

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DENIS SABOTI

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DENI SABOTI

VPLIV POLIMORFNE OBLIKE IN MEDFAZNEGA KONTAKTA  
NA UČINKOVITOST OBLAGANJA KLARITROMICINA S  $\text{SiO}_2$

THE INFLUENCE OF POLYMOPRHISM AND  
INTERFACIAL CONTACT ON THE EFFICIENCY OF COATING  
CLARITHROMYCINE WITH  $\text{SiO}_2$

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo in Kemijskem inštitutu pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm. in somentorstvom izred. prof. dr. Mirana Gaberščka, dipl. kem., SEM analize ter analize rentgenske praškovne difrakcije smo opravili na Kemijskem inštitutu, meritve stičnih kotov in površinskih energij smo opravili na Fakulteti za farmacijo.

Zahvaljujem se Aljažu Godcu ter Urošu Mavru za praktične in teoretične napotke pri opravljanju raziskovalnega dela, kot tudi izr. prof. dr. Odonu Planinšku za pomoč pri meritvah površinskih energij. Posebej se zahvaljujem prijatelju Urošu Trstenjaku za vso podporo, ki mi jo je tekom študija nesebično izkazal.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm. in somentorstvom izred. prof. dr. Mirana Gaberščka, dipl. kem.

## KAZALO

KAZALO .....	1
SEZNAM OKRAJŠAV .....	2
POVZETEK .....	3
ABSTRACT .....	4
1. UVOD .....	5
1.1 SiO <sub>2</sub> .....	5
1.2 Sol-gel postopek .....	6
1.3 Polimorfizem trdnih snovi .....	14
1.4 Klaritromicin .....	15
2. NAMEN DELA .....	20
3. MATERIALI IN METODE .....	21
3.1 Uporabljene snovi in oprema: .....	21
3.2 Priprava vzorca .....	22
3.3 Karakterizacija vzorca .....	23
3.4 Teorija homogene in heterogene nukleacije .....	24
4. REZULTATI .....	29
5. RAZPRAVA .....	40
6. SKLEP .....	43
7. LITERATURA .....	44

## SEZNAM OKRAJŠAV

- $\gamma$ ... površinska oz. medfazna energija
- $\theta$ ... stični kot
- $\sigma$ ... interfacialne interakcije
- A... površina
- V...volumen
- T... temperatura
- $W^*$ ... aktivacijska energija nukleacije (kristalizacije)
- $V_n$ ...volumen jedra
- $v_l$ ...volumen enote
- $A_n$ ...površina jedra
- $\Phi$ ... parameter energije prenasičenja
- $\gamma_{CF}$ ...medfazna energija med jedrom in tekočo fazo
- $\gamma_{SC}$  ...medfazna energija med substratom in jedrom
- $\gamma_{SF}$  ...medfazna energija med substratom in raztopino
- R... polmer sferičnega jedra
- $k$ ...Boltzmann-ova konstanta
- T ...temperatura
- S...razmerje prenasičenja
- $\gamma_X$  in  $\gamma_Y$ ...površinski energiji faz X in Y
- $\gamma_X^D$  in  $\gamma_Y^D$  ...disperzijski komponenti površinskih energij faz X in Y
- $\gamma_X^P$  ter  $\gamma_Y^P$  ...polarni komponenti površinskih energij faz X in Y
- $\Omega$ ...kinetični predfaktor
- J ...hitrostna konstanta nukleacije
- KMC... klaritromicin
- TEOS... tetraetil ortosilikat
- XRPD... rentgenska praškovna difrakcija
- SEM... vrstična elektronska mikroskopija
- SiO<sub>2</sub>...silicijev dioksid
- TMOS...tetrametoksisiloksan
- EtOH...etanol

## POVZETEK

Oblaganje je učinkovit postopek za zaščito, prirejanje sproščanja ali maskiranje neprijetnega okusa zdravilnih učinkovin. Za učinkovito oblaganje mora biti učinkovina med procesom stabilna ter netopna, kontakt z nastajajočo oblogo, ki je pogojen predvsem z medfazno energijo, pa čim boljši. Namen dela je bil teoretično in eksperimentalno preučiti vpliv polimorfne oblike klaritromicina na učinkovitost oblaganja s  $\text{SiO}_2$ , dobljenim po bazično kataliziranem sol-gel postopku. Medfazni kontakt smo preučevali z meritvami površinske energije posameznih komponent ter računanjem aktivacijskih energij heterogene nukleacije  $\text{SiO}_2$  na površini polimorfov klaritromicina pri različnih pogojih oblaganja.

Poiskali smo korelacijo med aktivacijsko energijo za nukleacijo ter učinkovitostjo oblaganja. Pri tem smo se poslužili meritev površinske energije, vrstične elektronske mikroskopije, rentgenske praškovne difrakcije, ter klasične termodinamike nukleacije in rasti delcev.

Dokazali smo, da medfazni kontakt med delci klaritromicina in oblogo odločilno vpliva na učinkovitost oblaganja. Na primeru dveh polimorfov klaritromicina smo pokazali, da se z isto vrsto obloge bolje oblaga bolj termodinamsko stabilen polimorf (oblika II), kar neposredno korelira z nižjimi stičnimi koti med nukleusom nastajajoče obloge in klaritromicinom ter se ujema z napovedmi predlaganega teoretičnega modela.

Glede na ugotovljeni eksperimentalno teoretični model je tako mogoče z upoštevanjem in merjenjem površinskih lastnosti materialov bolj ali manj uspešno napovedovati ustrezen izbor najbolj primernih polimorfov za oblaganje po sol-gel postopku, v našem primeru oblaganje klaritromicina s  $\text{SiO}_2$ .

## ABSTRACT

Coating is an efficient way for protection, controlled release and taste masking of active pharmaceutical ingredients (API). For an efficient coating the active substance must be stable and insoluble during the process. Additionally the contact with forming coating that is merely defined by interfacial energy, should be as good as possible. Our goal was to theoretically and experimentally assess the influence of clarithromycin polymorphism on the efficiency of coating with SiO<sub>2</sub>, obtained by base-catalyzed sol-gel procedure. The interfacial contact was studied by measuring the surface energies of each component and calculating the activation energies for heterogeneous nucleation of SiO<sub>2</sub> on the surface of clarithromycin for both polymorphs in different coating conditions.

We found correlation between activation energy for nucleation and the coating efficiency. Measurement of surface energy, scanning electron microscopy, X-ray powder diffraction and the theory of classical thermodynamics of nucleation and the growth of particles have been used to show that the interfacial contact between clarithromycin particles and the coating has a significant influence on the efficiency of coating process. Using an example of two polymorphs we showed that with the same type of coating, a more thermodynamically stable polymorph (form II) is easier to coat, which is directly correlated to lower contact angles between the nucleus of forming coating and clarithromycin, as well as our whole theoretical model.

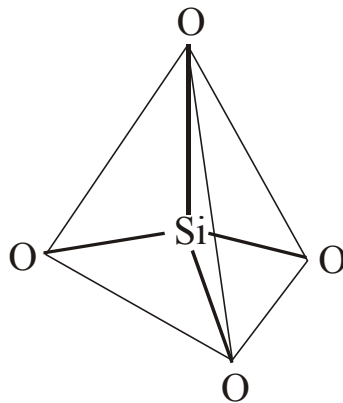
Using our experimental results and theoretical model, with knowledge of surface properties of materials, we can predict a suitable choice of polymorphs for coating with sol-gel procedure as in our case SiO<sub>2</sub> coating of clarithromycin.

## 1. UVOD

### 1.1 SiO<sub>2</sub>

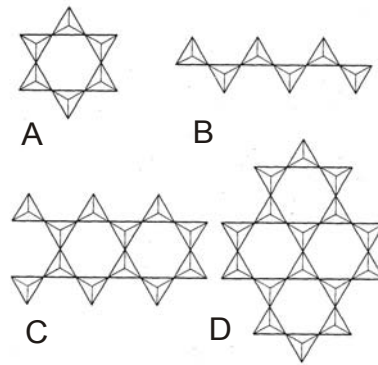
Silicijev dioksid je modrikasto bel prah, brez vonja in okusa. Načeloma je SiO<sub>2</sub> netoksična, neiritirajoča snov, primerna za peroralno in dermalno aplikacijo, vendar pa vdih prahu lahko povzroči iritacijo dihalnega trakta [1].

Silicijev dioksid (SiO<sub>2</sub>) predstavlja približno 75 % mase zemeljske skorje. Nahaja se v prosti obliki ali vezan v silikatih. V prosti obliki se v naravi najpogosteje nahaja v treh polimorfnih modifikacijah: kvarc, tridimit, kristobalit [2,3]. Poleg tega se SiO<sub>2</sub> nahaja v številnih mešanih kristalih s kovinskimi oksidi-silikatih (npr. montmorilonitih, hektoritu in kaolinitu) [3]. Silicijevi in kisikovi atomi tvorijo tetraedrično strukturo, v kateri je vsak silicijev atom obdan s štirimi kisikovimi [2].



Slika 1: Tetraeder [SiO<sub>4</sub>]<sup>4-</sup>

Tetraedri [SiO<sub>4</sub>]<sup>4-</sup> se povezujejo med seboj v obročje, dvojne verige, enojne verige ter v plasti. S sinteznim pristopom lahko pridobimo poleg kristaliničnih modifikacij čistega SiO<sub>2</sub> tudi njegovo amorfno obliko. Amorfna oblika kaže tetraedrično osnovno ureditev silicijevih in kisikovih atomov, pri čemer tetraedri niso prostorsko urejeni kot v primeru kristaliničnih SiO<sub>2</sub> [2].



**Slika 2: Modifikacije kristaliničnega SiO<sub>2</sub> (A-ciklični heksasilikati, B-silikat z enojno verigo, C-silikat z dvojno verigo, D-plastoviti silikat ).**

### 1.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Uprašeni SiO<sub>2</sub> je močno higroskopen, kar pomeni da adsorbira velike količine vode, pri čemer se sam ne raztopi. V kislih do nevtralnih raztopinah (pH = 0-7) deluje kot zgoščevalec, pri višjih pH vrednostih se ta učinek zmanjša.

Silicijev dioksid je slabo topen v organskih topilih, dobro topen pa v raztopinah alkalijskih hidroksidov pri pH ≥ 10.7 in pri povišani temperaturi, kjer tvori silikate. Z vodo tvori koloidno disperzijo [1].

### 1.1.2 SiO<sub>2</sub> gel

SiO<sub>2</sub> kserogel, pridobljen po sol-gel metodi, je netoksičen in biokompatibilen [4,5,6]. V telesu se pretvori v Si(OH)<sub>4</sub>, ki se izloča skozi ledvica [4]. Gel je potencialno sredstvo za izdelavo sistemov s kontroliranim sproščanjem učinkovin, njegova prednost je pridobivanje z relativno nizkimi stroški. Sol-gel proces poteka pri relativno nizkih T in milih pogojih, kar omogoča vgrajevanje občutljivih molekul kot so proteini. [4,5,6].

S spreminjanjem pH in razmerja voda/tetraetil ortosilikat (TEOS), vplivamo na strukturo SiO<sub>2</sub> gela. S tem spreminjamo njegovo razgradnjo in hitrost sproščanja učinkovine v raztopini [4].

## 1.2 Sol-gel postopek

### 1.2.1 Splošno o sol-gel postopku

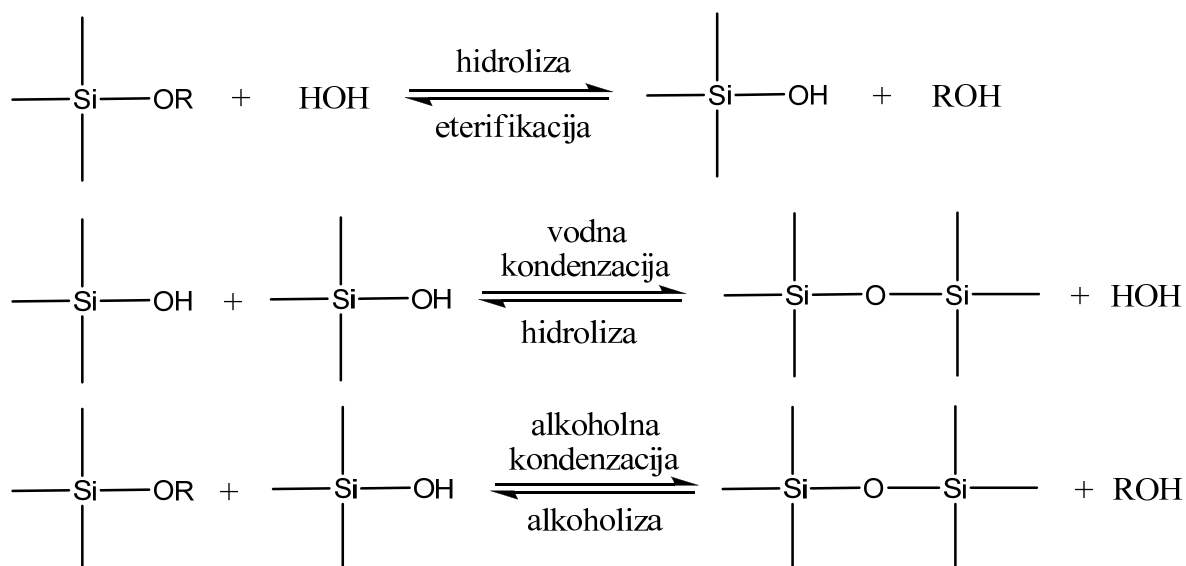
Pri postopku nastanejo monoliti, vlakna, filmi ali monodisperzni praški [8]. Natančneje, gre za nastanek anorganske mreže iz koloidne suspenzije (sol) in geliranje sola, kjer je končni produkt mreža v kontinuirani tekoči fazi (gel) [7].

Prekurzorje za sintezo koloidov sestavljajo različni reaktivnimi ligandi, ki obdajajo atom kovine. Primerni so kovinski alkoksidi, med katerimi sta najbolj uporabna alkoksisilana

TMOS (tetrametoksisiloksan) in TEOS (tetraetoksisiloksan). Možna je tudi uporaba analogov, kot so aluminati, titanati in borati (možno tudi v zmesih).

Sol-gel postopek na ravni funkcionalnih skupin sestavljajo tri reakcije:

- hidroliza,
- alkoholna kondenzacija,
- vodna kondenzacija.



