

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

KARLO LOVRIĆ

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARLO LOVRIĆ

**VREDNOTENJE KOKRISTALOV FLUKONAZOLA,
PRIPRAVLJENIH Z MLETJEM**

**CHARACTERIZATION OF FLUCONAZOLE
COCRYSTALS, PREPARED BY SOLID-STATE
GRINDING**

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljal na Oddelku za stabilnost podjetja Krka, d.d., Novo mesto in na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonu Planinška in somentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja. Meritve jedrske magnetne resonance so opravili v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti v Ljubljani. Meritve rentgenske praškovne difrakcije so opravili na Oddelku za strukturne raziskave podjetja Krka, d.d., Novo mesto. Analize dinamične sorpcije pare so opravili na Oddelku za stabilnost podjetja Krka, d.d., Novo mesto.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Odonu Planinšku in somentorju prof. dr. Danijelu Kiklju za pomoč, nasvete in vodenje pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem Jožetu Kastelicu, mag. farm. z Oddelka za stabilnost podjetja Krka, za pomoč in dragocene nasvete pri eksperimentalnem delu, prof. dr. Janezu Plavcu in dr. Primožu Šketu za izvedbo analiz jedrske magnetne resonance v trdnem, Matjažu Pajku, dipl. inž. kem. teh., za izvedbo analiz rentgenske praškovne difrakcije in Andreju Gartnerju, univ. dipl. kem., za izvedbo analiz dinamične sorpcije pare.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonu Planinška in somentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja.

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT	III
1. UVOD	1
1.1. KOKRISTALI	1
1.2. FARMACEVTSKI KOKRISTALI	3
1.3. INTERAKCIJE MED KOMPONENTAMI KOKRISTALA	4
1.4. NAČRTOVANJE KOKRISTALOV	5
1.5. PRIDOBIVANJE KOKRISTALOV	6
1.5.1. PRIDOBIVANJE KOKRISTALOV IZ RAZTOPINE.....	7
1.5.2. PRIDOBIVANJE KOKRISTALOV Z MLETJEM	8
1.5.3. MLETJE BREZ TOPILA	10
1.5.4. MLETJE Z DODATKOM TOPILA	15
1.5.5. OSTALE METODE PRIPRAVE KOKRISTALOV.....	17
1.6. VREDNOTENJE NASTANKA KOKRISTALOV	18
1.7. UPORABNOST KOKRISTALOV V FARMACIJI.....	21
1.7.1. TEMPERATURA TALIŠČA.....	21
1.7.2. HIGROSKOPNOST	22
1.7.3. TOPNOST	23
1.7.4. HITROST RAZTAPLJANJA	25
1.7.5. INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA	26
1.7.6. KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA.....	27
1.8. FLUKONAZOL	28
1.8.1. DELOVANJE IN UPORABA	28
1.8.2. OSNOVNI PODATKI.....	29
1.8.3. KOKRISTALI FLUKONAZOLA.....	29
2. NAMEN DELA	33
3. MATERIALI IN METODE	34
3.1. MATERIALI	34
3.2. METODE	36
4. EKSPERIMENTALNI DEL	40
4.1. MLETJE FLUKONAZOLA S POTENCIALNIMI TVORCI KOKRISTALOV	40
4.2. PRIPRAVA KOKRISTALOV	42

4.2.1.	FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA = 1:1	42
4.2.2.	FLUKONAZOL : MALEINSKA KISLINA = 1:3	42
4.2.3.	FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA = 2:1	42
4.2.4.	FLUKONAZOL : JABOLČNA KISLINA = 1:1	42
4.2.5.	FLUKONAZOL : VINSKA KISLINA = 1:1	42
4.2.6.	FLUKONAZOL : MALONSKA KISLINA = 1:1	43
4.2.7.	FLUKONAZOL : SALICILNA KISLINA = 1:1	43
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	44
5.1.	VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)	44
5.2.	TERMIČNA ANALIZA KOKRISTALOV IN POSAMEZNIH KOMPONENT	46
5.3.	IR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA	50
5.4.	RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRPD)	54
5.5.	JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA V TRDNEM	58
5.6.	ANALIZA DINAMIČNE SORPCIJE PARE (DVS)	61
5.7.	INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA (IDR)	65
5.8.	DOLOČANJE HITROSTI RAZTAPLJANJA Z UPORABO KOŠARIC	68
6.	SKLEP	71
7.	LITERATURA	73

POVZETEK

Zdravilne učinkovine lahko obstajajo v trdnem stanju v različnih oblikah (polimorfi, solvati, soli, amorfna oblika), ki se med seboj razlikujejo po fizikalno-kemijskih lastnostih, kot so temperatura tališča, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost in higroskopnost. Zadnja leta postajajo zanimivi farmacevtski kokristali, saj lahko povečajo število kristalnih oblik v katerih se nahaja zdravilna učinkovina in omogočajo izboljšanje klinično pomembnih fizikalno-kemijskih lastnosti. Kokristali, ki spadajo v razred neraziskanih snovi, ponujajo vrsto možnosti za farmacevtsko industrijo.

Kokristalizacija je metoda kristalizacije, ki omogoča povezovanje dveh ali več komponent znotraj ponavljajoče se kristalne rešetke brez tvorjenja ali prekinjanja kovalentne vezi. Komponente so ponavadi nevtralne molekule, ki se medsebojno povezujejo z vodikovimi vezmi. Farmacevtski kokristal je sestavljen iz zdravilne učinkovine in tvorca kokristala, ki je lahko substanca, ki se splošno uporablja v prehrambeni ali farmacevtski industriji.

Priprava kokristalov z mletjem trdnih komponent predstavlja alternativo tradicionalni metodi kokristalizacije iz raztopine in ponuja nekaj izrazitih prednosti. V več primerih se je izkazalo, da lahko pripravimo kokristale le z metodami, povezanimi z mletjem. Nedavne modifikacije postopka mletja, kjer dodamo majhne količine topila, izboljšajo proces kokristalizacije v trdnem stanju.

V sklopu diplomske naloge smo z mletjem ob dodatku topila z različnimi tvorci kokristalov pripravili pet kokristalov flukonazola: flukonazol : fumarna kislina v razmerju 2:1, flukonazol : glutarna kislina v razmerju 1:1, flukonazol : maleinska kislina v razmerju 1:3, flukonazol : jabolčna kislina v razmerju 1:1, flukonazol : salicilna kislina v razmerju 1:1 in kokristal flukonazol : malonska kislina v razmerju 1:1, ki smo ga pripravili z mletjem brez uporabe topila.

Pripravljene kokristale smo ovrednotili s kombinacijo naslednjih analiznih metod: diferenčne dinamične kalorimetrije, infrardeče spektroskopije, praškovne rentgenske difrakcije in jedrske magnetne resonance v trdnem. Rezultati teh metod so potrdili nastanek kokristalov.

Izvedli smo tudi analizo dinamične sorpcije pare in različne topnostne študije kokristalov, ki so potrdile, da lahko s tvorbo kokristalov spremenimo fizikalno-kemijske lastnosti flukonazola.

ABSTRACT

Active pharmaceutical ingredients (API) are found in different solid state forms (polymorphs, solvates, salts, amorphous form), which differ in their physicochemical properties, such as the melting point, solubility, dissolution rate, stability and hygroscopicity. In recent years there is growing interest in pharmaceutical cocrystals, which can significantly increase the number of crystal forms that exist for a particular API, and they can lead to improvements in physical properties of clinical relevance. Cocrystals represent a class of unexplored compounds and offer huge opportunities for the pharmaceutical industry.

Cocrystallization is a crystallization method that allows the binding of two or more components within one periodic crystalline lattice without making or breaking covalent bonds. These components are generally neutral molecular species linked via hydrogen bonds. Pharmaceutical cocrystal is composed of API and cocrystal former, that can be chosen among widely used substances in food or pharmaceutical industry.

The solid-state grinding approach of preparing cocrystals is an alternative to the traditional method of solution crystallization and possesses several distinct advantages. In several cases certain cocrystal materials can be prepared only by solid-state grinding methods. These examples underscore the importance of solid-state grinding approach in the search for new cocrystals. Recent modification of the solid-state grinding, in which small quantities of solvent are introduced, increase the process of cocrystallisation.

In the scope of this dissertation we used solid-state grinding with minimal addition of a solvent of appropriate polarity, with different cocrystals formers, which resulted in five cocrystals of fluconazole. We have succeeded in preparing the following cocrystals: fluconazole : fumaric acid = 2:1, fluconazole : glutaric acid = 1:1, fluconazole : maleic acid = 1:3, fluconazole : malic acid = 1:1, fluconazole : salicylic acid = 1:1 and fluconazole : malonic acid = 1:1, which was prepared by grinding without the addition of solvent.

Prepared cocrystals were characterized with combination of solid-state methods including differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance and X-ray powder diffraction. Results acquired by these methods provided enough data to confirm cocrystal formation.

We have also performed dynamic vapour sorption studies and different dissolution studies which confirmed that we can change physicochemical properties of fluconazole by cocrystal forming.

SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT

δ	- kemijski premik
BCS	- biofarmacevtski klasifikacijski sistem (Biopharmaceutics Classification System)
cm^{-1}	- recipročni centimeter
CP	- prenos polarizacije iz protonov na ogljik (proton-to-carbon cross polarisation)
CSD	- podatkovna baza CSD (Cambridge Structural Database)
DSC	- diferenčna dinamična kalorimetrija (differential scanning calorimetry)
DVS	- dinamična sorpcija pare (dynamic vapor sorption)
EAFUS	- vse kar se dodaja hrani v ZDA (everything added to food in the United States)
GRAS	- splošno varne substance (generally recognized as safe)
HPLC	- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high pressure liquid chromatography)
Hz	- hertz
IDR	- intrinzična hitrost raztapljanja (intrinsic dissolution rate)
IR	- infrardeče/-a
J	- joule
K	- kelvin
MAS	- vrtenje pod magičnim kotom (magic-angle spinning)
NMR	- jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
ppm	- ena na milijon (parts per million)
SEM	- vrstični elektronski mikroskop (scanning electron microscope)
SSNMR	- jedrska magnetna resonanca v trdnem (solid-state NMR)
T	- transmitanca
$t_{90\%}$	- čas, v katerem se raztopi 90 % zdravilne učinkovine
XRPD	- rentgenska praškovna difrakcija (X-ray powder diffraction)
ZU	- zdravilna učinkovina

1. UVOD

Večina zdravilnih učinkovin se pri normalnih pogojih nahaja v trdnem agregatnem stanju in so najpogosteje vgrajene v trdne farmacevtske oblike, kot so kapsule ali tablete. Ureditev molekul v kristalni strukturi lahko vpliva na fizikalno-kemijske lastnosti, kot so topnost, hitrost raztapljanja, higroskopnost, stabilnost, biološka uporabnost, oblika delcev, gostota, barva, stisljivost, ipd. Farmakokinetične lastnosti zdravilne učinkovine so pogosto odvisne od njenih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki niso odvisne le od molekulske strukture, temveč tudi od kristalne strukture oz. ureditve molekul v prostoru.

Pri razvoju formulacij in izboljšanju učinkovitosti zdravilne učinkovine lahko spreminjamo fizikalno-kemijske lastnosti s tvorbo soli, hidratov/solvatov, različnih polimorfnih oblik in tvorbo amorfne oblike. V zadnjih letih pa se uveljavlja tvorba kokristalov kot dodatna možnost za spreminjanje bistvenih lastnosti zdravilnih učinkovin.

1.1. KOKRISTALI

V znanstveni literaturi se je pojem kokristal prvič pojavil leta 1968, ko so opisali večkomponentni kristal pirimidina s purinom (1). Ker je področje raziskovanja kokristalov relativno mlado, znanstveniki še vedno niso enotni glede splošne definicije pojma kokristal (2). Vsem pa je skupno, da so kokristali enotne kristalinične snovi, sestavljene iz najmanj dveh različnih komponent. Mnenja, kaj razumemo pod pojmom komponenta, so si različna in tukaj nastanejo največje razlike v definiciji pojma kokristal. Komponenta je lahko trdna, tekoča, plinasta in atom, ion ali molekula (3, 4). Ker gre za področje, ki se nenehno razvija, je tudi nomenklatura zato tako raznolika (5).

V diplomski nalogi se bomo držali definicije, ki se je že uveljavila v slovenskem znanstvenem prostoru in glasi: kokristali so enotne kristalinične snovi, njihovo kristalno rešetko sestavljajo nevtralne molekule v stehiometrijskem razmerju, ki so pri sobnih pogojih v trdnem agregatnem stanju (6).

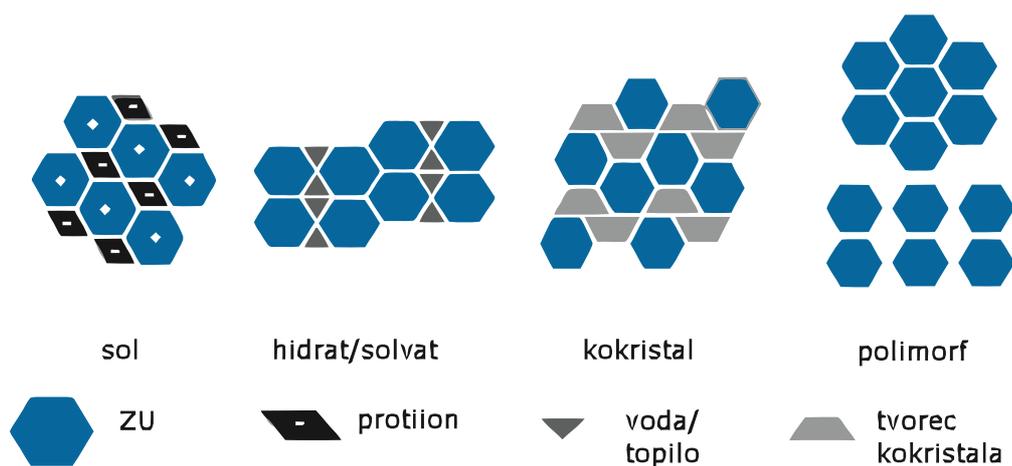
Kokristal je trdna snov v kateri sta dve različni molekuli, ki sta med seboj povezani z nekovalentnimi vezmi, pravilno urejeni po določenem vzorcu, ki se ponavlja v treh dimenzijah. Kokristale uvrščamo med t.i. večkomponentne kristale, kamor spadajo še hidrati, solvati, klatrati, inkluzijski kompleksi in soli.

Večkomponentni kristali so sestavljeni iz dveh ali več komponent (atom, ion ali molekula), ki so povezane z medmolekulskimi interakcijami. Pri hidratih in solvatih je ena izmed komponent voda oziroma topilo. Klatrati so kristali, kjer je ena izmed komponent ujeta v prostorih znotraj kristalne strukture druge komponente (2, 7). Kadar v večkomponentnem kristalu nastopajo ioni ali ionizirane molekule, pa govorimo o solih (slika 1).

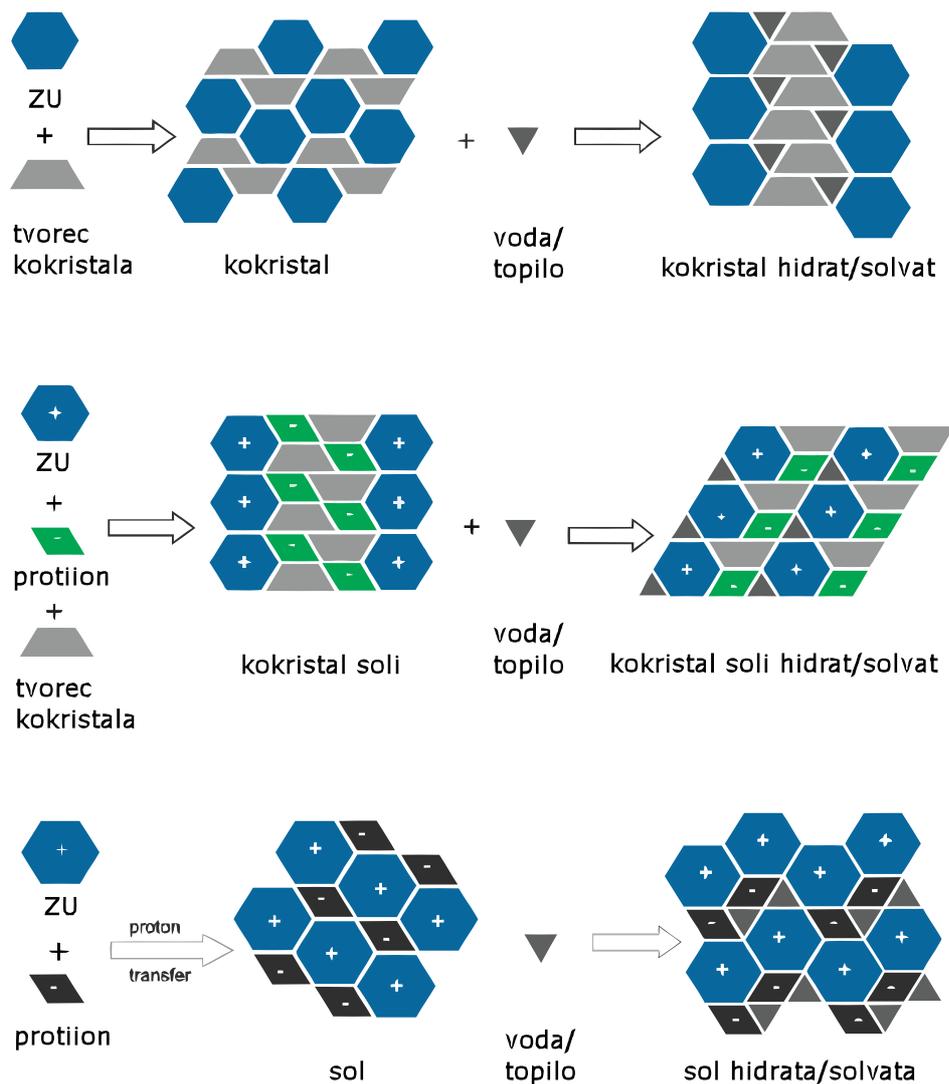
Soli se od kokristalov razlikujejo na podlagi prenosa protona s kisline na bazo. Če se proton nahaja na bazi, potem je prišlo do prenosa protona, in kristaliničen kislinsko-bazični kompleks je sol. Če ne pride do prenosa protona, ta ostane na kislini in potem imamo kokristal. Vendar v nekaterih primerih ne moremo jasno določiti položaj protona, ker se ta nahaja nekje vmes (3, 8, 9).

