodnejše za proces nukleacije (4).



Slika 3: Vpliv temperature na velikost in Gibbsovo prosto energijo tvorbe kritičnega jedra ($T_1 < T_2$) (2).

Za nastanek primarnih heterogenih kristalizacijskih jeder so odgovorni prisotni tuji delci, kot so majhni delci nečistot, prahu, zdrobljenega stekla (2, 6). Pri tem procesu gre za nalaganje molekul topljenca (kristalni depozit) na drugo trdno površino. Pomembno vlogo v tem primeru ima medfazna energija γ med tujo trdno površino in kristalnim depozitom. Da poteče kristalizacija, mora obstajati afiniteta med tema dvema trdnima površinama (2). Če raztopini v metastabilnem stanju dodamo majhno količino cepitvenih kristalov željene snovi, se lahko izognemo procesu nukleacije, saj je rast kristalov v metastabilnem področju energijsko ugodnejši proces kot nukleacija (4).

Do sekundarne nukleacije pride takrat, ko so v prenasíčeni raztopini prisotni kristali topljenca. Nukleacija je v takem primeru posledica medsebojnih trkov kristalov, trkov kristalov s stenami posode in mešalom ali pa pride do nastanka novih jeder s fragmentacijo krhkih kristalov. Tudi tukaj je energija, ki je potrebna za tvorbo sekundarnih jeder manjša od energije za nastanek homogenih jeder (4).

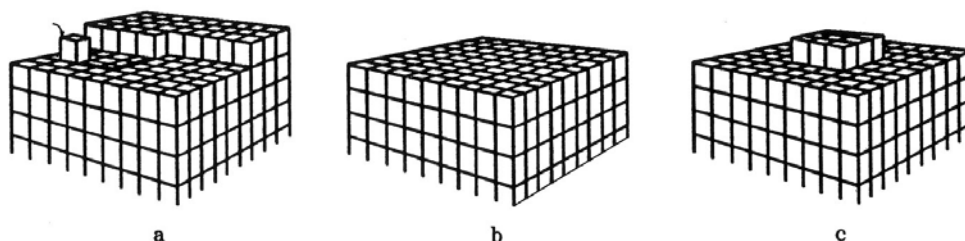
Kristalna rast

V prenasíčenem sistemu najprej nastanejo stabilna kristalizacijska jedra, ko pa se stopnja prenasíčenja zmanjša in je raztopina v termodinamsko metastabilnem stanju, prevlada proces kristalne rasti pri katerem nastanejo kristali, vidni s prostim očesom (4). Rast

kristalov poteka v dveh glavnih stopnjah. Prva je difuzija topljenca (rastna enota kristala oz njen prekursor) iz raztopine na površino rastočega kristala, druga pa je vgraditev materiala v kristalno rešetko (2, 5, 8).

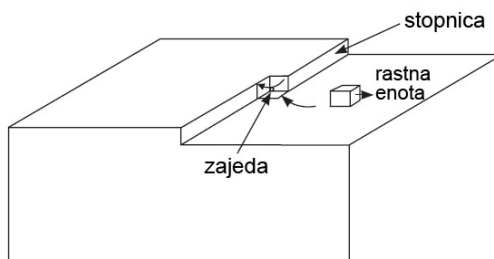
Obstaja več teorij, ki skušajo razložiti mehanizem rasti kristalov, med njimi tudi teorija o adsorpcijskih plasteh, znotraj katere je več modelov (2):

Po Gibbs-Volmerjevem modelu (slika 4) naj bi rast kristalov potekala po stopnjah. Ko prispe rastna enota kristala na površino kristalizacijskega jedra, se nanjo šibko adsorbira in nato difundira na željeno mesto. To se ponavlja toliko časa, dokler ni zapolnjena celotna površina. Pred začetkom rasti nove plasti se mora tvoriti kristalizacijski center, t.j. dvodimenzionalno kristalizacijsko jedro. Za njegov nastanek je potrebno manj energije in tudi nižja stopnja prenasičenja, kot za nastanek primarnega homogenega jedra (2, 8).



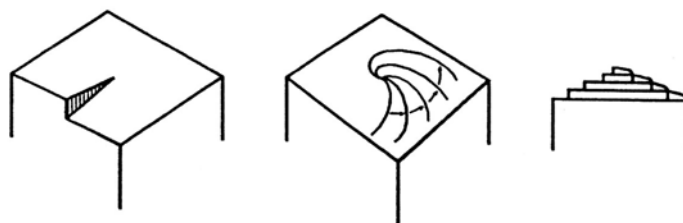
Slika 4: Gibbs-Volmerjev model kristalne rasti brez linijskih defektov: a – migracija proti željeni lokaciji, b – popolna plast, c – površinsko kristalizacijsko jedro (2).

Po Kosselovem modelu oz. modelu kontinuirane rasti naj bi kristal rasel po plasteh, vendar površina rastočega kristala ni ravna, ampak stopničasta in posejana s pikčastimi defekti. Rastne enote se integrirajo v zajede na hrapavi površini rastočega kristala, kjer je potrebna najmanjša energija za pripenjanje (slika 5). Ko so vsi defekti zapolnjeni in so vse površine kristala gladke, je potreben drug mehanizem za nadaljno rast. Nastanek nove stopnice omogoča dvodimenzionalno kristalizacijsko jedro, kot to predvideva Gibbs-Volmerjev model (2, 8).



Slika 5: Kosselov model rasti kristalne površine (8).

Model vijačne dislokacije so predstavili Burton, Cabrera in Frank (zato ga imenujemo tudi model BCF). Večina kristalov ima nepravilnosti v zgradbi, ki jih imenujemo površinski defekt. Od teh so vijačne dislokacije najpomembnejše za kristalno rast. Ko se taka vijačna motnja pojavi na jedru, začne kristal rasti stopničasto (slika 6). Nastanek dvodimenzionalnih kristalizacijskih jeder v tem primeru ni potreben (2, 8).

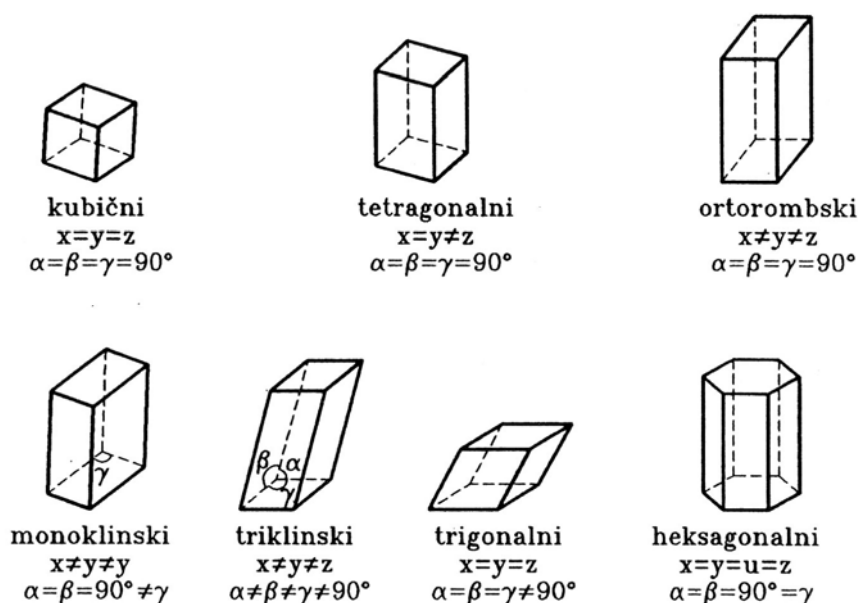


Slika 6: Model BCF (2).

1.2 NOTRANJA ZGRADBA IN ZUNANJI VIDEZ KRISTALA

V kristalografiji ločimo med notranjo zgradbo in zunanjim videzom kristala. Notranjo zgradbo oz. kristalno obliko v angleški literaturi zaznamuje beseda *form*, ki etimološko izvira iz grške *morfe* - postava, oblika. Zunanji videz oz. habitus kristala pa označuje ang. beseda *habit*, ki izhaja iz latinskega izraza za videz oziroma način rasti (9).

Pri opisovanju notranje zgradbe kristalov je najpomembnejše translatorno periodično pojavljanje izbranega geometrijskega telesa z vzporednimi nasprotnimi ploskvami, ki ga imenujemo osnovna kristalna celica (10). Vsako osnovno celico določajo celične konstante (robovi a , b , c in koti med njimi α , β in γ). Osnovne celice se medsebojno povezujejo v kristalno mrežo. Kristale razdelimo po obliki osnovne celice v sedem kristalnih sistemov: monoklinski, triklinski, trigonalni, ortorombski, tetragonalni, heksagonalni in kubični (slika 7) (2, 8).



Slika 7: Kristalni sistemi (2).

Polimorfizem je sposobnost spojine, da kristalizira v več kot eni kristalni obliki. Različne polimorfne oblike se med seboj razlikujejo v prostorski ureditvi in/ali orientaciji molekul v kristalni rešetki (razlikujejo se po obliki osnovne celice) (2, 11). Za polimorfe je značilno, da imajo enake lastnosti v tekočem in plinastem agregatnem stanju, v trdnem stanju pa se obnašajo kot različne snovi (9). V trdnem stanju izkazujejo različne fizikalne lastnosti: temperatura tališča in sublimacije, toplotna kapaciteta, entalpija, termodinamska aktivnost, topnost, optične in električne lastnosti, specifična gostota, trdnost (11). Praktičen pomen obstoja različnih polimorfnih oblik je predvsem v njihovih razlikah v topnosti in hitrosti raztapljanja, s čimer lahko vplivamo na biološko uporabnost in terapevtski učinek posameznih zdravilnih učinkovin (12). Pri določeni temperaturi in tlaku je termodinamsko stabilna samo ena polimorfna oblika, ostale so metastabilne ali nestabilne in z določeno kinetiko spontano prehajajo v stabilno.

Zunanji videz kristala (habitus) je rezultanta vpliva kinetičnih dejavnikov okolja na hitrost rasti kristala v posameznih prostorskih smereh. Navzven se ta proces kaže kot vzpodbujanje rasti enih in zaviranje nastanka drugih ploskev zaradi prisotnosti topil in različnih primesi. Na videz kristala, tj. njegovo morfologijo imajo največji vpliv tiste ploskve, ki rastejo najpočasneje (5, 8, 9). Kristali se tako razlikujejo po relativni velikosti posameznih ploskev medtem ko oblika osnovne celice ostane nespremenjena (slika 8) (2).

Zaradi različno izraženih površin se različne morfološke oblike kristala med seboj razlikujejo v vrsti in številu na površini prisotnih funkcionalnih skupin in zato tudi v površinski energiji (13).



Slika 8: Modifikacije znotraj heksagonalnega sistema (2).

Zunanji videz kristalov vpliva na nekatere pomembne formulacijske parametre, kot so porazdelitev velikosti delcev, pretočnost prahov, mešanje, aglomeracija, raztapljanje, stisljivost in trdnost tablet (5).

1.3 VPLIV POGOJEV KRISTALIZACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI KRISTALOV

1.3.1 HITROST OHLAJANJA / STOPNJA PRENASIČENJA

Hitrost ohlajanja raztopine v procesu kristalizacije preko vpliva na stopnjo prenasíčenja vpliva na hitrost nukleacije in hitrost rasti kristalov, ter s tem na velikost kristalov. Če povečamo hitrost ohlajanja se zmanjša velikost kristalov zaradi nepopolne rasti večjega števila majhnih kristalov. Nižja temperatura povzroči večje prenasíčenje, ki vodi do pospešene nukleacije in s tem nastanek večjega števila manjših kristalov (14, 15). Nukleacija je v primerjavi z rastjo kristalov hitrejši proces (2).

Nasprotno pa se pri nizki stopnji prenasíčenja zmanjša hitrost nukleacije, kar vodi do podaljšane in postopne rasti kristalov in posledično do večjih kristalov (14).

1.3.2 MEŠANJE

Mešanje vpliva predvsem na velikost oz. porazdelitev velikosti kristalov. Z mešanjem se velikost kristalov zmanjša ker se povečata tako primarna kot tudi sekundarna nukleacija. Povečana frekvenca trkov molekul topljenca, ki je posledica mešanja, lažje premaga energijsko bariero, kar je potrebno za tvorbo kristalizacijskega jedra pri primarni

nukleaciji. Pri sekundarni nukleaciji pa pride do nastanka novih kristalnih jeder zaradi lomljenja že nastalih kristalov kot posledica trkov med samimi kristali, med kristali in mešalom in/ali med kristali in steno posode. Manjša velikost kristalov je predvsem posledica povečane sekundarne nukleacije (14).

1.3.3 KRISTALIZACIJSKO TOPILO

Kristalizacijsko topilo ima pomemben vpliv na nukleacijo in kristalno rast, vendar le-ta ni natančno pojasnjen (4, 14).

Topilo, ki ga uporabimo kot kristalizacijski medij lahko vpliva tako na kristalno strukturo (5, 16, 17), kot tudi na zunanji videz kristalov (14, 15), katerih posledica so različne fizikalno-kemijske lastnosti kristalov.

Organska topila lahko razdelimo v tri skupine (18):

- polarna protična topila: proton-donorji; molekule topila se med sabo povezujejo z vodikovimi vezmi,
- dipolarna aprotična topila: dipol-dipol interakcije med molekulami topila. Vsebujejo C=O dvojno vez, brez –OH. Imajo visoko dielektrično konstanto,
- nepolarna aprotična topila: šibke van der waalsove sile med molekulami topila. Imajo nizko dielektrično konstanto.

Topnost spojine v kristalizacijskem topilu je odvisna od interakcij med topljencem in topilom (dielektrična konstanta). Večja ko je topnost, manjša je medfazna energija in večja je afiniteta med kristalizacijskim medijem in topljencem ter manjša je stopnja prenasičenja, ki je potrebna za spontano nukleacijo. To ne drži v primeru, ko se med molekulami topljenca in topila vzpostavijo močne interakcije (npr. vodikove vezi). Pred oz. med nukleacijo se morajo molekule topljenca desolvatirati, da se lahko vzpostavijo vezi med molekulami topljenca pri agregaciji le-teh v klastre. To je v primeru močnih povezav topilo-topljenec oteženo in posledično je nukleacija upočasnjena. V nekaterih primerih, ko do desolvatacije ne pride, nastanejo solvati (psevdopolimorfi – kristali, ki imajo v svojo strukturo vgrajene molekule topila) (5).

Pri nukleaciji se molekule topljenca v raztopini odvisno od narave topila povezujejo prek vodikovih vezi v različne agregate, ki so prekursorji kristalov. Različni prekursorji lahko vodijo do nastanka različnih kristalnih oblik (polimorfizem) (16).

Med kristalno rastjo lahko molekule topila tvorijo vodikove vezi s funkcionalnimi skupinami molekul topljenca, ki jih le-te potrebujejo za vgraditev v kristalno mrežo in s

tem otežujejo gradnjo kristalov. Prav tako se molekule topila lahko adsorbirajo na določene kristalne površine, s tem blokirajo rastna mesta in posledično vplivajo na hitrost rasti kristalov in videz kristalov (različna rast v različnih prostorskih smereh) (4). Različna topila vodijo do različnega vzorca kristalne rasti, ker pride do različnih interakcij med molekulami topila in različnimi ploskvami kristalov, kar vodi do spremenjene kristalne morfologije (15). Polarna topila se močneje adsorbirajo na hidrofilne ploskve (ploskve, na katerih so izpostavljene hidrofilne funkcionalne skupine; tudi prek vodikovih vezi). Rast teh ploskev je zaradi tega zavrtja in poteka pretežno na hidrofobnih ploskvah (19). V nepolarnih topilih pride do adsorpcije molekul topila na hidrofobnih ploskvah in s tem do inhibicije rasti le-teh. Pretežna rast posameznih ploskev kristala s polarno ali nepolarno površino vpliva na površinsko energijo kristalov in topnost oz. hitrost raztapljanja (preko močljivosti) (15).

Po drugi strani pa lahko ugodne interakcije med topilom in topljencem na specifičnih ploskvah vodijo do zmanjšane medfazne napetosti, kar povzroči prehod gladke površine v hrapavo, to pa posledično v hitrejšo rast te površine (15,19).

Poleg interakcij na molekularnem nivoju vplivajo na morfologijo kristalov tudi lastnosti topila, kot so viskoznost in površinska napetost (15, 17).

1.4 POVRŠINSKA ENERGIJA

Vse snovi vstopajo v interakcije z okoljem s svojimi površinami, zato nam je njihovo pravilno vrednotenje lahko v pomoč pri reševanju številnih težav v farmacevtski tehnologiji.

Mejna površina, imenovana tudi medfaza, loči dve snovi ali dve fazi iste snovi drugo od druge. Ločimo mejno površino med naslednjimi fazami: tekoče-plinasto, tekoče-tekoče, trdno-plinasto, trdno-tekoče, trdno-trdno. Na vseh mejnih površinah je prisotna prosta površinska oz. medpovršinska energija, ker medmolekulske sile v notranjosti ene homogene faze niso enake silam med molekulami na mejni površini.

Prosta površinska energija tekočine je po celotni površini tekočine enaka, njena vrednost pa je številčno enaka neposredno merljivi površinski napetosti. Površinska napetost je definirana kot delo, ki je potrebno za tvorbo 1 cm² površine tekočine, površinska energija pa je enaka delu, ki je potrebno za povečanje površine. Proces povečanja površine obsega dve glavni fazi: prekinitev vezi med istovrstnimi molekulami ter ponovno ureditev molekul

s položaja, ki so ga imele v notranjosti snovi, v položaj, ki ga imajo na površini. Zaradi prostega gibanja molekul potečeta pri tekočinah oba procesa hkrati in pride do enakomerne porazdelitve površinske energije po celotni površini tekočine (20). Tekočina se pri povečanju površine deformira elastično, kar pomeni, da se molekule razporedijo tako, da ohranijo enakomerno gostoto (21).