**Slika 3: Reakcije pri sol-gel postopku**

Lastnosti posamezne anorganske mreže, pripravljene s sol-gel postopkom so odvisne od več faktorjev, ki vplivajo na posamezne reakcije v teku postopka. Mednje spadajo pH, temperatura, čas reakcije, koncentracije reagentov, vrsta in koncentracija katalizatorja, razmerje H<sub>2</sub>O/TEOS (R), ter čas priprave in sušenja [9,10].

Hidroliza in (poli)kondenzacija potekata skoraj sočasno (najprej samo hidroliza, potem pa obe hkrati). Potek hidrolize še pred začetkom kondenzacije lahko pospešijo ustrezno izbrani pogoji (pH, razmerje voda/Si, vrsta in koncentracija katalizatorja). Ker se voda in alkoksidi med seboj ne mešajo, izberemo tako topilo, ki je primerno za oboje (običajno alkohol). V prisotnosti topila je hidroliza olajšana zaradi mešanja vode in alkoksida z alkoholom.

Ko število siloksanskih vezi narašča, se individualne molekule SiO<sub>2</sub> povežejo preko mostov, agregirajo ter se vpletajo v mrežo, nakar se tvori gel. Pri sušenju se znebimo ujete tekoče faze (alkohol, voda), zaradi česar se mreža skrči. Poteče lahko še nadaljnja kondenzacija. Pri tem adicija topila in ustrezna sprememba reakcijskih parametrov lahko pospeši esterifikacijo in depolimerizacijo, ki so obratni procesi od osnovnega [19,20,21].

Če povzamemo polimerizacija poteka v treh stopnjah:

1. polimerizacija monomerov do delcev,
2. rast delcev,
3. povezovanje delcev v verige, nato v mreže, ki se razširijo čez tekočo fazo in jo zgoščujejo v gel.

Kislinsko kataliziran postopek ima za posledico mrežo iz primarno linearnih ali naključno razvejanih polimerov. Ti se preuredijo in tvorijo bolj razvejane mreže, ki gelirajo.

Pri bazično kataliziranem postopku nastajajo bolj razraščeni asociati (clusterji), ki ne penetrirajo v tekočo fazo (geliranja zato ni), pač pa se vedejo kot diskretni asociati.

- **Kisla kataliza**

- Pretežno linearen in občasno premrežen polimer



- **Bazična kataliza**

- Visoko premreženi klastri



Slika 4: Produkti sol-gel postopka pod kislimi in bazičnimi pogoji.

### 1.2.2 Vpliv vrste in koncentracije katalizatorja

Reakcija je možna brez katalizatorja, vendar je ob njegovi prisotnosti hitrejša in bolj popolna. Najpogosteje uporabljeni katalizatorji so mineralne kisline (HCl) in amonijeve spojine. Uporabni so tudi očetena kislina, KOH, amini, KF in HF. Na stopnjo (obseg) hidrolize najbolj vplivata moč in koncentracija katalizatorja [11,12].

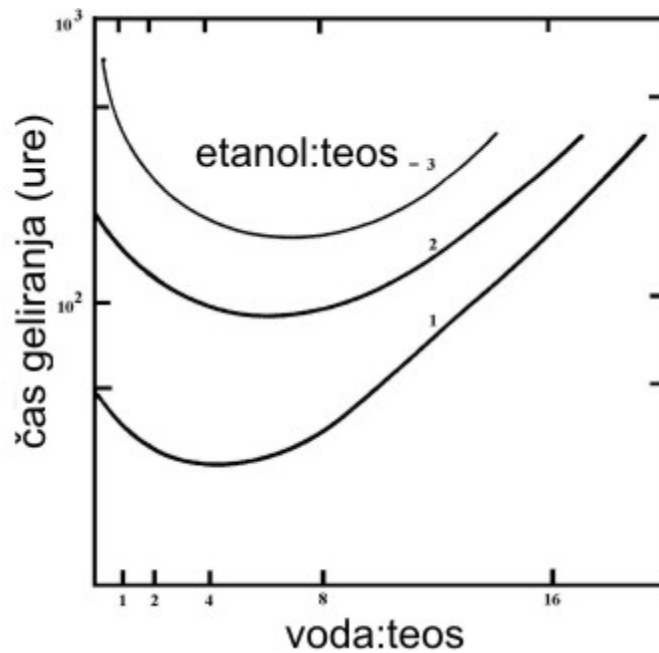
### 1.2.3 Kislinsko kataliziran mehanizem

Ugotovili so, da se vse močne kisline obnašajo podobno, medtem ko šibkejšje za dosego enakega obsega reakcije potrebujejo dalj časa. Iz diagrama logaritma konstante stopnje



Če dodajamo vodo v manjših količinah ( $R \ll 2$ ), se favorizira mehanizem, pri katerem nastaja alkohol. Če  $R$  preseže vrednost 2,28, je favoriziran mehanizem, pri katerem nastaja voda. Če zvišamo  $R$ , medtem ko imamo konstantno razmerje TOPILO/TEOS, se zmanjša koncentracija silikata. To zmanjša stopnjo hidrolize in kondenzacije, kar ima za posledico daljše čase geliranja [15].

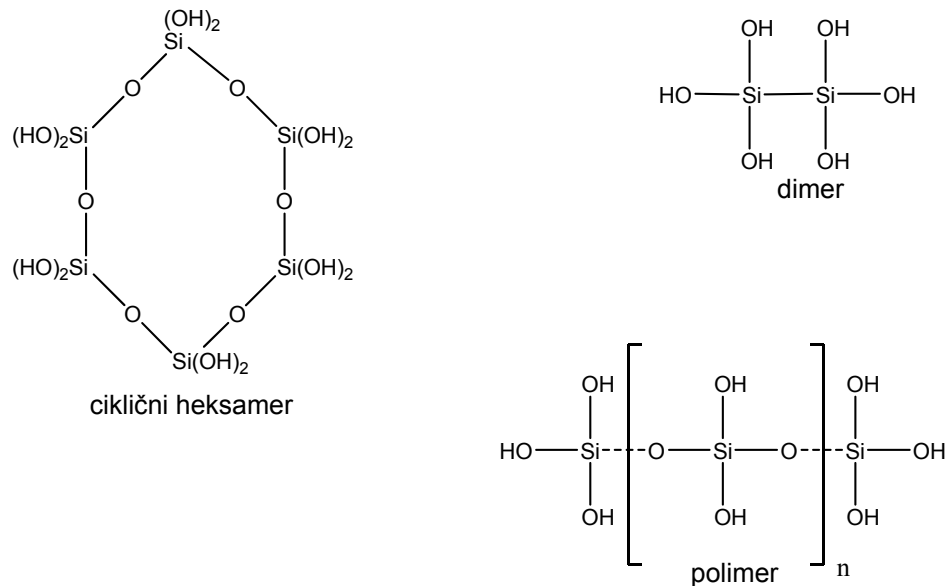
Ker je voda stranski produkt kondenzacije, velike vrednosti  $R$  povečajo obseg siloksanske hidrolize.



Slika 7: Časi geliranja v odvisnosti od razmerja  $H_2O/TEOS$  ( $R$ ) za kislinsko katalizirano reakcijo.

## 1.2.6 Kondenzacija

Na reakcijo kondenzacije vplivata pH in katalizatorji (kislinski/bazični, konc.).



Slika 8: Različne oblike potencialnih polimerov

### 1.2.6.1 Vpliv pH

Polimerizacija za tvorbo siloksanskih vezi poteka preko kondenzacije, pri kateri nastajata alkohol ali voda. Pri tem se tvorijo monomeri, dimeri, linearni trimeri, ciklični trimeri, ciklični tetrameri in obroči iz več osnovnih enot [7]. Ta sekvenca reakcije kondenzacije zahteva depolimerizacijo (odpiranje obroča) in prisotnost monomerov, ki so v raztopini v ravnotežju z oligomeri in tistimi, nastalimi z depolimerizacijo [11].

Stopnja depolimerizacij, pri katerih pride do odprtja obroča, in stopnja adicije monomerov sta odvisni od pH okolice:

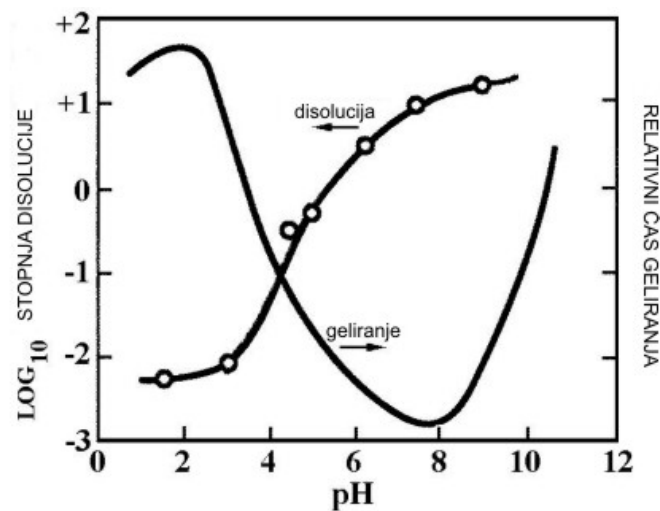
-pH < 2: Stopnja kondenzacije je proporcionalna koncentraciji  $H^+$ . Ker je topnost  $SiO_2$  nizka pod pH=2, pride do formiranja in agregiranja primarnih delcev  $SiO_2$ . Nastajanje mreže vpliva le malo na rast delcev, ko ti zrastejo nad 2 nm premera. Nastajajoča mreža je zgrajena iz zelo majhnih delcev [11].

-pH=2-6: Stopnja kondenzacije je proporcionalna koncentraciji  $OH^-$ . Kondenzacija prednostno poteka med močno kondenziranimi, šibko kondenziranimi in nevtralnimi vrstami oligomerov, topnost  $SiO_2$  je majhna.

Potek dimerizacije je počasen, ko pa le ta steče, se dimeri prednostno vežejo z monomeri in tvorijo trimere, ti se povežejo z monomeri v tetramere. Ciklizacija poteka zaradi neposredne

bližine koncev verige polimerov in zaradi pomanjkanja monomerov. Nadaljnja rast poteka tako, da se delci z manjšo molekulsko maso adherirajo na delce, ki so bolj kondenzirani ali pa se bolj kondenzirani delci agregirajo, kar vodi do nastanka verig in mreže. Rast preneha, ko premer delcev doseže 2-4nm [8].

pH > 7: Polimerizacija poteka enako kot med pH 2 in 6. Kondenzirane vrste so v tem območju že ionozirane in se zato odbijajo. Rast poteka primarno z adicijo monomerov na močno kondenzirane delce in manj z agregacijo bolj kondenziranih delcev. Ker je topnost SiO<sub>2</sub> pri tem pH večja in ker je odvisnost velikosti od topnosti nad tem pH višja, se velikost delcev poveča in njihovo število zmanjša, saj se dobro topni majhni delci raztopijo in ponovno obarjajo na površini večjih in manj topnih. Rast se zaključi, ko postane razlika med topnostjo najmanjšega in največjega delca neopazna. Temu procesu pravimo Ostwaldovo “zorenje”(Ostwald ripening). Velikost delcev je torej predvsem odvisna od temperature (višja temperatura pomeni večje delce), hitrost rasti pa je odvisna od porazdelitve velikosti delcev [11].



Slika 9: Raztapljanje in relativni čas geliranja v odvisnosti od pH

### 1.2.6.2 Vpliv vrste in koncentracije katalizatorja

Tako kot hidroliza tudi kondenzacija lahko poteka brez katalizatorja (pri organosiloksanah je uporaba le-teh koristna). Uporabljamo lahko enake katalizatorje kot pri hidrolizi, kar poveča njihovo uporabo, pomembno pa je, da izberemo katalizator v skladu z izbiro zdravilne učinkovine, ki jo vgrajujemo.

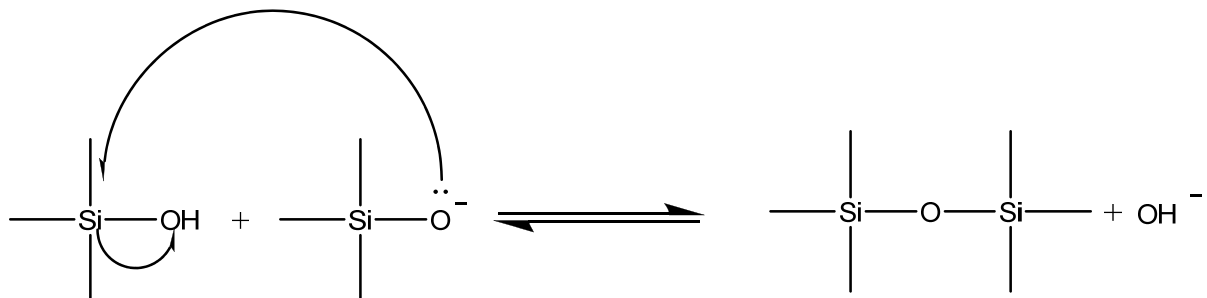
Pokazalo se je, da je reakcija kondenzacije specifična v primeru uporabe kisline ali baze [16]. Iller je pokazal, da pod bolj bazičnimi pogoji časi geliranja naraščajo [13]. Katalizatorji, ki določijo pH, vplivajo na vrsto delcev, ki nastanejo pri reakciji.

### 1.2.6.3 Kislinsko kataliziran mehanizem

Kislinsko kataliziran kondenzacijski mehanizem najverjetneje vključuje protoniranje silanolne skupine. Protoniranje naredi silicijev atom bolj elektrofilen in tako bolj reaktiven za nukleofilni napad. Najbolj bazične silanolne skupine (tiste na monomerih in slabo razvejenih oligomerih) se protonirajo najprej, zato reakcije kondenzacije prednostno potekajo med nenabitimi delci in protoniranimi silanolnimi skupinami na monomerih in koncih verig [11].

### 1.2.6.4 Bazično kataliziran mehanizem

Najbolj sprejet mehanizem za bazično katalizirano kondenzacijo vključuje napad nukleofilne deprotonirane (disociirane) silanolne skupine na silicijev atom. Ta mehanizem predvideva nastanek pet in šest koordinatnih silicijevih prehodnih stanj, podobno kot pri  $S_N2$  tipu mehanizma [13].