Po svoji strukturi so kokristali najbližje solvatom, saj gre v obeh primerih za heteromolekularne strukture, pri čemer je osnovna razlika med obema v agregatnem stanju komponent pri normalnih pogojih. Pri kokristalih sta obe komponenti v trdnem stanju, pri solvatih pa je ena komponenta v tekočem stanju.

Kokristal je najpogosteje sestavljen iz dveh molekul, iz tarčne molekule in tvorca kokristala. Lahko pa je sestavljen iz treh ali več molekul, v tem primeru je tarčna molekula ponavadi v obliki solvata ali soli in imamo kompleksne večkomponentne kristale: kokristale hidratov/solvatov, soli kokristalov, soli hidratov/solvatov itd. (slika 2).



Slika 1. Večkomponentni kristali (2).



Slika 2. Kompleksni večkomponentni kristali (2).

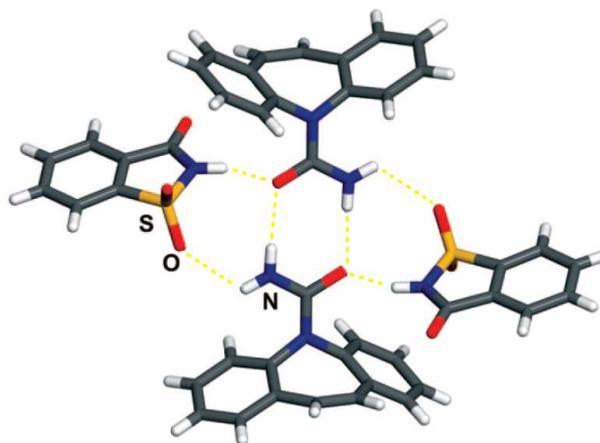
1.2. FARMACEVTSKI KOKRISTALI

Kadar v kokristalu nastopa zdravilna učinkovina kot ena izmed komponent, govorimo o farmacevtskem kokristalu. V farmacevtskem kokristalu mora biti poleg zdravilne učinkovine tudi tvorec kokristala farmacevtsko sprejemljiv. To pomeni, da lahko izbiramo med številnimi uveljavljenimi snovmi, ki se uporabljajo v farmacevtski ali prehrambeni industriji in veljajo za splošno varne. Te substance najdemo na seznamih EAFUS (Everything Added to Food) in GRAS (Generally Regarded as Safe) (10).

Kokristali so zanimivi za farmacevtsko industrijo, ker ponujajo možnost izboljšanja fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilnih učinkovin brez tvorjenja ali prekinjanja kovalentne vezi (11).

S tvorbo kokristalov ustvarimo nove strukture zdravilne učinkovine, ki skupaj s tvorcem kokristala gradi edinstveno kristalno rešetko. Spremenjene lege molekul v kristalni rešetki in spremembe v medmolekulskih povezavah vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti trdne snovi. S kokristalizacijo lahko spreminjamo lastnosti zdravilnih učinkovin, ki so pomembne za farmacevtsko uporabo. To so temperatura tališča, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost, higroskopnost, biološka uporabnost in mehanske lastnosti (12).

Farmacevtski kokristali so zanimivi tudi zaradi prednosti, ki jih ponuja kokristalizacija v primerjavi s tradicionalno metodo optimiranja fizikalnih lastnosti s tvorbo soli. Za tvorbo kokristalov ne potrebujemo funkcionalne skupine, ki lahko ionizira, kot je to potrebno pri tvorbi soli. Pri izbiri potencialnih tvorcev kokristala imamo pestro izbiro iz množice farmacevtsko sprejemljivih molekul, ki jih lahko uporabimo in s tem tudi veliko možnosti za prilagajanje fizikalno-kemijskih lastnosti. Nasprotno pa je število protionov primernih za tvorbo soli bolj omejeno (13).



Slika 3. Kristalna struktura kokristala karbamazepin : saharin (33).

1.3. INTERAKCIJE MED KOMPONENTAMI KOKRISTALA

Med molekulami v kokristalih prevladujejo nekovalentne vezi. Najpomembnejše interakcije v kristalih so vodikove vezi, ki nastanejo v spojinah, kjer je vodik vezan na elektronegativen atom. Vodikova vez je usmerjena v prostoru in njena energija z razdaljo pada. Razdelimo jih na močne vodikove vezi ($20-40 \text{ kJ mol}^{-1}$) $\text{OH}\cdots\text{O}$, $\text{OH}\cdots\text{N}$, $\text{NH}\cdots\text{O}$ in na šibke vodikove vezi ($2-20 \text{ kJ mol}^{-1}$) $\text{CH}\cdots\text{O}$, $\text{OH}\cdots\pi$, $\text{CH}\cdots\text{N}$, $\text{NH}\cdots\pi$. Vez $\text{NH}\cdots\text{N}$ uvrščamo vmes, med močne in šibke. Zaradi svoje robustnosti in usmerjenosti so vodikove vezi koristno orodje za sintezo kokristalov (14).

Van der Waalsove interakcije ($2-10 \text{ kJ mol}^{-1}$) so neusmerjene, šibke, njihova moč pa z razdaljo hitro pada. Najpogostejše so $\text{C}\cdots\text{C}$, $\text{C}\cdots\text{H}$, $\text{H}\cdots\text{H}$ in $\text{CH}\cdots\pi$. Zadnja vez izkazuje značilnosti Van der Waalsovih interakcij in vodikovih vezi (14).

V kristalih so lahko prisotne tudi π - π interakcije, ki so posledica prekrivanja p-orbital aromatskih sistemov (15).

Kristalna struktura kokristala karbamazepina s saharinom ponazarja kako se molekule medsebojno povezujejo z vodikovimi vezmi (slika 3).

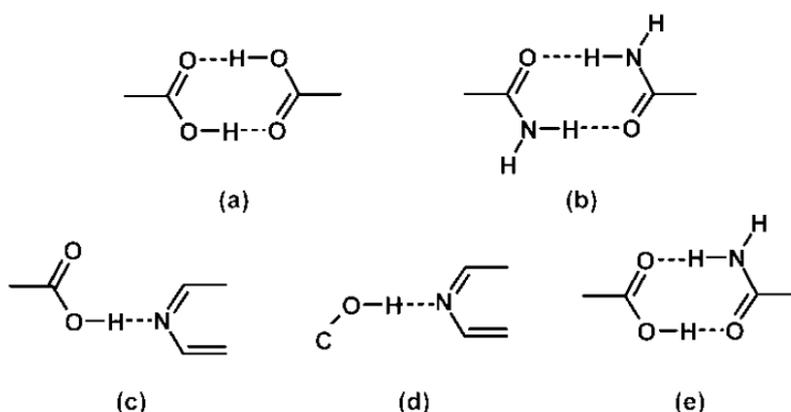
1.4. NAČRTOVANJE KOKRISTALOV

Če želimo kar najbolje povečati eksperimentalno učinkovitost tvorbe kokristalov, moramo načrtovati pripravo kokristala. Ta postopek imenujemo inženiring kokristalov. Najprej moramo analizirati tarčno molekulo zdravilne učinkovine. Preučiti moramo obstoječe kristalne oblike, število in razporeditev donorjev in akceptorjev vodikove vezi, možnosti tvorbe soli, konformacijsko fleksibilnost in gibljivost molekul. Rigidne, simetrične zdravilne učinkovine z nizko molekulsko maso so bolj primerne za kokristalizacijo. Sledi iskanje primernih tvorcev kokristalov, ki morajo biti čimbolj komplementarni s tarčno molekulo in jih izberemo s pomočjo pravil za tvorbo vodikove vezi in molekularne prepoznavne. Lahko si pomagamo z računalniškimi modeli in simulacijami, a zaenkrat zaradi kompleksnosti ni mogoče napovedati, ali bo med dvema molekulama potekla kokristalizacija.

Prvi korak pri načrtovanju kokristalov je analiza obstoječih kristalnih oblik tarčne molekule in identifikacija pomembnih strukturnih enot znotraj molekule, ki povezujejo molekule med seboj z nekovalentnimi povezavami in jih imenujemo sintoni. Ti se pojavljajo v mnogih znanih kristalnih strukturah, ki so objavljene v podatkovni bazi Cambridge Structural Database - CSD, ki predstavlja najpopolnejšo zbirko znanih kristalnih struktur (16). Cambridgeova strukturna podatkovna baza že vsebuje okoli 500.000 določenih kristalnih struktur in se nenehno dopolnjuje (17, 18). S pomočjo struktur, ki jih najdemo v podatkovni bazi CSD, lahko ocenimo, kakšne so možnosti medmolekulskih povezav med funkcionalnimi skupinami tarčne molekule in potencialnega tvorca kokristala. Če upoštevamo hierarhijo sintonov, ki se pojavljajo med množico funkcionalnih skupin, in dejstvo da so določene funkcionalne skupine (karboksilne kisline, amidi in alkoholi) posebno primerne za tvorbo heterosintonov, nam

to znanje olajša izbiro komplementarne komponente, ki bo lažje tvorila medmolekulske vodikove vezi in bo vodila do nastanka kokristala (12).

Sintone delimo v dve skupini: Homosintoni so sestavljeni iz dveh identičnih komplementarnih funkcionalnih skupin, ki sta med sabo najpogosteje povezani z vodikovimi vezmi. Heterosintoni pa so sestavljeni iz različnih, komplementarnih funkcionalnih skupin, ki sta prav tako med sabo povezani z vodikovimi vezmi. Za nastanek kokristala je ključno, da tvorjenje heterosintonov prevladuje nad homosintoni (slika 4) (19).



Slika 4. Primeri homosintonov (a, b) in heterosintonov (c, d, e) (19).

Komplementarni heterosintoni, ki dajejo prednost nastanku kokristala, so že dobro raziskani in poenostavljeno jih lahko ponazorimo s pari: karboksilna kislina - dušikov heterocikel, karboksilna kislina - amid in alkohol - dušikov heterocikel (slika 4) (12, 19). Kokristale, ki vsebujejo ustrezne sintone, lahko pripravimo iz raztopine z obarjanjem, s sublimacijo, iz taline ali z mletjem trdnih komponent s krogličnim mlinom (20, 21).

1.5. PRIDOBIVANJE KOKRISTALOV

Kokristale lahko pripravimo na različne načine, najbolj uveljavljeni metodi sta kokristalizacija iz raztopine in priprava z mletjem sestavin v krogličnem mlinu. Kokristale lahko pripravimo tudi s kokristalizacijo iz koncentrirane suspenzije, iz taline, s sublimacijo sestavin ali z delikvescenco sestavin pri visoki relativni vlažnosti, vendar so te metode bolj zapletene in se manj uporabljajo (22, 23, 24).

Priprava kokristalov je težavna in nepredvidljiva. Na razpolago imamo več metod, še vedno pa ni mogoče napovedati ali bo kokristalizacija uspešna ali ne. Zato moramo vsako reakcijo eksperimentalno preiskusiti z različnimi tehnikami in potrditi nastanek

kokristala. Posebej težko je pridobiti monokristale primerne velikosti in kakovosti za analizo difrakcije z rentgenskimi žarki (25).

Strategije načrtovanja kokristalov se še vedno raziskujejo in mehanizem nastanka je še dokaj nepojasnen. Velja, da je potrebno različni molekuli s komplementarnimi funkcionalnimi skupinami, ki ju želimo kokristalizirati, približati dovolj blizu na molekularnem nivoju, da lahko omogočimo nastanek novih vodikovih vezi, ki so energijsko bolj ugodne, kot tiste med enakimi molekulami. Takrat je nastanek kokristala termodinamsko (ne nujno kinetično) bolj ugoden.

1.5.1. PRIDOBIVANJE KOKRISTALOV IZ RAZTOPINE

Kokristale pogosto pripravljamo s tradicionalno kristalizacijo iz raztopine, in sicer z odparevanjem topila, ohlajanjem raztopine ali z dodajanjem netopila. Ključno pri kokristalizaciji iz raztopin je stehiometrijsko razmerje obeh komponent kokristala, zlasti če odparimo topilo do suhega. Če ne uporabimo ustreznega stehiometrijskega razmerja, pride do obarjanja prebitne komponente, ki jo moramo nato ločiti od nastalih kokristalov.

Pri pridobivanju kokristalov iz raztopin ima pomembno vlogo tudi izbira topila. Pomembno je, da sta obe komponenti podobno topni v izbranem topilu, sicer se najprej obori manj topna komponenta.

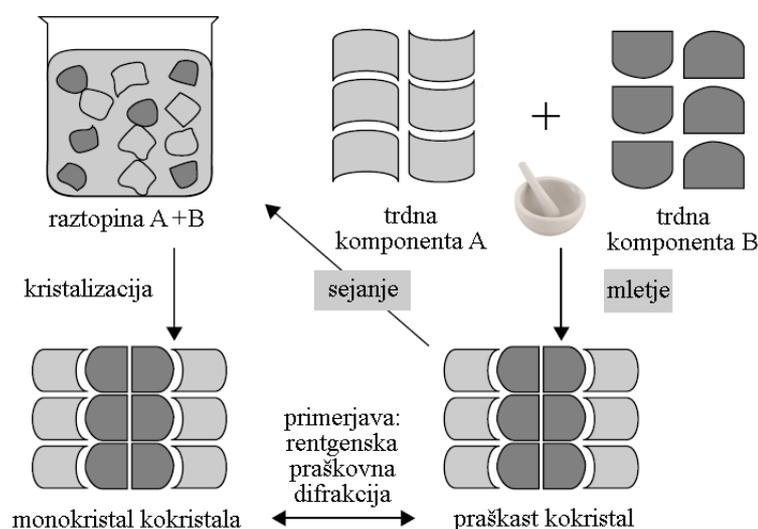
Obstaja več razlogov za priljubljenost pridobivanja kokristalov iz raztopine. Najpomembnejši je, da lahko na ta način dobimo velike, dobro oblikovane monokristale, s katerimi lahko vrednotimo kristalno strukturo z uporabo analize difrakcijskega vzorca monokristala, ki je poznana kot najboljša metoda za določanje kristalne strukture (20).

Pomanjkljivosti pridobivanja kokristalov iz raztopin se kažejo v problemih s topnostjo začetnih komponent v izbranem topilu. Pomembna je zadostna in primerljiva topnost vseh komponent, v nasprotnem primeru bo prišlo do obarjanja manj topne sestavine, zaradi česar se bomo oddaljili od pogojev, ki so idealni za nastanek kokristala. A tudi podobna topnost ne zagotavlja uspešne izdelave kokristala. Topilo, ki ga uporabimo pri kokristalizaciji, se lahko vmeša v želeno medmolekulske interakcije in tako postane del kristalne rešetke. Na ta način nastali solvat ovira nastanek načrtovanega kokristala. Dodatna težava pri kokristalizaciji iz raztopin je tudi velika poraba topila pri pripravi kokristalov.

Študije kažejo, da lahko pričakujemo večji uspeh pri kokristalizaciji zdravilnih učinkovin, ki imajo več polimorfnih oblik. Če ima neka snov več polimorfov, pomeni, da

je tudi dovolj fleksibilna in ni omejena zgolj na en tip kristalne ureditve. Tako so povečane možnosti, da se bo molekula lažje prilagodila drugi komponenti in tvorila kokristal (26). Ampak v primeru polimorfnih kokristalnih sistemov lahko pri kristalizaciji iz topila pride do nastanka nezaželenega metastabilnega polimorfa.