Zaradi različne mobilnosti molekul v trdni snovi površine trdne snovi ne moremo enačiti s površino tekočine. Pri povečanju površine trdne snovi pogosto pride do plastične deformacije, in sicer zato, ker se molekule ne morejo gibati k površini. Čeprav molekule trdne snovi težijo k vzpostavitvi ravnotežja, se to dogaja v primerjavi s tekočino zelo počasi (tudi neskončno dolgo). Posledica je povečana razdalja med molekulami. Tako je na enako veliki površini trdne snovi lahko različno število molekul, oziroma površino trdne snovi lahko povečamo, ne da bi povečali število molekul na površini. Zato površinska napetost pri trdnih snoveh ni nujno enaka prosti površinski energiji. To rezultira v različni porazdelitvi površinske energije po površini trdne snovi. Hrapava trdna površina ima različna področja z različnimi vrednostmi površinske energije (robovi kristalov imajo na primer višjo površinsko energijo od ravnih površin). Poleg kemične sestave vpliva na površinsko energijo določene trdne snovi predvsem njena zgodovina, oziroma pogoji, ki jim je bila predhodno izpostavljena (21).

Za oceno proste površinske energije trdnih snovi je na voljo nekaj metod, npr. merjenje stičnega kota s tekočinami in adsorpcija plinov, določamo pa le povprečno vrednost površinske energije na površinsko enoto (20).

Poznavanje površinske energije trdne snovi ima velik pomen pri optimizaciji lastnosti snovi, optimizaciji proizvodnih procesov izdelave zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi ter trdnih farmacevtskih oblik.

V tehnoloških procesih proizvodnje zdravil ugotavljamo, da se lahko trdne snovi obnašajo različno, odvisno od prisotnosti različnih nečistot, porazdelitve velikosti delcev, različnih oblik kristalov, hrapavosti površine (21).

2 NAMEN DELA

Pogoji kristalizacije vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti nastalih kristalov. Namen diplomske naloge je bil preučiti vpliv izbora kristalizacijskih topil na izbrane fizikalne lastnosti modelne zdravilne učinkovine K-2605/05. V ta namen smo pripravili vzorce s prekristalizacijo modelne zdravilne učinkovine iz različnih čistih organskih topil. Da bi dobili čim boljšo sliko vpliva topil, smo ostale pogoje kristalizacije, kot so režim ohlajanja in hitrost mešanja, poskušali ohranjati konstantne. Vzorce smo nato z različnimi instrumentalnimi tehnikami analizirali, iz dobljenih rezultatov pa poskušali ugotoviti korelacije z naravo (polarnostjo) topila za prekristalizacijo.

Za modelno zdravilno učinkovino K-2605/05 je bila predhodno ugotovljena samo ena kristalna oblika. V takem primeru so razlike v fizikalnih lastnostih kristalov predvsem posledica razlik v njihovem zunanem videzu.

Za karakterizacijo notranje strukture in zunanje oblike kristalov, njihovih površinskih in drugih fizikalnih lastnosti smo uporabili naslednje metode:

- rentgenska praškovna difrakcija (XRPD),
- termogravimetrična analiza (TGA),
- diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC),
- infrardeča spektroskopija (FT-IR),
- določanje prave gostote s helijevim piknometrom,
- optična in vrstična elektronska mikroskopija,
- analiza porazdelitve velikosti delcev,
- inverzna plinska kromatografija (IGC),
- kot močenja,
- določanje intrinzične hitrosti raztapljanja in kinetične topnosti.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

- K-2605/05, Krka d.d., Slovenija,
- Acetonitril, J.T.Baker, Nizozemska,
- Tetrahidrofuran, Fluka, Švica,
- Etanol, Riedel de Haën, Nemčija,
- Metanol, J.T.Baker, Nizozemska,
- Izobutanol, Fluka, Švica,
- Izopropanol, J.T.Baker, Nizozemska,
- Aceton, Merck, Nemčija,
- Etilmetilketon, Merck, Nemčija,
- Etilacetat, J.T.Baker, Nizozemska,
- 1,4-dioksan, Merck, Nemčija.

NAPRAVE ZA PRIPRAVO VZORCEV

- Magnetno mešalo z grelcem RCT basic IKA Labortechnik, Nemčija,
- Tehtnica Mettler Toledo PG6002-S Delta Range, Švica.

NAPRAVE ZA ANALIZO

- Rentgenski difraktometer Philips X'pert Pro, Nizozemska,
- DSC 822e Mettler Toledo, ZDA,
- TGA/DSC1 Mettler Toledo, ZDA,
- FT-IR Spectrometer, Spectrum 1000, Perkin Elmer, ZDA,
- Optični mikroskop Olympus BX50, povezan z digitalno kamero Olympus DP70, Japonska,
- Vrstični elektronski mikroskop Supra 35VP, Carl Zeiss, Nemčija,
- Naprava za analizo velikosti delcev Mastersizer 2000, Malvern instruments, Velika Britanija
- Naprava za določanje intrinzične hitrosti raztapljanja VanKel 7000, ZDA,
- Inkubator 100 s stresalnikom Unimax 1010, Heidolph, Nemčija,
- Helijev piknometar Accupyc 1330 Pycnometer Micromeritis, ZDA,

- Za inverzno plinsko kromatografijo (IGC) prirejeni plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N, ZDA,
- Naprava za merjenje stičnega kota: Drop Shape Analysis System - DSA100, Krüss, Nemčija

3.2 METODE

3.2.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA – XRPD

Rentgenska analiza je zelo uporabna analizna metoda za proučevanje kristalov, saj dve kemijski substanci ne moreta tvoriti kristalov, ki bi imeli identično prostorsko razporeditev ravnin v vseh smereh (22). Je ena najboljših metod za identifikacijo in kvantifikacijo polimorfov in solvatov. Podaja informacije o strukturi trdne snovi. Rentgenski žarki (*x-ray*) so del elektromagnetnega sevanja in ležijo med UV in gama žarki, z valovnimi dolžinami $100 - 0,1 \cdot 10^{-10}$ m (Å). Ko rentgenski žarki določene valovne dolžine (monokromatsko rentgensko sevanje) potujejo skozi kristal, pride do razpršitve žarkov v vseh smereh. Pogoje, pri katerih pride do loma žarkov, podaja Braggov zakon /3/ (23, 24, 25):

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \theta \quad /3/$$

kjer je n red refleksije (npr.: 1,2,3,...), λ valovna dolžina žarka, d razdalja med dvema ravninama v kristalu (Å) in θ lomni kot (°).

Rezultat rentgenske analize je difraktogram, ki podaja serijo uklonskih (difrakcijskih) črt, ki jih izmerimo pri določenih kotih. Ukloni žarkov na monokristalu nam dajejo podatke o osnovni celici, ukloni na praškastih vzorcih pa omogočajo identifikacijo fizikalne (kristalne oz. amorfne) oblike substance. Določitev kristalne strukture iz praškovega difraktograma je možna čeprav je zelo zahtevna. Za rutinsko analizo se za določitev polimorfne modifikacije uporablja primerjava difraktograma vzorca z difraktogrami referenčnih materialov (23).

Rentgenska analiza amorfne oblike nam daje le en ali več razširjenih pikov. Primerna je tudi za določanje stopnje kristaliničnosti, saj lahko iz intenzitete difraktograma kristala in amorfa določimo frakcijo kristalov v vzorcu (23, 25).

3.2.2 TERMOANALIZNE METODE

Mnoge fizikalno-kemijske lastnosti snovi lahko proučujemo s termoanaliznimi tehnikami. Aparature, ki jih uporabljamo v ta namen, delujejo na različne načine in nam dajejo različne informacije o lastnostih vzorca (12).

3.2.2.1 Termogravimetrija - TGA

TG je termoanalizna metoda, ki spremlja spremembo mase vzorca ob spreminjanju temperature. Najpogosteje se uporablja pri proučevanju desolvatacije in termičnega razpada snovi. Uporabna je za kvantitativno določanje vsebnosti celokupnih hlapnih primesi v trdni snovi (npr. ostanek topil).

Termogravimetrični (TG) analizator ima vgrajeno tehtnico, ki neprekinjeno beleži maso vzorca kot funkcijo temperature. Vzorec damo v peč, ki ni v neposrednem stiku z vzorcem in segrevamo s konstantno hitrostjo. Rezultat meritve je TG krivulja, ki nam poda spremembo mase vzorca (izguba ali prirastek mase) kot funkcijo temperature. Iz TG krivulje lahko sklepamo na fizikalne spremembe vzorca (desolvatacija). TG analizator je lahko sklopljen z masnim spektrometrom (TG-MS) ali IR spektroskopom (TG-IR), kar omogoča identifikacijo plinastih komponent, ki nastajajo oz se sproščajo med analizo (23).

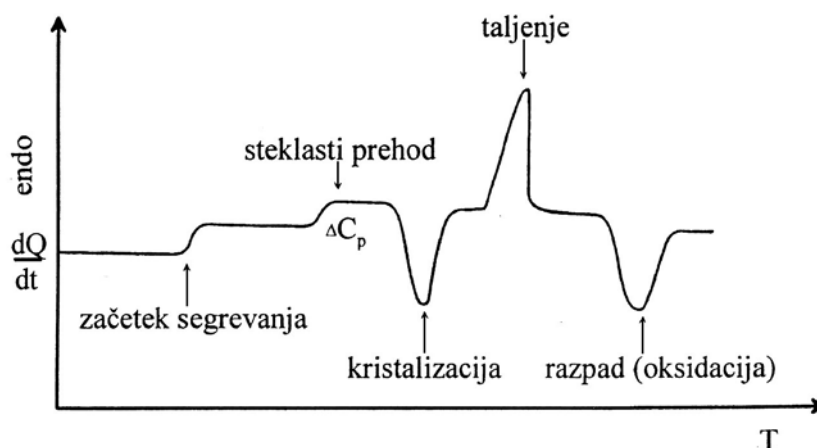
3.2.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija – DSC

Diferenčna dinamična kalorimetrija je v farmaciji najbolj uporabljana metoda termične analize. Omogoča nam merjenje razlik v toplotnem toku med preiskovanim vzorcem in referenco v odvisnosti od temperature vzorca. Kot referenco uporabljamo inertno snov npr. prazen lonček (12).

Vzorec natančno natehtamo v lonček, ki je ponavadi iz aluminija ali pa v primeru analize snovi s tališčem oz. termično spremembo, ki jo želimo določiti, nad 400°C, iz platine ali zlata.

Vzorec in referenco segrevamo ločeno z določeno hitrostjo, pri čemer sta oba izpostavljena istim pogojem (tlak, prepihovanje s plinom). Vzorec lahko energijo absorbira (endotermna reakcija) ali jo sprošča (eksotermna reakcija), zato temperaturi vzorca in reference nista več enaki. Razliko v temperaturi zaznajo senzorji, ki vključijo grelec bodisi v vzorčni (endotermna sprememba) ali referenčni celici (eksotermna sprememba) in temperatura se izenači. Merimo razliko v toplotnem toku (dH/dt), ki ga moramo dovajati, da dosežeta

vzorec in referenca isto temperaturo. Rezultat je DSC krivulja odvisnosti toplotnega toka (dH/dt) od temperature (T) (slika 9) (12).



Slika 9: DSC krivulja z najpogostejšimi prehodi, ki jih lahko opazimo pri analizi trdnega vzorca (12).

Z vrhovi ("piki") označujemo spremembo entalpije in območje temperature, v katerem je do spremembe prišlo. Z DSC lahko proučujemo polimorfizem, določamo vsebnost nečistot ter naslednje fizikalno-kemijske lastnosti snovi:

- tališče, temperaturno območje taljenja, temperaturo kristalizacije,
- entalpijo (toploto) taljenja,
- toplotno kapaciteto,
- odparevanje, desorpcijo,
- steklasti prehod,
- termično stabilnost,
- oksidacijske razpade,
- kinetiko reakcije razpada.

Diferenčni dinamični kalorimeter je potrebno pred meritvami kalibrirati. Gre za eksperimentalno določitev odvisnosti izmerjenega signala in toplotnega toka z uporabo standardne referenčne snovi z znanimi in dobro definiranimi lastnostmi (ponavadi indij) (12).

Prednosti DSC so hitra priprava vzorca, hitrost analize ter možnost analiziranja trdnih snovi in tekočin v širokem temperaturnem območju. Omejitve se pojavijo kadar v vzorcu potekajo v istem temperaturnem območju termične spremembe različnega izvora. V tem

primeru je težko opredeliti naravo prehoda, saj se le-ti lahko prekrivajo (npr. taljenje in rekristalizacija). Omejitve metode se pojavijo tudi pri zelo šibkih prehodih, pri merjenjih zelo majhnih sprememb toplotne kapacitete ali pri določevanju toplotne kapacitete pri izotermnih pogojih. Metodi, ki omogočata premagovanje omejitev klasične DSC metode sta diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature in hyper DSC (večja občutljivost) (26).

3.2.3 INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

Pri absorpcijskih spektroskopskih analiznih metodah gre za vzbujanje molekul s svetlobnim sevanjem določene valovne dolžine oz. energije.

Delovno območje IR spektroskopije je del spektra elektromagnetnega valovanja z valovnimi dolžinami 0,78 - 1000 μm .

IR spekter razdelimo na območja:

- bližnje (*near*): 0,78 - 2,5 μm ,
- srednje (*middle*): 2,5 - 50 μm ,
- daljno (*far*): 50 - 1000 μm .

Energija IR sevanja je dovolj velika, da povzroči molekulska nihanja in rotacije, toda premajhna, da bi povzročila prehod elektronov na višji energijski nivo. Da pride do absorpcije IR sevanja, morajo molekulska nihanja in vibracije povzročiti spremembo dipolnega momenta molekule. Kadar se frekvenci sevanja in vibracij ujemata, absorbirano sevanje povzroči spremembo amplitude molekulskih vibracij. IR neaktivne so molekule s centrom simetrije in homonuklearne molekule (N_2 , O_2 , Cl_2), saj v tem primeru med nihanjem in rotacijami ne prihaja do sprememb dipolnega momenta. Rezultat meritev je IR spekter z absorpcijskimi trakovi v karakterističnih frekvenčnih območjih (27).

Uvedba FT-IR (IR spektroskopija, pri kateri za procesiranje signala uporabljamo Fourierjevo transformacijo) je prinesla mnoge prednosti pred običajno metodo: visoka selektivnost, visoka ločljivost, hitro snemanje spektra... Je zelo uporabna metoda za proučevanje zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi. Še posebno uporabna je za identifikacijo različnih polimorfov in psevdopolimorfov, kjer snemamo vzorce v trdnem stanju (komprimati s KBr ali NaCl, ki ne absorbirata IR sevanja) (27).

3.2.4 DOLOČANJE PRAVE GOSTOTE S HELIJEVIM PIKNOMETROM

Gostota snovi je pomemben parameter pri napovedovanju obnašanja praškastih trdnih snovi v različnih tehnoloških procesih. Definirana kot razmerje med njeno maso m in volumnom V /4/:

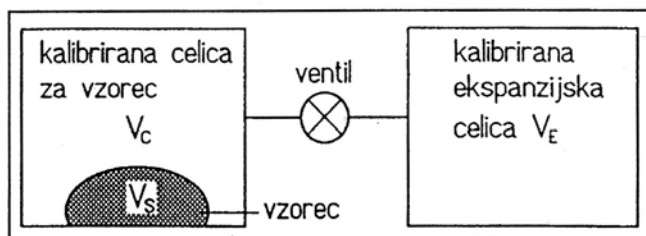
$$\rho = \frac{m}{V} \quad /4/$$

Določevanje gostote je preprost pristop za ugotavljanje vrste snovi in njihove čistote, kot tudi za ugotavljanje sprememb strukture vzorcev.

V nekem volumnu trdnih delcev so poleg njih prisotni še prazni prostori, ki jih zapolnjuje zrak, kar otežuje določanje pravega volumna snovi. Tej težavi se izognemo z metodo določanja prave gostote s helijevim piknometrom. Helij se uporablja zaradi majhne velikosti atoma, tako da lahko prodira tudi v najmanjše pore, njegova inertnost pa izključuje adsorpcijo na trdne površine. Metoda je nedestruktivna in je uporabna pri vseh trdnih snoveh.

S helijevim piknometrom določamo volumen vzorca preko spremembe tlaka helija v celici z določenim volumnom. Iz podatka za maso, ki ga dobimo s tehtanjem, piknometer izračuna gostoto (28).

Bistvena dela naprave sta celica za vzorec (V_c) in ekspanzijska celica (V_e) (slika 10).



Slika 10: Prikaz obeh celic helijevega piknometra (28).

V celico vložimo natehtan vzorec neznanega volumna (V_s) in jo napolnimo z znano množino helija. Tlak v celici naraste na tlak P_1 . Za celico V_c velja enačba /5/:

$$P_1 \cdot (V_c - V_s) = n_c \cdot R \cdot T \quad /5/$$

pri čemer je n_c množina helija v celici V_c , R splošna plinska konstanta in T temperatura.

Za ekspanzijsko celico velja enačba /6/:

$$P_a \cdot V_e = n_e \cdot R \cdot T \quad /6/$$

kjer je P_a tlak helija, s katerim je bila preprihana ekspanzijska celica pred meritvijo in je enak tlaku v prostoru (atmosferskemu tlaku) (28).