Slika 10: bazično kataliziran mehanizem kondenzacije

### 1.3 Polimorfizem trdnih snovi

Polimorfizem je definiran kot obstoj snovi z enako kemijsko sestavo in različnimi mrežnimi strukturami in/ali različnimi konformacijami. Psevdopolimorfizem se nanaša na kristalne snovi, v katerih so molekule topila del mrežne strukture (solvati). Različni polimorfi in solvati imajo različne kristalne celice in mreže ter različne konformacije, kot tudi različne mrežne energije in entropije. Zato imajo ponavadi različne fizikalno-kemijske lastnosti, kot npr. gostoto, trdoto, lomni količnik, temperaturo tališča, entalpijo taljenja, topnost, hitrost raztapljanja, ostale termodinamske lastnosti in celo barvo.

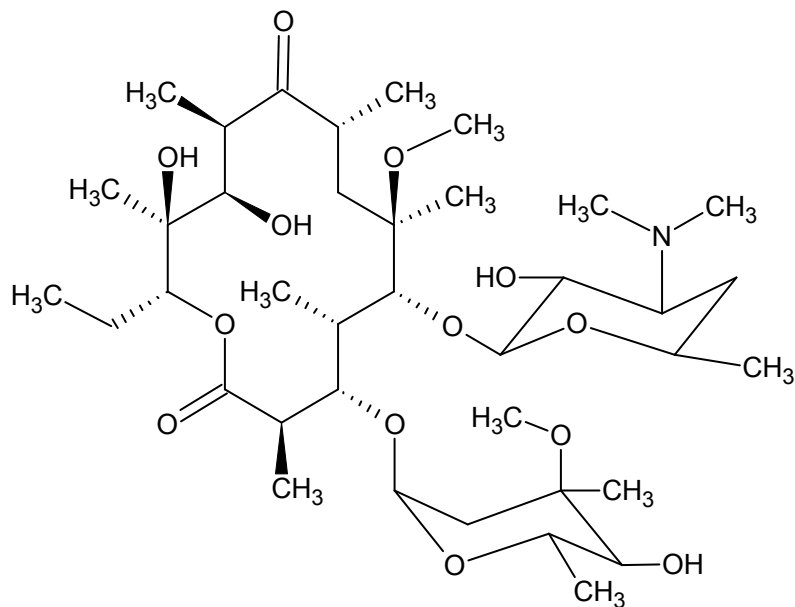
Na osnovi razlik v termodinamskih lastnostih razdelimo polimorfe na enantiotrope in monotrope, glede na to ali se lahko ena oblika reverzibilno pretvori v drugo ali ne. V enantiotropnem sistemu je pri določeni temperaturi pod tališčem (temperatura polimorfne transformacije) mogoča reverzibilna transformacija med polimorfoma. V monotropnem sistemu reverzibilna polimorfna transformacija pod temperaturo tališča ni mogoča.

Znano je, da lahko nekatere organske molekule tvorijo različne kristalne mreže preko različnih mehanizmov. Glede na to, kakšni so ti mehanizmi, jih umetno razdelimo na strukturne polimorfe (*packing polymorphism*) in konformacijske polimorfe (*conformational polymorphism*). Razdelitev je umetna, saj so konformacijski polimorfi lahko hkrati tudi strukturni in obratno. Strukturni polimorfizem predstavlja sisteme, v katerih se konformacijsko relativno rigidne organske molekule preko različnih intermolekularnih mehanizmov uredijo v različne kristalne mreže.

Pri konformacijskem polimorfizmu gre za sisteme, kjer se konformacijsko gibljive molekule lahko zvijejo v različne konformere, ki se uredijo v različne kristalne mreže [17].

## 1.4 Klaritromicin

Klaritromicin, 6-O-metileritromicin A, je polysintezni derivat eritromicina s protimikrobnim delovanjem in ga uvrščamo v skupino makrolidnih antibiotikov [18]. Zanje je značilen makrociklični laktonski obroč, na katerega so z glikozidnimi vezmi vezane sladkorne komponente [19]. Klaritromicin uporabljamo peroralno za sistemsko zdravljenje bakterijskih infekcij [20].



Slika 11: Strukturna formula klaritromicina.

### 1.4.1 Fizikalno-kemijske lastnosti

Klaritromicin je šibka baza z molekulsko formulo C<sub>38</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>13</sub> in molekulsko maso 747,95 g/mol [18]. Je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek, praktično netopen v vodi, topen v acetonu in etilenkloridu ter slabo topen v metanolu in etanolu [21]. Njegova topnost se povečuje z nižanjem pH vodnih raztopin. Zaradi dobre permeabilnosti in slabe topnosti v vodi ga uvrščamo v razred II po biofarmaceutski klasifikaciji [22]. S prekristalizacijo klaritromicina iz etanola dobimo kristale s temperaturo tališča 222-225°C [12].

### 1.4.2 Farmakodinamika

Preko vezave na P-mesto 50S podenote ribosomov zavira sintezo bakterijskih beljakovin in tako onemogoča normalno delovanje bakterijskih celic [23]. Nizka toksičnost pri človeku je verjetno posledica bistveno drugačne strukture ribosomov humanih celic, zaradi česar ne pride do vezave učinkovine na njihovo 50S podenoto. Klaritromicin deluje bakteriostatično

še preko zaviranja delovanja ribosomalne peptidiltransferaze, na nekatere bakterije pa deluje tudi baktericidno [20]. Pri nekaterih bakterijah pride do antagonističnega delovanja makrolidov, kloramfenikola in linkozamidov, saj se vsi vežejo na isto tarčno mesto.

#### **1.4.3 Odpornost bakterij**

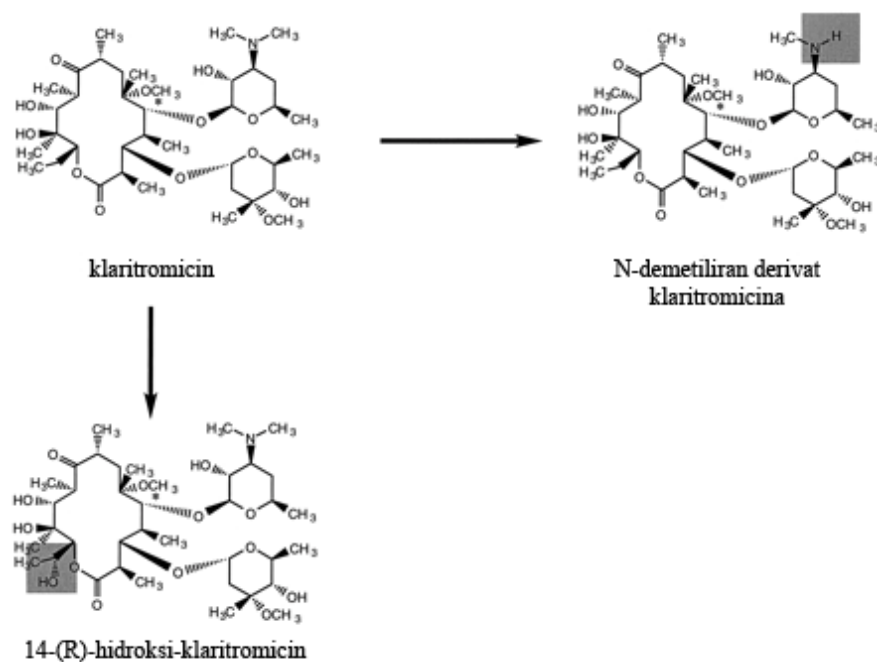
Pridobljena odpornost mikroorganizmov na delovanje makrolidnih antibiotikov temelji na treh mehanizmih, prenaša pa se preko kromosomov ali plazmidov. Bakterije, odporne na delovanje makrolidnih antibiotikov, tvorijo encime za metiliranje adenina na ribosomalni RNA in tako preprečijo vezavo protimikrobnega zdravila na spremenjeno tarčno mesto, klaritromicin pa poleg tega velja še za močnega induktorja omenjenih encimov [23]. Odpornost mikroorganizmov na makrolide je lahko tudi posledica inaktivacije samega antibiotika [20], ali pa spremembe transportnih mehanizmov in aktivnega izčrpavanja učinkovine iz celic [24].

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

Klaritromicin je močan, učinkovit antibiotik s širokim spektrom delovanja na po Grammu pozitivne in negativne aerobne, anaerobne ali fakultativno anaerobne bakterije, deluje pa tudi na druge bakterije (klamidije, mikoplazme, ureaplazme, mikobakterije) in atipične mikobakterije [23]. Makrolidni antibiotiki so splošno indicirani pri infekcijah s po Grammu pozitivnimi bakterijami pri bolnikih, ki so odporni na penicilinske antibiotike ali tetracikline in pri pacientih, ki so alergični na penicilinske antibiotike [19]. Klaritromicin je indiciran pri okužbah zgornjih (tonzilofaringitis, sinusitis) in spodnjih (bronhitis, pljučnica) dihal, pri okužbah z mikobakterijami, uporabljamo pa ga tudi pri zmernih okužbah kože in podkožja [25]. V kombinaciji z zaviralci izločanja želodčne kisline (npr. omeprazol) ga pri bolnikih s peptično razjedo želodca ali dvanajstnika uporabljamo kot najučinkovitejši način odstranitve *Helicobacter pylori* [24]. Klaritromicin je v kombinaciji s pirimetaminom uporaben pri akutnem encefalitisu s *Toxoplasma gondii* pri obolelih za AIDS-om [19], zaradi njegovega *in vitro* delovanja proti *Bacillus anthracis* pa naj bi se po smernicah Centrov za kontrolo in preventivo bolezni v ZDA uporabljal tudi pri terapiji antraksa v kombinaciji s ciprofloksacinom ali doksiciklinom [26].

### 1.4.5 Farmakokinetika

Klaritromicin je stabilen v prisotnosti želodčne kisline po peroralni aplikaciji ter se hitro in dobro absorbira iz prebavil (predvsem iz jejunuma). Zaradi velikega predsistemskega metabolizma, ki je predvsem posledica metabolizma v jetrih, je njegova biološka uporabnost približno 50 %. Hrana ne vpliva na obseg absorpcije, jo pa nekoliko upočasni. Zaradi majhne stopnje ionizacije se klaritromicin dobro porazdeljuje v tkiva, približno 80 % pa se ga reverzibilno veže na plazemske beljakovine. Presnova učinkovine v jetrih je hitra in intenzivna ter poteka z N-dealkiliranjem, oksidacijo s citokrom P450 in položajno specifično hidroksilacijo na mestu C<sub>14</sub>. Poznanih je vsaj 7 metabolitov, 14-(R)-hidroksiklaritromicin pa ima tako kot izhodna učinkovina protimikrobno delovanje. Njegova minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je dvakrat večja od MIK klaritromicina, kar pa ne velja pri bakteriji *Haemophilus Influenzae*, saj je v tem primeru presnovek dvakrat bolj učinkovit od izhodne učinkovine. Farmakokinetika zaradi nasičenja jetrnih encimov pri visokih odmerkih ni linearna. Klaritromicin se v večji meri izloča iz telesa s sečem, nekaj pa se ga izloči tudi z blatom [24].



Slika 12: Glavna metabolita klaritromicina

#### **1.4.6 Varnost**

Predklinične študije na živalih so pokazale, da je toksično delovanje klaritromicina odvisno od odmerka in trajanja zdravljenja, da so toksični odmerki bistveno večji od priporočenih odmerkov klaritromicina za zdravljenje in da so jetra primarni tarčni organ, ki je prizadet pri vseh toksičnih odmerkih, pri čemer se je stanje po prenehanju jemanja zdravila normaliziralo. Toksično delovanje se je pokazalo tudi na želodcu, priželjcu in ostalih limfatičnih tkivih ter na ledvicah [24]. *In vitro* in *in vivo* raziskave so pokazale, da klaritromicin ni genotoksičen in mutagen [23]. Prav tako niso dokazali toksičnega delovanja na zarodek [24].

#### **1.4.7 Polimorfizem klaritromicina**

Klaritromicin obstaja v trdni obliki v treh znanih kristaliničnih (polimorfni) oblikah; I, II ter O. Farmacevtske oblike na tržišču vsebujejo klaritromicin v polimorfni obliki II, ker je le-ta termodinamsko najbolj stabilna [27].

##### **1.4.7.1 Klaritromicin oblika I**

Kinetično stabilnejšo kristalinično obliko klaritromicina I, ki nastaja hitreje, pripravimo tako, da klaritromicin rekristaliziramo iz topila (npr. etanol) ter produkt sušimo pod znižanim tlakom [27].

##### **1.4.7.2 Klaritromicin oblika II**

Termodinamsko stabilno kristalinično obliko klaritromicina II lahko pripravimo na več načinov.

- a. Kristalinično obliko klaritromicina I pretvorimo v obliko II s segrevanjem v vakuumskem sušilniku pri temperaturi višji od 80°C [27].
- b. Suspenzijo klaritromicina v nepolarnem topilu (npr. aceton, heptan) segrevamo pri refluxu 15 minut, še vročo raztopino filtriramo ter ponovno segrevamo pri refluxu, nato pa raztopino ohlajamo pri sobni temperaturi ter kasneje še na ledeni kopeli, tako da se oborijo kristali klaritromicina v obliki II. Nastalo suspenzijo prefiltriramo in kristale učinkovine sušimo v vakuumskem sušilniku [27].
- c. Klaritromicin I lahko pri sobni temperaturi pretvorimo v polimorfno obliko II z močnim mešanjem suspenzije učinkovine v vodi ali v zmesi vode in organskega

topila, ki se ne meša z vodo in v katerem je klaritromicin praktično netopen (služi le za raztapljanje morebitnih organskih nečistot v izhodnem materialu), nato pa suspenzijo prefiltriramo in kristale učinkovine čez noč sušimo v vakuumskem sušilniku pri 60°C. Tako lahko na enostaven način in po nizki ceni učinkovito pridobivamo zelo čist produkt brez ostanka organskih topil [28].

#### **1.4.7.3 Klaritromicin oblika O**

Klaritromicin v obliki O združuje vse solvate učinkovine, ko molekulo klaritromicina solvatirajo molekule naslednjih topil: etanol, izopropilacetat, izopropanol ali tetrahidrofuran [27, 29]. Ker gre pri solvatih za psevdopolimorfizem, to pomeni, da so molekule topila del kristalne rešetke, in ne za pravi polimorfizem. Pri našem delu nismo preučevali fizikalno-kemijskih lastnosti te oblike klaritromicina.