Vse te težave kažejo na kompleksnost in zahtevnost pridobivanja kokristalov iz raztopin. Da bi se izognili nekaterim težavam in vzgojili dovolj velike monokristale, ki so dovolj kvalitetni za rentgensko analizo monokristalov, znanstveniki čedalje bolj uporabljajo tudi metodo sejanja kokristalov (angl. cocrystal seeding). Pridobivanje kokristalov s sejanjem poteka podobno kot pridobivanje iz raztopine. Obe komponenti, ki ju želimo združiti v kokristal, ob segrevanju raztopimo v topilu. Ko se topilo ohladi in preden se začne kokristalizacija, dodamo semena kokristalov v raztopino, ki vzpodbudijo nukleacijo kokristalov iste oblike kot v semenih. S sejanjem lahko pridobimo obliko kokristala, katerega nastanek je kinetično manj ugoden. Tako lahko kokristale pridobljene z mletjem ali s katero drugo metodo pretvorimo v dovolj velike monokristale, primerne za rentgensko analizo (slika 5) (27, 28, 29).



Slika 5. Pridobivanje kokristalov iz raztopine in z mletjem (11).

1.5.2. PRIDOBIVANJE KOKRISTALOV Z MLETJEM

Mletje trdnih komponent spada v področje t.i. mehanokemije, kjer z mehansko aktivacijo snovi pride do kemijskih sprememb. Mehanokemijo pozna človeštvo že več tisoč let, od časa, ko so plemenski zdravilci uporabljali nekaj podobnega pestilu in

možnarju, da so lahko obdelali zdravilne rastline. Najzgodnejša omemba mehanokemije v znanstveni literaturi se pojavi leta 1844, ko je Wöhler z metjem pripravil 1:1 kokristal kinona in hidrokinona (30). Pri mletju omenjenih komponent je prišlo do nastanka kristalinične snovi zelene barve, to je bil dokaz, da je reakcija potekla. Znanstveniki so kasneje skušali ugotoviti kaj je nastala snov. V času, ko niso poznali rentgenskih žarkov, so o nastali strukturi lahko le ugibali, vse do leta 1958, ko so objavili popolno strukturo monoklinskega kristala kinhidrona (31).

Zanimanje za mletje in tvorbo kokristalov pa zasledimo od leta 1980, ko so Etter in sodelavci demonstrirali, da lahko s suhim mletjem nastane kokristal metiladenina in metiltimina (32).

Kokristale z (suhih) mletjem pripravimo tako, da pomešamo obe komponenti v zelenem stehiometrijskem razmerju in ju zmeljemo, ročno s pestilom v možnarju ali, boljše, z uporabo krogličnega oziroma vibracijskega mlina.

Priprava kokristalov z mletjem predstavlja alternativo postopkom pridobivanja kokristalov iz raztopine in ponuja nekaj prednosti. Topnost vhodnih komponent v določenem topilu pri mletju trdnih snovi ni pomembna, kar zelo razširi uporabnost metode v primerjavi s kokristalizacijo iz raztopine. Kokristalizacija v trdnem stanju brez topila prav tako izloči možnost nastanka neželenih solvatov (33).

Pomemben napredek pri mletju se je pojavil, ko so Shan in sodelavci spoznali, da majhen kontroliran dodatek topila med mletjem izboljša proces in občutno poveča kinetiko nastanka kokristalov (34). Mletje z dodatkom topila nudi številne prednosti pred kokristalizacijo iz topila. Tako ni potrebno, da sta obe komponenti dobro topni v dodanem topilu, izkoristek je večji in večja je kristaliničnost produkta. Z izbiro pravega topila je mogoče kontrolirati nastanek polimorfov. V določenih primerih lahko z mletjem z dodatkom topila dobimo kokristale, ki jih ni mogoče pridobiti s kokristalizacijo iz topila (35).

Učinkovitost kokristalizacije z mletjem v primerjavi s kokristalizacijo iz topila so preučevali na primeru 25 kokristalov, ki so bili pripravljene iz raztopine in objavljeni v različnih člankih. Študija je pokazala, da je priprava kokristalov z mletjem z dodatkom topila zelo uspešna, saj so vseh 25 objavljenih kokristalov pridobili tudi z mletjem (36).

Obe metodi, suho mletje in mletje z dodatkom topila, sta se uveljavili kot hitri in visoko učinkoviti metodi za reševanje (ang. screening) kokristalov, soli in polimorfni oblik farmacevtskih učinkovin (37, 38).

Mletje predstavlja zanimivo alternativo uporabi topil tudi zato, ker velja za okolju prijazno sintezno kemijo, saj pri odkrivanju in procesiranju novih ali obstoječih učinkovin nastane malo ali nič odpadnih produktov. Pri pripravi kokristalov z omenjeno metodo ne potrebujemo velikih količin topila. To pomeni, da uporabljamo ekološko sprejemljiv pristop, torej se priprava kokristalov z mletjem sklada z načeli t.i. zelene kemije (ang. green chemistry). Gre za filozofijo, ki spodbuja načrtovanje produktov in procesov, ki v kemijskih raziskavah zmanjšajo porabo in ustvarjanje okolju nevarnih substanc (39).

1.5.3. MLETJE BREZ TOPILA

Študije makroskopskih mehanizmov suhega mletja nakazujejo, da kokristalizacije v trdnem stanju ne moremo opisati kot izključen mehanizem. Namesto tega naj bi bilo možnih več mehanizmov, s katerimi se pri mletju tvorijo kokristali in vsak mehanizem vsebuje različen tip vmesne faze. Podrobno preučeni mehanizmi vključujejo: molekularno difuzijo, tvorbo evtektika in kokristalizacijo preko amorfnе faze. Vsem trem različnim mehanizmom je skupno, da molekule (plin, tekočina, amorf) v vmesni fazi izkazujejo povečano mobilnost in/ali višjo energijo glede na njihove začetne kristalinične oblike. Čeprav so v naslednjih primerih predstavljene študije za vsak mehanizem posebej, lahko v praksi kokristali nastajajo hkrati z nekaj ali z vsemi predstavljenimi mehanizmi (33).

Kokristalizacija z mletjem (brez topila) preko molekulske difuzije

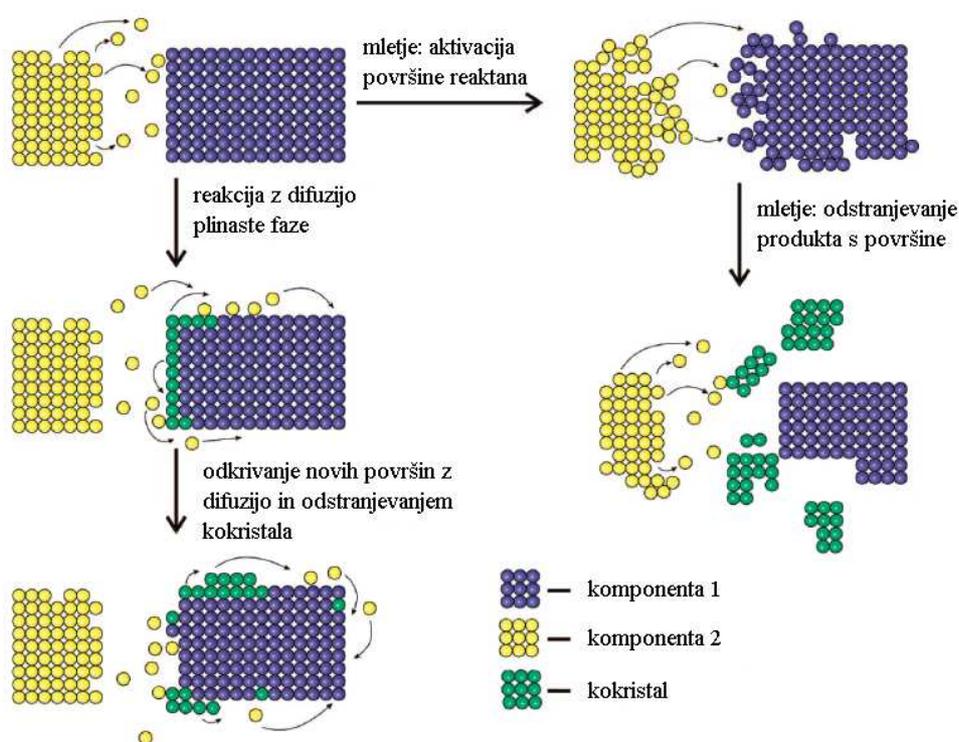
Kokristalizacija preko molekulske difuzije med dvema trdnima reaktantoma je mogoča, ko ima eden ali oba reaktanta visok parni tlak. V takih sistemih se tvorba kokristala lahko pojavi na stiku med trdnima reaktantoma, celo v odsotnosti mletja in mešanja. Rastogi in sodelavci so ugotovili, da sta površinski premik in difuzija plinaste faze osnovna mehanizma tvorbe kokristala pikrinske kisline z aromatskimi ogljikovodiki (40).

Enaki mehanizmi verjetno potekajo pri mletju hlapnega p-benzokinona z različnimi fenolnimi derivati (41). Pri izpostavitvi kristalov 2,2'-bifenola (bifenil-2,2'-diol) param p-benzokinona opazimo nastanek kokristala, kar kaže, da tvorba kokristala poteka preko difuzije plinaste faze (42).

Tvorba kokristala v mirujoči zmesi mikroniziranih praškov p-benzokinona in 2,2'-bifenola poteka približno 60 ur. Po vzpostavitvi ravnotežja lahko reakcijo znova poženemo s kratkim mletjem zmesi, kar kaže, da je nastanek kokristalov omejen z

razpoložljivostjo novih površin za difuzijo molekul na kristale reaktantov. To interpretacijo so potrdili tudi eksperimenti z difuzijo hlapov p-benzokinona, kjer so opazili tvorbo kokristalov na površini bifenolnega kristala. Tako so prišli do spoznanja, da mletje pri kokristalizaciji v trdnem stanju poveča hitrost reakcije z izpostavljanjem novih površin reaktanta in mešanjem trdne reaktivne zmesi (42).

V drugem primeru, ko so racemat bi- β -naftola (1,1'-binaftil-2,2'-diol) izpostavili hlapom p-benzokinona in pomešali obe trdni komponenti, niso dobili kokristala. Nasprotno pa je pri mletju zmesi bi- β -naftola in p-benzokinona v stehiometrijskem razmerju 2:3 prišlo do nastanka kokristala. Iz tega lahko sklepamo, da mletje igra bolj pomembno vlogo pri tvorbi kokristala, kot samo mešanje hlapnih trdnih reaktantov. Mletje naj bi omogočalo tvorbo kokristala s premagovanjem močnih intermolekularnih vezi med molekulami v kristalu bi- β -naftola. Hkrati naj bi potekala tvorba neurejenih plasti molekul na površini kristala reaktanta s pomočjo striga (ang. shearing) – mehanizma sorodnega tvorjenju amorfne faze, a omejenega na dvodimenzionalno površino kristala (slika 6).



Slika 6. Potek reakcije v trdnem stanju z difuzijo plinaste faze in difuzijo površin brez mletja (levo) in z mletjem (desno) (33) .

Razliko med mehanizmom, kjer nastane kokristal p-benzokinona z difuzijo hlapov v primeru z 2,2'-bifenolom in mehanizmom z mletjem, kjer potrebujemo mehansko aktivacijo površine bi- β -naftola, si lahko razlagamo z občutno močnejšimi medmolekulskimi vezmi v kristalu bi- β -naftola kot v kristalu 2,2'-bifenola.

Iz rezultatov raziskav, kjer sta Rastogi in Singh opazovala hitrost reakcije pikrinske kisline z različnimi aromatskimi tvorci kokristalov, predvidevajo, da gre za model v katerem hlapi in površinska difuzija sodelujeta pri nastanku kokristala (43).

Natančneje, pomemben prispevek difuzije hlapov opazimo pri kokristalih z naftalenom, medtem ko pri težjih aromatskih ogljikovodikih opazimo večji pomen površinske difuzije pri nastanku kokristala, kar je povezano z nižjim parnim tlakom teh molekul. Prav tako so opazili, da oblika in simetrija molekul v manjšem obsegu vplivata na hitrost reakcije. Ploščate in ravne molekule običajno reagirajo hitreje, kot molekule z velikimi substituenti. Rezultati raziskav nakazujejo mehanizem tvorbe kokristalov, kjer prevladuje površinska difuzija podprta z različnimi stopnjami difuzije plinaste faze. V takšnih sistemih je vloga mletja, da poveča površinsko difuzijo z mešanjem reaktantov, da z mletjem ustvari nove reaktivne površine in jih mehansko aktivira tako, da reaktanti lažje vstopajo v reakcijo (slika 6).

Kokristalizacija z mletjem (brez topila) preko vmesne tekoče faze

Pri kokristalizaciji z mletjem preko vmesne tekoče faze je tvorba kokristala pospešena z vmesno tekočo fazo, ki nato postane del trdnega kokristalnega produkta. Najenostavnejši je primer mletja dveh komponent, od katerih je ena komponenta pri sobnih pogojih v tekoči obliki. Tako dobimo solvate, ki nastanejo po enakem mehanizmu preko vmesne tekoče faze, a teh tukaj ne bomo obravnavali. V primeru kokristalizacije z mletjem preko vmesne tekoče faze, kjer dodamo med dve komponenti še nekaj vode, da pospeši tvorbo kokristala, se lahko nepričakovano tvori kokristal hidrat (44). Kokristalizacija z mletjem je lahko posredovana z vmesno tekočo fazo tudi v primerih, ko komponente kokristala tvorijo podhlajene, metastabilne evtektične faze, ki se pozneje strdijo in iz njih nastane kokristal (45).

Nastanek kokristalov hidratov

Dodatek topila pri mletju zmesi dveh komponent kokristala lahko včasih omogoči kokristalizacijo tako, da nastane produkt, ki vključuje molekule topila kot sestavni del

kokristala. Iz tega razloga je mletje s tekočimi komponentami vsestranska tehnika za odkrivanje trikomponentnih kokristalov. V nekaterih primerih lahko nastanek trikomponentnega kokristala hidrata pri mletju dosežemo z uporabo vode kot reaktanta ali z uporabo enega ali več kristaliničnih hidratov. Kot primer, pri suhem mletju brezvodnega teofilina in brezvodne citronske kisline z manjšo količino vode dobimo kokristal hidrat, ki je sestavljen iz teofilina, citronske kisline in vode v ekvimolarnem razmerju (44).

Isti kokristal dobimo tudi z mletjem teofilin hidrata z brezvodno citronsko kislino, z mletjem brezvodnega teofilina z monohidratom citronske kisline, pa tudi z mletjem teofilin monohidrata z monohidratom citronske kisline. Mletje brezvodnega teofilina z brezvodno citronsko kislino pa, nasprotno, vodi v nastanek brezvodnega kokristala v razmerju 1:1. V prisotnosti molekul vode prevladuje tvorba kokristala hidrata nad tvorbo brezvodnega kokristala (44).

Nastanek evtektika

Razumevanje vloge nastanka evtektika pri sintezi kokristala bi lahko bilo zelo pomembno za razvoj novih farmacevtskih materialov. Nastanek kokristala iz predhodno nastale metastabilne evtektične tekoče faze so preučevali Davey in sodelavci na primeru kokristala difenilamina in benzofenona (45). Na temelju kokristalov, dobljenih iz raztopine, je razvidno, da se obe komponenti v kokristalu povezujeta z eno vodikovo vezjo $N-H\cdots O$.

Če pomešamo difenilamin in benzofenon, obe brezbarvni komponenti kokristala, opazimo nastanek rumene faze na mejni površini obeh komponent (45). Mikroskopsko opazovanje mejne površine med dvema makroskopskima monokristaloma difenilamina in benzofenona je pokazalo taljenje površine, ki poteče, dokler ni večina materiala pri sobni temperaturi preoblikovana v tekočino. Sledi nukleacija kokristala, ki povzroči, da se celotna talina strdi in tvori trden kokristal. Mletje v z evtektikom posredovani kokristalizaciji ima dva vpliva na nastanek kokristalov. Prvič, mletje razkrije nove površine reaktanta za tvorbo evtektika, in drugič, z vzpodbujanjem nukleacije kokristala poveča tvorbo kokristala v evtektični fazi.

Kokristalizacija preko amorfne faze

Tvorba amorfnega intermedijata je najverjetnejši mehanizem nastanka kokristala pri kokristalizaciji trdnih snovi, ki niso hlapne in so povezane z močnimi medmolekulskimi

interakcijami (vodikove vezi) oz. kjer ni difuzije molekul. Ta ugotovitev je posebej pomembna v povezavi s kokristalizacijo zdravilnih učinkovin.

Tvorba kokristala z mletjem, ki poteka preko vmesne amorfnе faze, nam daje priložnost, da lahko kontroliramo izid kokristalizacije z uravnavanjem temperature pri mletju. Takšno možnost so predstavila Willart in Descams na enokomponentnih sistemih, kot so laktoza, manitol in sorbitol. Prišla sta do zaključka, da z mletjem materialov pri temperaturah nižjih od temperature steklastega prehoda snovi, najverjetneje pride do tvorbe amorfnе faze. Pri mletju pri temperaturah, ki so blizu ali višje od temperature steklastega prehoda snovi, pa lahko prej pričakujemo nastanek metastabilnih polimorfnih oblik (46).