Ko odpremo ventil med celicama, tlak P_1 pade na ravnotežno vrednost P_2 /7/:

$$P_2 \cdot (V_c - V_s + V_e) = n_c \cdot R \cdot T + n_e \cdot R \cdot T \quad /7/$$

Delovna enačba helijevega piknometra /8/:

$$V_s = V_c - \frac{V_e}{\frac{(P_1 - P_a)}{(P_2 - P_a)} - 1} \quad /8/$$

3.2.5 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA – SEM

Z vrstično elektronsko mikroskopijo lahko z veliko ločljivostjo proučujemo morfologijo površin trdnih snovi. Namesto bele svetlobe kot pri optičnem mikroskopu vrstični elektronski mikroskop za preučevanje površine uporablja snop elektronov. V vrstičnem elektronskem mikroskopu elektroni potujejo v vakuumu. Preko kondenzorskih in objektivnih leč zadenejo ustrezno nameščen vzorec. Vakuum je potreben zato, da ohranimo snop elektronov čim bolj homogen. Pri interakciji med pospešenim primarnim snopom elektronov in površino vzorca dobimo odbite elektrone, sekundarne elektrone, Augerjeve elektrone in rentgenske žarke različnih energij. Odbiti in izbiti elektroni se gibljejo po komori, v kateri je nameščen detektor. Elektroni, ki zadenejo detektor, izzovejo signal. Elektronska vezja ta signal pretvorijo v sliko, ki jo dobimo na zaslonu.

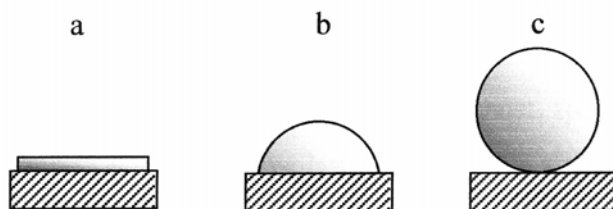
Preiskovani vzorec se nahaja v komori na nosilcu, ki ima opcije vrtenja okoli osi in nagiba, tako da lahko vzorec opazujemo z vseh strani. Za opazovanje površine vzorcev lahko uporabimo sekundarne emitirane elektrone. Topografija vzorcev vpliva na njihovo smer in intenziteto, zato na zaslonu različno orientirane ploskve vidimo kontrastno, kar omogoča globinsko ostrino, torej realno sliko površine. Če so preiskovani vzorci slabo elektronsko prevodni, jih napršimo s tankim filmom prevodnega materiala (npr. zlatom). Na ta način preprečimo, da se vzorec pri izpostavitvi elektronskemu snopu električno nabije. Električno neprevoden vzorec se lahko poškoduje (toplotno, radiacijsko), kar lahko povzroči spremembo strukture vzorca (24, 29).

3.2.6 MOČLJIVOST IN DOLOČANJE STIČNEGA KOTA

Močljivost je definirana kot sposobnost tekočine, da se razprostira po površini trdne ali tekoče snovi, ki v njej ni topna oziroma se z njo ne meša.

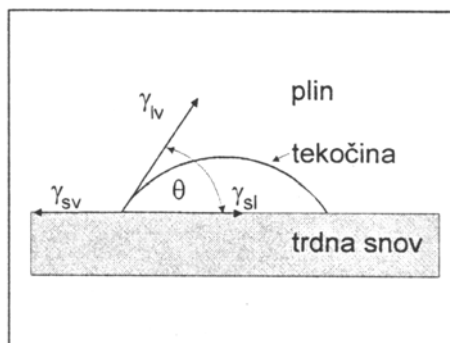
Merilo za močljivost trdnih snovi je stični kot oz. kot močenja (θ). Površinske in medpovršinske energije določajo, kaj se bo s kapljico tekočine zgodilo, ko bo v stiku z mejno površino. Stični kot lahko zavzame vrednosti od 0° do 180° . Geometrijsko ga opišemo s tangento na površino kapljevine ob stiku s trdno snovjo (28).

Kapljevina moči trdnino, če je kot močenja manjši od 90° . Če je stični kot večji od 90° velja, da kapljevina trdne snovi ne moči. Mejna primera sta $\theta = 0^\circ$, ko kapljevina popolnoma moči trdnino in $\theta = 180^\circ$, ko kapljevina popolnoma ne moči trdnine (slika 11).



Slika 11: Shematski prikaz različnih stopenj močenja: a - popolno močenje, b - delno močenje, c - popolno nemočenje (28).

Na sliki 12 so predstavljene sile, ki delujejo na kapljico tekočine na površini trdne snovi. Površinska energija trdne snovi γ_{sv} povzroča razširjanje kapljice, medtem ko temu procesu nasprotujeta medfazna energija med trdno snovjo in tekočino γ_{sl} in vodoravna komponenta površinske napetosti tekočine $\gamma_{lv} \cdot \cos\theta$.



Slika 12: Ravnovesje sil, ki jim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino (28).

Stični kot je odvisen od medfaznih napetosti med trdno, tekočo in plinasto fazo. Odvisnost opisuje Young-Duprejeva enačba /9/:

$$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cdot \cos \theta \quad /9/$$

kjer je γ_{sv} površinska energija trdne snovi, γ_{sl} medfazna napetost med tekočino in trdno snovjo, γ_{lv} površinska napetost tekočine ter $\cos \theta$ kosinus stičnega kota (28).

Lastnosti zunanje površine kristala bodo odvisne od tekočine, iz katere je snov kristalizirala (znotraj kristala so funkcionalne skupine, ki so manj primerne za to tekočino). Kristalna oblika lahko spremeni površinske lastnosti kristala. Če delec ni popolnoma kristaliničen, ampak je na površini amorfen, ima površina molekularno mobilnost, tako da se molekule lahko reorientirajo in zmanjšajo prosto površinsko energijo pri kontaktu s trdno ali katerokoli drugo fazo. Pogosto velja, da sprememba v kristalni obliki (npr. polimorfizem) lahko spremeni hitrost raztapljanja ali topnost zdravilne učinkovine (30).

Obstaja več metod za goniometrično (metoda sedeče kapljice) določanje stičnega kota kapljice na površini trdne snovi:

- neposredno merjenje kota s pomočjo mikroskopa oz. »*Contact angle*« metra, ki omogoča merjenje s pomočjo vgrajene merilne skale
- fotografiranje kapljice in določitev višine h ter polmera r kapljice, stični kot pa izračunamo s pomočjo enačbe /10/:

$$\tan \frac{\theta}{2} = \frac{h}{r} \quad /10/$$

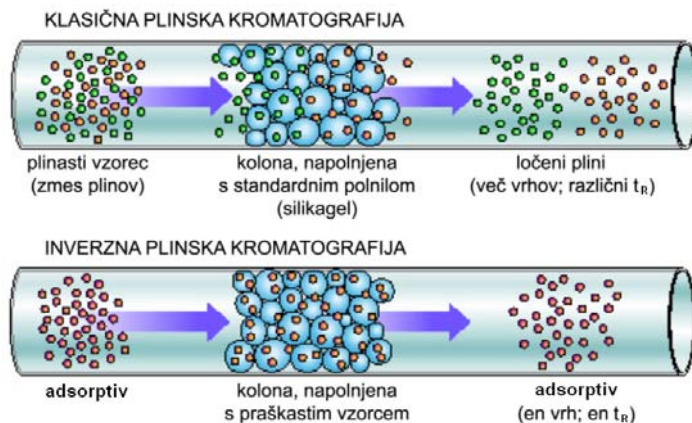
- snemanje kapljice s posebno aparaturo in določanje stičnega kota iz video slike

V diplomski je bila uporabljena slednja. Prednost metode z uporabo kamere za slikanje ali snemanje je, da lahko kapljico hitro posnamemo in se s tem izognemo dinamičnim vplivom (spreminjanje stičnega zaradi neravne površine, pronicanja tekočine v vzorec). Pri analizi posnetkov se ponavadi uporabi računalniški program, ki izračuna stični kot z različnimi metodami. Te metode se razlikujejo glede na matematični model, ki se uporabi za izračun stičnega kota in glede na to ali se pri izračunu upošteva oblika celotne kapljice, del kapljice ali le območje faznega stika trdno-tekoče-plinasto (13). Teoretično najbolj natančna metoda za izračun stičnega kota je Young–Laplaceovo prilaganje ali analiza aksisimetrične oblike kapljice (axisymmetric drop shape analysis – ADSA). Pri tej metodi program obdela celotno obliko kapljice, prilaganje oblike pa vsebuje popravek, ki upošteva, da poleg medfaznih interakcij vpliva na obliko kapljice tudi masa tekočine (31).

Neposredno merjenje stičnega kota praškov ni mogoče, zato pripravljamo stisnjene ploščice. Metode s stiskanjem pa imajo določene pomanjkljivosti. V veliko primerih praški niso zadovoljivo stisljivi, zaradi tega ploščice niso pravih oblik. S stiskanjem pa lahko povzročimo spremembe v lastnostih površine. Tako lahko pride do lomov, zaradi katerih nastane nova površina ali pa pride do plastične deformacije (28).

3.2.7 INVERZNA PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Inverzna plinska kromatografija (IGC) je nadgradnja konvencionalne plinske kromatografije. Pri metodi IGC za merjenje uporabljamo modificirani plinski kromatograf z nameščeno stekleno kolono znane dolžine in notranjega premera, napolnjeno s preučevanim praškastim vzorcem. Vzorec predstavlja stacionarno fazo. Mobilno fazo predstavlja inertni nosilni plin (dušik ali helij), ki s stacionarno fazo ne vstopa v interakcije. V interakcije z vzorcem vstopajo le polarni in nepolarni standardi (adsorptivi - plinske faze organskih topil), ki jih s pomočjo injektorja injiciramo v kolono in se eluirajo z nosilnim plinom (slika 13) (32).



Slika 13: Primerjava IGC in klasične plinske kromatografije (32).

Vsak standard, ki se eluira, potrebuje za pot od začetka kolone (injektorja) do izhoda kolone (detektorja) določen čas (retencijski čas). Detektor je lahko FID -Flame Ionization Detector ali TCD -Thermal Conductivity Detector. Na podlagi dobljenih podatkov za retencijski čas oziroma retencijski volumen izračunamo površinsko energijo preiskovane snovi.

Prekratki retencijski časi ne omogočajo zadostnih interakcij med molekulami parne faze in visoko energetskimi mesti na površini vzorca in s tem zanesljive ločbe. Predolgi retencijski časi pa tudi niso primerni, saj v tem primeru prihaja do neželenih interakcij z nizko energetskimi mesti. Retencijske čase nadzorujemo s spreminjanjem pretoka nosilnega plina, s temperaturo vzorca ali z dolžino kolone. Poudarek pri merjenju z IGC je na t.i. neskončnem redčenju adsorptiva, ki omogoča proučevanje interakcij samo med molekulami plinske in trdne faze ob odsotnosti interakcij med molekulami plina (32).

Iz izmerjenih retencijskih časov izračunamo retencijski volumen nosilnega plina za posamezen adsorptiv V_n , ki predstavlja volumen mobilne faze, potreben za elucijo adsorptiva iz kolone /11/:

$$V_n = jF(t_r - t_o) \quad /11/,$$

kjer je j korekcijski parameter, ki upošteva stisljivost nosilnega plina, F volumski pretok nosilnega plina, t_r retencijski čas adsorptiva ter t_o retencijski čas metana.

Pri tehniki neskončnega redčenja termodinamsko opišemo naslednje ravnotežje /12/:

$$\Delta G_a^\circ = -\Delta G_d^\circ = RT \ln \frac{V_n P_{sg}}{S m \pi_o} \quad /12/,$$

kjer je ΔG_a° prosta energija adsorpcije, ΔG_d° prosta energija desorpcije, P_{sg} standardni tlak plina, π_o standardni površinski tlak adsorbiranega filma, ko so razdalje med molekulami adsorbiranega plina enake razdaljam med molekulami v plinski fazi, S specifična površina preiskovane snovi in m masa preiskovane snovi.

Ker sta P_{sg} in π_o konstanti, lahko zapišemo /13/:

$$\Delta G_a^\circ = RT \ln V_n + C \quad /13/,$$

kjer je V_n retencijski volumen in C konstanta, odvisna od izbranega standardnega stanja.

Prosta energija adsorpcije ΔG_a° je v sorazmerju z adhezijskim delom W_a in površino adsorbiranih molekul a . Zapišemo lahko /14/:

$$\Delta G_a^\circ = N_a a W_a \quad /14/,$$

kjer je N_a Avogadrovo število. Adhezijsko delo je sicer definirano kot delo, potrebno za ločitev enote površine dveh tekočin.

Nepolarni prispevek k adhezijskemu delu W_a^d med dvema površinama lahko izrazimo kot dvakratnik korena produkta nepolarnih prispevkov k površinski energiji tekočine in trdne snovi /15/:

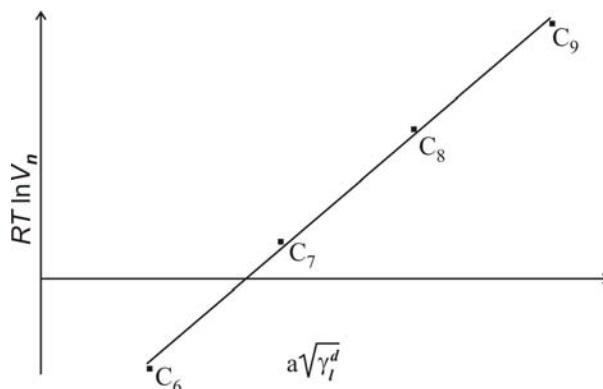
$$W_a^d = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} \quad /15/,$$

kjer je γ_s^d nepolarni prispevek k površinski energiji trdne snovi in γ_l^d nepolarni prispevek k površinski napetosti tekočine.

Pri uporabi adsorptivov, ki vstopajo v interakcije s trdno površino le z Londonovimi disperzijskimi silami je adhezijsko delo odvisno le od nepolarnih (disperzijskih) interakcij na medpovršini. Taki adsorptivi so alkani z različno dolžino verige: heksan, heptan, oktan, nonan, dekan. V tem primeru je $W_a = W_a^d$ in s kombinacijo enačb (13,14 in 15) lahko izpeljemo /16/:

$$RT \ln V_n = 2N_a \sqrt{\gamma_s^d} a \sqrt{\gamma_l^d} + C \quad /16/.$$

V diagramu $RT \ln V_n = f(a\sqrt{\gamma_l^d})$ po metodi najmanjših kvadratov narišemo premico in iz njenega naklona izračunamo γ_s^d (slika 14).



Slika 14: Diagram $RT \ln V_n = f(a\sqrt{\gamma_l^d})$ za n-alkane (32).

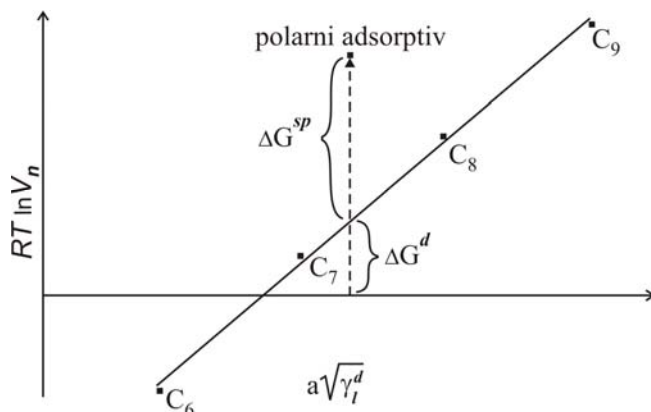
Ko v kolono uvedemo polarne adsorptive, se med njimi in praškastim vzorcem vzpostavijo tako specifične (polarne) kot tudi disperzijske (nepolarne) interakcije. Prosta energija adsorbcije ΔG° je zanje podana kot /17/:

$$\Delta G^\circ = \Delta G^d + \Delta G^{sp} \quad /17/,$$

kjer predstavlja ΔG^{sp} specifično komponento in ΔG^d nespecifično komponento proste

energije adsorpcije. Točka, ki ustreza posameznemu polarnemu plinu, leži nad referenčno premico n-alkanov (slika 15). Iz razlike med njeno ordinato in projekcijo na referenčni premici izračunamo ΔG^{sp} /18/, ki karakterizira polarne interakcije med omenjenim adsorptivom in vzorcem:

$$\Delta G^{sp} = RT \ln V_n - \Delta G^d \quad /18/.$$



Slika 15: Izračun ΔG^{sp} za polarni adsorptiv (32).

Na osnovi specifičnih interakcij med polarnimi molekulami in preiskovano snovjo lahko določimo kisle in bazične konstante preiskovane snovi z upoštevanjem donorskih (DN) in akceptorskih (AN^*) števil za polarne molekule. Za izračun kisló-bazičnih komponent površinske energije preiskovane snovi uporabimo Gutmannovo enačbo /19/:

$$\frac{\Delta G^{sp}}{AN^*} = K_A \frac{DN}{AN^*} + K_D \quad /19/$$

Po Gutmannu lahko tekočine opredelimo glede na donorsko ali akceptorsko število (preglednica 1). Donorsko število DN označuje bazičnost oziroma elektron donorske lastnosti. Akceptorsko število AN pa označuje kislost oziroma elektron akceptorske lastnosti. Riddle in Fowkes sta predlagala korekcije parametra AN (AN^* je korigirana AN vrednost) (32).