#### **1.4.7.4 Amorfen klaritromicin**

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

- a. Klaritromicin z mletjem pretvorimo v amorfno obliko [30,31].
- b. Klaritromicin raztopimo v topilu (npr. metanol ali aceton), nato pa topilo odstranimo s sušenjem z razprševanjem ter tako dobimo amorfne delce učinkovine.

## 2. NAMEN DELA

Oblaganje je učinkovit postopek za zaščito, maskiranje neprijetnega okusa zdravilnih učinkovin ali prirejanje sproščanja. Za učinkovito oblaganje mora biti učinkovina med procesom stabilna ter netopna, kontakt z nastajajočo oblogo, ki je pogojen predvsem z medfazno energijo, pa čim boljši. Namen dela je teoretično in eksperimentalno preučiti vpliv polimorfne oblike klaritromicina na učinkovitost oblaganja s SiO<sub>2</sub>, dobljenim po bazično kataliziranem sol-gel postopku. Medfazni kontakt bomo preučevali z meritvami površinske energije posameznih komponent ter računanjem aktivacijskih energij heterogene nukleacije SiO<sub>2</sub> na površini polimorfov klaritromicina pri različnih pogojih oblaganja. Poskušali bomo poiskati korelacijo med aktivacijsko energijo za nukleacijo ter učinkovitostjo oblaganja. Pri delu se bomo poslužili meritev površinske energije, vrstične elektronske mikroskopije, rentgenske praškovne difrakcije, diferenčne termične analize s termogravimetrijo ter klasične termodinamike nukleacije in rasti delcev.

### **3. MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 Uporabljene snovi in oprema:**

- H<sub>2</sub>O
- ETANOL 100% (Riedel de Häen)
- NH<sub>3</sub> 25% sol. (Merck)
- TEOS (Merck)
- KMC (Sigma)
- difraktometer Siemens D-5000
- kroglčni mlin MM 200 Haan (Retsch)
- elektronski mikroskop FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss
- ultrazvočna kadička Fritsch 17002
- analitska tehtnica Mettler Toledo AG 285
- precizna tehtnica Sartorius 1474
- magnetno mešalo Kika RCT Basic
- sušilnik Instrumentaria streimatic ST-11
- hidravlična preša P/N 15011, Graseby Specac
- Processor Tensiometer K12

### 3.2 Priprava vzorca

Izvedli smo prekristalizacijo KMC iz 100% EtOH in vode. V prvem primeru smo v 500ml bučki raztopili 5g KMC (Sigma) v 200g 100%EtOH, pri znižanem tlaku odparili topilo, preostanek topila pa odfiltrirali pri znižanem tlaku ter sušili tri ure pri 50°C. V drugem primeru smo v 500ml bučki dispergirali 10g KMC (Sigma) v 250ml H<sub>2</sub>O, ter mešali čez noč na magnetnem mešalu. Kristale smo odfiltrirali ter sušili v sušilniku tri ure pri 50°C [39].

Pred nadaljnjim oblaganjem smo obe kristalni obliki KMC zmleli zaradi zožanja porazdelitve velikosti delcev. Oblaganje KMC smo v obeh primerih izvedli tako, da smo v bučko dali EtOH, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O ter KMC. Zaprto bučko smo pustili pol ure v ultrazvočni kopeli, nato smo postopoma dodajali TEOS ter bučko vrteli, po končanem dodajanju je sledilo mešanje še 1 uro. Po oblaganju smo kristale filtrirali, sprali s 100% EtOH ter sušili pri 50°C čez noč.

**Tabela 1: Mase snovi, potrebne za oblaganje vzorca s SiO<sub>2</sub>**

<b>snov</b>	<b>masa (g)</b>
Klaritromicin (H <sub>2</sub> O ali EtOH)	2,41
etanol	24,6
NH <sub>3</sub> sol – nasičena raztopina	0,49
TEOS	4,17

### **3.3 Karakterizacija vzorca**

#### **3.3.1 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)**

Z XRPD smo potrdili prisotnost obeh kristaliničnih oblik KMC ter njihovo oblaganje s SiO<sub>2</sub>. Meritve so bile opravljene z aparatom Siemens D-5000 z uporabo bakrove K1 linije. Analiza je bila opravljena na Kemijskem inštitutu.

#### **3.3.2 Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)**

Posušene vzorce smo pred mikroskopijo zdrobili in nanесли na obojestransko lepljivi ogljikov trak (SPI Supplies, USA). Vzorce smo nato poslikali z uporabo field emission tehnike vrstičnega elektronskega mikroskopa (FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Germany), pri napetosi 1 keV. Analiza je bila opravljena na Kemijskem inštitutu.

#### **3.3.3 Določanje površinskih energij**

Proste površinske energije obeh oblik KMC ter zmesi etanola in vode smo določili z merjenjem stičnih kotov. Uporabili smo metodo z Wilhelyjevo ploščico ter Processor Tensiometer K12. Energije smo nato izračunali po Wu-jevi enačbi (15), v kombinaciji z Youngovo (3).

Za določanje proste površinske energije KMC smo uporabili polarno in nepolarno tekočino (dijodometan in voda), pred meritvijo smo KMC stisnili v ploščico z uporabo hidravlične preše (P/N 15011, Graseby Specac). Za določanje polarnih in disperzijskih prispevkov proste površinske energije zmesi etanola in vode smo pripravili 5 raztopin v različnih razmerjih in sicer: 10% m/m(EtOH), 40% m/m(EtOH), 60% m/m(EtOH), 80% m/m(EtOH) ter 90% m/m(EtOH). Tem raztopinam smo pomerili stični kot s platinasto ploščico (celokupni prispevek) ter teflonsko ploščico (disperzijski prispevek). Polarno komponento smo izračunali na podlagi Youngove enačbe (3). [32].

### 3.4 Teorija homogene in heterogene nukleacije

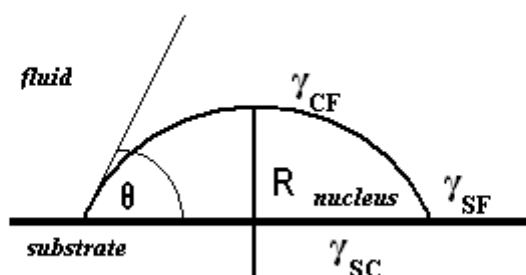
Glede na klasično teorijo nukleacije, lahko energijo tvorbe sferičnega jedra preko homogenega mehanizma v prenasičeni raztopini opišemo z enačbo:

$$W_{\text{homo}} = -\frac{V_n}{v_1}\phi + A_n\gamma_{CF} \equiv -\frac{4\pi R^3}{3v_1}kT \ln S + 4\pi R^2\gamma_{CF} \quad (1),$$

kjer  $V_n$  predstavlja volumen jedra,  $v_1$  je volumen enote, ki raste,  $\phi$  je parameter energije prenasičnja,  $A_n$  je površina jedra,  $\gamma_{CF}$  je medfazna energija med jedrom in tekočo fazo,  $R$  je polmer sferičnega jedra,  $k$  Boltzmann-ova konstanta,  $T$  je temperatura in  $S$  razmerje prenasičenja ( $S=a/a_\infty$ , kjer je  $a$  aktivnost topljenca v prenasičeni raztopini in  $a_\infty$  aktivnost nasičene raztopine). Homogena nukleacija se pojavi v odsotnosti katalizatorja in ob visoki nasičenosti. Kadar je v raztopini že prisotna površina, poteče heterogena nukleacija (tvorba jedra v kontaktu s trdno površino). Energijo nastanka sferičnega jedra v kontaktu z ravno trdno površino nam opiše enačba:

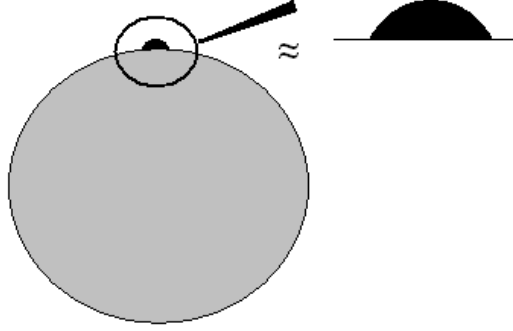
$$W_{\text{hetero}} = -\frac{V_n}{v_1}\phi + A_{CF}\gamma_{CF} + A_{SC}(\gamma_{SC} - \gamma_{SF}) \equiv -\frac{V_n}{v_1}kt \ln S + A_{CF}\gamma_{CF} + A_{SC}(\gamma_{SC} - \gamma_{SF}) \quad (2),$$

Kjer je  $\gamma_{SC}$  medfazna energija med jedrom in raztopino,  $A_{SC}$  je površina med substratom (ravno površino) in jedrom,  $\gamma_{SC}$  medfazna energija med substratom in jedrom ter  $\gamma_{SF}$  medfazna energija med substratom in raztopino.



Slika 13: Shema medfaznih energij in stičnega kota

Delci modelne substance so skoraj sferični, zato obravnavanje substrata kot ravne površine ni točno. Kljub temu so nastajajoča jedra veliko manjša od substrata, kar pomeni, da lahko omenjeno teorijo uporabimo tudi na tem sistemu.



Slika 14: Tvorba jedra (črno) na delcu modelne substance (sivo).

Uporabimo lahko Youngovo enačbo stičnih kotov:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SF} - \gamma_{SC}}{\gamma_{CF}} \quad (3).$$

Medfazne energije,  $\gamma^{XY}$ , smo izračunali z enačbo 4 [36]:

$$\gamma^{XY} = \gamma_X + \gamma_Y - 2\sigma^d - 2\sigma^p \equiv \gamma_X + \gamma_Y - \frac{4\gamma_X^D \gamma_Y^D}{\gamma_X^D + \gamma_Y^D} - \frac{4\gamma_X^P \gamma_Y^P}{\gamma_X^P + \gamma_Y^P} \quad (4),$$

kjer sta  $\gamma_X$  in  $\gamma_Y$  površinski energiji faz  $X$  in  $Y$ ,  $\sigma^p$  in  $\sigma^d$  predstavljata specifične (elektron donorske in elektron akceptorske) in disperzijske (Van der Waalsove) interakcije med  $X$  in  $Y$ ,  $\gamma_X^D$  in  $\gamma_Y^D$  sta disperzijski komponenti in  $\gamma_X^P$  ter  $\gamma_Y^P$  sta polarni komponenti površinskih energij faz  $X$  in  $Y$  ( $\gamma_X^D + \gamma_X^P = \gamma_X$ ). Enačba 2 nam pove, da bo medfazna energija manjša, če si bosta polarnosti faz  $X$  in  $Y$  podobni (tako bodo prispevki interakcij v enačbi 15 večji). [36]

Volumen jedra v enačbi (1) je

$$V_n^{hetero} = nV_1 \equiv \frac{1}{3} \pi R^3 (2 + \cos \theta)(1 - \cos \theta)^2 \quad (5)$$

in CF ter SC medfazna površina (slika 10) se izračunata kot

$$A_{CF} = 2\pi R^2 (1 - \cos \theta) \quad (6)$$

$$A_{SC} = \pi R^2 (1 - \cos^2 \theta) \quad (7).$$

Z uporabo enačb (5-7), enačbo 2 pretvorimo v

$$W_{hetero} = -\frac{\left(\frac{1}{3}\pi R^3(2+\cos\theta)(1-\cos\theta)^2\right)}{v_1} kT \ln S + 2\pi R^2(1-\cos\theta)\gamma_{CF} + \pi R^2(1-\cos^2\theta)(\gamma_{SC} - \gamma_{SF}) \quad (8).$$

Energijska bariera nukleacije obstaja za oba mehanizma, z maksimizacijo enačb (1) in (8):

$$\left(\frac{\partial W_{homo}}{\partial R}\right) = 0 \quad (9)$$

$$\left(\frac{\partial W_{hetero}}{\partial R}\right)_{\theta} = 0 \quad (10)$$

dobimo

$$W_{homo}^* = \frac{16\pi v_1^2 \gamma_{CF}^3}{3(kT \ln S)^2} \quad (11)$$

za aktivacijsko energijo homogene nukleacije in

$$W_{hetero}^* = \frac{16\pi v_1^2 \gamma_{CF}^3}{3(kT \ln S)^2} \left(\frac{1}{4}(2+\cos\theta)(1-\cos\theta)^2\right) \quad (12)$$

za aktivacijsko energijo heterogene nukleacije. Da ugotovimo, kateri mehanizem poteka v našem sistemu, je pomembno, da določimo razmerje aktivacijskih energij:

$$\frac{W_{hetero}^*}{W_{homo}^*} = \left(\frac{(2+\cos\theta)(1-\cos\theta)^2}{4}\right) \quad (13).$$

Če vstavimo enačbo (3) v (13), dobimo:

$$\frac{W_{hetero}^*}{W_{homo}^*} = \frac{\left(2 + \left(\frac{\gamma_{SF} - \gamma_{SC}}{\gamma_{CF}}\right)\right) \left(1 - \left(\frac{\gamma_{SF} - \gamma_{SC}}{\gamma_{CF}}\right)\right)^2}{4} \quad (14).$$

Stični kot med nastajajočim nukleusom in delcem KMC v različnih sestavah mešanice EtOH/voda smo izračunali z Youngovo enačbo

$$\theta = \arccos\left(\frac{\gamma^{SF} - \gamma^{SC}}{\gamma^{CF}}\right) \quad (15)$$