Rodriguez-Hornedo in sodelavci so na primeru mletja karbamazapina in saharina prikazali, da z mletjem komponent pod pričakovano temperaturo steklastega prehoda te zmesi, nastane amorfnа faza, ki po mirovanju na sobni temperaturi počasi prehaja v obliko kokristala (47). Temperaturo steklastega prehoda amorfnе zmesi lahko ocenimo glede na temperaturo steklastega prehoda obeh komponent (48). Poleg tega so ugotovili, da mletje dveh reaktantov pri sobni temperaturi povzroči delno amorfizacijo in delno kokristalizacijo. Ob mirovanju na sobni temperaturi delež kokristala v zmesi narašča, saj se zmes pretvarja v kokristal in končno nastane čisti kokristal. Rezultati se ujemajo z mehanizmom reakcije, kjer mletje omogoča kokristalizacijo karbamazepina in saharina s tvorbo amorfnega intermediata z visoko energijo in visoko mobilnostjo molekul. Amorfnа faza se pozneje pretvori v kokristal, počasi z mirovanjem, ali pospešeno z dodatnim mletjem. Pretvorba amorfnе faze je ovirana pri nižji temperaturi in olajšana pri temperaturah, ki so blizu pričakovani temperaturi steklastega prehoda zmesi.

Ker je kokristalizacija karbamazepina in saharina pri mletju odvisna od temperature steklastega prehoda amorfnega intermediata, lahko pospešimo kokristalizacijo pri nižjih temperaturah z uporabo mehčala kot je voda, ki zniža temperaturo steklastega prehoda zmesi in tako poveča mobilnost molekul in hitrost kokristalizacije (48). To so dokazali s shranjevanjem amorfnega intermediata pri 75 % relativne vlage in z eksperimentom, v katerem so mleli karbamazepin dihidrat. V obeh primerih se pospeši tvorba kokristala v primerjavi z rezultati karbamazepina, ki so ga hranili pri 0 % relativne vlažnosti in z rezultati brezvodnega karbamazepina (48). Vlaga (voda) ne deluje samo kot mehčalo, ampak lahko delikvescenca omogoči tvorbo kokristala iz zmesi trdnih komponent kokristala. V vlažni atmosferi lahko v teh primerih poteče nastanek kokristala v treh

korakih, in sicer najprej poteče privzem vlage, sledi raztapljanje reaktanta in nato tvorba jeder kokristala in njihova rast (49).

1.5.4. MLETJE Z DODATKOM TOPILA

Oblika mletja, pri kateri zmesi dodamo nekaj kapljic ustreznega topila, se pogosto uporablja pri sintezi kokristalov. Dodano topilo mora imeti ustrezno polarnost in mora topiti eno od sestavin, ali pa delno topiti obe sestavini. V nasprotju s kokristalizacijo z mletjem, posredovano z vmesno tekočo fazo, kjer se tekoča faza porablja v samem postopku kokristalizacije, ima tekoča faza pri mletju z dodatkom topila katalitično vlogo (50). Dodano topilo načeloma ne izginja med reakcijo, razen, če izhlapeva. Izjema so reakcije, kjer molekule tekoče faze oblikujejo porozno ogrodje in lahko posledično ostanejo rahlo ujete v strukturi produkta.

Še vedno ni popolnoma jasno, kako tekoča faza pripomore k boljši učinkovitosti mletja z dodanim topilom, glede na navadno mletje (51). V nekaterih primerih naj bi imel dodatek majhne količine topila čisto fizikalno vlogo, topilo naj bi delovalo kot lubrikant in medij za pospešitev molekulske difuzije. V ostalih primerih naj bi imelo topilo pri mletju vpliv na oblikovanje formacije in zgradbe kokristalnega ogrodja (35).

Topilo kot medij za difuzijo molekul

Uspešnost mletja z dodatkom topila je odvisna od kemijske narave topila, ki ga dodamo. Dokaze za to najdemo v analizi trikomponentnih faznih diagramov z nikotinamidom in cimetovo kislino z dodatkom nekaj kapljic vode ali metanola, ki so jo opravili Chiarella, Davey in Peterson (52). Analiza faznih diagramov poda razlago, zakaj je težko dobiti kokristal iz raztopine. Kokristalizacija iz raztopine, v kateri sta obe komponenti bistveno različno topni, se bo prej končala z obarjanjem ene izmed komponent kokristala, medtem ko pri kokristalizaciji iz raztopine, v kateri sta obe komponenti podobno topni, lahko pričakujemo nastanek kokristala. Ker reakcije mletja z dodatkom topila praviloma potekajo v področju faznega diagrama, kjer je vsebnost topila nizka, pričakujemo, da bo kokristal vedno termodinamsko najstabilnejša faza. Relativne topnosti obeh komponent imajo majhen pomen na kontrolo izida mletja z dodatkom topila (53). Zaradi tega razloga smatramo, da ima topilo velik pomen pri povečanju difuzije molekul in povezovanju komplementarnih komponent.

Primer kako lahko z mletjem z dodatkom topila zaobidemo probleme, ki so povezani s topnostjo komponent kokristala, je podan na primeru kokristalizacije teobromina z malonsko kislino (54). Kokristalizacija iz raztopine obeh komponent je bila nemogoča zaradi slabe topnosti in nenadnega obarjanja teobromina. Vendar je z mletjem z dodatkom topila ekvimolarne količine teobromina in malonske kisline z lahkoto nastal kokristal v 20 minutah. Hitrost reakcije, visok izkoristek in kristaliničnost kokristala pripomorejo k hitremu določanju strukture z rentgensko praškovo difrakcijo (54).

Zaradi večje učinkovitost mletja z dodatkom topila v primerjavi s kokristalizacijo iz raztopine lahko to metodo uporabimo kot alternativo pridobivanju kokristalov iz koncentriranih suspenzij. To so dokazali Bučar in sodelavci (55).

Kontrola izida kokristalizacije z dodatkom topila z izbiro topila

Lastnosti dodanega topila, ki ga uporabimo pri mletju, lahko imajo odločilen pomen pri postopku kokristalizacije. Braga in sodelavci so na primeru zmesi pimelinske kisline in 1,1'-di(4-piridi)ferocena odkrili, da pri mletju komponent brez topila ne dobimo novega kristaliničnega materiala. Če so to zmleto zmes izpostavili hlapom diklorometana, kloroforma, dietiletra, nitrometana in etil laktata, je nastal kokristal, medtem ko hlapi metanola, etanola, vode ali izopropil alkohola vodijo v nastanek piridinijeve soli. Zelo zanimivo je, da so pri mletju teh istih komponent z dodanim metanolom ali diklorometanom vedno dobili kokristal. Ti rezultati nam nedvomno kažejo, da lahko lastnosti topila vplivajo na potek kokristalizacije z mletjem, tudi v primeru minimalnih količin topila (56).

Vpliv topila na nastanek kokristala pri mletju z dodatkom topila so pojasnili tudi Trask in sodelavci na primeru kokristalizacije kofeina in glutarne kisline (35). Kokristalizacija iz raztopine obeh komponent iz čistega kloroforma ali iz čistega metanola je težavna, zaradi občutno različnih topnosti obeh spojin v obeh topilih. Rast kokristala iz zmesi kloroforma in metanola vodi k nastanku monokristala kokristala glutarne kisline in kofeina v razmerju 1:1 v dveh polimorfnih oblikah, A in B. Toda pri mletju z dodatkom topila obeh komponent, v prisotnosti majhne količine cikloheksana, nastane izključno kokristal oblike A, medtem ko pri mletju s kloroformom dobimo kokristal oblike B.

Oblikovanje ogrodij povezanih z H-vezmi

Molekule tekoče faze lahko pri mletju delujejo kot šablona pri nastanku poroznih, z vodikovimi vezmi povezanih ogrodij kokristalov. Ta mehanizem je pojasnjen na primeru mletja β -kofeina in jantarne kisline ob prisotnosti dioksana. Pri mletju obeh komponent z dodatkom dioksana nastane kokristal, v strukturo katerega so ujete molekule dioksana (57).

Molekule dioksana so ujete znotraj kanalov v strukturi kokristala. To nakazuje, da je nastanek trikomponentnega kokristala rezultat sposobnosti dioksana, da sodeluje pri usmerjanju in oblikovanju kofeina in jantarne kisline v kokristal in ni rezultat močnih interakcij med tremi komponentami, kot v kokristalu hidratu. Kofein in jantarna kislina ne reagirata pri mletju brez topila ali pri mletju z dodanim metanolom (dobro topilo za jantarno kislino) ali acetonitrilom (dobro topilo za kofein), tako lahko opustimo možnost, da je nastanek kokristala samo rezultat topnosti. Mehanokemijski nastanek kokristala enakega ogrodja poleg dioksana oblikuje še 17 drugih molekul, večina teh je tekočih pri sobnih pogojih. Za primerjavo, poskusi za pridobitev enakega ogrodja s kokristalizacijo iz raztopine so bili uspešni le v 4 primerih, v ostalih se obori ali kofein ali jantarna kislina. Ta razlika med rezultati kokristalizacije z mletjem in kokristalizacije iz raztopine pokaže, kako lahko mehanokemijske metode premagajo težave s topnostjo, ki se pojavijo pri pripravi kokristalov iz raztopin (57).

1.5.5. OSTALE METODE PRIPRAVE KOKRISTALOV

Iz taline pripravimo kokristale tako, da eno izmed komponent kokristala segrejemo nad tališče, tako da je ena komponenta tekoča, druga pa je v trdnem stanju. Trdna komponenta se v stiku s talino deloma raztopi. Sistem počasi ohladimo, da pride do rekristalizacije. Iz rekristalizirane taline nato s pomočjo mikroskopa in z uporabo različnih filtrov ugotavljamo ali je prišlo do nastanka kokristala. Ta metoda se uporablja predvsem pri rešetanju kokristalov, saj z njo ni mogoče dobiti čistih kokristalov (58, 59).

Kokristale lahko pripravimo tudi iz koncentrirane suspenzije. Zmes obeh komponent raztopimo v manjši količini topila, tako da dobimo prenasičeno raztopino. To nato nekaj dni mešamo pri sobnih pogojih. Kokristal nastane posredno iz raztopine, podoben princip kot pri prehodih med polimorfi. Metoda je primerna le za odkrivanje novih kokristalov, zaradi nečistosti pa ni primerna za pridobivanje večjih količin kokristalov (60).

1.6. VREDNOTENJE NASTANKA KOKRISTALOV

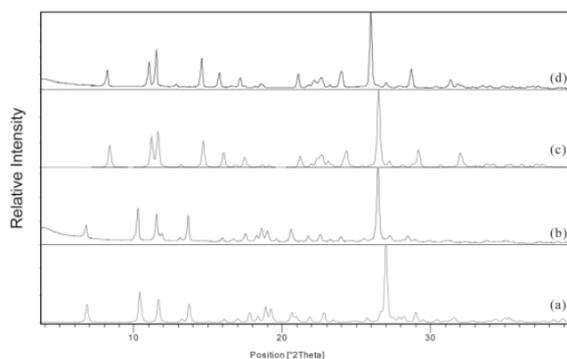
Komponente v kokristalu so urejene na edinstven način in kristalna struktura kokristala se razlikuje od struktur posameznih komponent. Zato so za vrednotenje kokristalov primerne vse metode, ki nam podajajo informacijo o kristalni strukturi. V procesu izdelave nas najprej zanima, ali je prišlo do nastanka novega kokristala. To ponavadi najprej preverimo z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), rentgensko praškovo analizo (XRPD), ramansko in infrardečo (IR) spektroskopijo. Z analizo s temi metodami dobimo posamezne spektre, ki jih nato primerjamo med seboj. V primeru, da kokristal ne nastane, so spektri vzorcev vsota spektrov izhodnih komponent. Če pa komponente tvorijo novo skupno kristalno strukturo, so spektri drugačni. V DSC-spektreu vidimo eno samo tališče; v XRPD-difraktogramu se pojavijo odkloni pri kotih, ki jih ni v spektrih izhodnih spojin; v ramanskem in IR-spektreu zaznamo spremembe v »fingerprint« območju in signale, ki so posledica novih interakcij. Vendar s temi metodami ne moremo razlikovati, za kakšne večkomponentne kristale gre: za solvate, soli ali kokristale, saj tudi pri tvorbi soli ali solvata nastanejo edinstveni spektri. Potrebne so zmogljivejše metode.

Najbolj zaželena metoda za strukturno karakterizacijo in potrjevanje nastanka kokristalov je rentgenska analiza na monokristalu (ang. Single Crystal X-Ray Diffraction), saj s to metodo dobimo podrobne informacije o kristalni strukturi, o prostorski urejenosti molekul in natančno strukturno sliko, iz katere razberemo vrsto in položaj interakcij v kokristalu.

Glavna omejitev metode je, da je zelo težavno pridobiti dovolj velike monokristale, primerne za rentgensko difrakcijo. Monokristali morajo biti dovolj veliki in ustrezne kakovosti. Tudi ko kokristali ustrezajo zahtevam za rentgensko difrakcijo, ne moremo vedno nedvomno določiti položaja vodikovega atoma (ali pride do prenosa protona iz kisline na bazo ali ne) (13). Zato je za karakterizacijo potencialnih kokristalov najbolje uporabiti kombinacijo več različnih tehnik (XRPD, IR, NMR v trdnem), ki ne zahtevajo priprave monokristalov.

Številni poizkusi so tudi pokazali, da so mehanokemijske metode bolj učinkovite, kot priprava kokristalov iz raztopine, predvsem mletje z dodatkom topila. Tako pripravljene kokristali so zmleti in niso primerni za rentgensko difrakcijo na monokristalih. Zaradi tega se znanstveniki trudijo rešiti ta problem z odkrivanjem možnosti strukturne določitve, ki ne zahteva monokristalov (13). Kokristale pripravljene z mletjem lahko analiziramo z rentgensko praškovo difrakcijo (XRPD) (54). S to metodo

odkrivamo spremembe v kristalni rešetki, zato je to močno orodje pri proučevanju polimorfnih kristalnih oblik in kokristalov. Iz oblike spektra med seboj ločimo različne kristalne oblike. Tako lahko ugotovimo, ali nam je uspelo pripraviti novo kristalno obliko ali pa je naš vzorec le zmes izhodnih snovi. Če imamo za določen kokristal na razpolago strukturne podatke pridobljene iz rentgenske difrakcije na monokristalu, lahko iz teh podatkov s pomočjo programa simuliramo difraktogram rentgenske praškovne difrakcije. Strukturne podatke dobimo iz monokristalov, ki jih sami pripravimo iz raztopine, ali pa jih dobimo iz podatovne baze CSD. Difraktogram rentgenske praškovne difrakcije za kokristal pripravljen z mletjem nato primerjamo s simuliranim difraktogramom (29). To metodo so uporabili tudi Trask in sodelavci na primeru kokristala kofeina in glutarne kisline, ki so jih pridobili z mletjem z dodatkom topila (slika 7). Če se difraktograma ujemata, lahko za vzorec pripravljen z mletjem potrdimo nastanek kokristala (35).



Slika 7. Praškovni difraktogrami (a) simuliran signal iz kristalne strukture kokristala oblike I, (b) signal kokristala oblike I pridobljenega z mletjem kofeina in glutarne kisline, (c) simuliran signal iz kristalne oblike kokristala oblike II, (d) signal kokristala oblike II pridobljenega z mletjem kofeina in glutarne kisline (35).

Po podobnem principu se je razvila tudi metoda strukturnega določanja iz XRPD. V zadnjih nekaj letih je razvoj opreme za XPRD, kot tudi računalniških programov in metod dosegel takšen napredek, da lahko določimo kristalno strukturo iz podatkov praškovne rentgenske difrakcije (20). Na dveh primerih kokristalov teobromina, s trifloroacetno kislino in z malonsko kislino, so znanstveniki pokazali, kako lahko metodo praškovne rentgenske difrakcije uporabimo za hitro strukturno karakterizacijo kokristalov (54). Oba kokristala so strukturno določili v enem dnevu, brez potrebe po monokristalu. Pri tem so si pomagali z računalniškimi programi za določanje kristalne strukture iz podatkov praškovne rentgenske difrakcije, kot so DASH, DICVOL04 in TOPAS (54). Metodo so poimenovali direct-space. Program najprej na podlagi znane molekulske formule in podatkov iz praškovne rentgenske difrakcije o osnovni celici in prostorski skupini (ang.

space group) sestavi možne kristalne strukture. Iz vseh možnih kristalnih struktur preračuna in simulira spektre praškovne rentgenske difrakcije, ki jih nato primerja s spektrom, ki smo ga eksperimentalno pridobili. Kristalna struktura simuliranega spektra, ki se najbolje ujema z izmerjenim, je enaka kristalni strukturi analiziranega vzorca (kokristala) (13, 20).

Tako XRPD postaja močno orodje za določanje strukture trdnih vzorcev v organski kemiji. To potrjuje tudi podatek o letnem povečevanju števila tako določenih struktur organskih spojin (54).