Preglednica 1: Površinska napetost (γ_1^d), elektron donorsko (DN) in elektron akceptorsko število (AN in AN*) nekaterih adsorptivov v uporabi pri IGC (32):

Tekočina	γ_1^d (mJ/m ²)	DN (kcal/mol)	AN	AN* (kcal/mol)	Lastnost
C ₆ H ₁₄ → C ₁₀ H ₂₂	18,4 → 23,4	0	0	0	nevtralni
tetrahidrofuran	22,5	20	8	0,5	bazičen
acetone	16,5	17	12,5	2,5	amfoteran
etilacetat	19,6	17,1	9,3	1,5	amfoteran
kloroform	25,9	0	23,1	5,4	kisel

Ker pri IGC ni predhodne obdelave vzorca, se tako izognemo spremembam površine delcev, ki so sicer pri ostalih metodah precej pogoste. Vzorec moramo pred pričetkom meritev prepihovati s suhim nosilnim plinom. Metoda IGC postaja vse bolj uporabna. Z njo med drugim iščemo razlike med serijami zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi (*»batch-to-batch«*), razlike pred mletjem snovi in po njem, raziskujemo vpliv vlažnosti na površino, lahko pa tudi določamo temperaturo steklastega prehoda amorfnim vzorcem (32).

3.2.8 DOLOČANJE INTRINZIČNE HITROSTI RAZTAPLJANJA – IDR

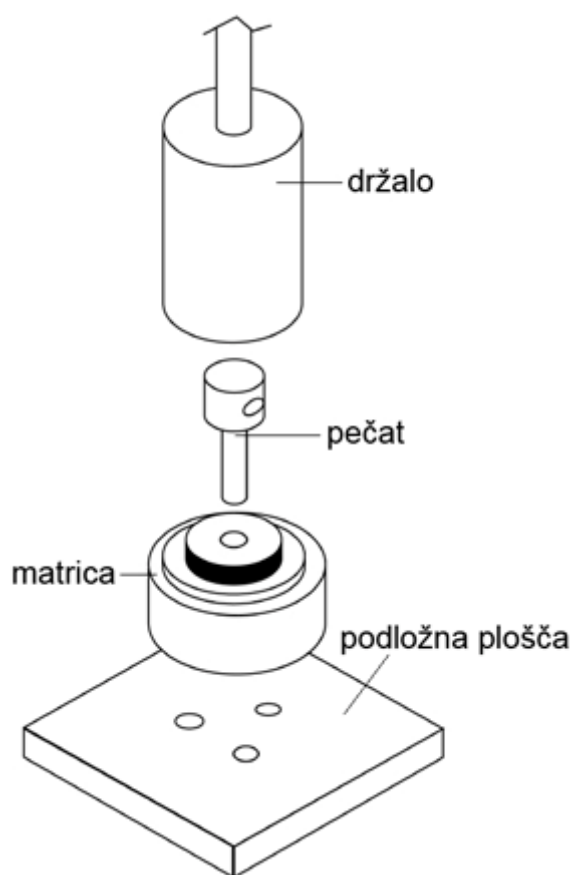
Raztapljanje je dinamičen proces, pri katerem molekule topljenca prehajajo v topilo. Hitrost raztapljanja je definirana kot količina trdnega topljenca, ki v časovni enoti preide v raztopino in je odvisna od interakcij molekul topljenca in topila (20).

Testi raztapljanja so eni najpogostejše uporabljenih metod za karakterizacijo učinkovin in za kontrolo kakovosti določenih farmacevtskih oblik. Še posebej so pomembni pri učinkovinah, katerih hitrost absorpcije je pogojena s hitrostjo raztapljanja (33). Na hitrost raztapljanja in biološko uporabnost učinkovine vplivajo njene lastnosti v trdnem stanju: kristaliničnost, amorfnost, polimorfizem, hidracija, solvatacija, velikost delcev in njihova površina.

Intrinzična hitrost raztapljanja učinkovine (IDR – intrinsic dissolution rate) je definirana kot hitrost raztapljanja čiste učinkovine s konstantne površine pri konstantnih pogojih (temperatura, hitrost mešanja, pH in ionska jakost medija za raztapljanje). Ker gre za preizkuse na čistih substancah (zdravilnih učinkovinah), se metoda uporablja tudi za

preizkušanje kemične ekvivalence učinkovin, ki so bile sintetizirane po različnih postopkih (33).

Naprava za določanje IDR sestoji iz pečata in matrice, ki ima na spodnji strani tri navoje, ki omogočajo pritrditev gladke podložne plošče (slika 16). V matrično vdolbino vsujemo natehtano količino preiskovane snovi, vstavimo pečat in stisnemo s pomočjo hidravlične stiskalnice. Pri tem nastane neporozni komprimat, ki ima na spodnji strani površino definirane velikosti. Odstranimo podložno ploščo, matrico namestimo na držalo, to pa na napravo za mešanje (ki vrtili držalo z matrico) in potopimo v termostatisiran testni medij za raztapljanje. Pri tem moramo paziti, da ne pride do nastanka zračnih mehurčkov na površini snovi, ki bi vodili do napak (34).



Slika 16: Sestavni deli naprave za pripravo komprimata z držalom (35).

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 PRIPRAVA VZORCEV

Različne vzorce smo pripravili s prekristalizacijo izhodne modelne zdravilne učinkovine K-2605/05 iz izbranih čistih organskih topil: acetonitril, tetrahidrofuran, etanol, metanol, izobutanol, izopropanol, aceton, etilmetilketon, etilacetat in 1,4-dioksan.

Aparatura za prekristalizacijo je bila sestavljena iz trogrle bučke, povratnega hladilnika, termometra in magnetnega mešala. 10 g izhodne modelne zdravilne učinkovine K-2605/05 smo suspendirali v ustrezni količini topila in segrevali na refluxu do vrelišča topila. Nato smo dodajali topilo dokler ni prišlo do popolne raztopitve, tako da smo dobili nasičeno raztopino pri temperaturi vrelišča topila. Še vročo raztopino smo filtrirali in počasi ohlajali pri konstantnem mešanju z magnetnim mešalom s hitrostjo 370 obratov na minuto. Ko se je raztopina ohladila na 30°C, smo jo še 1 uro mešali pri sobni temperaturi, nato pa še dve uri in pol na ledu (pri temperaturi od -5°C do 0°C). Izpadlo oborino smo nato odnučali in sprali z majhno količino hladnega topila. Oborino smo nato sušili na zraku pri sobni temperaturi, dokler ni bila vsebnost rezidualnih topil nižja od 1%. Tako hitrost mešanja, kot režim ohlajanja sta bila pri pripravi vseh vzorcev enaka.

Preglednica 2: Uporabljena prekristalizacijska topila, njihove dielektrične konstante in temperature vrelišča, ter eksperimentalni podatki topnosti modelne zdravilne učinkovine v topilih pri temperaturi njihovega vrelišča.

Oznaka vzorca	prekristalizacijsko topilo	dielektrična konstanta	temp. vrelišča (°C)	topnost pri temp. vrelišča (mg/mL)
K-2605/05-1	acetonitril	35,69	81,6	122
K-2605/05-2	tetrahidrofuran	7,43	66,2	233
K-2605/05-3	etanol	24,85	78,3	107
K-2605/05-4	metanol	32,61	64,5	150
K-2605/05-5	i-butanol	16,78	108	200
K-2605/05-6	i-propanol	19,26	82,3	55
K-2605/05-7	aceton	20,49	56,5	69
K-2605/05-8	etilmetilketon	18,25	80	125
K-2605/05-9	etilacetat	5,99	77	19
K-2605/05-12	1,4-dioksan	2,21	101	355

4.2 ANALIZNE METODE

4.2.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA ANALIZA

Rentgenske difraktograme vzorcev smo posneli na rentgenskem praškovem difraktometru Philips X'pert Pro pri naslednjih pogojih:

- $\text{CuK}\alpha$ radiacija,
- območje od $2,9280$ do $31,0615^\circ 2\theta$,
- korak $0,0167^\circ 2\theta$,
- integracijski čas $250,190$ s,
- valovna dolžina $1,54187 \text{ \AA}$.

4.2.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Vzorci smo analizirali v perforiranih aluminijastih lončkih na aparatu DSC822e proizvajalca Mettler Toledo. Analizo smo opravili pod naslednjimi pogoji:

- hitrost segrevanja $10^\circ\text{C}/\text{min}$,
- atmosfera N_2 ,
- temperaturno območje $20 - 220^\circ\text{C}$.

Instrument je bil dnevno kalibriran. Kot standarda smo uporabili indij (tališče $156,6^\circ\text{C}$, talilna entalpija $28,45\text{J/g}$) in kositer (tališče $231,8^\circ\text{C}$, talilna entalpija $60,46\text{J/g}$).

4.2.3 TERMOGRAVIMETRIČNA ANALIZA

Vzorci smo analizirali v odprtih platinastih lončkih na aparatu TGA/DSC1, proizvajalca Mettler Toledo. Analizo smo opravili pri naslednjih pogojih:

- hitrost segrevanja $10^\circ\text{C}/\text{min}$,
- atmosfera N_2 ,
- temperaturno območje $20 - 220^\circ\text{C}$.

4.2.4 SREDNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

Srednje infrardeče spektre vzorcev smo snemali s FT-IR spektrometerom Spectrum 1000, proizvajalca Perkin Elmer pri naslednjih pogojih:

- območje snemanja $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$,
- ločljivost 2 cm^{-1} ,
- interval 1 cm^{-1} .

1 mg vzorca smo v terilnici dodali 64 mg KBr, premešali s pistilom in s pomočjo hidravlične stiskalnice stisnili v tabletko, kateri smo nato posneli IR spekter.

4.2.5 DOLOČANJE PRAVE GOSTOTE

Uporabljali smo helijev piknometar Accupyc 1330. Celico helijevega piknometra smo do $\frac{2}{3}$ napolnili z vzorcem, katerega maso smo natehtali z analizno tehtnico.

4.2.6 ANALIZA OBLIKE DELCEV

Vzorci smo opazovali z optičnim mikroskopom Olympus BX50, izbrane vzorce pa nato še z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35VP. Pri ustreznih povečavah smo posneli fotografije za posamezne vzorce.

4.2.7 ANALIZA PORAZDELITVE VELIKOSTI DELCEV

Analizo porazdelitve velikosti delcev smo opravili z napravo za analizo velikosti delcev Mastersizer 2000. Posamezne vzorce smo dispergirali v vodi. Velikost delcev je podana v volumskih odstotkih.

4.2.8 INVERZNA PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Analizo smo opravili z za IGC prirejenim plinskim kromatografom Agilent Technologies 6890N. Približno 300 mg vzorca smo napolnili v stekleno kolono, ki smo jo nato prepihovali pri temperaturi 30°C in s stalnim pretokom nosilnega plina helija 5 ml/min najmanj 5 ur.

Pogoji analize:

- uporabljeni adsorptivi: metan, n-heksan, n-heptan, n-oktan, n-nonan, tetrahidrofuran, aceton, dietilacetat, kloroform,

- 2 paralelki pri pretoku nosilnega plina helija 5 ml/min,
- temperatura kolone 30°C,
- temperatura injektorja 150°C,
- temperatura detektorja 250°C.

4.2.9 MERJENJE STIČNEGA KOTA

Stični kot, ki ga tvori kapljica tekočine na preiskovanih vzorcih smo določali z metodo sedeče kapljice s pomočjo aparature Krüss Drop Shape Analysis – DSA 100 povezano z osebnim računalnikom in ob uporabi računalniškega programa Krüss Drop Shape Analysis.

Približno 200 mg vzorca smo stresli v kalup in ga s pomočjo hidravlične stiskalnice stisnili s silo 8 ton (15 s) v tabletko. Za testno tekočino smo izbrali 0,01M HCl. Volumen injicirane kapljice na preiskovano površino je bil 3 µL. Stični kot smo določili takoj zatem, ko smo dvignili iglo iz kapljice. Pazili smo, da je bila kapljica na trdni površini ustrezno osvetljena in slika kapljice, posneta z vgrajeno kamero, ustrezno izostrena, da je lahko računalniški program pravilno ocenil obliko kapljice. Iz ustrezne slike kapljice je računalniški program določil stični kot tekočine na trdni snovi z metodo Young-Laplaceovega prileganja.

4.2.10 INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA

Intrinzično hitrost raztapljanja smo določali po predpisih USP na aparaturi VanKel 7000. V valjaste posode smo nalili 900 ml medija za raztapljanja (0,01M HCl), jih postavili na termostatisirano vodno kopel ($37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) in nastavili hitrost vrtenja nastavkov na 100 obratov/min.

Po 200 mg vzorca smo stresli v matrično vdolbino, vstavili pečat in s hidravlično stiskalnico pri obremenitvi 1 tone stisnili v komprimat, ki ima na spodnji strani površino $0,5\text{ cm}^2$. Po odstranitvi podložne plošče smo nastavke vstavili v držala in spustili v medij za raztapljanje, 2,5 cm od dna valjaste posode. Vzorčili smo ročno, z injekcijsko brizgo preko filtrskih nastavkov. Koncentracijo raztopljene modelne zdravilne učinkovine smo določali s HPLC analizo.

4.2.11 KINETIČNA TOPNOST

Za določanje kinetične topnosti smo uporabili metodo s stresanjem (ang. *shake flask method*). V erlenmajerico smo zatehtali 10 mg vzorca, dodali 20 ml testnega medija in 1 uro stresali na stresalniku Unimax 1010 v inkubatorju pri 37°C. Nastalo raztopino smo nato filtrirali, vsebnost raztopljene zdravilne učinkovine pa vrednotili s HPLC.

Kinetično topnost smo določali v naslednjih testnih medijih:

0,01M HCl,

fosfatni pufer pH = 6,8.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

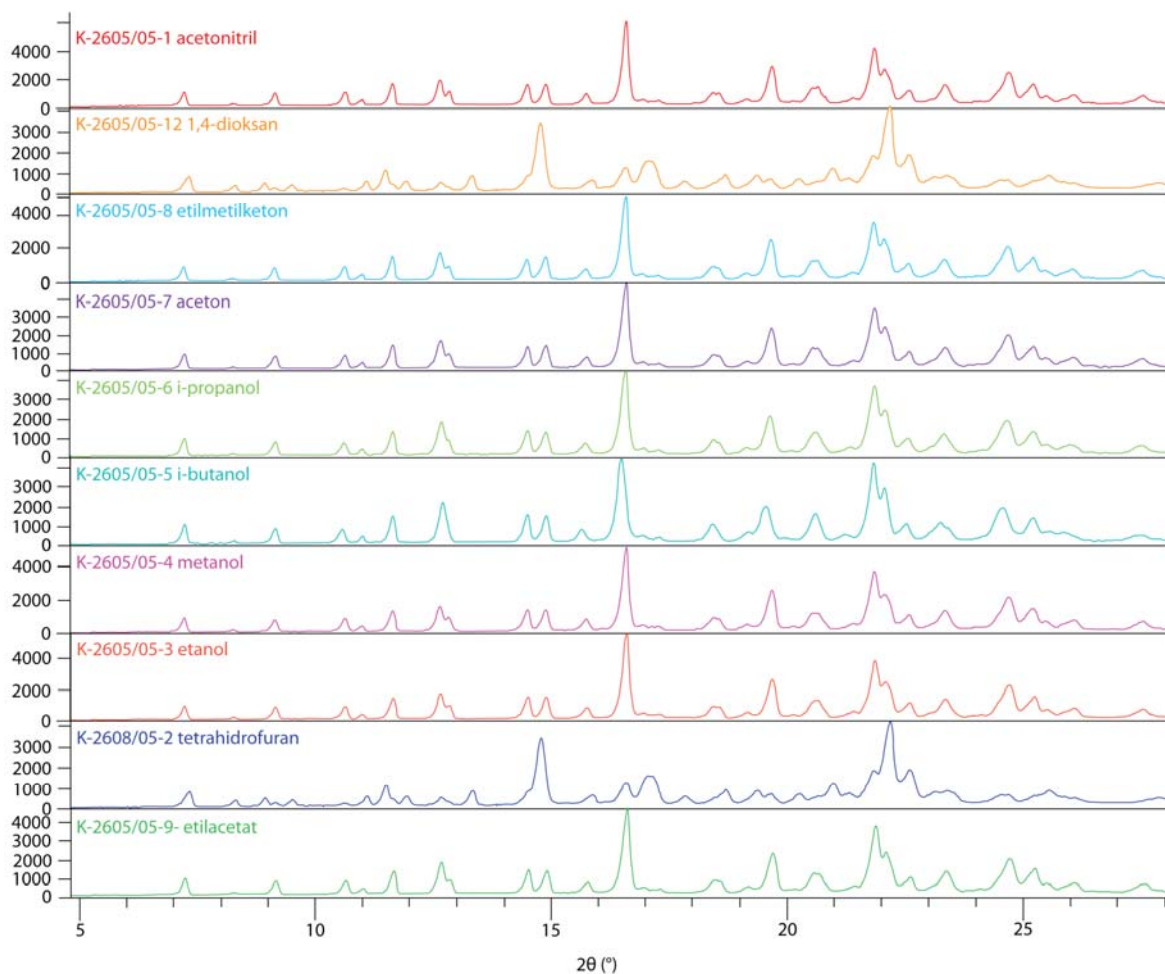
Rentgenska praškovna analiza je zelo uporabna metoda za študij kristalne strukture trdnih snovi. Ima prednost pred ostalimi metodami, ker je nedestruktivna in predhodna priprava vzorcev ni potrebna. Metoda je zanesljiva za določanje kristalnih oblik v vzorcih, ki vsebujejo le eno obliko, saj so difrakcijski piki posameznih oblik aditivni.