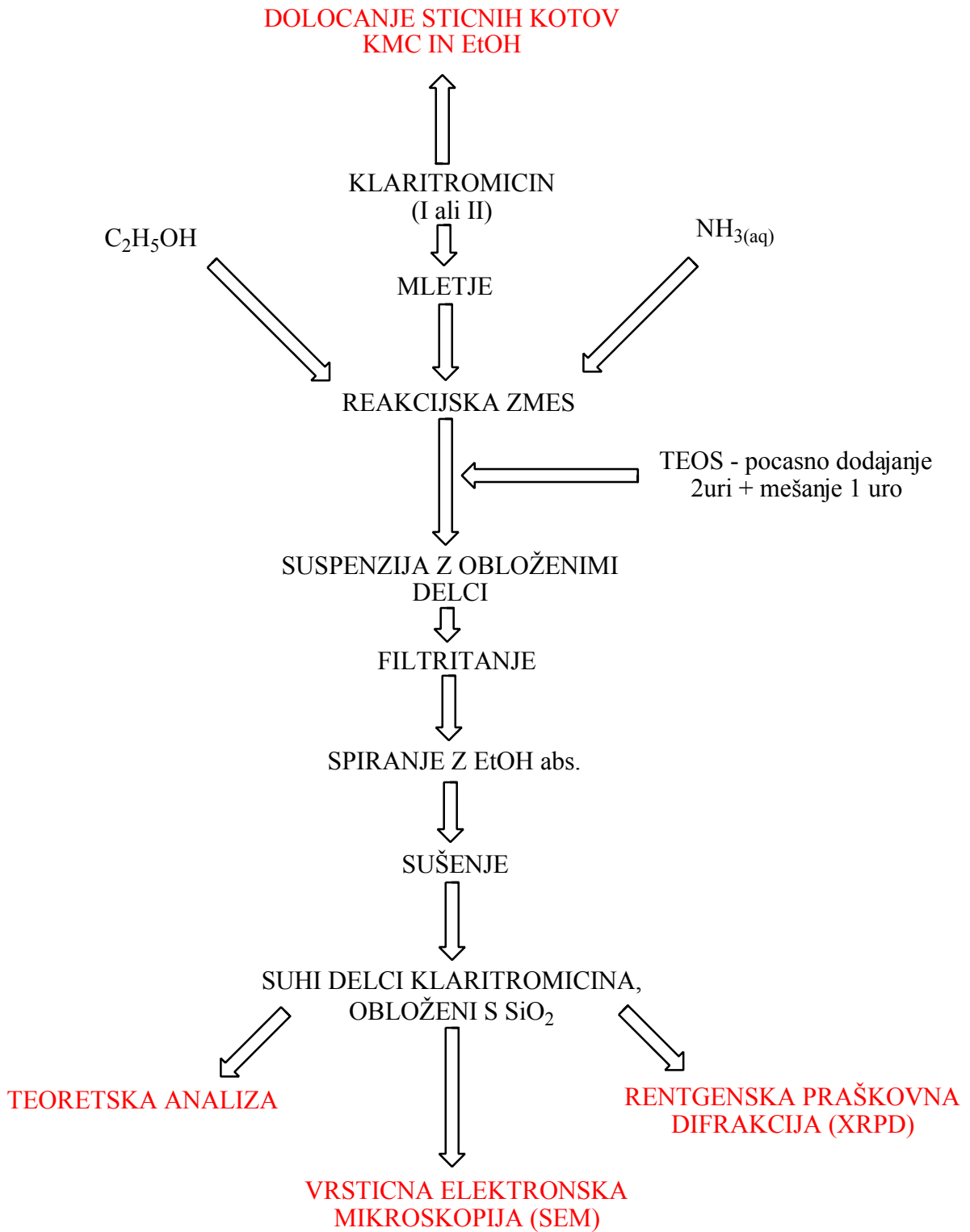
Ker nukleacija predstavlja termično vzbujen proces (proces pogojen z naključnimi fluktuacijami lokalne koncentracije kot posledica termičnega gibanja), lahko hitrostno konstanto nukleacije opišemo z Arrhenius-ovi podobno enačbo (16):

$$J = \Omega \exp\left(-\frac{W^*}{k_B T}\right) \quad (16)$$

kjer je  $\Omega$  kinetični prefaktor, ki vsebuje vse specifične kinetične lastnosti. Enačbo interpretiramo takole: Hitrostna konstanta nukleacije je proporcionalna produktu konstante dinamike fluktuacij in verjetnosti, da bo fluktuacija dovolj velika (eksponentni člen). Ker sta  $\Omega$  in aktivacijska energija za homogeno nukleacijo neodvisna od površine KMC (torej je v obeh primerih enaka) lahko zapišemo enačbo, ki opisuje razmerje hitrostnih konstant heterogene nukleacije za obe vrsti KMC:

$$\frac{J_E}{J_W} = \exp\left(\frac{W_{hom}^*}{k_B T} \{W_{het,W}^* - W_{het,E}^*\}\right) \quad (17)$$

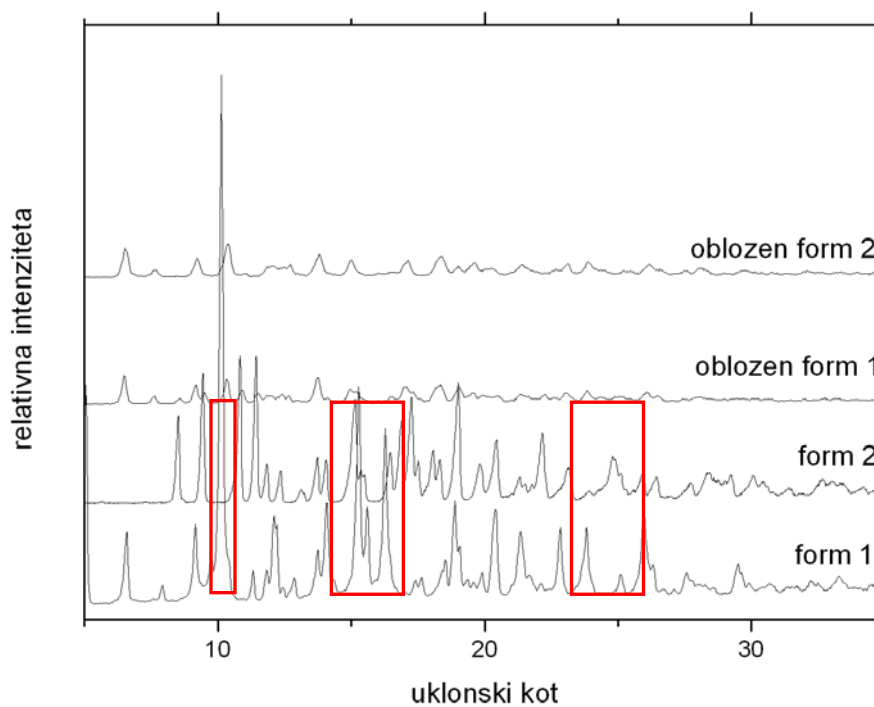
Iz literature je znano, da so tipične vrednosti  $\frac{W_{hom}^*}{k_B T}$  med 10 (za visoka prenasajenja) in 100 (za nizka prenasajenja) [37].



Slika 15: Shematski prikaz poteka eksperimenta

## 4. REZULTATI

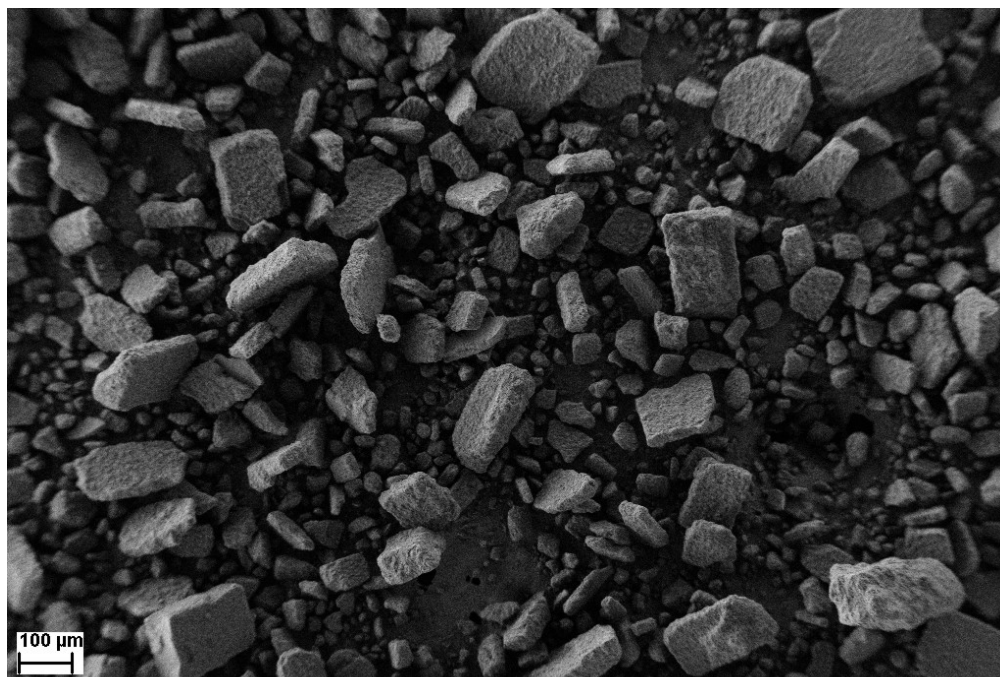
Z uporabo XPRD analize smo proučili razlike v polimorfizmu obeh oblik KMC, prav tako smo opazovali povečanje amorfnosti površine vzorcev na račun oblaganja s SiO<sub>2</sub>.



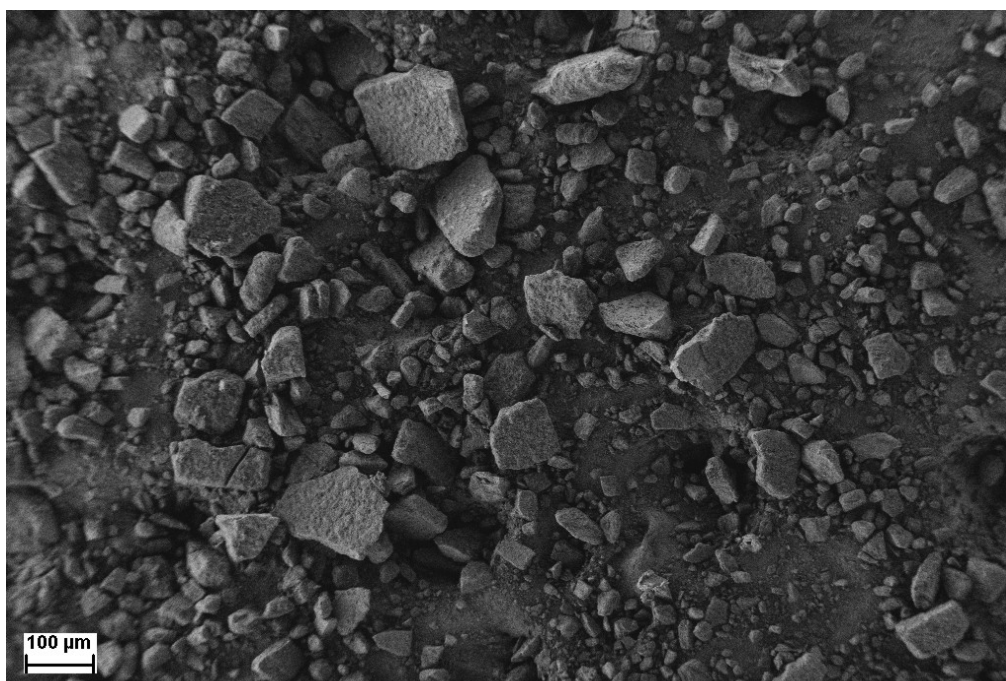
**Slika 16: XPRD analiza vzorcev, kjer so označene razlike med obema polimorfni oblikama KMC, ter vidni zglajeni vrhovi zaradi oblaganja z amorfno siliko.**

Slika 16 prikazuje najbolj vidne razlike med polimorfoma, ki so significantne in označene z rdečo. Na sliki vidimo tudi obložena vzorca, ki sta veliko bolj amorfna kot izhodne snovi, kar je posledica prisotnosti SiO<sub>2</sub> obloge.

Pregledali smo morfološke razlike med vzorci, pri čemer smo uporabili metodo vrstične elektronske mikroskopije SEM. Na sliki 17 vidimo posnetek izvornega vzorca. Razvidno je, da so delci po velikosti in obliki zelo heterogeni in relativno veliki.

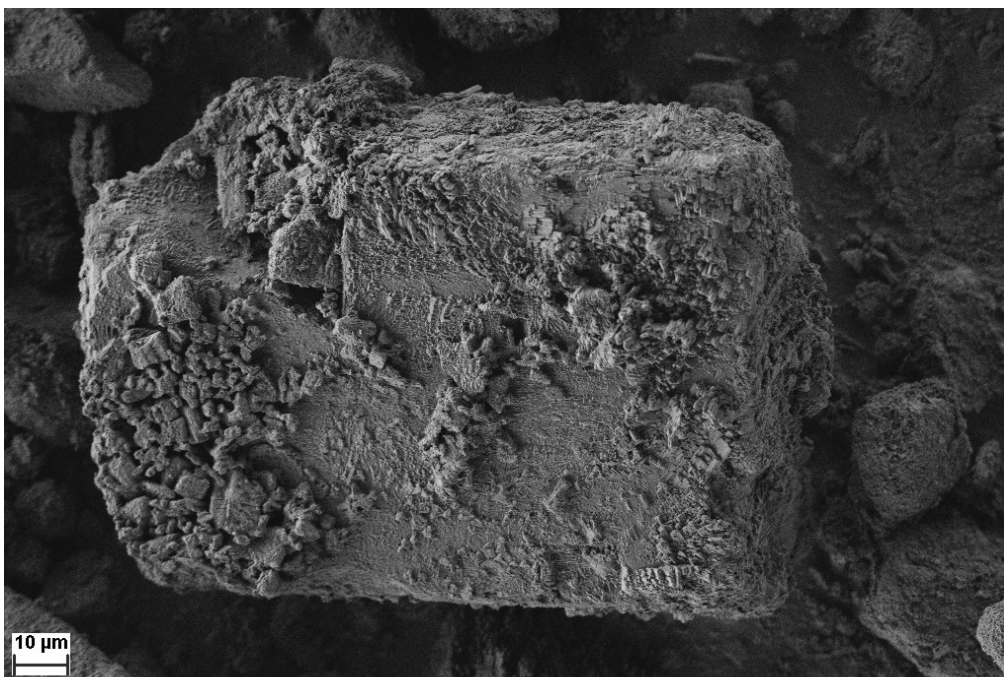


**Slika 17: KMC Sigma – izvorni vzorec**



**Slika 18: KMC I, prekristaliziran iz EtOH**

Na slikah 18 in 19 vidimo KMC I, prekrizaliziran iz EtOH, pri čemer ponovno opazimo heterogenost velikosti in oblike delcev. Površina delcev je neravna in hrapava, zaradi morfologije lahko pričakujemo nekoliko slabše oblaganje kot pri KMC II. Delci so podobne velikosti in morfologije kot izvorni material.