Z jedrsko magnetno resonanco v trdnem – SSNMR (angl. Solid State Nuclear Magnetic Resonance) lahko dobimo izčrpne podatke o strukturi farmacevtskih kokristalov. Analiza NMR v trdnem stanju nedestruktivno analizira majhne količine praškastih vzorcev. To prednost izkoriščamo pri analizi farmacevtskih kokristalov pripravljenih z mehanokemijskimi tehnikami, ki ne dopuščajo analize na monokristalih. SSNMR je analizna metoda, specifična za jedrsko mesto in občutljiva na vodikove vezi in lokalne konformacijske spremembe. S to metodo lahko ovrednotimo kokristale in solvate. S SSNMR lahko dostopamo do različnih informacij v eno- in dvodimenzionalnih eksperimentih, s katerimi preučimo interakcije med jedri. S pomočjo računskih pristopov pa lahko določimo tudi strukturo kokristala, ker se metoda dobro dopolnjuje z rentgensko praškovno difrakcijo. Ta metoda za karakterizacijo kokristalov se še ni popolnoma uveljavila, zato v literaturi najdemo omejeno število študij (61).

Termična analiza DSC je uporabna za natančno določitev talilnega intervala kokristalov in drugih termičnih procesov, kot so razpad, rekristalizacija, prehajanje med polimorfnimi modifikacijami, izguba topila pri solvatih ipd. (37)

IR spektroskopija je močno orodje za identifikacijo kokristalov na osnovi "fingerprint" območja in sprememb absorpcijskih trakov funkcionalnih skupin, iz katerih lahko sklepamo, da je prišlo do interakcij med funkcionalnimi skupinami. Na primer, če pri tvorbi kokristala sodeluje karboksilna kislina, lahko opazimo jasne razlike v absorpcijskih trakovih med nevtralno karboksilno kislino in karboksilatnim anionom. Če je v kokristalu prisotna nevtralna medmolekulska $\text{OH}\cdots\text{N}$ vodikova vez, lahko pričakujemo dva široka trakova pri 2450 in 1950 cm^{-1} (2).

Še bolj napredna je ramanska spektroskopija, ki jo zagovarjajo kot alternativo praškovni difrakciji. Z ramansko spektroskopijo lahko preiskujemo vpliv kristalne strukture na vibracijsko energijo vezi in z njo je mogoče razlikovati med različnimi polimorfi. Ker je ramanska spektroskopija komplementarna praškovni difrakciji, lahko z

njuno kombinacijo močno povečamo razumevanje pojavov v trdnem stanju (62). Pri bližnji IR spektroskopiji pa se je pokazalo, da ni dovolj specifična za identifikacijo kompleksnih trdnih vzorcev (63).

1.7. UPORABNOST KOKRISTALOV V FARMACIJI

Farmacevtski kokristali prinašajo veliko novih možnosti za farmacevtsko industrijo, saj omogočajo optimiranje fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilnih učinkovin, ki so pomembne v zgodnji fazi razvoja zdravila. Tako lahko vplivamo na kristaliničnost, temperaturo tališča, higroskopsnost, topnost in hitrost raztapljanja. Zanimivi so tudi, ker nudijo možnost patentiranja novih kristalnih oblik in s tem podaljševanje patentne zaščite zdravilne učinkovine.

Če želimo razviti farmacevtsko obliko, primerno za širšo uporabo, moramo najprej raziskati fizikalno-kemijske lastnosti kokristalov na enak način, kot pri ostalih trdnih oblikah. Zanima nas kako so se spremenile lastnosti ZU, ki smo jo vgradili v kokristal:

- *Temperatura tališča*

Ali se tališče kokristala spreminja v odvisnosti od posameznih komponent in ali lahko temperaturo tališča ocenimo na podlagi niza večih kokristalov?

- *Higroskopsnost*

Ali lahko s kokristalizacijo ZU izboljšamo njeno obnašanje pri različni vlažnosti?

- *Topnost*

Ali lahko spremenimo topnost ZU, če jo vgradimo v kokristal?

- *Hitrost raztapljanja:*

Se hitrost raztapljanja ZU v kokristalu izboljša v primerjavi s samo ZU?

- *Biološka uporabnost:*

Lahko izboljšamo biološko uporabnost ZU, če uporabimo njene kokristale?

1.7.1. TEMPERATURA TALIŠČA

Temperatura tališča je bistvena fizikalna lastnost, ki je določena s temperaturo, pri kateri je trdna faza v ravnotežju s tekočo fazo. Če je le mogoče, določamo tališče s pomočjo DSC, kjer lahko pridobimo dodatne informacije, kot je entalpija taljenja. Na temperaturo tališča kristalinične snovi vplivajo različni dejavniki, npr. molekularna

razporeditev znotraj kristalne rešetke, molekularna simetrija, intermolekularne interakcije in konformacijske prostostne stopnje molekule. V večkomponentnem sistemu, kot je kokristal, je situacija še bolj kompleksna, ker ima vsaka komponenta (molekula) svoje lastnosti in te vplivajo na okolje in intermolekularne interakcije svojega soseda.

Schultheiss in Newman sta naredila pregled tališč objavljenih kokristalov in primerjavo le teh s tališči ZU in tvorca kokristala z namenom, da bi odkrili kakršnokoli povezavo med tališči kokristalov. Želela sta ugotoviti ali je tališče višje, nižje ali med tališči obeh komponent. Po pregledu 50 različnih kokristalov sta ugotovila, da ima 51 % kokristalov tališče med tališčem ZU in tvorcem kokristala, 39 % jih je s tališčem nižjim od tališč obeh komponent, 6 % jih ima tališče višje od obeh komponent in 4 % kokristalov ima enako tališče kot ZU ali tvorec kokristala (2). Ta pregled jasno kaže, da lahko spremenimo tališče ZU s tvorbo kokristala. Kokristalizacijo lahko uporabimo tudi takrat, kadar želimo znižati tališče učinkovine.

1.7.2. HIGROSKOPNOST

Pomembna lastnost zdravilnih učinkovin je tudi higroskopsnost oz. sposobnost vezave vode pri različnih relativnih vlažnostih, ki lahko vpliva na procesiranje, formuliranje, pakiranje in shranjevanje zdravil. Pogosto se zgodi, da vlaga povzroči neželene spremembe zdravilne učinkovine, kot so polimorfne transformacije, tvorba hidrata ali kristalizacija amorfnih oblik, kar lahko vpliva na varnost in biološko uporabnost zdravila.

Uveljavljen je pristop racionalnega izbora pomožnih snovi za posamezno formulacijo, s katerimi zmanjšamo vpliv vlage in neželene spremembe. Učinkovit pristop pri reševanju problema nestabilnosti zdravilnih učinkovin zaradi povišane zračne vlažnosti je lahko tudi kokristalizacija zdravilne učinkovine (64).

Znani so številni primeri izboljšanja stabilnosti z uporabo kokristalizacije: kokristal kofein : oksalna kislina je veliko bolj stabilen kot brezvodni kofein (65), kokristal karbamazepin : nikotiamid (66) in kokristal indometacin : saharin (67).

Vpliv vlage na stabilnost praškastih farmacevtskih snovi lahko zelo hitro in enostavno preučimo z metodo dinamične sorpcije pare (angl. Dynamic Vapour Sorption – DVS), ki temelji na zelo natančnem gravimetričnem sistemu, ki meri sorpcijo in desorpcijo ekstremno majhnih količin vode, v odvisnosti od relativne nasičenosti. Sorpcijske eksperimente izvajamo prvenstveno z vodo ali pa tudi z organskimi topili (68).

Uporaba DVS metode nam zagotavlja kvalitativne in kvantitativne podatke o vezavi vode na učinkovino, pomožno snov ali na različne farmacevtske formulacije. Poleg uporabe za določevanje sorpcijskih/desorpcijskih izoterm, metodo DVS uporabljamo še za ugotavljanje kinetike privzema in izgube vlage, določevanje amorfnosti in kristaliničnosti, določanje razlik polimorfnih modifikacij, morfoloških lastnosti, ugotavljanje tvorbe in izgube hidratov, kapilarne kondenzacije in stabilnostna testiranja (69).

1.7.3. TOPNOST

V zgodnjih fazah razvoja novega zdravila je eden izmed pomembnejših parametrov topnost in posledično hitrost absorpcije zdravilne učinkovine. Slaba topnost ZU je lahko posledica visoke lipofilnosti molekule in/ali močnih medmolekulskih interakcij, ki zahtevajo več energije za prekinitev vezi med molekulami topljenca (ZU). Preučevanje topnosti novih kokristalov v zgodnjih fazah razvoja lahko pomaga pri iskanju primernih rešitev za izboljšanje topnosti slabo topnih učinkovin.

Kokristali, nasprotno kot amorfi, ne vplivajo samo na kinetiko raztapljanja, temveč tudi na ravnotežno topnost, vendar je to povečanje manj izrazito kot v primeru soli zdravilnih učinkovin. Ravnotežna topnost je odvisna od stabilnosti kokristala v topilu. Pri dobro topnih kokristalih je skoraj nemogoče določiti dejansko topnost kokristala, saj ZU izstopa iz kokristala v obliko, ki je bolj stabilna v raztopini. Topnost dobro topnih kokristalov lahko zgolj ocenimo na podlagi meritev koncentracij v prehodnem stanju, kjer je raztopina v ravnotežju z ZU in kokristalom (70). V nekaterih primerih, so vodikove vezi med obema komponentoma dovolj močne da molekuli ostaneta povezani tudi v raztopini. Pri tem lahko nastane prenasičena raztopina zdravilne učinkovine. To velja za slabše topne komponente, ki dajejo v raztopinah bolj stabilne kokristale (71).

Topnost kokristala narašča s topnostjo obeh komponent, tako tvorca kokristala kot ZU. Tvorec kokristala, ki je približno vsaj desetkrat bolj topen od ZU, omogoča nastanek kokristala z ZU, ki bo bolj topen od čiste ZU. To pomeni, da lahko topnost in hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine prilagajamo z izbiro različno topnih tvorcev kokristala (70).

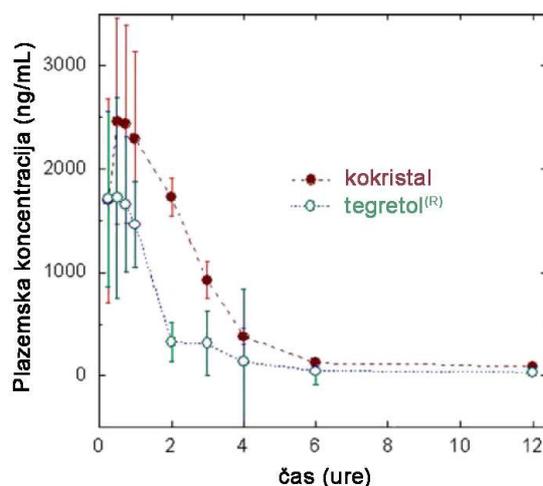
Raziskave so pokazale, da lahko s kokristalizacijo težko topne učinkovine občutno povečamo njeno topnost (primer itrakonazol) (12). Dobro poznani so tudi ostali primeri

izboljšanja topnosti in hitrosti raztapljanja kokristalov karbamazepina, fluoksetina, in sildenafil(12).

Ker sta topnost in prepustnost skozi membrane glavni karakteristiki ZU, ki vplivata na absorpcijo in s tem na biološko uporabnost in učinkovitost zdravilne učinkovine, poskušajo razvojni laboratoriji povečati topnost ZU hkrati pa ohraniti stabilnost. Tvorba soli je sicer najbolj uporabljen pristop za izboljšanje topnosti zdravilnih učinkovin, vendar nimamo pri vseh molekulah te možnosti. To predvsem velja za nevtralne molekule, šibke baze in kisline, ki ne morejo tvoriti soli. V takšnih primerih se kot uspešna alternativa izkaže tvorba kokristalov. Prednost kokristalizacije je tudi v tem, da imamo na izbiro ogromno število potencialnih tvorcev kokristalov, ki jih lahko uporabimo za spreminjanje fizikalno-kemijskih lastnosti. Takšen pristop nam omogoča dopolnitev obstoječih metod in tako lahko uporabimo tudi molekule z omejenimi farmacevtskimi profili, katerih lastnosti ne moremo spreminjati z funkcionalnimi skupinami, ki lahko ionizirajo (12).

Povečana topnost lahko občutno poveča absorpcijo in biološko uporabnost zdravilnih učinkovin (12, 72). S kokristalizacijo lahko povečamo topnost molekul kandidat, s tem razširimo nabor molekul primernih za nadaljne študije in iskanje primerne ZU (28).

Hickey in sodelavci so s pripravo kokristala karbamazepina in saharina uspešno izboljšali topnost, zmanjšali število možnih polimorfov in s tem povečali stabilnost. Tudi študija biološke uporabnosti na psih je pokazala občutno izboljšanje absorpcije učinkovine v obliki kokristala, v primerjavi z obstoječim izdelkom na trgu (slika 8) (66).



Slika 8. Plazemske koncentracije karbamazepina pri psih po enkratnem odmerku 200 mg Tegretola® oz. kokristala (66).

1.7.4. HITROST RAZTAPLJANJA

Hitrost raztapljanja nam pove, kako hitro se trdna snov raztopi v topilu. Raztapljanje je sestavljeno iz dveh povezanih procesov: sprostitve molekul topljenca iz trdne faze, ki ji sledi prenos teh molekul s pomočjo difuzije po celi prostornini topila. Hitrost celotnega procesa je določena s hitrostjo najpočasnejše stopnje, ponavadi je to difuzija topljenca. Na hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine vplivajo lastnosti kot so: kristaliničnost, amorfnost, polimorfizem, hidratacija, solvatacija, velikost delcev in površina delcev zdravilne učinkovine (73).

Hitrost raztapljanja lahko opišemo s Noyes-Whitney-evo enačbo:

$$\frac{dm}{dt} = kA(C_s - C),$$

kjer m predstavlja maso topljenca, ki se raztopi v topilu v času t , dm/dt predstavlja hitrost raztapljanja, A površino snovi, ki je v kontaktu s topilom, C_s koncentracijo topljenca nasičene raztopine pri določeni temperaturi, C koncentracijo topljenca v topilu v času t in k konstanto hitrosti raztapljanja. Faktorji, ki vplivajo na hitrost raztapljanja, so opisani v preglednici I:

Preglednica I. Parametri, ki vplivajo na hitrost raztapljanja (73).

simbol iz Noyes-Whitney-eve enačbe	parameter
A , površina snovi, ki je v kontaktu s topilom	velikost delcev disperzibilnost praškastih snovi v topilu poroznost delcev
C_s , topnost topljenca v danem mediju	temperatura narava topila molekulska struktura topljenca* kristalna oblika snovi* prisotnost ostalih snovi*
C , koncentracija topljenca v topilu v času t	volumen topila katerikoli proces, ki odstranjuje topljenec iz topila
k , konstanta hitrosti raztapljanja	debelina mejne plasti (boundary layer) difuzijski koeficient topljenca v topilu*

* S kokristalizacijo zdravilne učinkovine lahko vplivamo na molekulsko strukturo ZU, kristalno obliko ZU in difuzijski koeficient ZU v topilu. V strukturi kokristala imamo prisotno pomožno snov (tvorec kokristala), prisotnost katerega prav tako vpliva na hitrost raztapljanja ZU.

1.7.5. INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA

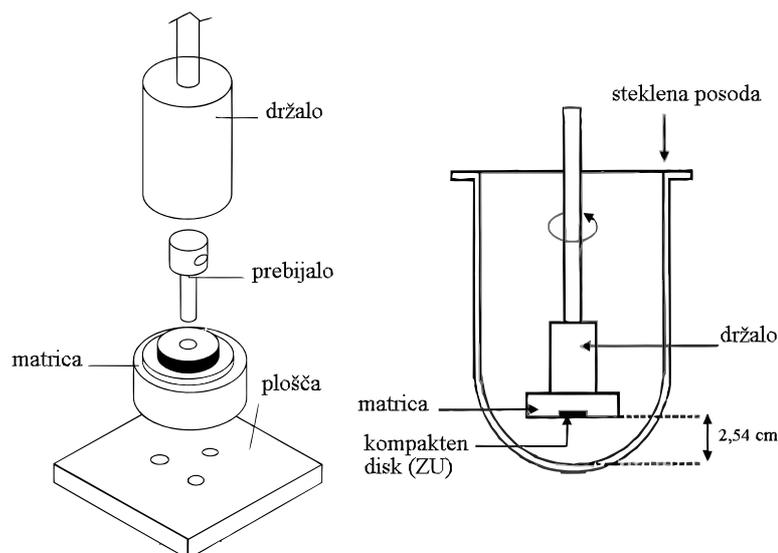
Intrinzična hitrost raztapljanja (IDR) je definirana kot hitrost raztapljanja čiste snovi pri konstantnih pogojih s konstantne površine, ki je v stiku s topilom in je odvisna od fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine. Na hitrost raztapljanja vplivajo tudi hidrodinamika in pogoji testiranja (temperatura, viskoznost tekočine, pH, ionska moč v primeru kadar imamo snovi, ki ionizirajo). Intrinzično hitrost raztapljanja lahko določimo, ko izpostavimo površino snovi primernemu mediju za raztapljanje, medtem ko ohranjamo konstantno temperaturo, hitrost vrtenja mešala in pH. Običajno izražamo intrinzično hitrost raztapljanja v $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$. Tako lahko z določanjem intrinzične hitrosti raztapljanja karakteriziramo lastnosti farmacevtskih substanc in pomožnih snovi (74).