Pri analizi kristaliničnih vzorcev K-2605/05 se je rentgenska praškovna analiza, v kombinaciji s termično analizo in infrardečo spektroskopijo, pokazala kot zelo uporabna metoda za ugotavljanje ali modelna zdravilna učinkovina pri prekristalizaciji iz različnih topil kristalizira v različnih polimorfnih oblikah.

Primerjava posnetih difraktogramov vzorcev (slika 17) je pokazala dva različna tipa difraktogramov.

Difraktogrami večine vzorcev se med sabo ne razlikujejo, kar pomeni da gre za isto kristalno obliko. Le-ti se ujemajo z difraktogramom znane kristalne oblike. Od ostalih se razlikejeta difraktograma vzorcev K-2605/05-2 (THF) in K-2605/05-12 (1,4 - dioksan), ki pa sta si med sabo zelo podobna. Kot kaže gre za potencialno novo kristalno obliko zdravilne učinkovine (ali pa celo za zmes dveh oblik).

V obeh izjemnih primerih ima prekristalizacijsko topilo zelo nizko dielektrično konstanto. Posplošitev, da modelna zdravilna učinkovina iz topila z nizko dielektrično konstanto kristalizira v drugi kristalni obliki nam preprečuje vzorec K-2605/05-9, prekristaliziran iz etilacetata, ki je po vrednosti dielektrične konstante vmes med tetrahidrofuranom in 1,4-dioksanom in kristalizira v znani kristalni obliki. Lahko govorimo o tendenci, da spojina kristalizira v drugi kristalni obliki pri prekristalizaciji iz bolj nepolarnih topil, vendar imajo očitno tudi druge lastnosti topila pomembno vlogo pri tem, v kateri polimorfni obliki bo spojina kristalizirala.



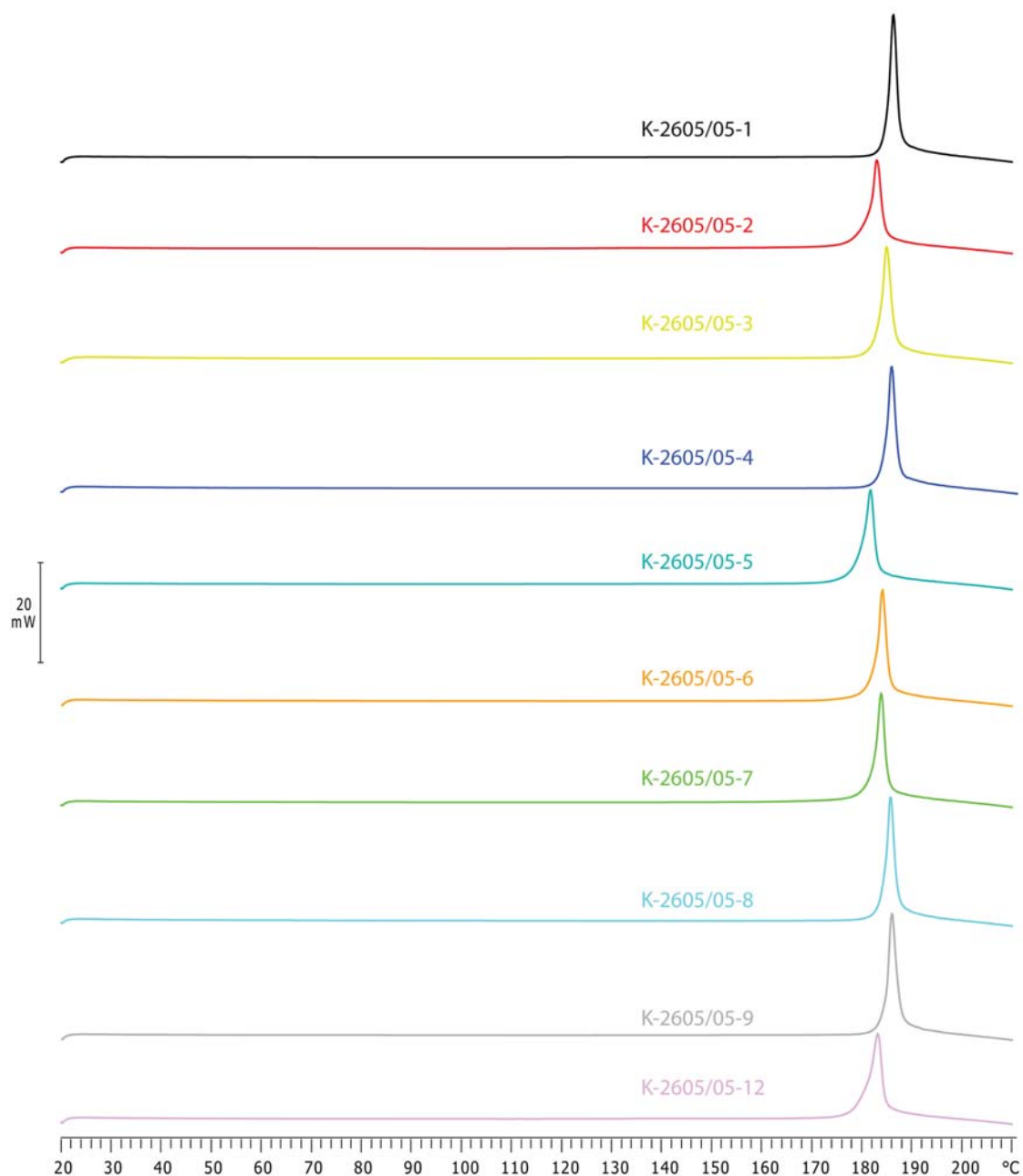
Slika 17: Primerjava difraktogramov vzorcev, prekristaliziranih iz različnih topil.

5.2 TERMIČNA ANALIZA

5.2.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

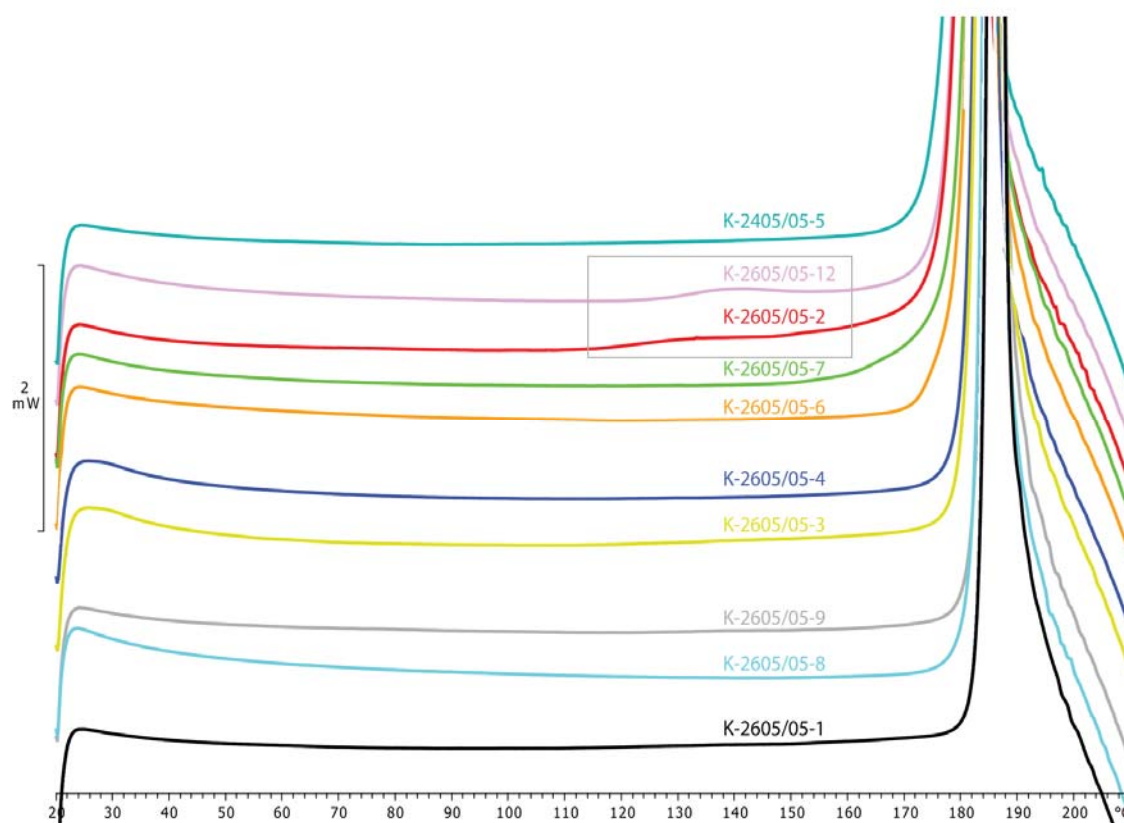
Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo za posamezne vzorce posneli DSC termograme (slika 18) na podlagi katerih smo določili temperaturo taljenja (T_{tal}) in talilno entalpijo (ΔH_{tal}) (preglednica 3).

Pri pregledu DSC krivulj vzorcev vidimo, da temperatura tališča vzorcev variira od $179,32^{\circ}\text{C}$ za K-2605/05-5 (izobutanol) do $184,61^{\circ}\text{C}$ za K-2605/05-1 (acetonitril). Do razlik prihaja tudi v talilnih entalpijah posameznih vzorcev. Talilni vrhovi so pravilni in ozki, kar kaže na čiste vzorce. V obeh mejnih primerih naj bi šlo za isto t.j. znano kristalno obliko, zato je tako velika razlika (5°C) nekoliko neobičajna. Le-ta je lahko posledica različne mase analiziranega vzorca, različne morfologije (velikost in oblika) delcev ali pa različne stopnje kristaliničnosti vzorcev.



Slika 18: Primerjava DSC krivulj

Vzorca K-2605/05-2 in K-2605/05-12, ki naj bi predstavljala novo kristalno obliko, imata tališče znotraj območja, ki ga določata oba mejna primera, tako da samo na podlagi tališča z DSC analizo ne moremo razlikovati med obema oblikama. Pri podrobnejšem pregledu DSC krivulj (slika 19) lahko pri vzorcih K-2605/05-2 in K-2605/05-12 opazimo šibak in raztegnjen endotermni pik , ki se začne pri 120°C. Le-tega pri ostalih vzorcih ni moč zaznati.



Slika 19: Primerjava DSC krivulj pri večji ločljivosti v smeri y-osi (natančnejši prikaz odziva). V pravokotniku sta označena pika, na podlagi katerih se vzorca K-2605/05-2 in -12 razlikujeta od ostalih.

Omenjeni šibak endotermni efekt smo pripisali prehodu metastabilne nove kristalne oblike v stabilno znano kristalno obliko v trdnem stanju (ang. *solid-solid polymorph transition*). Zaradi precej velikih razlik v temperaturah tališča, določenih z DSC analizo smo vzorcem tališče določili tudi s segrevanjem vzorcev pod mikroskopom (ang. *hot-stage analysis*). Analiza je pokazala nekoliko drugačno sliko temperatur tališč (preglednica 3). Tališča so nekoliko nižja, kot smo jih določili z DSC, kar je posledica različnih hitrosti segrevanja (pri DSC analizi je bila hitrost segrevanja konstantna, 10°C/min skozi celotno analizo, medtem ko smo pri segrevanju vzorcev pod mikroskopom le-te najprej hitro segrevali do 174°C, nato pa s hitrostjo 1°C/min do njihove stalitve).

Razlike med vsemi vzorci so bile minimalne. Očitnih razlik v temperaturi tališča nismo zaznali niti med obema različnima kristalnima oblikama, kar potrjuje našo domnevo, da pride pri segrevanju do prehoda metastabilne nove kristalne oblike v stabilno znano kristalno obliko.

Preglednica 3: Tališča in talilne entalpije posameznih vzorcev, določene z DSC in tališča, določena s »hot-stage« analizo

Vzorec	DSC analiza		»hot-stage« analiza
	T_{tal}^* (°C)	ΔH_{tal} (J/g)	T_{tal}^{**} (°C)
K-2605/05-1	184,61	140,21	175,1
K-2605/05-2	180,79	130,44	174,8
K-2605/05-3	182,98	142,46	174,8
K-2605/05-4	182,72	141,83	174,9
K-2605/05-5	179,32	135,26	174,9
K-2605/05-6	182,23	139,25	175,0
K-2605/05-7	181,78	144,19	175,1
K-2605/05-8	183,95	136,08	175,0
K-2605/05-9	184,46	138,97	175,1
K-2605/05-12	180,37	133,79	174,9

* tališča so določena kot ekstrapolirane vrednosti temperature začetka taljenja (*onset T*)

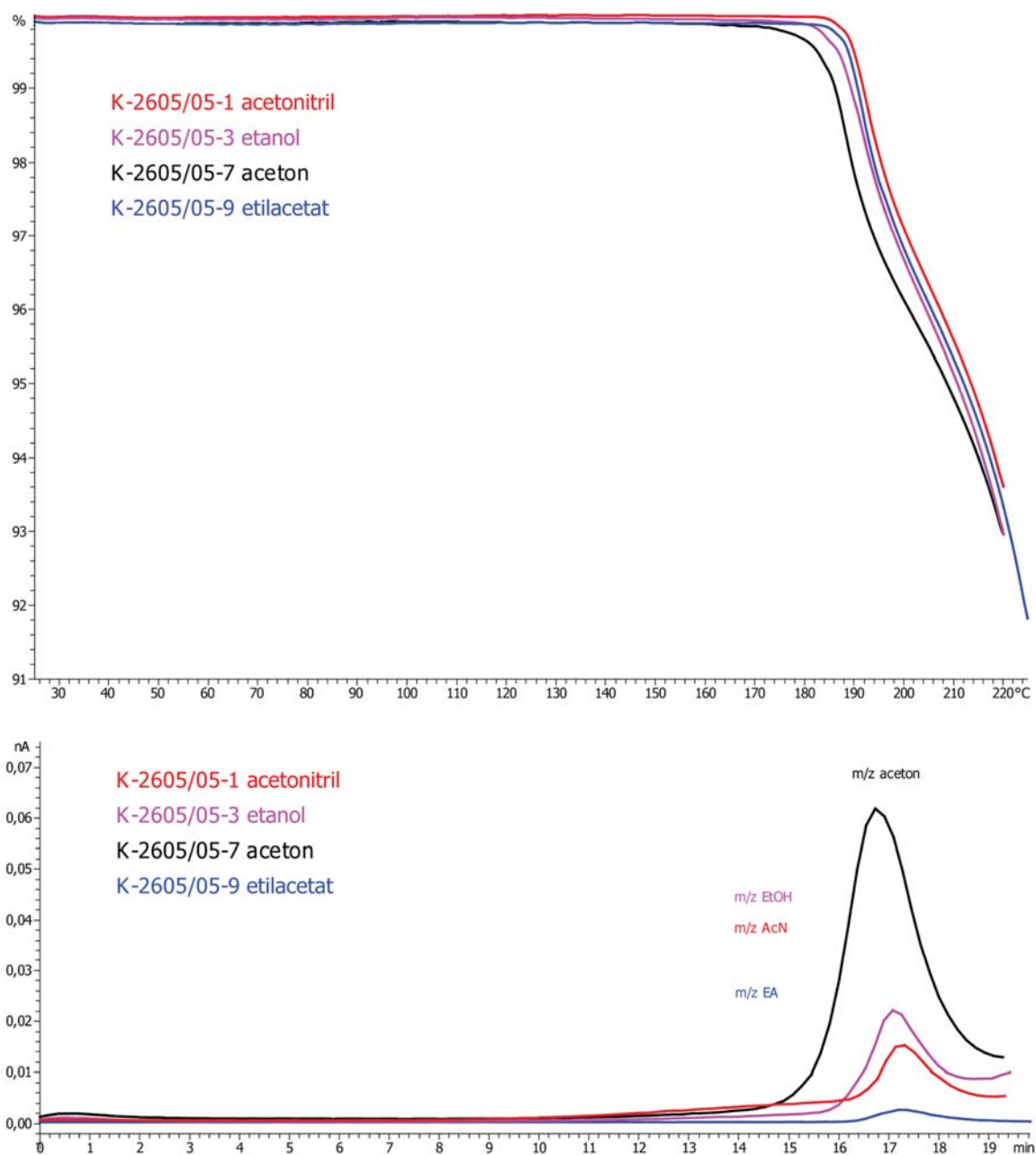
** temperatura, pri kateri pod mikroskopom opazimo prve pretvorbe kristalov v kapljice

5.2.2 TERMOGRAVIMETRIČNA ANALIZA

Termogravimetrična analiza med drugim omogoča določitev celokupne vsebnosti hlapnih snovi v trdnem vzorcu, v kombinaciji z masno spektrometrijo (kot je bilo v našem primeru) pa nam metoda omogoča tudi identifikacijo in kvantifikacijo teh hlapnih snovi.

Vsak pripravljen vzorec smo sušili na zraku pri sobni temperaturi toliko časa, dokler ni bila vsebnost rezidualnih topil, ki smo jo določili z metodo izgube pri sušenju, nižja od 1%.

Na izbranih vzorcih, na katerih smo izvajali nekoliko obsežnejše študije, smo izvedli tudi termično analizo v kombinaciji z masno spektrometrijo. TG krivulje (slika 20) so pokazale, da do taljenja, ki mu zelo hitro sledi tudi razpad, ni moč zaznati izgube mase. V začetku taljenja se sicer sprost nekaj topila, vendar v zelo majhnih količinah. Vsebnost rezidualnih topil ni bila večja kot 0,3%. Temperature, pri katerih je prišlo do izhajanja rezidualnih topil so bile višje od 150°C, kar je precej višje od vrelišč teh topil. To pomeni, da so topila nekako vezana v strukturo, vendar je vsebnost le-teh premajhna, da bi lahko govorili o solvatih.