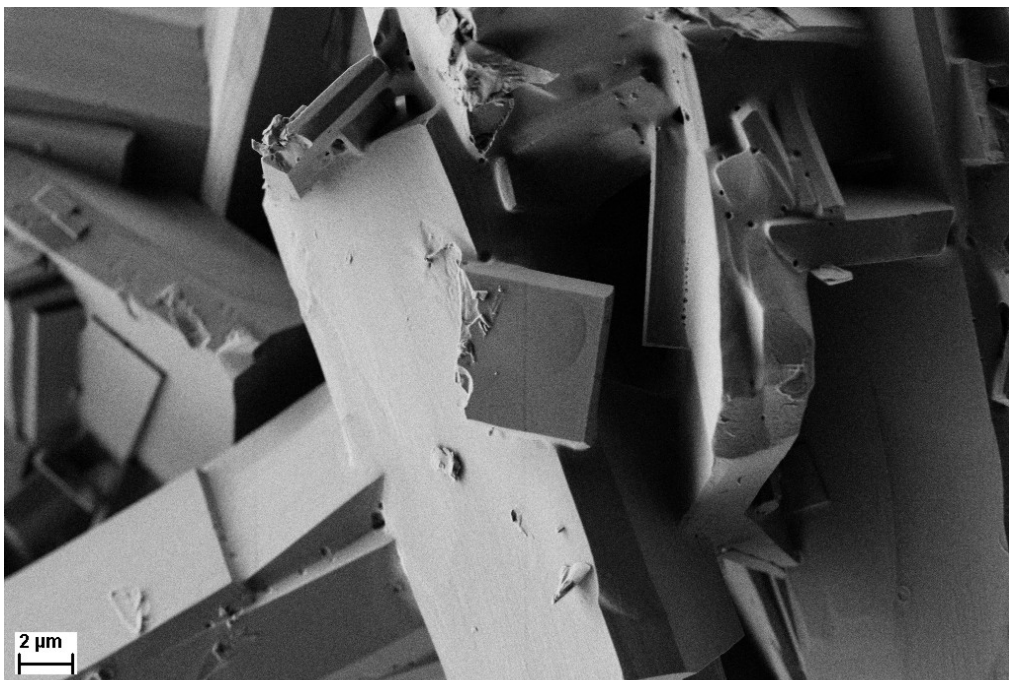


**Slika 19: KMC I, prekrizalizitan iz EtOH**

Na slikah 20 in 21 vidimo KMC II, prekrizaliziran iz H<sub>2</sub>O, pri čemer vidimo po velikosti in obliki bolj homogen vzorec kristalov z ravnimi in ostrimi ploskvami. Delci so prav tako manjši od izvornega materiala.



**Slika 20: KMC II, prekristaliziran iz H<sub>2</sub>O**



**Slika 21: KMC II, prekristaliziran iz H<sub>2</sub>O**

Eksperimentalno smo določili površinske energije KMC I in KMC II, ter površinske energije (napetosti) zmesi etanola in vode v ustreznih masnih razmerjih. Vrednosti površinskih energij, z disperzijskimi in polarnimi prispevki so podane v tabeli, pri tem so bile vrednosti KMC in EtOH eksperimentalno določene, vrednosti SiO<sub>2</sub> so povzete po literaturi. [33, 34, 35, 36].

**Tabela 2: Izmerjene in literaturne vrednosti specifičnih površinskih energij (napetosti) ( $\gamma_s$ ) z disperzijskimi ( $\gamma_s^d$ ) in polarnimi ( $\gamma_s^p$ ) prispevki .**

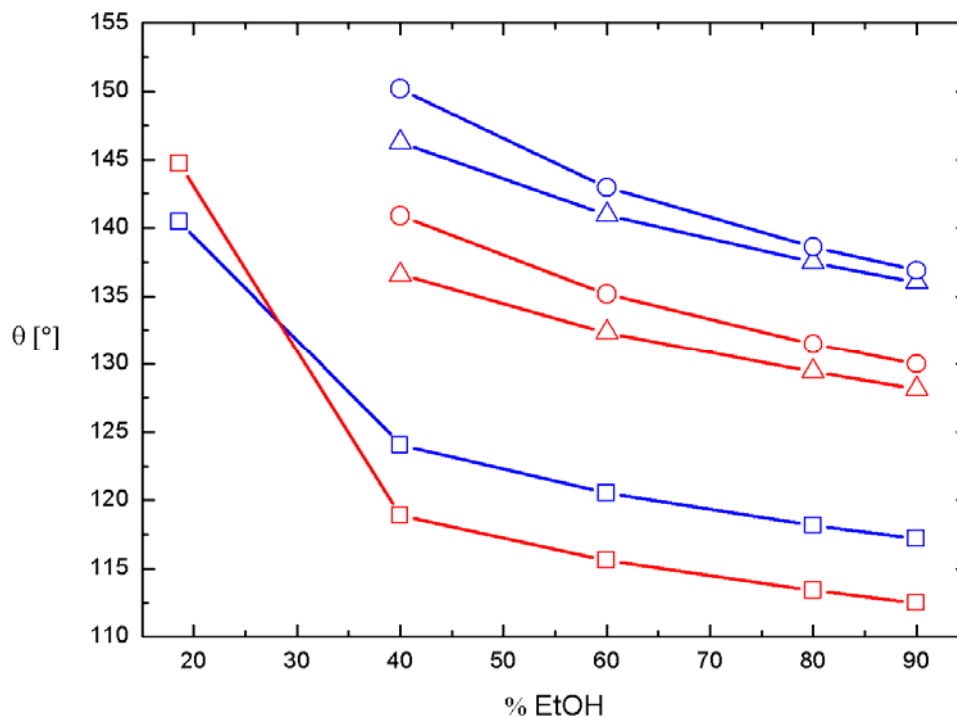
	$\gamma_s$	$\gamma_s^d$	$\gamma_s^p$
<b>18,6 % EtOH</b>	47 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
<b>40 % EtOH</b>	31,0	15,8	15,2
<b>60 % EtOH</b>	27,7	13,8	13,9
<b>80 % EtOH</b>	25,3	12,5	12,9
<b>90 % EtOH</b>	24,3	12,0	12,3
<b>KMCI/E</b>	63,4	46,7	16,8
<b>KMCII/W</b>	66,4	43,6	22,8
<b>SiO<sub>2B</sub></b>	76,0 <sup>b</sup>	115,0 <sup>b</sup>	191,0
<b>SiO<sub>2C</sub></b>	35,6 <sup>c</sup>	159,8 <sup>c</sup>	195,4
<b>SiO<sub>2D</sub></b>	71,3 <sup>d</sup>	153,6 <sup>d</sup>	224,9

\*specifične površinske energije so v enotah mJ/m<sup>2</sup>

Iz podatkov v tabeli 2 vidimo, da vrednosti specifičnih površinskih napetosti raztopin padajo z večanjem vsebnosti EtOH. Pri tem opazimo padanje tako polarnih kot disperzijskih prispevkov energij. Celokupna površinska energija KMC I (iz EtOH) je nižja od celokupne površinske energije KMC II (iz H<sub>2</sub>O). Pri tem ima KMC II višji polarni prispevek, kot KMC I. Za SiO<sub>2</sub> so podani trije sklopi vrednosti, ki se v literaturi in praksi najpogosteje pojavljajo, pri tem pa opazimo predvsem velik polarni prispevek površinske energije pri vseh vrstah SiO<sub>2</sub>. Teoretično lahko predvidevamo, da bodo interakcije med SiO<sub>2</sub> ter KMC II višje, kot med SiO<sub>2</sub> ter KMC I, saj so polarni prispevki površinskih energij v prvem primeru višji.

Stični kot med nastajajočim nukleusom in delcem KMC v različnih sestavah mešanice EtOH/voda smo izračunali z Youngovo enačbo, rezultati so prikazani na sliki 22. Zaradi variabilnih literaturnih podatkov za površinske energije SiO<sub>2</sub> smo uporabili tri različne vrednosti.

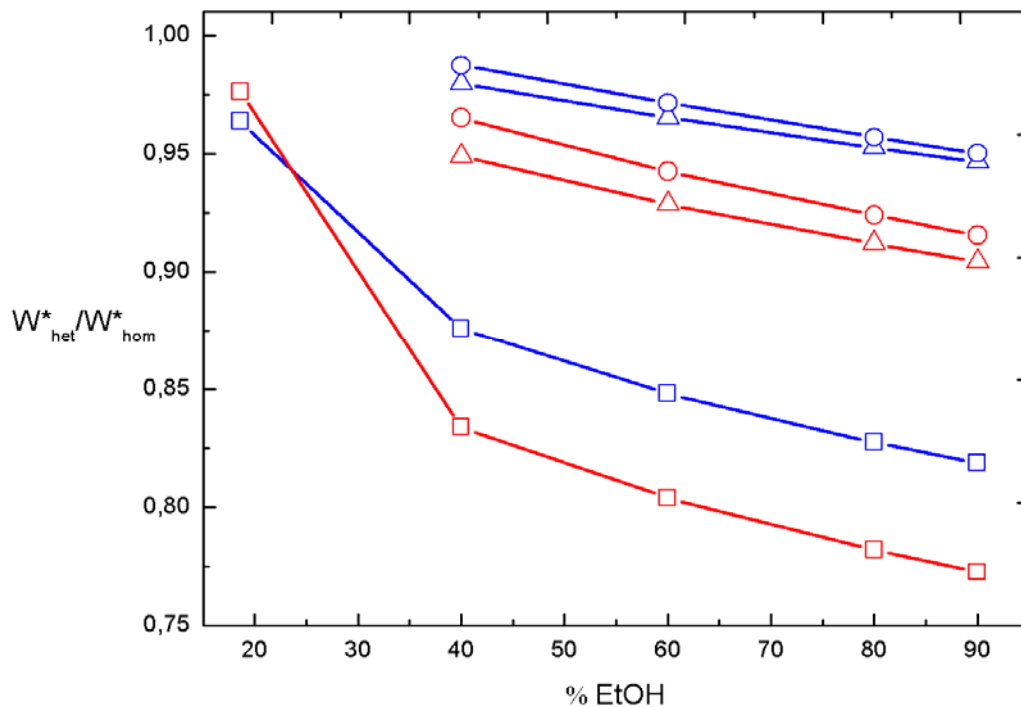
Pridobljene eksperimentalne podatke smo nato matematično obdelali s predstavljenim teoretskim modelom, izračunali teoretske stične kote, razmerja aktivacijskih energij ter razmerja hitrostnih konstant za heterogene nukleacije. Pri tem smo dobili sledeče rezultate:



**Slika 22: Izračunani stični koti  $\text{SiO}_2/\text{KMC}$  v odvisnosti od vsebnosti etanola. Modre črte ustrezajo obliki KMC I, ki so jo kristalizirali iz etanola, rdeče pa KMC II, dobljeni iz vodne raztopine. Krožci ustrezajo podatkom iz  $\text{SiO}_2\text{B}$ , trikotniki iz  $\text{SiO}_2\text{C}$  in kvadratki iz  $\text{SiO}_2\text{D}$ .**

Iz slike 22 je razvidno, da so izračunani stični koti v primeru mešanic z  $>30\%$  EtOH za vse uporabljene vrednosti površinske energije  $\text{SiO}_2$  manjši za polimorf KMC II, kristaliziran iz  $\text{H}_2\text{O}$ , kar pomeni, da je medfazni kontakt z nastajajočim nukleusom v primeru slednjega boljši.

Razmerje aktivacijskih energij za nukleacijo  $\text{SiO}_2$  na delcih KMC smo izračunali z enačbo (14), rezultati so prikazani na sliki 23.

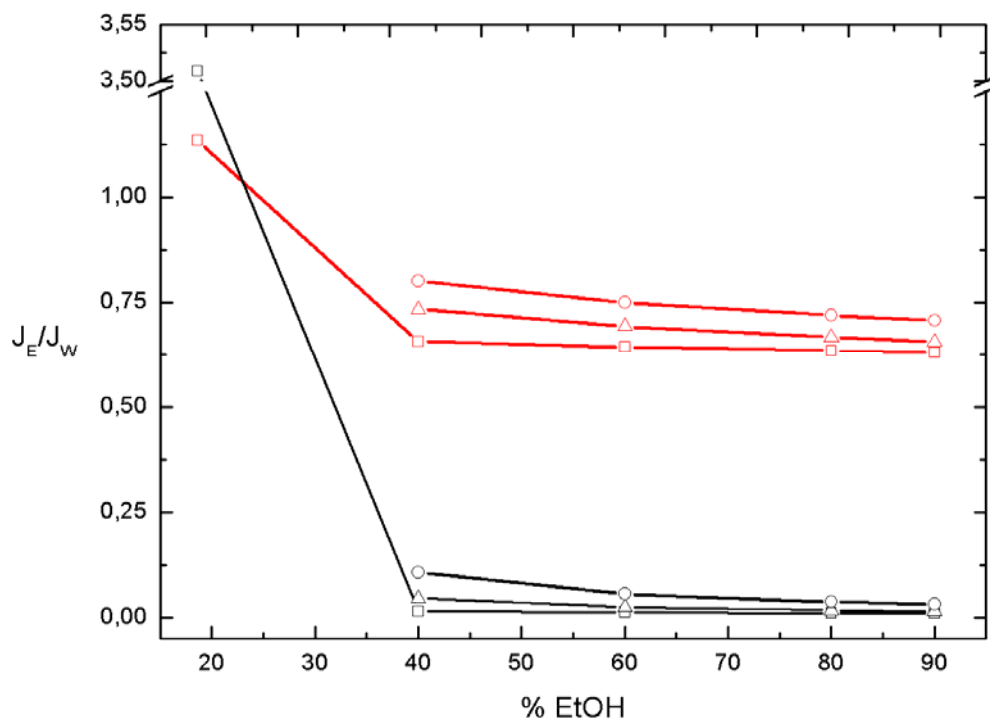


**Slika 23: Razmerje aktivacijskih energij za homogeno in heterogeno nukleacijo SiO<sub>2</sub> na KMC. Modre črte ustrezajo obliki KMC I, ki so jo kristalizirali iz etanola, rdeče pa KMC II, dobljeni iz vodne raztopine. Krožci ustrezajo podatkom iz SiO<sub>2</sub><sub>B</sub>, trikotniki iz SiO<sub>2</sub><sub>C</sub> in kvadratici iz SiO<sub>2</sub><sub>D</sub>.**

Vidimo, da je aktivacijska energija za heterogeno nukleacijo v vseh primerih nižja od tiste za homogeno, torej bo SiO<sub>2</sub> preferenčno nastajal na površini KMC. Opazimo tudi, da je to razmerje v primeru KMC II, kristaliziranega iz vode, nižje v primeru mešanic z >30% EtOH za vse uporabljene vrednosti površinske energije SiO<sub>2</sub>.