Razlikovati moramo med intrinzično hitrostjo raztapljanja in intrinzično topnostjo, gre za dva različna pojma. Intrinzična topnost je topnost neionizirane oblike topljenca.

IDR je lahko uporaben indikator za oceno biološke uporabnosti zdravilne učinkovine, kar so dokazali Yu in soledavci. Če je IDR več kot $1 \text{ mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ pomeni, da raztapljanje ne bo omejujoči faktor pri absorpciji, medtem ko pri učinkovinah z IDR manjšim od $0,1 \text{ mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ pričakujemo, da bo raztapljanje omejevalo absorpcijo. Pri učinkovinah z vmesnimi vrednostmi IDR je raztapljanje lahko omejujoči dejavnik pri absorpciji zdravilne učinkovine ali pa tudi ne. Splošno naj bi bila meja med dobro in slabo topnimi učinkovinami pri IDR $0,1 \text{ mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ (75).

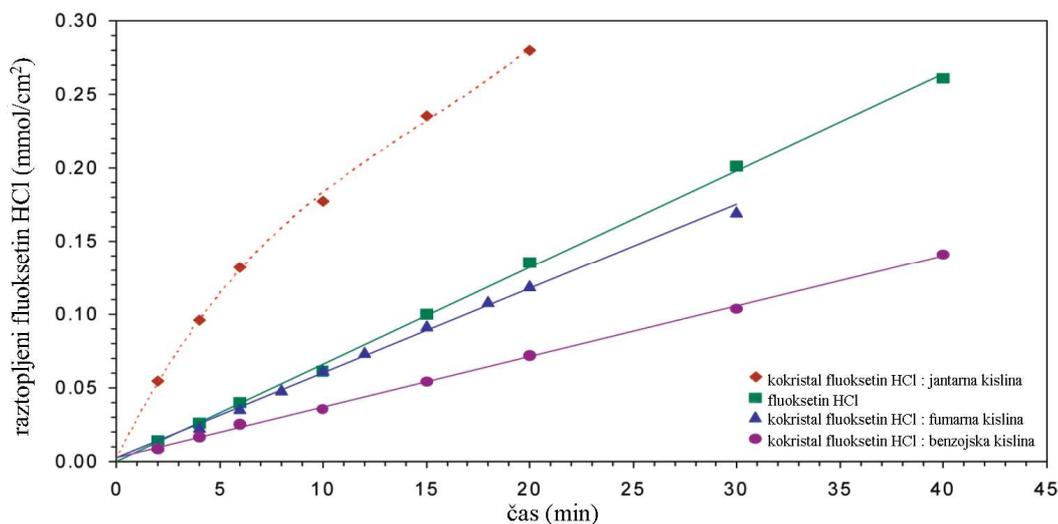
Določanje intrinzične hitrosti raztapljanja

Pri intrinzični hitrosti raztapljanja (IDR) določamo hitrost raztapljanja brez vpliva velikosti delcev. To dosežemo tako, da stisnemo prašek v disk z Woodovim aparatom (slika 9). Sestavljen je iz ravne plošče na katero s tremi vijaki privijemo matrico. Matrica ima na sredini okroglo odprtino premera od 0,1 do 1,0 cm, v katero stresemo material, ki mu nameravamo izmeriti IDR. V odprtino nato vstavimo prebijalo in s stiskalnico stisnemo material. Na dnu matrice nastane kompakten disk preiskovanega materiala z ravnim dnom, ki je pri poskusu v neposrednem stiku z medijem. Matrica se nato privije na držalo, ki ga potem vstavimo v napravo za merjenje hitrosti raztapljanja in potopimo v posodo z medijem (76).



Slika 9. Shemi Wood-ove naprave.

Merimo koncentracijo analita skozi časovno obdobje in določimo hitrost raztapljanja v $\text{mg}/\text{min}/\text{cm}^2$ ali $\text{mmol}/\text{min}/\text{cm}^2$ (slika 10). Med eksperimentom mora disk ostati cel, zato je tlak med stiskanjem lahko kritičen faktor za slabo stisljive praške. Pomembno je tudi, da po stiskanju in med samim raztapljanjem ni sprememb v obliki diska, saj v nasprotnem primeru ta tudi vpliva na površino in meritve niso veljavne (74).



Slika 10. Profili intrinzične hitrosti raztapljanja fluoksetina HCl in kokristalov (91).

1.7.6. KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA

Farmacevtski kokristali so trdne snovi z edinstveno in nepredvidljivo strukturo in fizikalnimi lastnostmi, ki lahko ustrezajo kriterijem za patentno zaščito, saj so novi, koristijo določenemu namenu in njihov nastanek ni očiten (77). Določeni farmacevtski

kokristali lahko imajo izrazito komercialno prednost in jih je zato smiselno zaščititi kot intelektualno lastnino.

Kokristali ponujajo veliko možnosti za patentiranje, ker obstaja tudi veliko število molekul, ki jih lahko uporabimo kot tvorec kokristala. Farmacevtska industrija ima tako možnost povečati obseg svoje intelektualne lastnine in podaljšati patentne pravice. Kokristali so zanimivi tudi za generično industrijo, saj naj bi predstavljali alternativo polimorfom in solvatom, vendar regulatorni aspekti tukaj še niso popolnoma dorečeni. Registracija zdravil, ki vsebujejo kokristale, še vedno ostaja odprto vprašanje. Jih lahko registriramo po skrajšanem postopku podobno kot hidrate in slovate, ali pa so potrebne obsežne klinične študije, kot pri zdravilnih učinkovinah v obliki soli (77)?

Patentiranih je že nakaj kokristalov in pričakujemo lahko, da se bo število patentnih prijav povečevalo. Omeniti velja patent strokovnjakov iz Plive, ki so patentirali kokristal sildenafil z acetilsalicilno kislino (78). Devarakonda in sodelavci pa so patentirali kokristal aripiprazola z fumarno kislino (79), ki je stabilen in primeren za industrijsko proizvodnjo. Prav tako so že patentirani kokristali tenofovira in teofilina (80, 81).

1.8. FLUKONAZOL

1.8.1. DELOVANJE IN UPORABA

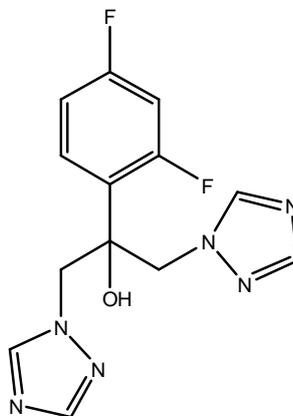
Flukonazol je triazolni antimikotik, ki se uporablja pri zdravljenju invazivnih glivičnih infekcij. Flukonazol inhibira glivni encim 14α -demetilazo, ki sodeluje v biosintezi ergosterola. Veže se na hemsko skupino lanosterol- 14α -demetilaze in tako prepreči oksidativno demetilacijo lanosterola v ergosterol. Zaradi pomankanja ergosterola je zmanjšana stabilnost glivine celične membrane, kar vpliva na prenos hranil in sintezo hitina, poruši se integriteta celične membrane in sledi propad celice.

Zaradi dobrih farmakokinetičnih lastnosti, varnosti, učinkovitosti in širokega spektra delovanja ga uporabljamo tako topikalno pri površinskih mikozah, kot tudi peroralno pri sistemskih infekcijah. Uporablja se pri zdravljenju vaginalne kandidoze, sluznične kandidoze (npr. orofaringealne kandidoze in kandidoze požiralnika), pri zdravljenju globoke sistemske kandidoze, pri zdravljenju kriptokoknega meningitisa in pri preprečevanju okužb, ki jih povzroča *Candida* pri bolnikih z zmanjšano obrambno sposobnostjo organizma (po citotoksični kemoterapiji ali radioterapiji, po transplantaciji kostnega mozga, pri bolnikih z AIDS-om) (82, 83).

1.8.2. OSNOVNI PODATKI

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

Strukturna formula:



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

Molska masa: 306,3 g/mol

Opis: Flukonazol je bela kristalinična snov. Lahko topen je v metanolu, topen v etanolu in acetonu, težko topen v vodi in toluenu ter zelo težko topen v heksanu. Je zelo šibka baza s pKa vrednostjo 1,76 pri 24 °C in je posledično nedvomno neprotonirana pri pH vrednostih, višjih od 3,5.

Topnost v vodi: 8 g/l (pri 37 °C)

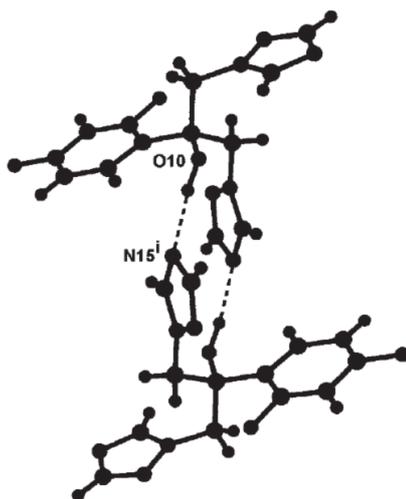
Tališče: 138-140 °C

Log P: 0,5

Vir: (83, 84)

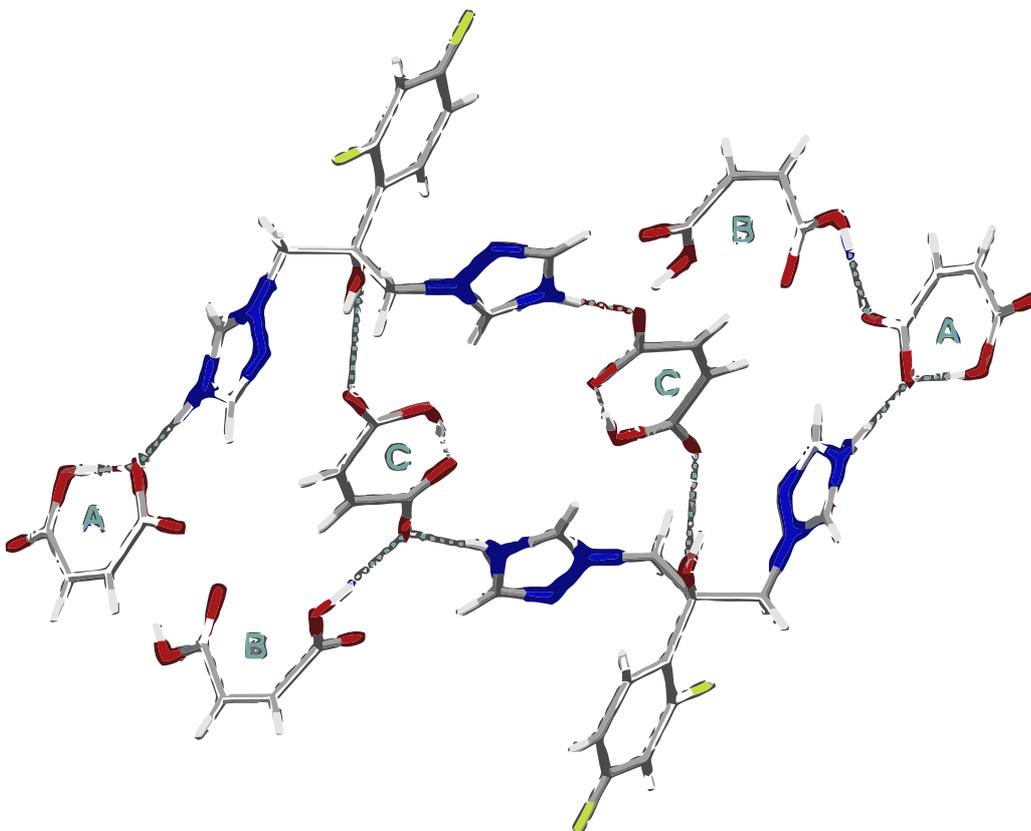
1.8.3. KOKRISTALI FLUKONAZOLA

Molekula flukonazola vsebuje dva triazolna obroča, ki sta dobra akceptorja vodikove vezi in eno hidroksilno skupino - donorsko skupino vodikove vezi, preko 2,4-difluorofenilne skupine pa so mogoče π - π interakcije s komplementarnimi skupinami. Iz kristalne strukture flukonazola je razvidno, da so molekule flukonazola povezane v dimere preko vodikovih vezi, ki povezujeta hidroksilni skupini in N4 atoma triazolskih obročev dveh molekul flukonazola (slika 11) (85).



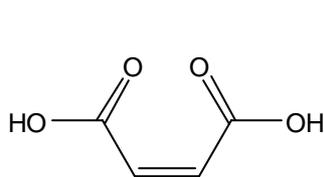
Slika 11. Kristalna struktura flukonazola. S prekinjenimi črtami so prikazane vodikove vezi (85).

Znani sta tudi dve različni polimorfni modifikaciji flukonazola, flukonazol monohidrat in solvati flukonazola z acetonom, benzenom in etil acetatom, kar kaže na veliko sposobnost flukonazola za tvorbo intramolekularnih, kot tudi intermolekularnih vodikovih vezi in drugih interakcij (86). Kot tak je flukonazol primerna učinkovina za pripravo kokristalov, kar so tudi dokazali Kastelic in sodelavci (87).

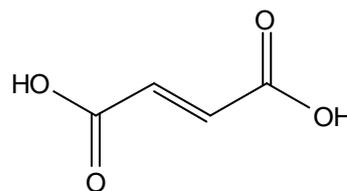


Slika 12. Kristalna struktura kokristala flukonazol : maleinska kislina 1:3 (90).

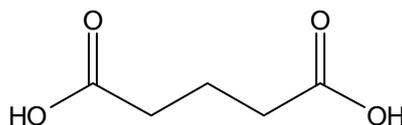
Kastelico in sodelavcem je uspelo z metodo kokristalizacije iz topila pripraviti tri nove kokristale flukonazola. Kot pomožne snovi so uporabili različne dikarboksilne kisline, ker so dosedanje raziskave o kokristalih pokazale, da je povezava karboksilne kisline in dušikovega heterocikla najpogosteje zastopana kombinacija v kokristalih. Poleg tega so dikarboksilne kisline v vodi na splošno dobro topne, kar daje dobre možnosti za izboljšanje raztapljanja učinkovine. Skušali so pripraviti kokristale flukonazola z maleinsko, fumarno, jantarno, jabolčno, vinsko in glutarno kislino. Z uporabo ustreznih topil oz. kombinacije topil in z različnimi postopki odparevanja topila ter poskusi pri različnih stehiometrijskih razmerjih, so uspešno pripravili kokristale: flukonazol : maleinska kislina v razmerju 1:3, flukonazol : fumarna kislina v razmerju 2:1 in flukonazol : glutarna kislina v razmerju 1:1. Vse tri kokristale jim je uspelo pripraviti v obliki monokristalov ustrezne velikosti in kakovosti za rentgensko difrakcijo na monokristalih, ki je najmočnejša metoda za karakterizacijo kokristalov. Tako so dobili popolne podatke o kristalni strukturi in interakcijah znotraj kokristala (slike 12-15). Iz teh podatkov so razbrali, da je kokristal flukonazola z maleinsko kislino dejansko kokristal soli, saj je prišlo do izmenjave protonov med maleinsko kislino in flukonazolom. Vsaka molekula flukonazola je sprejela dva protona od dveh molekul maleinske kisline. Nove kokristale so tudi okarakterizirali z rentgensko praškovo difrakcijo, jedrsko magnetno resonanco v trdnem, s termično analizo DSC, z IR-spektroskopijo in SSNMR metodami (87).