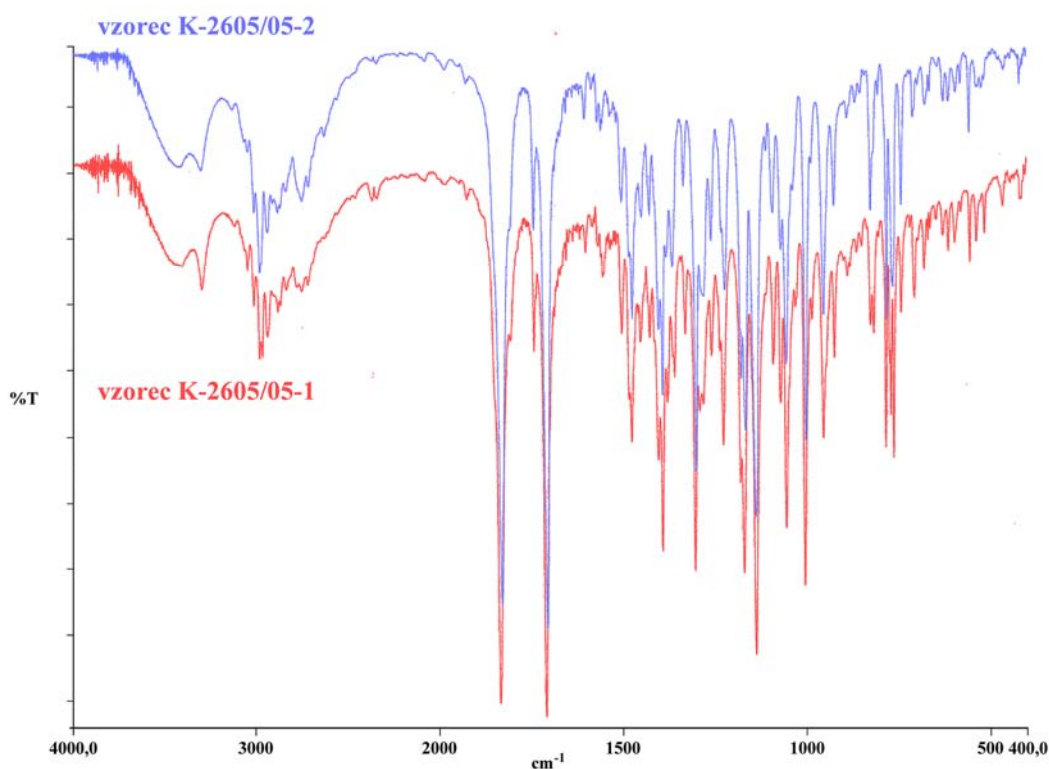
Slika 20: TGA-MS analiza: zgornja slika je rezultat termogravimetrične analize, spodnja masne spektrometrije.

V našem primeru analiz je sicer šlo za preverjanje ali so bila rezidualna topila v vzorcih prisotna v takšni meri, da bi lahko vplivala na rezultate analiz, drugače pa je ta metoda pomembna za določanje rezidualnih topil s stališča varnosti zdravil. To je zelo pomembno in farmakopejsko predpisano v primerih, ko se v katerikoli stopnji proizvodnje uporabljajo topila, ki so opredeljena kot topila z omejeno uporabo (po klasifikaciji Ph. Eur. 2. skupina) in imajo natančno predpisano dovoljeno vsebnost. Tudi v okviru diplomske naloge smo za

prekristalizacijo uporabili topila iz 2. skupine: metanol, tetrahidrofuran, acetonitril, 1,4-dioksan.

5.3 SREDNJA INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

Po natančnem pregledu in primerjavi absorpcijskih pikov IR spektrov vsi vzorci, razen dveh, ne kažejo bistvenih razlik, nekoliko odstopata le IR spektra vzorcev K-2605/05-2 in K-2605/05-12, ki pa sta pri medsebojni primerjavi enaka. Ta dva se, na prvi pogled precej podobna ostalim, od ostalih IR spektrov razlikujeta predvsem v premiku absorpcijskih trakov v območju funkcionalnih skupin iz 1329 cm^{-1} na 1333 cm^{-1} ter v območju prstnega odtisa (ang. *finger print*) spektra iz 1136 cm^{-1} na 1139 cm^{-1} in iz 1089 cm^{-1} na 1091 cm^{-1} . Sicer pa je v območju funkcionalnih skupin ($1200 - 3500\text{ cm}^{-1}$) še nekaj premikov absorpcijskih trakov večjih od 1 cm^{-1} , ki kažejo na razlike (predvsem pri 1832 cm^{-1} in 1302 cm^{-1}) (slika 21).



Slika 21: Primerjava IR spektrov, značilnih za vsako od različnih oblik. Rdeč spekter predstavlja znano obliko, moder pa novo kristalno obliko.

S kombinacijo analiz rentgenske praškovne difrakcije, termične analize in srednje infrardeče spektroskopije smo prišli do zaključka, da gre pri skoraj vseh vzorcih za isto, znano kristalo obliko, razen pri vzorcih prekristaliziranih iz tetrahidrofurana (K-260/05-2) in dioksana (K-2605/05-12), kjer gre najverjetneje za drugo, metastabilno kristalno obliko.

5.4 DOLOČANJE PRAVE GOSTOTE

Prave gostote vzorcev, določene s helijevim piknometrom (preglednica 4) se med seboj nekoliko razlikujejo. Z nekoliko manjšo gostoto od ostalih izstopata predvsem vzorca K-2605/05-2 in K-2605/05-12, ki sodeč po rezultatih predhodnih analiz predstavlja novo kristalno obliko. Prava gostota to ugotovitev potrjuje.

Ostale vzorce bi lahko nadalje razdelili v tri skupine, ki so glede na statistiko podatkov (Studentov t-test med vsemi pari, $n = 6$, $\alpha = 0,05$) signifikantno različne. V prvo skupino lahko uvrstimo vzorce K-2605/05-3, K-2605/05-8 in K-2605/05-9, v drugo vzorce K-2605/05-1, K-2605/05-6, K-2605/05-7, ter v tretjo vzorca K-2605/05-4 in K-2605/05-5, ki imata med vsemi vzorci največjo pravo gostoto. Glede na to, da gre pri teh vzorcih za isto kristalno obliko, so sicer ne prevelike razlike med temi vzorci lahko posledica razlik v velikosti kristalov, agregacije kristalov, stopnji kristaliničnosti vzorcev.

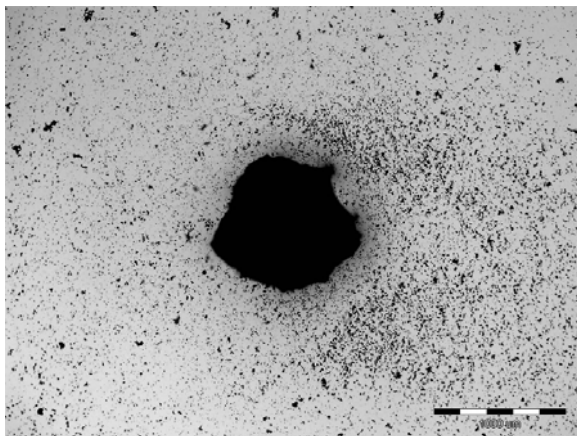
Preglednica 4: Prave gostote vzorcev določene s helijevim piknometrom.

Vzorec	prava gostota* (g/cm^3)	SD* (g/cm^3)
K-2605/05-2	1,296	0,002
K-2605/05-12	1,307	0,001
K-2605/05-8	1,315	0,001
K-2605/05-3	1,316	0,001
K-2605/05-9	1,316	0,001
K-2605/05-1	1,318	0,001
K-2605/05-6	1,318	0,001
K-2605/05-7	1,319	0,002
K-2605/05-4	1,322	0,001
K-2605/05-5	1,323	0,001

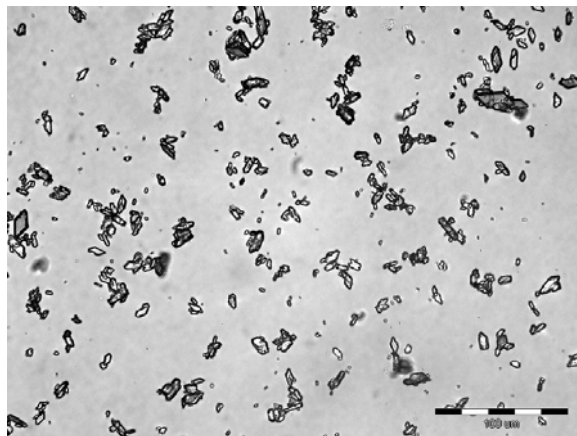
* rezultati so podani kot povprečne vrednosti šestih meritev in standardna deviacija (SD)

5.5 ANALIZA OBLIKE DELCEV

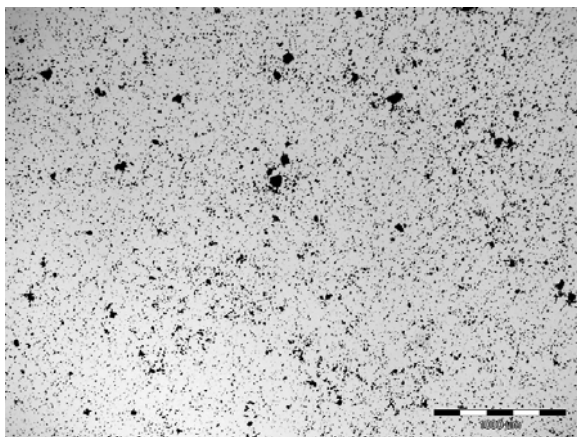
Na slikah, posnetih z optičnim mikroskopom je očitno, da so bili poleg primarnih delcev v vzorcih prisotni tudi skupki različnih velikosti. Pri večji povečavi lahko opazimo manjše razlike v velikosti in morfologiji delcev (slika 22).



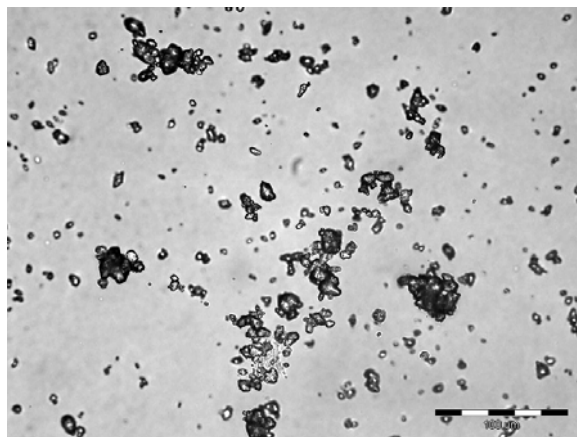
a) K-2605/05-7 (40-kratna povečava)



b) K-2605/05-7 (400-kratna povečava)



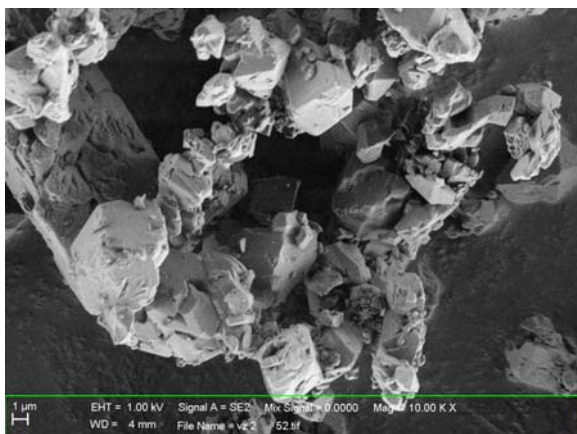
c) K-2605/05-9 (40-kratna povečava)



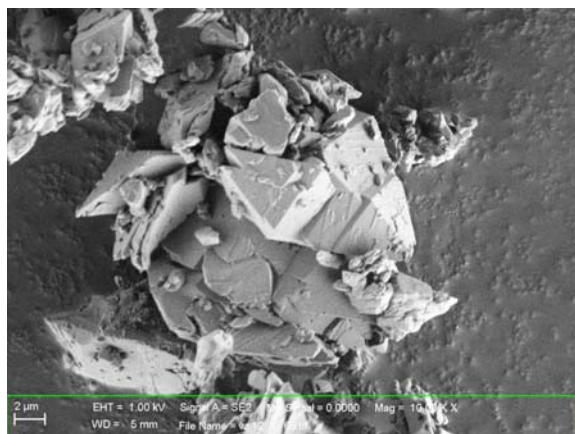
d) K-2605/05-9 (400-kratna povečava)

Slika 22: Primeri slik, posnetih z optičnim mikroskopom pri različnih povečavah vzorcev K-2605/5-7 in K-2605/5-9.

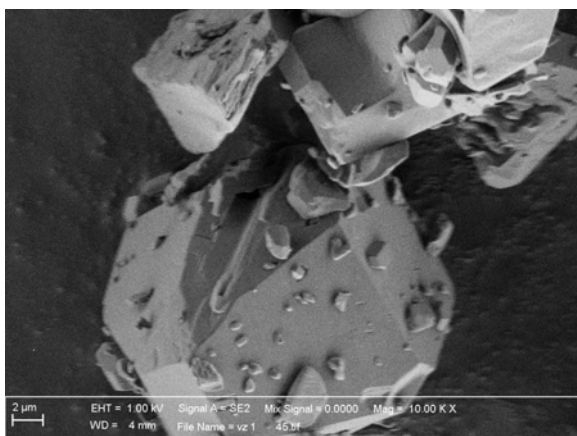
Da bi dobili natančnejšo sliko zunanjega videza kristalov, smo izbrane vzorce posneli tudi z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Tukaj so veliko bolj nazorno vidne tako razlike v velikosti kristalov, kakor tudi v njihovem zunanjem videzu (slika 23).



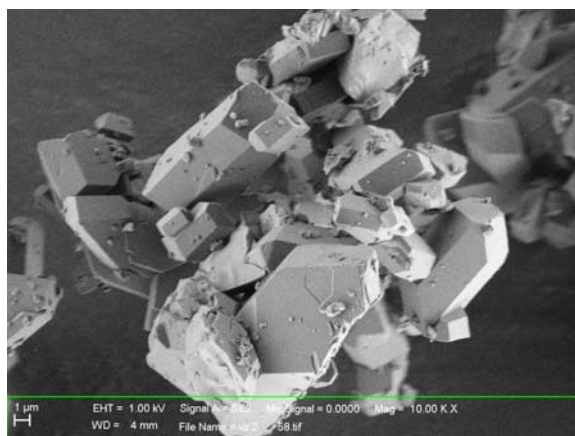
a) K-2605/05-2 (tetrahidrofuran)



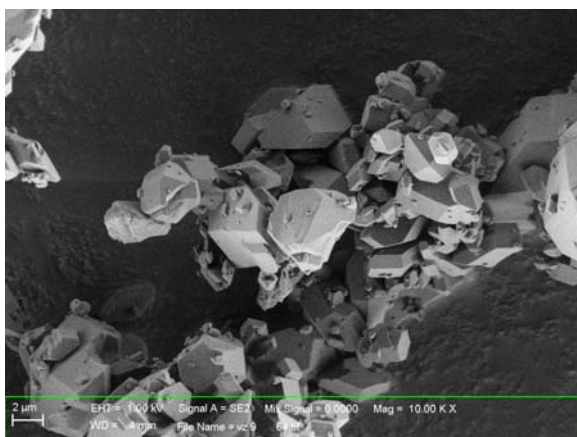
b) K-2605/05-12 (1,4 – dioksan)



c) K-2605/05-1 (acetonitril)



d) K-2605/05-7 (aceton)



e) K-2605/05-9 (etilacetat)

Slika 23: SEM posnetki vzorcev, prekristaliziranih iz različnih topil pri 10.000-kratni povečavi.

Kristali vzorcev K-2605/05-2 (slika 23a) in K-2605/05-12 (slika 23b), ki predstavljajo novo kristalno obliko, se tudi morfološko precej razlikujejo od ostalih vzorcev. V teh dveh vzorcih prevladujejo kristali nepravilnih oblik s hrapavo površino, med njimi pa so prisotni tudi kristali z ravnimi in gladkimi ploskvami, ter ostrimi robovi. Sodeč po SEM posnetkih bi lahko sklepali, da gre pri teh dveh vzorcih za zmes dveh kristalnih oblik.

Kristali ostalih vzorcev so bolj pravilnih oblik. Ploskve kristalov so ravne in gladke, robovi so ostri. Pri vzorcih K-2605/05-1 (slika 23c), K-2605/05-7 (slika 23d) in K-2605/05-9 (slika 23e) gre za isto, znano kristalno obliko. Ti vzorci se med seboj razlikujejo po velikosti in zunanjem videzu kristalov. Vidne so razlike v dimenzijah posameznih ploskev kristalov. Kristali vzorca K-2605/05-7 so nekoliko bolj podolgovati (ene ploskve kristala so precej večje od drugih) v primerjavi s kristali vzorcev K-2605/05-1 in K-2605/05-9.

Razlike v zunanji obliki kristalov so posledica različnih kristalizacijskih topil, ki vodijo do različnih interakcij med topilom in kristalizirajočim topljencem. Ta razlika lahko neposredno vpliva predvsem na tehnološke lastnosti, pomembne pri proizvodnji zdravila, kot so pretočne lastnosti, stisljivost ipd. Poleg tega pa razlike v dimenzijah ploskev in v funkcionalnih skupinah, ki so na teh ploskvah izražene, vodijo do različne površinske energije kristalov, kar vpliva na močenje in posledično na raztapljanje same zdravilne učinkovine pa tudi na interakcije le-te s pomožnimi snovmi.