Ker aktivacijska energija pogojuje kinetiko procesa, je najbolj nazorna predstavitev rezultatov izračunov s pomočjo hitrostnih konstant nukleacije,  $J$ . Iz literature je znano, da so tipične vrednosti  $\frac{W_{homo}^*}{k_B T}$  med 10 (za visoka prenasíčenja) in 100 (za nizka prenasíčenja)

[38]. Rezultati so prikazani na sliki 24.



Slika 24: Razmerje hitrostnih konstant heterogene nukleacije. Rdeče črte ustrezajo vrednosti

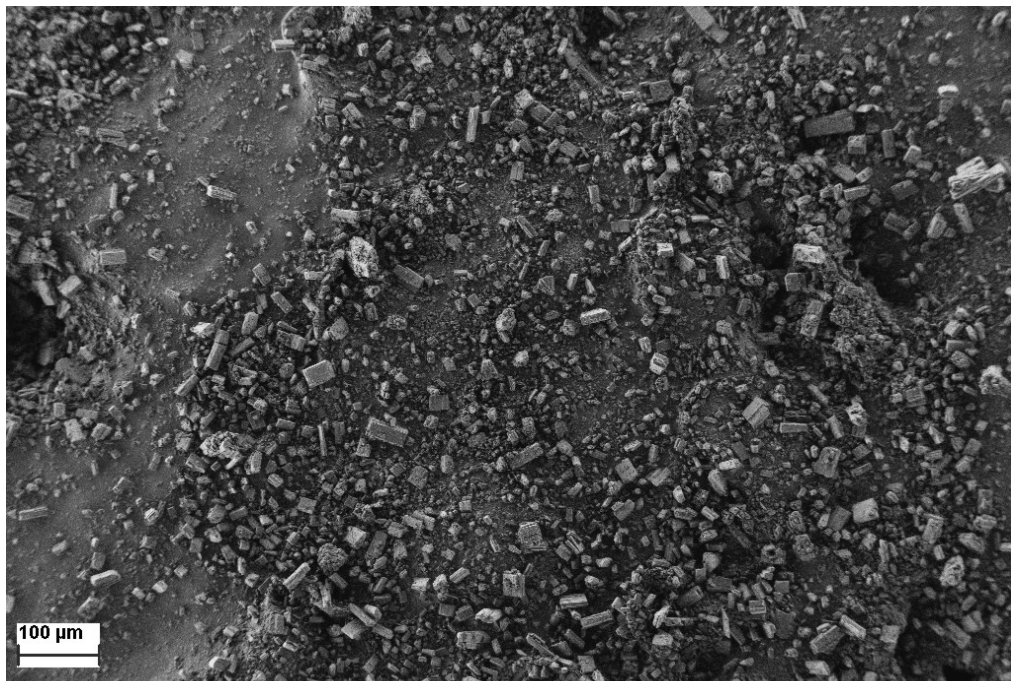
$\frac{W_{homo}^*}{k_B T} = 10$ , črne pa  $\frac{W_{homo}^*}{k_B T} = 100$ . Krožci ustrezajo podatkom iz  $\text{SiO}_2\text{B}$ , trikotniki iz  $\text{SiO}_2\text{C}$  in kvadrati

iz  $\text{SiO}_2\text{D}$ .

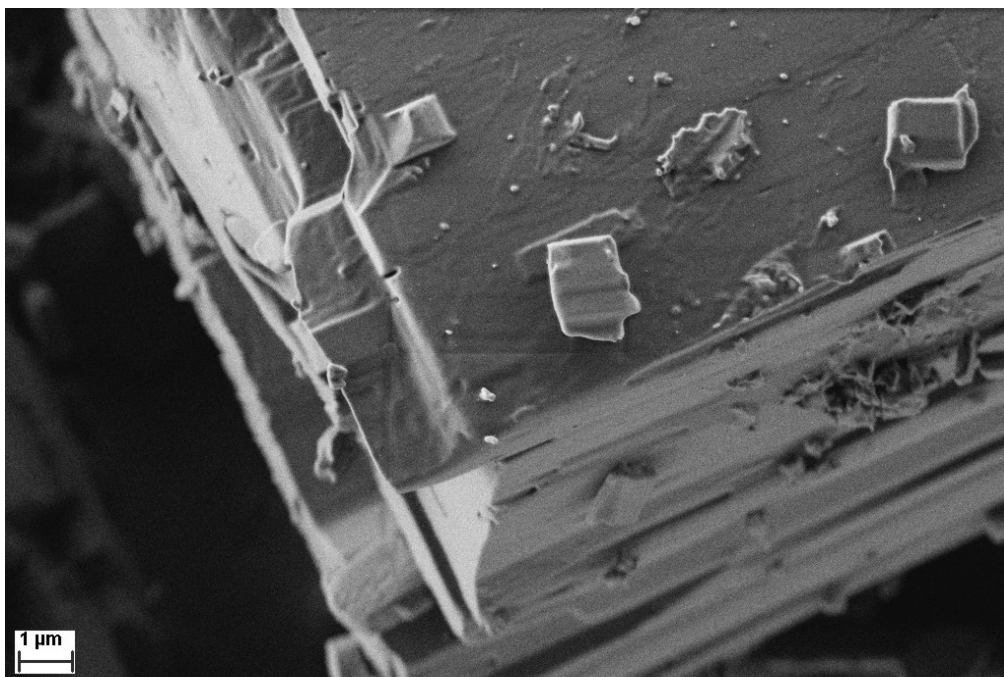
Iz slike 24 in razmerja hitrostnih konstant heterogene nukleacije za KMC I ( $J_E$ ) ter KMC II ( $J_W$ ) je razvidno, da je hitrostna konstanta heterogene nukleacije  $\text{SiO}_2$  na KMC v zmesih  $>25\%$  EtOH precej večja za KMC II, ki je bil kristaliziran iz vode, zato lahko teoretično pričakujemo, da bo oblaganje s  $\text{SiO}_2$  v tem primeru uspešnejše.

Izvedli smo oblaganje obeh oblik KMC, ki smo jih predhodno zmleli zaradi poenotenja velikosti delcev. Oblečene delce smo nato analizirali s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM).

Na slikah 25 in 26 vidimo delce KMC I, obložene s  $\text{SiO}_2$ . Kot omenjeno so bili pred oblaganjem mleti, tako smo dosegli bolj homogeno velikost delcev, kar je tudi razvidno s slike. Na sliki 26 se po oblaganju vidijo relativno jasni in ostri robovi obloženih delcev KMC I, kar nakazuje da je obloga na površini delcev tanjša.



Slika 25: KMC I predhodno mlet ter obložen s  $\text{SiO}_2$

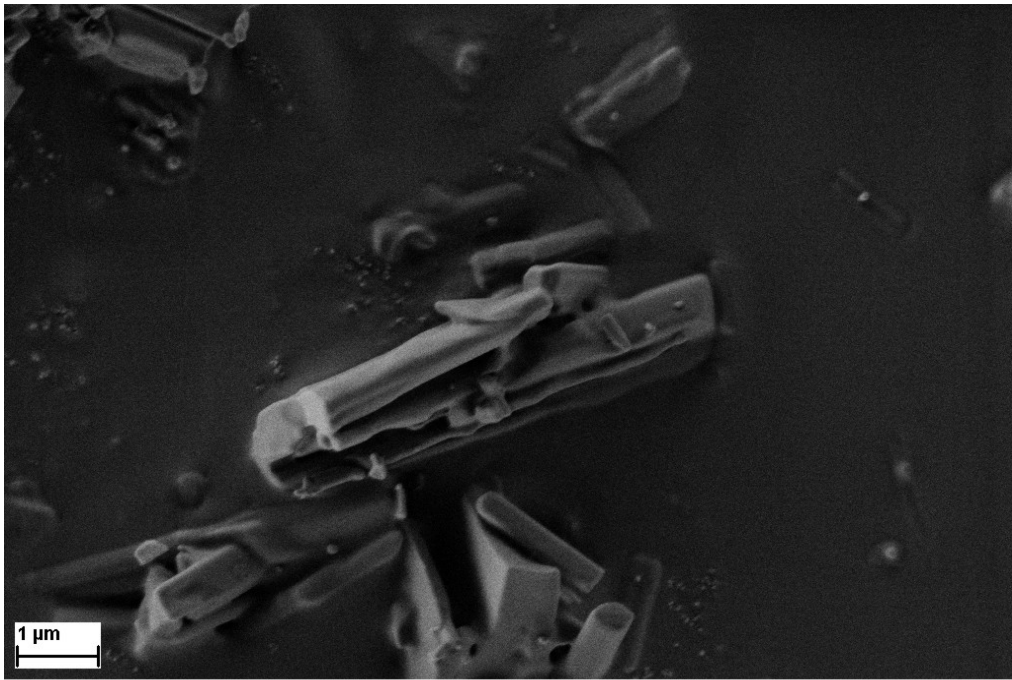


**Slika 26: KMC I predhodno mlet ter obložen s SiO<sub>2</sub>**

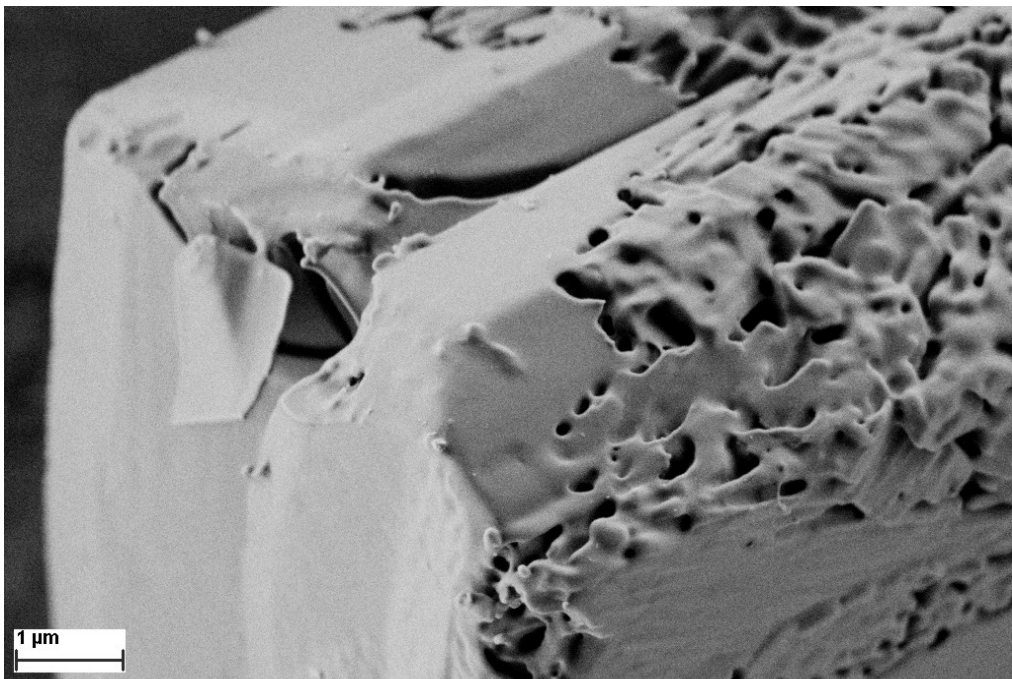
Na slikah 27, 28 in 29 vidimo delce KMC II, obložene s SiO<sub>2</sub>. Delci so bili predhodno homogenizirani z mletjem (slika 27), s slike 28 in 29 je razvidno, da so robovi obloženih delcev bolj zaobljeni in zaliti. Sklepamo lahko da je obloga na delcih KMC II debelejša.



**Slika 27: KMC II predhodno mlet ter obložen s SiO<sub>2</sub>**



Slika 28: KMC II predhodno mlet ter obložen s SiO<sub>2</sub>



Slika 29: KMC II predhodno mlet ter obložen s SiO<sub>2</sub>

## 5. RAZPRAVA

Glede na rezultate XPRD analize vzorcev ugotavljamo, da smo pri prekrizaciji izvornega materiala KMC-Sigma iz dveh različnih topil dobili tudi dva različna polimorfa in sicer KMC I ter KMC II. Rezultati XPRD analize KMC II so primerljivi z literaturnimi podatki o pripravi in analizi KMC II [39]. Po oblaganju obeh oblik KMC z amorfnim SiO<sub>2</sub> je rentgenska praškovna difrakcija pokazala zmanjšanje njune kristaliničnosti - na račun oblaganja (slika 16).

Kot je razvidno že iz literature izkazujeta polimorfni kristalni obliki I in II različne fizikalno-kemijske lastnosti, od katerih so nas predvsem zanimale površinske lastnosti obeh polimorfov. Na Fakulteti za farmacijo smo iz tega razloga proučili lastnosti z merjenjem stičnih kotov, ki so posledica morfologije vzorca ter lastnosti posameznega polimorfa.

Podatke za površinske energije SiO<sub>2</sub> smo povzeli iz literature, pri čemer smo izbrali tri vrednosti, ki so se v preteklih študijah največ pojavljale. Kot zadnje spremenljivke v našem sistemu oblaganja smo eksperimentalno določili površinske napetosti (energije) zmesi EtOH in vode v ustreznih masnih razmerjih. Metodo smo povzeli po članku skupine iz Fakultete za farmacijo [32], kjer smo z merjenjem stičnih kotov med raztopino in ploščico znanih dimenzij določali površinske energije ter njihove disperzijske ter polarne prispevke. Disperzijske smo izmerili s pomočjo nepolarne teflonske ploščice znanih dimenzij, polarne pa smo izračunali s pomočjo Youngove enačbe (3).

Pri rezultatih teh meritev v tabeli 2 opazimo, da celokupna površinska napetost zmesi EtOH in vode pada v odvisnosti od naraščanja vsebnosti EtOH. To v splošnem pomeni, da v takih zmesih z dodajanjem EtOH rahljamo interakcije med molekulami. Opazimo tudi da z dodajanjem EtOH proporcionalno padata tako disperzijski kot polarni prispevek površinskih napetosti raztopin. Pri merjenju površinskih energij KMC I in KMC II opazimo, da je površinska energija KMC II višja od površinske energije KMC I, prav tako ima KMC II višji polarni prispevek k površinski energiji. To pomeni, da bo KMC II najverjetneje bolje interagiral s SiO<sub>2</sub>, saj ima SiO<sub>2</sub> prav tako višji polarni prispevek k površinski energiji, kar je razvidno iz tabele 2.