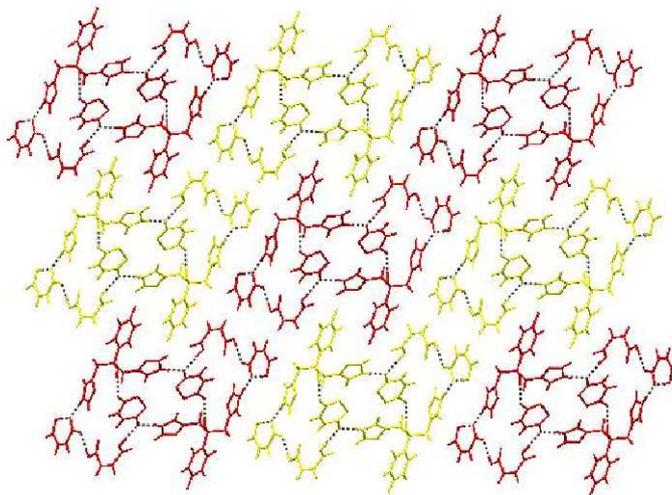
maleinska kislina



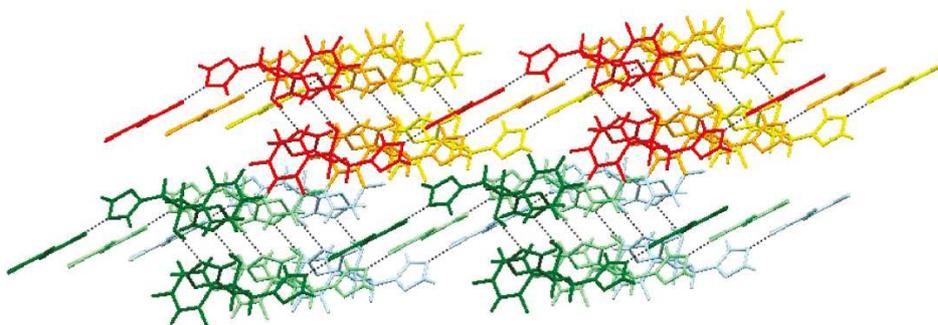
fumarna kislina



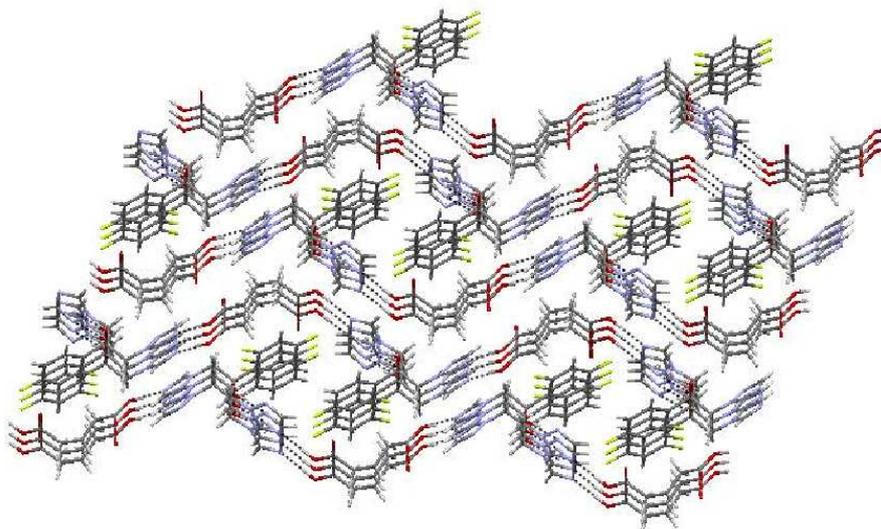
glutarna kislina



Slika 13. 3D struktura kokristala flukonazol : maleinska kislina v razmerju 1:3 (87).



Slika 14. 3D struktura kokristala flukonazol : fumarna kislina v razmerju 2:1 (87).



Slika 15. 3D struktura kokristala flukonazol : glutarna kislina v razmerju 1:1 (87).

2. NAMEN DELA

V tem diplomskem delu želimo smiselno nadaljevati dosedanje delo na področju kokristalov flukonazola. S pomočjo nove metode – mletja bomo poskušali pripraviti znane kokristale flukonazola, ki so jih pripravili Kastelic in sodelavci s kokristalizacijo iz raztopine (87). Želimo pripraviti kokristale flukonazola v večjih količinah, jih ovrednotiti in primerjati rezultate z dosedanjimi, prav tako bomo poskusili z mletjem pripraviti tudi nove kokristale flukonazola. Tako pripravljene in ovrednotene kokristale želimo primejati med seboj, ugotoviti razlike v bistvenih lastnostih, kot so hitrost raztapljanja in stabilnost.

Z diplomskim delom želimo bolje spoznati novo metodo priprave kokristalov z mletjem, ki se čedalje bolj uveljavlja. Mletje ponuja številne prednosti v primerjavi z ostalimi metodami in velja za metodo prvega izbora pri reševanju kokristalov. Priprava kokristalov z mletjem je časovno hitra, pogoje izdelave lahko dobro nadzorujemo, pri mletju potrebujemo zelo malo topila. Z mletjem bomo poskusili pripraviti znane kokristale flukonazola s fumarno, glutarno in maleinsko kislino. Poskušali bomo izdelati tudi nove kokristale flukonazola v kombinaciji z malonsko, jabolčno, vinsko, jantarno, citronsko, salicilno in nikotinsko kislino ter z ureo, nikotinamidom in metilparabenom. Kokristale bomo poskušali pripraviti z uporabo različnih topil, pri tem se bomo opirali na dosedanje raziskovalno delo Kastelica in sodelavcev pri pridobivanju kokristalov iz raztopine, saj nekateri rezultati nakazujejo nastanek kokristalov z jabolčno, vinsko in salicilno kislino.

Produkte mletja bomo nato okarakterizirali z metodami rentgenske praškovne difrakcije, jedrske magnetne resonance v trdnem, s termično analizo in z IR-spektroskopijo. Dobljene rezultate bomo primerjali s podatki, dobljenimi iz monokristalov.

Pri novih kokristalih, kjer podatki rentgenske praškovne difrakcije pokažejo na nastanek nove kristalinične faze, bomo poskušali pripraviti monokristale za rentgensko difrakcijo.

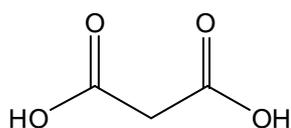
Če nam bo z mletjem uspelo pripraviti zadostne količine kokristalov, bomo skušali preučiti tudi hitrost raztapljanja in dinamično sorpcijo pare kokristalov flukonazola. Primerjali bomo lastnosti različnih kokristalov flukonazola z lastnostmi čistega flukonazola, ter lastnosti kokristalov z lastnostmi fizikalnih zmesi.

3. MATERIALI IN METODE

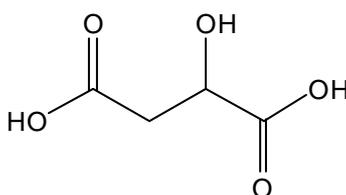
3.1. MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje spojine:

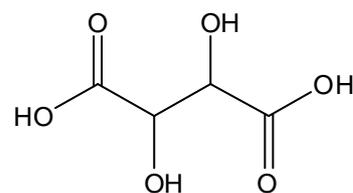
flukonazol	(Krka)
citronska kislina	(Sigma-Aldrich)
fumarna kislina	(Merck)
glutarna kislina	(Merck)
jabolčna kislina	(Merck)
jantarna kislina	(Fluka)
maleinska kislina	(Merck)
malonska kislina	(Merck)
nikotinska kislina	(Merck)
salicilna kislina	(Sigma-Aldrich)
vinska kislina	(Sigma-Aldrich)
metilparaben	(Sigma-Aldrich)
nikotinamid	(Merck)
urea	(Sigma-Aldrich)



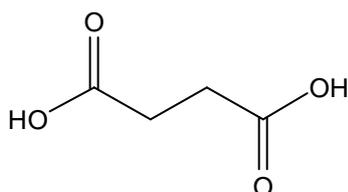
malonska kislina



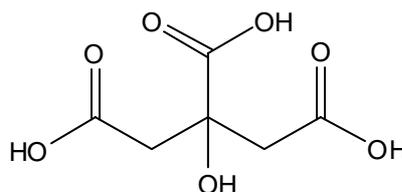
jabolčna kislina



vinska kislina



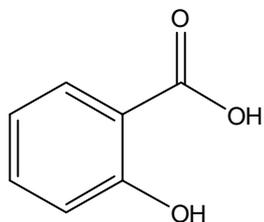
jantarna kislina



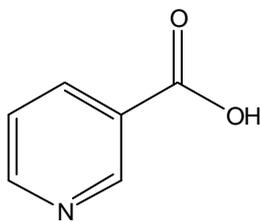
citronska kislina

in topila:

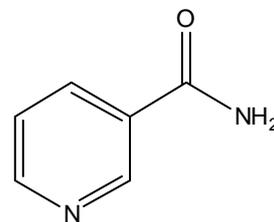
aceton	(Merck, čistota $\geq 99,9$ %)
acetonitril	(Merck, čistota $\geq 99,9$ %)
i-butilmetilketon	(Merck, čistota $\geq 99,0$ %)
cikloheksan	(Merck, čistota $\geq 99,9$ %)
deionizirana H ₂ O	
1,4-dioksan	(Merck, čistota $\geq 99,8$ %)
etanol	(Merck, čistota $\geq 99,9$ %)
etilacetat	(Merck, čistota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



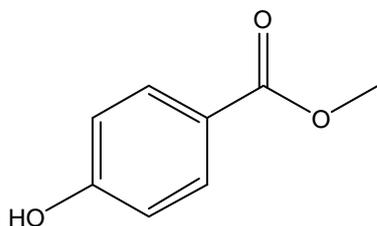
salicilna kislina



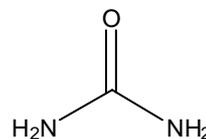
nikotinska kislina



nikotinamid



metilparaben



urea

3.2. METODE

Mletje

Kokristale z mletjem smo pripravili s pomočjo vibracijskega mlina Pulverisette 0 proizvajalca Fritsch (Idar-Oberstein, Nemčija) (slika 16), ki melje vzorce z udarjanjem in drgnjenjem krogle ob vzorec v možnarju. Možnar vibrira s pomočjo elektromotorja. Material, ki ga meljemo, prenese vibracije na kroglo, ki jo položimo na material, ki ga želimo zmleti. Na začetku je mletje posledica udarcev krogle v grobe delce, kasneje so drobni delci zmleti z drgnjenjem in gnetenjem materiala med kroglo in dnom možnarja. Material se nenehno poseda zaradi vibracij, to pomeni, da se tudi dobro premeša. Energijo udarca krogle lahko poljubno nastavljamo, posledično lahko precizno prilagajamo pogoje mletja vzorcu, ki ga meljemo.



Slika 16. Vibracijski mlin Pulverisette 0 Fritsch.

Priprava fizikalnih zmesi

Fizikalne zmesi smo pripravili tako, da smo najprej vsako čisto snov mleli v vibracijskem mlinu Pulverisette 0 Fritsch 10 min, nato smo zatehtali količini obeh komponent v željenem stehiometrijskem razmerju in ju z rahlim krožnim gibanjem s pestilom mešali v ahatni terilnici 15 min.

Rentgenska praškovna difrakcija

Praškovni difraktogrami so bili posneti z difraktometrom Philips X`Pert Pro MPD. Območje snemanja je znašalo $3 - 31^\circ$, 2θ . Integracijski čas je znašal 100 sekund, korak

pa $0,033^\circ$. Meritve so bile opravljene v podjetju Krka, d.d., Novo mesto, Oddelk za strukturne raziskave.

Jedrska magnetna resonanca v trdnem

^1H MAS NMR spektri so bili posneti z Varian NMR System 600 MHz NMR spektrometrom. Uporabljena je bila 3.2 mm NB Double Resonance HX MAS Solids sonda. Hitrost vrtenja vzorcev je znašala 20000 Hz. ^{13}C CP/MAS NMR spektri so bili posneti z Varian Unity Inova 300 MHz NMR-spektrometrom. Uporabljena je bila 5 mm MagicAngle VT CP/MAS sonda. Hitrost vrtenja vzorcev je znašala 5000 Hz. Meritve so bile izvedene v Nacionalnem centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Termična analiza

Termogrami DSC (diferenčne dinamične kalorimetrije) so bili posneti z instrumentom Differential Scanning Calorimeter DSC1 proizvajalca Mettler-Toledo (Švica), opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.10. na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi (pretok dušika je znašal 40 ml/min). Hitrost segrevanja je znašala 2 K/min.

IR spektroskopija

IR-spektre kokristalov in ostalih spojin v obliki KBr-diskov smo posneli s spektrofotometrom Perkin Elmer Spectrum BX FTIR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Meritve so potekale pri 25°C .

Intrinzična hitrost raztapljanja

Intrinzično hitrost raztapljanja smo določali po postopku iz ameriške farmakopeje (US Pharmacopeia) (88), v 900 ml deionizirane vode pri $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ in 100 obratih na minuto v stekleni posodi. V matrico Woodove naprave smo vstavili približno 250 mg kokristalov in stisnili s stiskalnico z maso 2,5 ton za 10 s, v diske s površino $0,5\text{ cm}^2$. Poskus smo izvajali 3 ure, v časovnih intervalih smo ročno vzorčili po 10 ml raztopine, topila nismo nadomeščali, smo pa to upoštevali pri izračunu vsebnosti raztopljenega flukonazola. Vsak kokristal smo pomerili v dveh paralelah in pri izračunu upoštevali povprečno vrednost. Koncentracijo flukonazola smo določili s pomočjo sistema HPLC. Iz

dobljenih podatkov smo s pomočjo linearne regresije določili intrinzično hitrost raztapljanja. Raztapljanje je potekalo na sistemu Vankel VK 7000 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Raztapljanje

Hitrost raztapljanja smo določali z metodo s košaricami po postopku iz ameriške farmakopeje (USP) (89). Košarice smo deloma priredili tako, da smo pokrili dno s plastično folijo. Poskus smo izvajali v 900 ml deionizirane vode pri 37 ± 0.1 °C, hitrost vrtenja košarice je bila 200 obratov na minuto. Pri vsakem poizkusu smo natančno zatehtali količino vzorca, ki je odgovarjala ekvivalentu 150 mg flukonazola in ga previdno prenesli v košarice. V 60 minutah smo v časovnih intervalih ročno vzorčili po 10 ml raztopine, ki smo jo nato filtrirali z uporabo membranskih filtrov velikosti 80 µm. Topila nismo nadomeščali, smo pa to upoštevali pri izračunu vsebnosti raztopljenega flukonazola. Vsak vzorec smo pomerili v dveh paralelah in pri izračunu upoštevali povprečno vrednost. Koncentracijo flukonazola smo določili s pomočjo sistema HPLC. Raztapljanje je potekalo na sistemu Vankel VK 7000 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Koncentracijo flukonazola v raztopini smo vrednotili s pomočjo HPLC sistema (HP Agilent 1100 HPLC). Pri tem smo uporabili nepolarno kolono Eclipse XDB-C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm, Agilent). Mobilna faza (MF) je bila sestavljena iz 70 % 0,05 M raztopine kalijevega dihidrogen fosfata, 20 % acetonitrila in 10 % metanola, pretok MF je znašal 1,0 ml/min. Injicirali smo po 20 µl vzorca. Ločba pa je potekala pri 25 °C. Flukonazol smo detektirali z UV diode array detektorjem pri valovni dolžini 261 nm. Meritve so bile opravljene v podjetju Krka, d.d., Novo mesto, Oddelek za stabilnost (Ljubljana).

Dinamična sorpcija pare (DVS)

Čisto posodico za DVS-vzorec smo razelektrili in posušili. V tako pripravljeno posodico smo natehtali od 20 do 25 mg vzorca. Posodico z vzorcem smo vstavili v napravo za avtomatsko merjenje sorpcije vlage DVS-1 (Surface Measurement System LTD) ter oboje ponovno razelektrili. Počakali smo, da se je na tehtnici vzpostavilo ravnotežje, tarirali in začeli z meritvijo.

Vzorke smo testirali s programskim spreminjanjem relativne vlažnosti od 0 do 95 % (11 stopenj) ter zopet nazaj do 0 %. Tak test smo dvakrat ponovili (dva cikla). Relativna vlažnost se je spreminjala v stopnjah po 10 %, le zadnja stopnja z 90 na 95 % in obratno. Meritve smo opravili pri kontrolirani sobni temperaturi (25 °C) in pretoku dušika 200 ml/min, ki mu je bila glede na nastavljeno relativno vlažnost primešana ustrezna količina vodne pare. Meritve so bile opravljene v podjetju Krka, d.d., Novo mesto, Oddelk za stabilnost (Ljubljana).

Vrstični elektronski mikroskop (SEM)

Praškaste kokristale smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Delce kokristalov smo pripeli na obojestranski karbonski lepilni trak (premer 12 mm, Oxon, Oxford Instruments, UK). Slike smo posneli s pomočjo sistema Supra 32VP (Zeiss, Oberkochen, Nemčija) s pospeševalno napetostjo 0,8 kV in sekundarnim detektorjem. Vzorce smo posneli z 10.000-kratno povečavo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Risanje in poimenovanje spojin

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

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. MLETJE FLUKONAZOLA S POTENCIALNIMI TVORCI KOKRISTALOV

Najprej smo poskušali z mletjem flukonazola in potencialnih tvorcev kokristalov v različnih stehiometrijskih razmerjih, z dodajanjem različnih topil in z mletjem brez topila, pridobiti čimveč vzorcev za nadaljno analizo in potrjevanje nastanka kokristalov. Vzorce (kokristale) smo pripravljali s pomočjo vibracijskega mlina Pulverisette 0 proizvajalca Fritsch (Nemčija).

Vzorce pripravljene z mletjem smo najprej analizirali z metodo DSC. Metoda DSC je hitra, enostavna in učinkovita pri rešetanju in odkrivanju novih kokristalov, a z njo ne moremo zagotovo potrditi nastanka nove kristalne oblike, saj pozitivne odzive dajejo tudi evtektične zmesi. V primerih, kjer se je pojavil primeren odziv in smo pričakovali nastanek kokristala, smo izvedli še analizo z rentgensko praškovo difrakcijo, s katero smo nedvomno potrdili nastanek nove kristalne oblike. Podatki XRPD so pokazali, da pri mletju flukonazola s fumarno, glutarno, maleinsko, jabolčno, malonsko in salicilno kislino, (krepko označene v preglednici II) pride do nastanka nove kristalne oblike.