5.6 PORAZDELITEV VELIKOSTI DELCEV

Analize porazdelitve velikosti delcev so med vzorci pokazale razlike tako v povprečni velikosti kot tudi v porazdelitvi velikosti delcev (preglednica 5). Pri večini vzorcev opazimo nehomogeno porazdelitev z dvema vrhovoma (bimodalnost). Vrhovi pri večjih velikostih predstavljajo skupke kristalov, ki smo jih opazili že pod mikroskopom. To smo pokazali tudi z analizami porazdelitve velikosti delcev izvedenih na vzorcih, ki smo jih predhodno izpostavili ultrazvoku. Le-ta je razbil prisotne agregate na manjše delce (s pojmom »agregati« opisujemo rahlo medsebojno povezane delce, do česar pride spontano, brez zunanjega vpliva), saj so se na histogramih vrhovi pri večjih velikostih znižali ali celo izginili.

Preglednica 5: Porazdelitev velikosti delcev posameznih vzorcev (brez uporabe ultrazvoka)

Velikostni razred (μm)	Porazdelitev velikosti delcev (volumski %)				
	K-2605/05-1	K-2605/05-2	K-2605/05-3	K-2605/05-4	K-2605/05-5
0,02 - 2,00	5,49	4,98	5,82	4,40	10,22
2,00 - 5,00	4,95	5,93	5,38	3,78	10,97
5,00 - 10,00	10,99	12,61	11,09	8,42	14,33
10,00 - 20,00	23,15	16,08	20,24	18,16	16,17
20,00 - 50,00	31,48	10,02	28,69	31,21	21,97
50,00 - 100,00	15,02	1,34	17,80	21,52	13,82
100,00 - 150,00	6,23	1,75	7,56	8,69	4,28
150,00 - 500,00	2,69	20,41	3,41	3,82	5,92
500,00 - 1000,00	0	20,71	0	0	2,33
>1000	0	6,16	0	0	0
Povprečna velikost (μm)	37,5	300,8	41,3	46,5	58,5
10% delcev manjših od (μm)	4,8	4,6	4,4	6,2	1,9
50% delcev večjih od (μm)	22,9	60,1	25,0	31,3	18,6
90% delcev manjših od (μm)	94,5	852,8	104,4	110,3	122,3

Velikostni razred (μm)	Porazdelitev velikosti delcev (volumski %)				
	K-2605/05-6	K-2605/05-7	K-2605/05-8	K-2605/05-9	K-2605/05-12
0,02 - 2,00	2,99	4,94	6,12	9,66	6,97
2,00 - 5,00	2,65	5,57	7,17	12,94	6,05
5,00 - 10,00	6,33	14,7	19,36	26,88	10,17
10,00 - 20,00	12,86	21,85	27,00	25,01	30,03
20,00 - 50,00	19,79	25,36	24,24	17,07	33,96
50,00 - 100,00	17,51	6,64	10,83	4,43	0,82
100,00 - 150,00	16,91	1,49	1,62	0,20	0,26
150,00 - 500,00	20,96	13,11	2,16	2,58	6,85
500,00 - 1000,00	0	6,27	1,51	1,23	4,85
>1000	0	0,07	0	0	0,04
Povprečna velikost (μm)	85,7	102,7	40,2	31,0	71,8
10% delcev manjših od (μm)	8,5	4,8	3,9	2,1	3,4
50% delcev večjih od (μm)	65,3	21,9	15,4	10,1	18,9
90% delcev manjših od (μm)	196,7	392,2	68,7	44,4	267,1

Velike razlike med povprečnimi velikostmi delcev vzorcev so predvsem posledica različnih velikosti in deležev prisotnih skupkov, ki jih z ultrazvokom do neke mere lahko

razbijemo. Razlike v velikosti primarnih delcev so precej manjše. Povprečne velikosti primarnih delcev vzorcev se nahajajo v območju med 10 μm in 30 μm . Najmanjše primarne delce kaže vzorec K-2605/05-9, največje pa vzorec K-2605/05-4.

Velikost delcev ima pomemben vpliv na različne analizne metode, uporabljene v študiju vzorcev modelne zdravilne učinkovine, npr. na termične analize in rentgensko praškovno difrakcijo, zato bi bilo morebiti smiselno pri nadaljnjih raziskavah te analize ponoviti na presejanih vzorcih.

5.7 DOLOČANJE STIČNEGA KOTA

Proces raztapljanja trdne snovi v topilu se začne, če topilo moči površino trdne snovi. Merilo za močljivost trdne snovi je stični kot oz. kot močenja, ki smo ga določili z metodo sedeče kapljice. Kot testno tekočino smo uporabili 0,01 M HCl, ker je bil to tudi medij, ki smo ga izbrali za določanje intrinzične hitrosti raztapljanja.

Preglednica 6: Stični koti 0,01 M HCl na stisnjenih vzorcih modelne zdravilne učinkovine K-2605/05.

Vzorec	stični kot* (°)	SD* (°)
K-2605/05-1	58,1	2,0
K-2605/05-2	62,2	2,0
K-2605/05-3	58,4	1,6
K-2605/05-4	59,1	1,4
K-2605/05-5	61,7	1,9
K-2605/05-6	61,3	1,7
K-2605/05-7	59,0	1,6
K-2605/05-8	63,4	2,0
K-2605/05-9	59,0	1,7
K-2605/05-12	59,7	2,4

* rezultati so podani kot povprečne vrednosti vsaj devetih meritev in standardna deviacija (SD)

Izmerjeni stični koti se nahajajo v območju od 58° do 63° (preglednica 6). Vzorci se med seboj glede na stične kote sicer nekoliko razlikujejo, vendar nam je statistika (Studentov t-test med vsemi pari, $n = 9-16$, $\alpha = 0,05$) pokazala, da ni noben vzorec signifikantno

različen od vseh ostalih. Najbolj izstopa vzorec K-2605/05-8, ki se značilno razlikuje od vseh vzorcev, razen K-2605/05-2. Zanimivo je, da od ostalih vzorcev ne izstopata niti vzorca K-2605/05-2 in K-2605/05-12, ki predstavljata novo kristalno obliko.

Na podlagi meritev stičnih kotov, ki jih tvori kapljica 0,01 M HCl na stisnjeni ploščici modelne zdravilne učinkovine ne moremo razlikovati med različnimi kristalnimi oblikami. Analiza nam prav tako ne omogoča napovedovanja razlik v kinetiki raztapljanja posameznih vzorcev.

Poleg tega ne moremo sklepati na povezave med stičnim kotom in polarnostjo prekristalizacijskega topila. V nadaljnjih študijah bi bilo smiselno izvesti meritve stičnih kotov še s katero drugo tekočino. Kljub temu, da smo kot močenja s pomočjo posnetka določili takoj po stiku tekočine in ploščice, bi problem pri meritvah z 0,01 M HCl lahko predstavlja pronicanje kapljice v stisnjen vzorec in sicer minimalno raztapljanje vzorca v testni tekočini.

5.8 INVERZNA PLINSKA KROMATOGRAFIJA

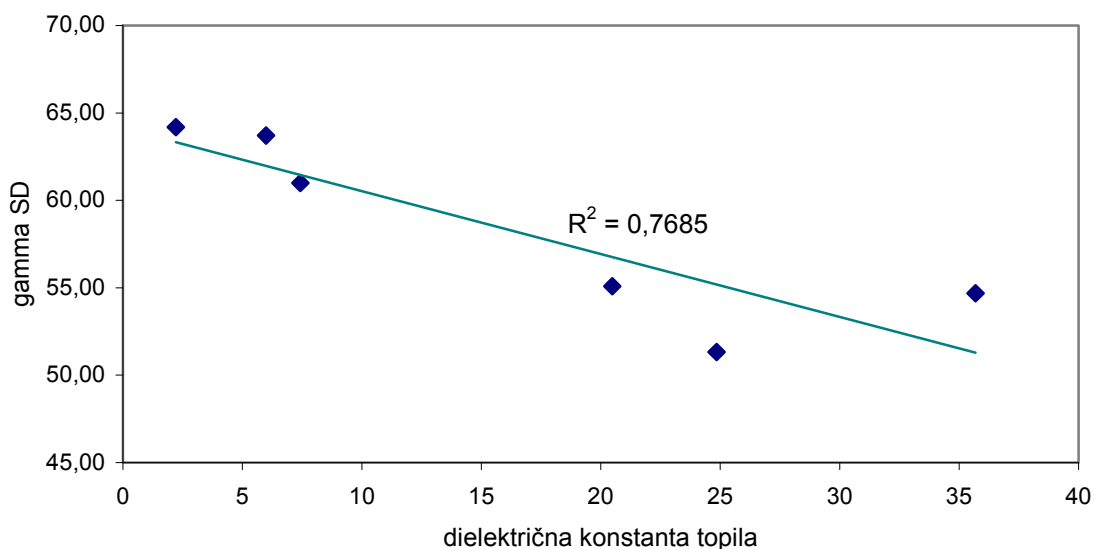
Z inverzno plinsko kromatografijo smo izmerili disperzijske in specifične interakcije med izbranimi vzorci modelne zdravilne učinkovine in apliciranimi standardi (adsorptivi). Ugotovili smo, da različna topila za prekristalizacijo vplivajo na površinske lastnosti prekristalizirane modelne zdravilne učinkovine. Rezultati, zbrani v preglednicah 7 in 8 predstavljajo povprečne vrednosti dveh paralelnih meritev.

Preglednica 7: Neporarna komponenta površinske energije γ_s^d vzorcev modelne zdravilne učinkovine, določena z n-alkani (heksan, heptan, oktan, nonan) glede na uporabljen prekristalizacijsko topilo in njegovo dielektrično konstanto kot merilom polarnosti.

Vzorec	topilo	dielektrična konstanta topila	γ_s^d * (mN/m)	SD* (mN/m)
K-2605/05-1	acetonitril	35,69	54,68	0,48
K-2605/05-2	tetrahidrofuran	7,43	60,99	0,80
K-2605/05-3	etanol	24,85	51,34	1,62
K-2605/05-7	aceton	20,49	55,09	0,69
K-2605/05-9	etilacetat	5,99	63,71	1,70
K-2605/05-12	1,4-dioksan	2,21	64,18	2,29

* rezultati so podani kot povprečne vrednosti dveh meritev in standardna deviacija (SD)

Vrednosti nepolarnih komponent površinske energije γ_s^d vzorcev (preglednica 7) smo med seboj statistično primerjali s Studentovim t-testom. S 5% stopnjo tveganja statistika pokaže, da se vrednosti γ_s^d vzorcev, ki so prekrizalizirani iz bolj nepolarnih topil (K-2605/05-2, K-2605/05-9, K-2605/05-12) značilno višje od vzorcev, prekrizaliziranih iz bolj polarnih topil (K-2605/05-1, K-2605/05-3, K-2605/05-7). V grobem lahko rečemo, da obstaja trend, da se z naraščanjem vrednosti dielektrične konstante prekrizalizacijskega topila zmanjšuje nepolarna komponenta površinske energije vzorca (slika 24).



Slika 24: Nepolarna komponenta površinske energije γ_s^d vzorcev modelne zdravilne učinkovine v odvisnosti od dielektrične konstante topila.

Rezultati specifičnih interakcij (preglednica 8) so podlaga za izračun konstant K_A in K_D (preglednica 9). Polarni standardi, ki jih pri tem uporabljamo imajo različne lastnosti. Glede na AN in DN vrednosti sta aceton in etilacetat amfoterna, kar pomeni da lahko vstopata v interakcije s površino preiskovane snovi kot Lewisova kislina ali baza. Aceton je glede na višjo AN vrednost ob zelo podobni DN vrednosti nekoliko bolj kisel od etilacetata. Tetrahidrofuran (THF) se obnaša kot Lewisova baza in karakterizira elektron akceptorske lastnosti površine vzorca, kloroform pa vstopa v interakcije kot Lewisova kislina in karakterizira elektron donorske lastnosti površine vzorca.

Preglednica 8: Vrednosti specifičnih komponent proste energije adsorpcije ΔG^{sp} različnih polarnih adsorptivov (tetrahidrofuran, aceton, etilacetat, kloroform) na izbrane vzorce.

Vzorec	$\Delta G^{sp} \pm SD^*$ (kJ/mol)			
	THF	aceton	etilacetat	kloroform
K-2605/05-1	4,154 $\pm$ 0,404	7,929 $\pm$ 0,008	6,986 $\pm$ 0,125	2,258 $\pm$ 0,214
K-2605/05-2	4,010 $\pm$ 0,407	7,507 $\pm$ 0,356	7,010 $\pm$ 0,253	1,761 $\pm$ 0,023
K-2605/05-3	4,817 $\pm$ 0,942	8,692 $\pm$ 0,977	7,148 $\pm$ 0,637	2,345 $\pm$ 0,166
K-2605/05-7	3,351 $\pm$ 0,511	7,678 $\pm$ 0,541	6,414 $\pm$ 0,046	1,909 $\pm$ 0,095
K-2605/05-9	4,247 $\pm$ 0,573	7,468 $\pm$ 0,723	6,717 $\pm$ 0,217	1,308 $\pm$ 0,010
K-2605/05-12	4,201 $\pm$ 0,757	8,150 $\pm$ 0,271	7,397 $\pm$ 0,059	2,037 $\pm$ 0,092

* rezultati so podani kot povprečne vrednosti dveh meritev in standardna deviacija (SD)

Na podlagi medsebojne statistične primerjave ΔG^{sp} za posamezne standarde topil (adsorptive) s Studentovim t-testom (enostranski test z $\alpha = 0,05$) vzorcev ne moremo razlikovati, razen v primeru specifičnih interakcij med molekulami kloroforma in površino preiskovanih vzorcev. Tukaj lahko na podlagi rezultatov s 95% gotovostjo trdimo, da vzorec K-2605/05-9 (etilacetat) tvori najšibkejšje interakcije s kloroformom v primerjavi z ostalimi analiziranimi vzorci, kar pomeni, da ima njegova površina relativno glede na druge vzorce najmanj bazičen značaj. Najbolj bazično površino imajo vzorci K-2605/05-1 (acetonitril), K-2605/05-3 (etanol) in K-2605/05-12 (dioksan). Vzorca K-2605/05-2 (tetrahidrofuran) in K-2605/05-7 (aceton) sta po bazičnosti površine nekje vmes.

Preglednica 9: Izračunane kislinske (K_A) in bazične (K_D) konstante.

Vzorec	topilo	$K_A \pm SD^*$	$K_D \pm SD^*$
K-2605/05-1	acetonitril	0,042 $\pm$ 0,005	0,368 $\pm$ 0,027
K-2605/05-2	tetrahidrofuran	0,041 $\pm$ 0,005	0,354 $\pm$ 0,005
K-2605/05-3	etanol	0,050 $\pm$ 0,011	0,349 $\pm$ 0,014
K-2605/05-7	aceton	0,033 $\pm$ 0,006	0,381 $\pm$ 0,013
K-2605/05-9	etilacetat	0,039 $\pm$ 0,014	0,340 $\pm$ 0,044
K-2605/05-12	1,4-dioksan	0,043 $\pm$ 0,010	0,387 $\pm$ 0,043

* rezultati so podani kot povprečne vrednosti izračunanih konstat dveh meritev in standardna deviacija (SD)

Izračunane kislinske (K_A) in bazične (K_D) konstante smo med seboj statistično primerjali (Studentov t-test, $\alpha = 0,05$) in ugotovili, da razlike med vzorci v nobenem primeru niso signifikantne. Na podlagi konstant K_A in K_D vzorcev ne moremo razlikovati. Na prvi pogled sicer lahko opazimo med vzorci manjše razlike, vendar da bi bile te tudi statistično značilne, bi morali meritve še večkrat ponoviti, da bi dobili natančnejše rezultate.

5.9 INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA

Da bi se izognili vplivu velikosti delcev na test raztapljanja smo izvedli test intrinzične hitrosti raztapljanja, pri kateri smo pripravili tableto/komprimat. S tem smo omogočili raztapljanje s konstantne površine in izključili vpliv velikosti delcev. Predhodno smo potrdili, da med pripravo komprimatov z mehansko obremenitvijo ni prišlo do pretvorbe kristalnih oblik. Slabo stran metode predstavlja mehanska obremenitev vzorcev, pri čemer lahko pride do spremembe površine kristalov in njihovih lastnosti, tako da dobljeni rezultati niso nujno odraz obnašanja intaktnih delcev.

Analize se običajno izvajajo v različnih vodnih medijih fizioloških pH vrednosti. Mi smo kot medij za določanje IDR vzorcev modelne zdravilne učinkovine K-2605/05, ki je v vodi slabo topna, uporabili 0,01M HCl.

Analize smo za vsak vzorec izvedli v treh paralelkah in iz naklona premice, izračunane po metodi najmanjših kvadratov določili intrinzično hitrost raztapljanja. Zaradi relativno počasnega raztapljanja so bile vse točke v času analize (90 min) v začetnem, linearnem delu krivulje intrinzične hitrosti raztapljanja.