Dobljene rezultate smo tudi teoretično ovrednotili. Ugotovili smo, da so izračunani stični koti med KMC II, ki smo ga prekristalizirali iz vode ter SiO<sub>2</sub> signifikantno nižji kot tisti s KMC I, ki smo ga prekristalizirali iz EtOH. Ta podatek nazorno kaže, da je medfazni kontakt med SiO<sub>2</sub> ter KMC II boljši kot med SiO<sub>2</sub> ter KMC I.

Naslednji uporabni podatek je bilo izračunano razmerje aktivacijskih energij  $\frac{W_{hetero}^*}{W_{homo}^*}$ , za

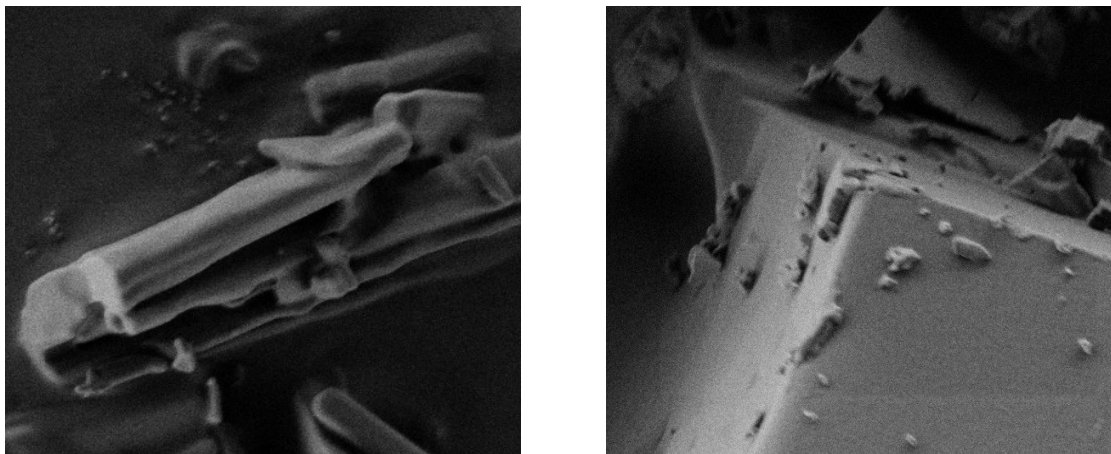
katerega smo opazili, da je stalno pod vrednostjo 1, kar pomeni, da je aktivacijska energija za heterogeno nukleacijo v vseh pričakovanih primerih nižja. To dognanje je pomembno, saj iz njega lahko sklepamo, da je tendenca po nastajanju nukleusov na površini KMC (heterogena nukleacija) večja od tendence nastajanja nukleusov v sami suspenziji (homogena nukleacija). Iz slike 23 je razvidno, da je razmerje aktivacijskih energij za KMC II nižje kot za KMC I. Zaradi nižje aktivacijske energije heterogene nukleacije pri oblaganju KMC II je verjetno, da bo oblaganje na tem polimorfu potekalo lažje kot na polimorfu KMC I.

Nukleacija je termično vzbujen proces, zato smo kot teoretski parameter izpostavili tudi razmerje hitrostnih konstant heterogene nukleacije  $\frac{J_E}{J_W}$ . Pri tem je s slike 24 razvidno, da je

hitrostna konstanta heterogene nukleacije na površini KMC II signifikantno višja od istega procesa na površini KMC I. Vsi teoretično ovrednoteni parametri govorijo o tem, da je dober medfazni kontakt v neposredni povezavi s hitrostjo in učinkovitostjo oblaganja. Sam kontakt je tako odvisen od morfologije posameznega delca KMC ter površinske energije določenega polimorfa KMC, kar smo kvantitativno potrdili z rezultati meritev stičnih kotov, ter matematično-teoretičnim modelom.

K že omenjeni XPRD analizi obloženih vzorcev (slika 16), ki potrjuje oblaganje z amorfnim SiO<sub>2</sub>, smo dodali še morfološki pregled vzorcev z uporabo vrstične elektronske mikroskopije (SEM). Opazili smo relativno gladke površine kristalov KMC II ter hrapave in po velikosti neenotne delce KMC I (slika 19 in 21). Glede na morfologijo smo pravilno sklepali, da se bodo delci KMC II bolje oblagali. Iz detajlov slik SEM (slika 30) je razvidno, da so robovi obloženih delcev KMC II (na sliki levo) bolj zaobljeni kot robovi delcev KMC I (na sliki desno), ki so ostrejši. Na ta način lahko sklepamo na debelino obloge, ki je v prvem primeru debelejša, kar popolnoma korelira z že opisanim teoretičnim pristopom. Tudi ti rezultati torej jasno nakazujejo, da je oblaganje bolj učinkovito na

primeru KMC II. Izkazalo se je, da termodinamsko bolj stabilna polimorfna oblika KMC (KMC II) omogoča boljši medfazni kontakt, kar pa v splošnem ni nujno da drži.



**Slika 30: SEM posnetek morfološke razlike v oblaganju obeh polimorfov s SiO<sub>2</sub> (levo KMC II, desno KMC I)**

KMC predstavlja le modelno substanco, tako zastavljen teoretično-eksperimentalni model je splošno uporaben v primeru proučevanja oblaganja delcev. Z upoštevanjem meritev in izračunov lahko izberemo in zagotovimo ustrezne pogoje za potek pretežno heterogene nukleacije, izberemo ugodnejši polimorf ter z ustreznimi pogoji dosežemo nižjo aktivacijsko energijo procesa. Pri tem za zagotavljanje heterogene nukleacije pazimo, da je stični kot med nukleusom in delci nižjo od  $180^\circ$ , kar dosežemo z izbiro primernega medija. Ustrezni medij nam hkrati zagotavlja nižjo aktivacijsko energijo heterogene nukleacije. Prikazana metoda je splošno uporabna v predformulacijskih in formulacijskih študijah farmacevtskih oblik. Na tak način lahko drastično zmanjšamo število eksperimentov in sintez, da dosežemo optimalno in zeleno oblaganje po sol-gel postopku. Oblaganje je pomembna tehnika zaščite, maskiranja okusa ter modificiranja sproščanja. Iz literaturnih podatkov vidimo, da ima tako obložen KMC podaljšan profil sproščanja, glede na dobljene rezultate pa bi KMC II moral imeti profil sproščanja še nekoliko daljši kot KMC I, saj je bila obloga le-tega zaradi učinkovitejšega oblaganja debelejša.

## 6. SKLEP

Osnova zastavljenega problema je bila obložiti dve polimorfni obliki KMC s  $\text{SiO}_2$  ter pokazati vpliv in pomen kontakta med KMC in  $\text{SiO}_2$  pri oblaganju. Tako oblaganje ima nalogo zaščite, maskiranja okusa, in v našem primeru tudi podaljšanja sproščanja. Glede na to, da obstajata dve različni polimorfni obliki, ki sta med sabo različni po fizikalno-kemijskih lastnostih, lahko predvidevamo, da se razlikujeta tudi po površinskih lastnostih. Tako imata med drugim tudi različen stični kot, ki ga nastajajoči nukleus tvori na površini delca KMC. Kakšen je ta stični kot, je odvisno od narave materiala oz. vrste polimorfa ter morfologije delca na mestu kjer nastaja nukleus. Z vrsto eksperimentalno-teoretskih pristopov smo na osnovi določanja stičnih kotov pokazali, da je učinkovitost oblaganja s  $\text{SiO}_2$  močno odvisna od kakovosti kontakta med obema fazama, torej KMC in nastajajočim nukleusom  $\text{SiO}_2$ .

Glede na to, da je uporabljen model splošno veljaven in ne velja samo za KMC, lahko na osnovi merjenja stičnih kotov in določenih izračunov ustrezno izberemo pogoje in materiale za optimalno oblaganje. Na ta način drastično zmanjšamo število potrebnih eksperimentov za doseganje optimalnih rezultatov oblaganja. Glede na rezultate in postavljen eksperimentalno-teoretični model je tako mogoče z upoštevanjem in merjenjem površinskih lastnosti materialov napovedovati ustrezen izbor najbolj primernih polimorfov za oblaganje po sol-gel postopku. KMC II je bolj termodinamsko stabilen od obeh polimorfov in omogoča boljši medfazni kontakt, kar pa ni nujno da v splošnem drži. V našem primeru smo ugotovili, da je oblaganje KMC oblike II s  $\text{SiO}_2$  učinkovitejše in homogenejše od oblike I ter da so izmerjeni in izračunani stični koti v tesni povezavi z učinkovitostjo oblaganja.

## 7. LITERATURA

- 1) Rowe R., Sheskey P. J., Weller P. J.: Handbook of Pharmaceutical Excipients 4<sup>th</sup> Edition, The Pharm Press, USA, 161-163, 2003
- 2) Ullmann' s encyclopedia of industrial chemistry, 5<sup>th</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 584-653, 1993
- 3) Lazarini F, Brenčič J: Splošna in anorganska kemija, DZS, Ljubljana 1984.
- 4) Kortusuo P., Ahola M., Kangas M.: In vitro release of dexmedetomidine from silica xerogel monoliths: effect of sol-gel synthesis parameters, Int J Pharm 221, 107-114, 2001.
- 5) Alfred Martin: Physical Pharmacy: Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences 4<sup>th</sup> Edition, Lipinncott Williams & Wilkins, USA, 497, 1993.
- 6) Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Fiori C, Lifshin E, Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, Plenum Press, New York, 479-483, 1984.
- 7) Lev, O. et al., Analytical Chemistry. 67(1), 22A-30A, 1995.
- 8) Keefer K.D., in: Silicon Based Polymer Science: A Comprehensive Resource; eds. Zeigler J.M. and Fearon F.W.G., ACS Advances in Chemistry Ser. No. 224, American Chemical Society, Washington DC, 227-240, 1990.
- 9) Prassas M. and Hench L.L., in: Ultrastructure Processing of Ceramics, Glasses, and Composites; eds. Hench L.L and Ulrich D.R., John Wiley & Sons, New York, pp. 100-125, 1984.
- 10) Brinker, C.J. J. Non-Crystalline Solids. 100, 31-50, 1988.
- 11) Brinker C.J. and Scherer G.W., Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, Academic Press, Inc, New York, 1990.
- 12) Aelion, R.; Loebel, A.; Eirich, F. J., Am. Chem. Soc. 72, 5705-5712, 1950.
- 13) Iller R.K., The Chemistry of Silica, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- 14) Kelts, L.W.; Effinger, N.J.; Melpolder, S.M., J. Non-Crystalline Solids. 83, 353-374, 1986.
- 15) Klein, L.C. Ann., Rev. Mater. Sci. 15, 227-248, 1985
- 16) Pohl E.R and Osterholtz F.D. in: Molecular Characterization of Composite Interfaces; eds. Ishida H. and Kumar G., Plenum: New York, 157, 1985.
- 17) Grant D.J.W., Theory and origin of polymorphism, v: Polymorphism in Pharmaceutical Solids, Vol. 95, Marcel Dekker, New York (1999), str. 1-33.

- 18) The Merck Index, 13<sup>th</sup> Edition. Merck & Company Incorporated, Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2001
- 19) Mutschler E: Arzneimittelwirkungen, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1997; 682-684, 695.
- 20) SmPC CLAROGEN 500 mg tablete. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
- 21) European Pharmacopoeia 5th Edition, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France, 2005; 2: 1309-1311.
- 22) Zhang X, Wang Y, Wang J, Wang Y, Li S: Effect of Pore Former on the Properties of Coated Film Prepared from Blends of Eudragit® NE 30 D and Eudragit® L 30 D-55. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007; 55: 1261-1263.
- 23) SmPC FROMILID filmsko obložene tablete 500 mg. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
- 24) SmPC Clarosip 250 mg zrnca za peroralno suspenzijo. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
- 25) SmPC Lekoklar 500 mg filmsko obložene tablete. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>, html
- 26) Brook I: The Prophylaxis and Treatment of Anthrax. International Journal of Antimicrobial Agents, 2002; 20: 320-325.
- 27) Sohn Y T, Rhee J K, Im W B: Polymorphism of Clarithromycin. Archives of Pharmacal Research, 2000; 23: 81-384.
- 28) Lee T S, Lee J C, Lee K I, Lee G S, Kim W J: Method of Preparing Form II Crystals of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/14099 A1, Mar. 16, 2000.
- 29) Spanton S G, Henry R F, Riley D A, Liu J H: Crystal Form O of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 98/31699, 1998.
- 30) Yonemochi E, Kitahara S, Maeda S, Yamamura S, Oguchi T, Yamamoto K: Physicochemical Properties of Amorphous Clarithromycin Obtained by Grinding and Spray Drying. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999; 7: 331-338.
- 31) Kumar N, Salman M, Gangakhedkar K K: Novel Amorphous Form of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/77017 A1, Dec. 21, 2000.

- 32) Dreu R, Širca J, Pintye-Hodi K, Burjan T, Planinšek O, Srčič S: Physicochemical properties of granulating liquids and their influence on microcrystalline cellulose pellets obtained by extrusion-spheronisation technology. *Int J Pharm* 2005; 291: 99-111
- 33) Biliński B: The influence of surface dehydroxylation and rehydroxylation on the components of surface free energy of silica gels. *Powder Technol* 1994; 81: 241.
- 34) Staszczuk P, Jańczuk B, Chibowski E: On the determination of the surface free energy of quartz. *Mater Chem Phys* 1985; 12: 469.
- 35) Wójcik W, Biliński B: Gas-adsorption studies on correlations between the flotability of minerals and the work of water adhesion to their surfaces. *Colloids Surf* 1988; 30: 275.
- 36) Wu S: Calculation of interfacial tensions in polymer systems, *J Polymer Sci: Part C* 1971; 34: 19-30.
- 37) Sugimoto T: *Monodispersed particles*, Elsevier Science B.V., The Netherlands, 2001.
- 38) van Oss C. J., Chaudhury M. K., Good R. J.: Interfacial Lifshitz-van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems, *Chem. Rev.*, 88 (1988) 927-941.
- 39) Lee T. S., Lee J. C., Lee, K. I., Lee, G. S., KIM W. J.: Method of Preparing Form II Crystals Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/14099 Mar. 16, 2000.