Preglednica 10: Intrinzične hitrosti raztapljanja posameznih vzorcev

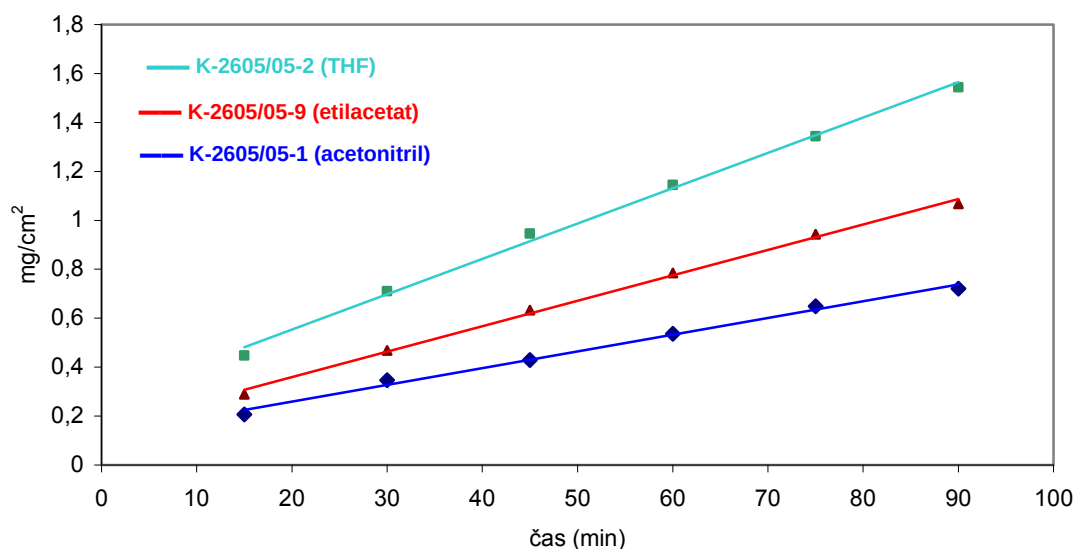
Vzorec	prekristalizacijsko topilo	IDR ^{*/**} (mg/cm ² /h)	SD ^{**} (mg/cm ² /h)
K-2605/05-1	acetonitril	0,410	0,015
K-2605/05-2	tetrahidrofuran	0,866	0,044
K-2605/05-3	etanol	0,588	0,017
K-2605/05-4	metanol	0,639	0,039
K-2605/05-5	i-butanol	0,529	0,076
K-2605/05-6	i-propanol	0,572	0,041
K-2605/05-7	aceton	0,587	0,013
K-2605/05-8	etilmetilketon	0,603	0,031
K-2605/05-9	etilacetat	0,624	0,049
K-2605/05-12	1,4-dioksan	0,736	0,020

* IDR (*intrinsic dissolution rate*) intrinzična hitrost raztapljanja

** rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh določitev IDR in standardna deviacija (SD)

IDR vrednosti, zbrane v preglednici 10, smo med seboj statistično primerjali s Studentovim t-testom ($\alpha = 0,05$) in ugotovili, da je intrinzična hitrost raztapljanja vzorca K-2605/05-1 značilno manjša od vseh ostalih, medtem ko sta IDR vrednosti vzorcev K-2605/05-2 in K-2605/05-12 značilno višji od vseh ostalih. V primeru slednjih dveh gre za novo polimorfno obliko, kar je verjetno vzrok omenjenih razlik. Kot smo sklepali že na podlagi DSC analize omenjenih vzorcev, lahko tudi glede na višje vrednosti IDR sklepamo, da gre za metastabilno obliko. Metastabilne kristalne oblike so namreč boljše topne od stabilne oblike in posledično lahko pričakujemo tudi hitrejši profil raztapljanja.

Razlike med preostalimi vzorci (K-2605/05-3, 4, 5, 6, 7, 8 in 9) so nesignifikantne in ne omogočajo medsebojnega razlikovanja teh vzorcev. Prav tako iz dobljenih rezultatov ne moremo sklepati na to, kako polarnost prekristalizacijskega topila vpliva na intrinzično hitrost raztapljanja vzorcev, razen v primeru K-2605/05-1, prekristaliziranem iz acetonitrila, ki ima najvišjo dielektrično konstanto med vsemi uporabljenimi topili in daje najpočasnejši profil raztapljanja iz konstantne površine (na sliki 25 najbolj položna premica).



Slika 25: Primerjava intrinzične hitrosti raztapljanja vzorcev K-2605/05-1, K-2605/05-2 in K-2605/05-9.

5.10 KINETIČNA TOPNOST

Z analizami kinetične topnosti smo za izbrane vzorce preverjali koliko topljenca se raztopi v eni uri v dveh različnih medijih za raztapljanje. Kinetično topnost smo določali z metodo stresanja, kot testna medija pa smo uporabili 0,01M HCl, na katerem so slonele tudi nekatere ostale analize, in fosfatni pufer pH = 6,8.

Preglednica 11: Kinetične topnosti vzorcev v 0,01M HCl in fosfatnem pufru pH=6,8.

Vzorec	topilo	0,01M HCl		fosfatni pufer pH=6,8	
		c [*] (mg/ml)	SD [*] (mg/ml)	c [*] (mg/ml)	SD [*] (mg/ml)
K-2605/05-1	acetonitril	0,086	0,003	0,111	0,002
K-2605/05-5	i-butanol	0,104	0,001	0,155	0,002
K-2605/05-7	aceton	0,116	0,001	0,213	0,003
K-2605/05-9	etilacetat	0,116	0,001	0,215	0,001
K-2605/05-2	tetrahidrofuran	0,157	0,001	0,297	0,006
K-2605/05-12	1,4-dioksan	0,163	0,005	0,300	0,005

* rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh analiz in standardna deviacija (SD)

Kot je razvidno iz rezultatov (preglednica 11), je modelna zdravilna učinkovina bolje topna v fosfatnem pufru $\text{pH} = 6,8$ kot v $0,01\text{M HCl}$, razvrstitev posameznih vzorcev glede na kinetično topnost pa je v obeh primerih identična. Tako ima statistično (Studentov t-test, $n = 3$, $\alpha = 0,05$) značilno najnižjo kinetično topnost vzorec K-2605/05-1, ki mu sledi vzorec K-2605/05-5 s signifikantno višjo kinetično topnostjo. Še višjo kinetično topnost imata vzorca K-2605/05-7 in -9, ki ju med sabo ne moremo razlikovati. Najvišjo kinetično topnost med analiziranimi vzorci imata vzorca K-2605/05-2 in -12. V primeru slednjih dveh gre za novo kristalno obliko, najvišje vrednosti kinetične topnosti pa sovpadajo tudi z najvišjimi vrednostmi intrinzične hitrosti raztapljanja. Tudi ta podatek potrjuje sklep, da gre pri novi polimorfni obliki za metastabilno kristalno obliko.

V primeru vzorca K-2605/05-1 najnižja vrednost kinetične topnosti prav tako sovpada z najnižjo intrinzično hitrostjo raztapljanja. To bi lahko veljalo tudi za preostale vzorce, vendar teh vzorcev ne moremo med seboj ločiti na podlagi IDR vrednosti, čeprav je nakazan podoben trend, kot ga kaže kinetična topnost. V nadaljnjih študijah bi bilo smiselno določati intrinzične hitrosti raztapljanja vzorcev v fosfatnem pufru $\text{pH} = 6,8$, saj vidimo da je kinetika raztapljanja hitrejša oz. topnost večja, kot v primeru $0,01\text{M HCl}$ pa tudi razlike med vzorci so večje.

Kot vidimo se metodi določanja kinetične topnosti in intrinzične hitrosti raztapljanja dopolnjujeta in potrujeta druga drugo.

Kot vse kaže narava prekristalizacijskih topil vodi do razlik v raztapljanju ne samo med različnimi polimorfi ampak tudi med vzorci z isto kristalno obliko, vendar različnim zunanjim videzom kristalov. Razlik ne moremo najbolje razložiti na podlagi dielektričnih konstant prekristalizacijskih topil, saj vzorca K-2605/05-7 (acetona) in K-2605/05-9 (etilacetat) ne kažeta razlik v raztapljanju kljub precejšnim razlikam v dielektričnih konstantah. Zelo podobno obnašanje obeh vzorcev bi lahko razložili, če bi za prekristalizacijski topil upoštevali Gutmannovo donorsko (DN) ali akceptorsko (AN) število, ki smo ju obravnavali v poglavju o inverzni plinski kromatografiji. Po teh dveh vrednostih sta si namreč obe topili zelo podobni.

Po drugi strani vzorec K-2605/05-1, prekristaliziran iz acetonitrila z najvišjo dielektrično konstanto med uporabljenimi topili daje značilno drugačne (najnižje) rezultate raztapljanja, medtem ko vzorca K-2605/05-2, prekristaliziran iz tetrahidrofurana in K-2605/05-12, prekristaliziran iz dioksana, kjer imata obe topili zelo nizko dielektrično konstanto kažeta najvišje rezultate raztapljanja pri čemer pa igra veliko vlogo drugačna kristalna oblika.

6 ZAKLJUČEK

Za modelno zdravilno učinkovino K-2605/05 je bila predhodno poznana ena sama kristalna oblika, vendar se je izkazalo, da pri prekrystalizaciji iz tetrahidrofurana in 1,4-dioksana nastaja nova (v obeh primerih ista) polimorfna oblika. Gre za topili, ki po Ph. Eur. spadata v 2. skupino topil in se verjetno ne bi uporabljali v proizvodnji zdravilne učinkovine. Kljub temu sta vzorca nazorno pokazala, da polimorfizem vpliva na preučevane fizikalno-kemijske lastnosti snovi.

Prekrystalizacija modelne zdravilne učinkovine iz ostalih izbranih čistih organskih topil, kot so acetonitril, različni alkoholi (metanol, etanol, i-propanol in i-butanol), ketoni (aceton, etilmetilketon) in etilacetat je vodila do nastanka kristalov z isto kristalno obliko, vendar pa so se le-ti med seboj razlikovali po zunanjem videzu (habitusu) in posledično v nekaterih fizikalnih lastnostih.

Kot zelo primerna analizna metoda za ločevanje med posameznimi kristalnimi oblikami se je izkazala rentgenska praškovna difrakcija, ki smo jo dopolnili še s termično analizo, srednjo infrardečo spektroskopijo ter določanjem prave gostote vzorcev.

Preučevanje morfologije vzorcev modelne zdravilne učinkovine z optičnim in elektronskim mikroskopom, ter z analizo porazdelitve velikosti delcev je razkrilo razlike v zunanjem videzu in velikosti kristalov tako med različnima polimorfnima oblikama, kot tudi med vzorci z identično notranjo strukturo. Razlike v zunanjem videzu kristalov so posledica različnih krystalizacijskih topil in se kažejo v različnih dimenzijah posameznih ploskev, kar vodi do razlik v funkcionalnih skupinah, ki so na teh ploskvah izražene in posledično do različne površinske energije kristalov. Ta razlika se je pokazala predvsem na nepolarnih komponentah površinske energije vzorcev, ki smo jih določali z inverzno plinsko kromatografijo in kažejo na to, da večje disperzijske površinske interakcije izkazujejo vzorci, ki so prekrystalizirani iz bolj nepolarnih topil.

Pri rezultatih analiz intrinzične hitrosti raztapljanja in kinetične topnosti smo opazili predvsem višje vrednosti pri vzorcih z novo kristalno obliko. Razlike med vzorci z isto polimorfno obliko so bile sicer opazne, vendar so bile v večini primerov neznailne in jih nismo mogli nedvoumno povezati s polarnostjo prekrystalizacijskega topila.

Rezultati kažejo, da različna organska topila, ki jih uporabimo za prekrystalizacijo sicer vplivajo na lastnosti zdravilne učinkovine, vendar je ta vpliv kompleksen in praviloma nepredvidljiv. Razlike med vzorci, ki jih dajejo nekateri rezultati, do neke mere sicer lahko

opredelimo na podlagi polarnosti prekristalizacijskih topil, vendar so to bolj izjeme kot pravila. Poleg polarnosti pa na kristalizacijo gotovo vplivajo tudi druge lastnosti topil (viskoznost, površinska napetost topil idr.).

7 LITERATURA

1. Petrič J., Kočevár M.: Organska kemija: Praktikum za organsko kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2000: 43-50.
2. Kočevár J.: Vloga kristalizacije pri oblikovanju zdravilnih pripravkov. Farm vestn 1993; 44: 55-74.
3. Byrn S.R., Pfeiffer R.R., Stowell J.G.: Solid-State Chemistry of Drugs 2nd Ed., SSCI Inc., West Lafayette, 1999: 7.
4. Crafts P.: The Role of Solubility Modeling and Crystallization in the Design of Active Pharmaceutical Ingredients. V: Ng KM, Gani R, Dam-Johansen K.: Chemical Product Design: Toward a Perspective through Case Studies. Elsevier B. V. 2007:23-87.
5. Nair R.-H., Ron C. K., Brent D. S., Jonathan M. M.: Crystalization: General principles and significance on product development. V: Swarbrick J., Encyclopedia of pharmaceutical technology, 3rd Ed 2007, vol. 2: 834-857.
6. Buckton G.: Interfacial phenomena in drug delivery and targeting, Harwood Academic Publishers, Singapore, 1995: 27-114.
7. Myers D.: Surfaces, interfaces and colloids. 2nd Ed., Lippincott Williams&Wilkins, Baltimore, 1993: 22-49.
8. Jones A.G.: Crystallization Process Systems, Butterworth Heinemann, Oxford, 2002: 1-4,128.
9. Bernstein J.: Polymorphism in Molecular Crystals, Clarendon Press, Oxford, 2002: 1-66.
10. Lazarini F., Brenčič J.: Splošna in anorganska kemija, DZS, Ljubljana, 1992: 138-160.
11. Grant D.J.W.: Theory and Origin of Polymorphism. V: Brittain HG: Polymorphism in Pharmaceutical Solids. 1st Ed. New York: Marcel Decker, 1999:1-33.
12. Planinšek O., Zajc N., Srčič S.: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji, Farm. Vest. 2001; 52: 173 -185.
13. Buckton G.: Interfacial Phenomena in drug delivery and targeting, Harwood Academic Publishers, Singapore, 1995:27-114.
14. Banga S., Chawla G., Varandani D., Mehta B.R., Bansal A.K.: Modification of the crystal habit of celecoxib for improved processability, J Pharm Pharmacol. 2007 Jan; 59(1):29-39.

15. Nokhodchi A., Bolourtchian N., Dinarvand R.: Crystal modification of phenytoin using different solvents and crystallization conditions, *Int J Pharm.* 2003 Jan 2; 250(1):85-97.
16. Park J.S., Park Y.J., Kang H.W., Kim C.K.: Solvent effects on physicochemical behavior of estradiols recrystallized for transdermal delivery, *Arch Pharm Res*, vol.31, no. 1, 2008:111-116.
17. Gu C.H., Li H., Gandhi R.B., Raghavan K.: Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening, *Int J Pharm.* 2004; 283(1-2):117-125.
18. Chen Y.H.: Initial Solvent-screening of Racemic (R/S)(±)-Ibuprofen and Crystallization Kinetics of Ibuprofen Sodium Salt; doktorska disertacija, 2007:48-82.
19. Lahav M., Leiserowitz M.: The effect of solvent on crystal growth and morphology, *Chem. Eng. Sci.* 2001; 56: 2245-2253.
20. Trojak A., Planinšek O., Srčič S.: Uporabnost parametra proste površinske energije v farmacevtsko tehnoloških procesih, *Farm Vestn* 2000; 51: 277-288.
21. Planinšek O., Srčič S., Kerč J.: Določanje površinske energije trdnih snovi, *Farm Vestn* 1996; 47:41-54.
22. Ewing G.W.: *Instrumental method of Chemical Analysis*, 5th Ed., McGraw-Hill, Singapore, 1985: 199.
23. Brittain R.G.: *Methods for Characterization of Polymorphs and Solvates*. V: Brittain R.G.: *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, New York: Marcel Dekker, 1999: 227-298.
24. Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A.: *Principles of Instrumental Analysis*. 5th Ed., Saunders College Publishing, Philadelphia, 1998: 549-553.
25. Suryanarayanan R.: *X-Ray Powder Diffractometry*. V: Brittain H.G.: *Physical Characterization of Pharmaceutical Solids*, Marcel Dekker, New York 1999:187-222.
26. Zajc N., Planinšek O., Srčič S.: Diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature, *Farm. Vest.* 2001; 52:187-195.
27. Duerst M.D.: *Spectroscopic Methods of Analysis: Infrared Spectroscopy*. V: Swarbrick J.: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 3rd. Ed, Informa Healthcare 2007, vol. 5:3405-3419.
28. Planinšek O., Srčič S.: Navodila za vaje pri predmetu Fizikalna farmacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2001 : 1-42.

29. Goldstein J.I., Newbury D.E., Echlin P., Joy D.C., Fiori C., Lifshin E.: Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis, Plenum Press, New York, 1984: 479-483.
30. Buckton G.: Surface characterization: Understanding sources of variability in the production and use of pharmaceuticals, J. Pharm. Pharmacol, 1995; 47:265-275.
31. Krüss DSA1 v 1,9 Drop Shape Analysis for DSA 100 User Manual v1,9-03. Hamburg, 2004: 121-155.
32. Zadnik J., Planinšek O., Kunaver M., Srčič S.: Uporaba inverzne plinkse kromatografije v farmaciji, Farm. Vest. 2003; 54: 207-218.
33. Dyas M.A., Shah U.U.: Dissolution and Dissolution Testing. V: Swarbrick J.: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3rd. Ed, Informa Healthcare 2007, vol. 2:908-929.
34. Monografija <1087> Intrinsic dissolution iz USP.
35. Varian Intrinsic Dissolution Apparatus Operator's Manual 2004: 13