Kokristalov flukonazola z vinsko kislino nam ni uspelo pripraviti z mletjem, smo jih pa pripravili v večjih količini iz raztopine. Pri tem smo si pomagali s sejanjem kokristalov zelene oblike, ki so jih pri raziskovalnem delu pripravili Kastelic in sodelavci.

Preglednica II. Seznam tvorcev kokristala, ki smo jih uporabili pri mletju s flukonazolom in rezultati rešetanja z metodama DSC in XRPD (znak + označuje zaznane spremembe).

potencialni tvorec kokristala	odziv po mletju flukonazola in potencialnega tvorca kokristala	
	DSC	XRPD
citronska kislina	-	-
fumarna kislina*	+	+
glutarna kislina*	+	+
jabolčna kislina*	+	+
jantarna kislina**	+	-
maleinska kislina*	+	+
malonska kislina*	+	+
metilparaben**	+	-
nikotinamid**	+	-
nikotinska kislina**	+	-
salicilna kislina*	+	+
urea**	+	-
vinska kislina***	-	-

* Pri poudarjenih kislinah nam je z mletjem uspelo pripraviti kokristale in jih okarakterizirati.

** Pri označenih spojinah po DSC-analizi dobimo pozitiven odziv, vendar se je po rentgenski praškovni difrakciji izkazalo, da ne nastane nova kristalna struktura. V teh primerih gre najverjetneje za nastanek evtektične zmesi.

*** Kokristale flukonazola z vinsko kislino smo pripravili iz raztopine s sejanjem.

4.2. PRIPRAVA KOKRISTALOV

4.2.1. FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA = 1:1*

Najprej smo mleli vsako komponento posamezno, po 10 minut. Nato smo flukonazol (2,0 g oz. 6,53 mmol) in glutarno kislino (0,86 g oz. 6,53 mmol) prenesli v možnar in rahlo pomešali s pestilom. Zmes smo pomočili s 300 µl n-heksana in 300 µl acetonitrila, položili kroglo in vse skupaj mleli 35 min. Po končanem mletju smo pustili topilo odpareti do suhega pri sobnih pogojih.

4.2.2. FLUKONAZOL : MALEINSKA KISLINA = 1:3*

Najprej smo 10 minut mleli vsako komponento posamezno. Nato smo v možnar prenesli 1,60 g (5,23 mmol) flukonazola in 1,82 g (15,7 mmol) maleinske kisline in rahlo pomešali s pestilom. Zmes smo pomočili s 400 µl acetonitrila, nanjo položili kroglo in mleli vse skupaj 35 min. Po končanem mletju smo pustili topilo odpareti do suhega pri sobnih pogojih.

4.2.3. FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA = 2:1*

Najprej smo vsako komponento posamezno mleli 10 minut, nato smo v možnar prenesli 2,0 g (6,53 mmol) flukonazola in 0,38 g (3,26 mmol) fumarne kisline in rahlo pomešali s pestilom. Zmes smo pomočili z 200 µl metanola, nanjo položili kroglo in mleli vse skupaj 80 min. Po končanem mletju smo pustili topilo odpareti do suhega pri sobnih pogojih.

4.2.4. FLUKONAZOL : JABOLČNA KISLINA = 1:1*

Flukonazol (2,0 g oz. 6,53 mmol) in jabolčno kislino (0,88 g oz. 6,53 mmol) smo s pestilom rahlo pomešali v možnarju, položili kroglo in mleli približno 20 min. Nato smo zmes pomočili s 500 µl EtOAc in nadaljevali z mletjem 35 min. Nastane lepljiva masa evtektik, ki smo ga sušili v vakumskem sušilniku 24 ur pri 60°C.

4.2.5. FLUKONAZOL : VINSKA KISLINA = 1:1*

Flukonazol (0,98 g oz. 3,2 mmol) in vinsko kislino (0,48 g oz. 3,2 mmol) smo ob segrevanju raztopili v nekaj ml acetonitrila. Nato smo raztopino ohladili pri sobni

temperaturi. V toplo raztopino smo dodali nekaj trdnih kokristalov flukonazol : vinska kislina, ki so jih pripravili Kastelic in sodelavci. S tem smo vzpodbudili rast in kristalizacijo zelene oblike kokristalov.

4.2.6. FLUKONAZOL : MALONSKA KISLINA = 1:1*

Kokristal flukonazola in malonske kisline smo pripravili z mletjem, tako da smo najprej zmleli obe komponenti posamično. Nato smo v možnarju rahlo pomešali 2,0 g (6,53 mmol) flukonazola in 0,68 g (6,53 mmol) malonske kisline, mleli smo 35 min brez uporabe topila. Nastane evtektik, talina, ki smo jo pustili stati 10 dni pri sobnih pogojih, da je počasi kristalizirala.

4.2.7. FLUKONAZOL : SALICILNA KISLINA = 1:1*

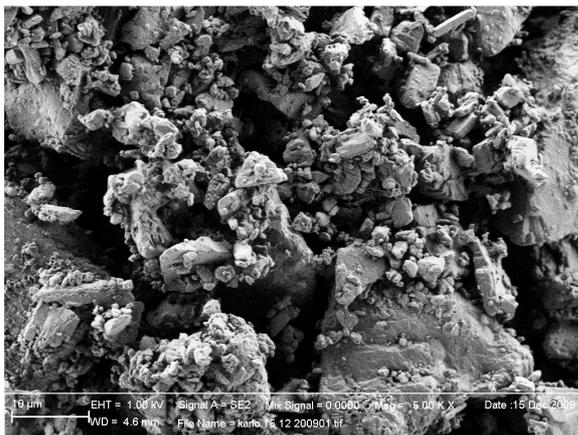
Najprej smo vsako komponento posamezno mleli 10 minut, nato smo v možnar prenesli 2,0 g (6,53 mmol) flukonazola in 0,90 g (6,53 mmol) salicilne kisline in rahlo pomešali s pestilom. Zmes smo omočili z 200 µl acetona, nanjo položili kroglo in mleli vse skupaj 40 min. Po končanem mletju smo pustili topilo odpareti do suhega pri sobnih pogojih.

* Vsi kokristali flukonazola, ki se pojavljajo v diplomski nalogi so pripravljene v navedenem stehiometrijskem razmerju. Zaradi preglednosti bomo v nadaljevanju diplomske naloge pri kokristalih izpustili navajanje stehiometrijskega razmerja.

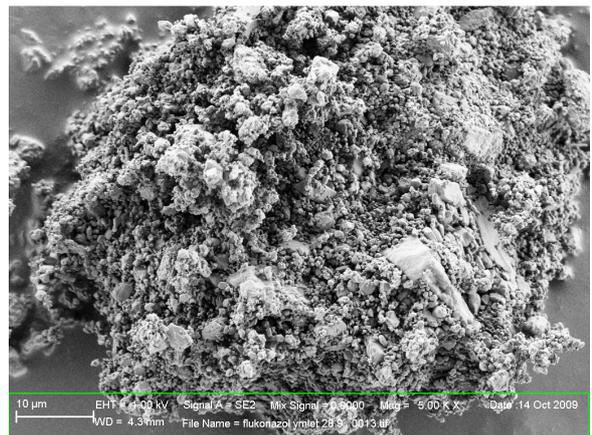
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)

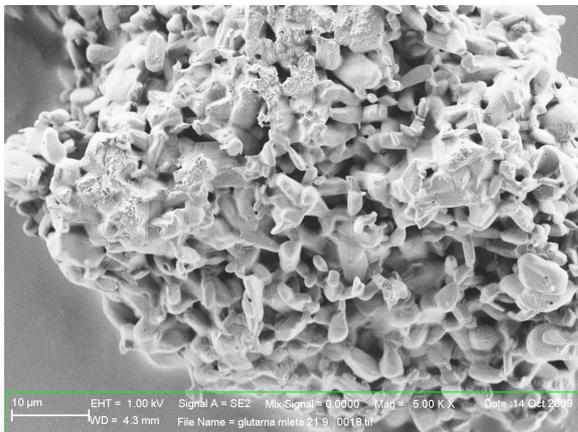
S pomočjo elektronskega mikroskopa smo najprej ugotavljali vpliv mletja na velikost nastalih kokristalov. Primerjali smo velikosti izhodnih snovi in kokristalov, ki smo jih pridobili z mletjem. Iz slik je razvidno, da se pri mletju velikost delcev občutno zmanjša, za primerjavo prikazujemo slike flukonazola pred in po mletju (sliki 17 in 18). Tudi velikosti delcev pomožnih snovi (tvorcev kokristala) se pri mletju zelo zmanjšajo (slika 19). Delci nastalih kokristalov so veliki do nekaj mikrometrov in so primerljive velikosti (slike 20-26). Ker velikost delcev vpliva na hitrost raztapljanja, smo to kasneje upoštevali pri izbiri metode za določanje hitrosti raztapljanja.



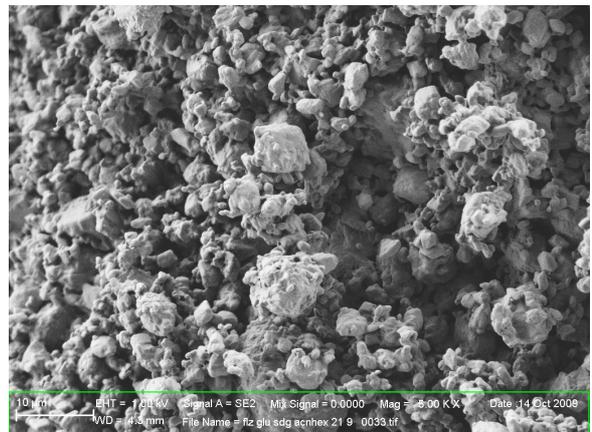
Slika 17. Flukonazol pred mletjem.



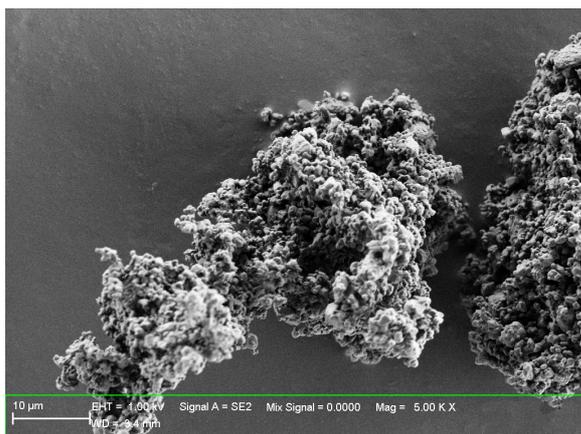
Slika 18. Flukonazol po 10 min mletju.



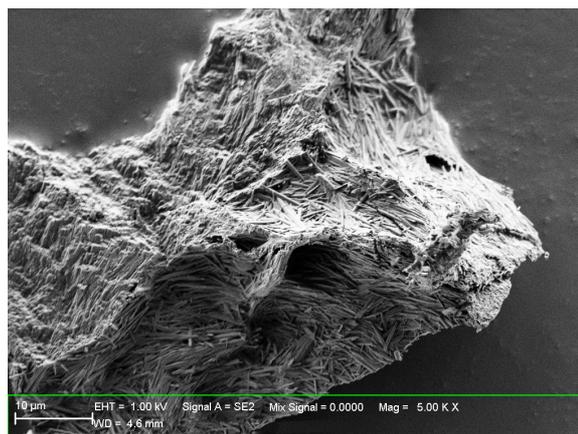
Slika 19. Glutarna kislina po 10 min mletju.



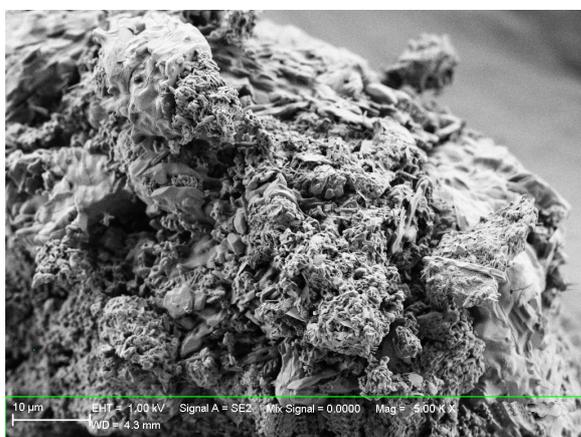
Slika 20. Koristal flukonazol : glutarna kislina



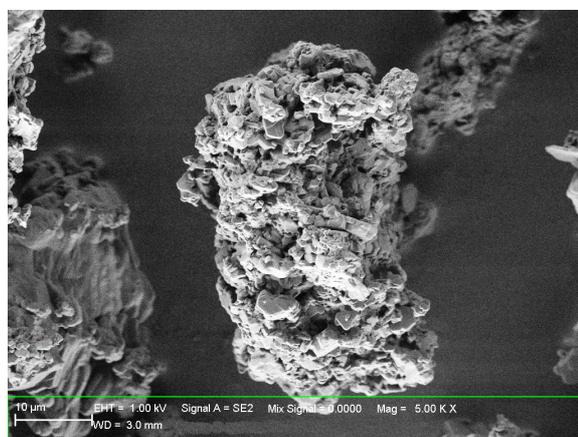
Slika 21. Koristal flukonazol : fumarna kislina.



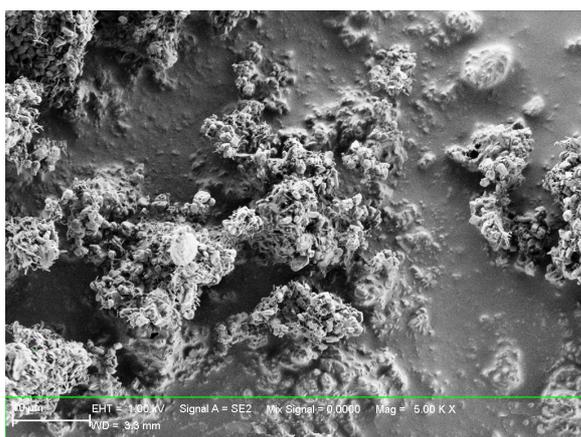
Slika 22. Koristal flukonazol : jabolčna kislina.



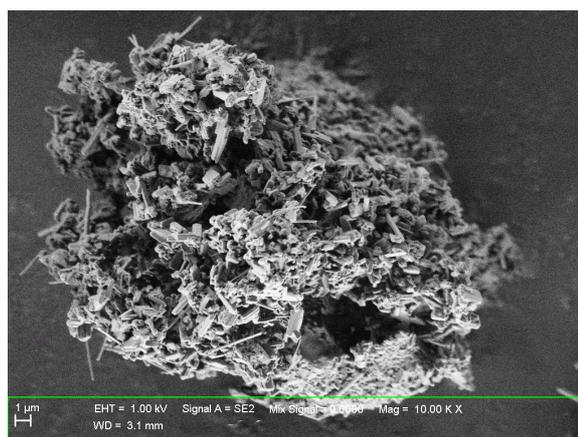
Slika 23. Koristal flukonazol : maleinska kislina.



Slika 24. Kokristal flukonazol : malonska kislina.



Slika 25. Koristal flukonazol : salicilna kislina.



Slika 26. Kokristal flukonazol : vinska kislina.

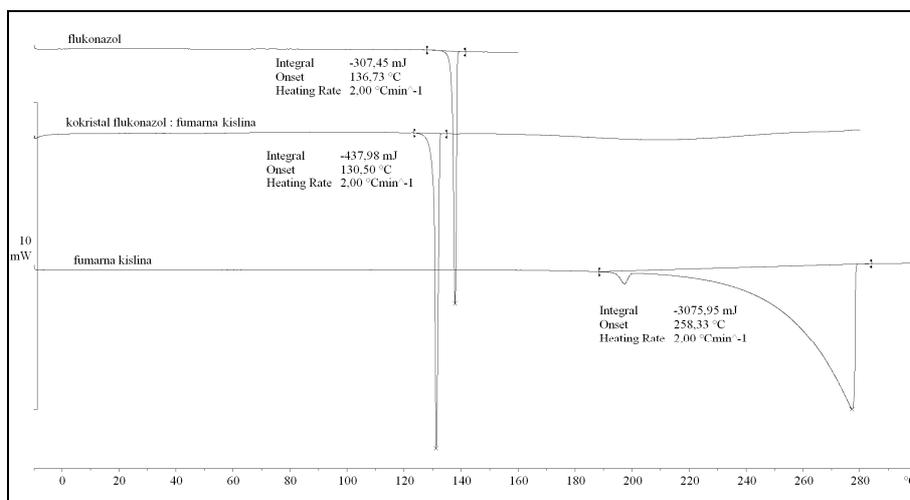
5.2. TERMIČNA ANALIZA KOKRISTALOV IN POSAMEZNIH KOMPONENT

S pomočjo termične analize DSC smo ugotavljali tališča kokristalov in jih primerjali s tališči flukonazola in pomožnih snovi. Iz oblike termograma lahko ugotovimo tudi čistoto nastalega kokristala.

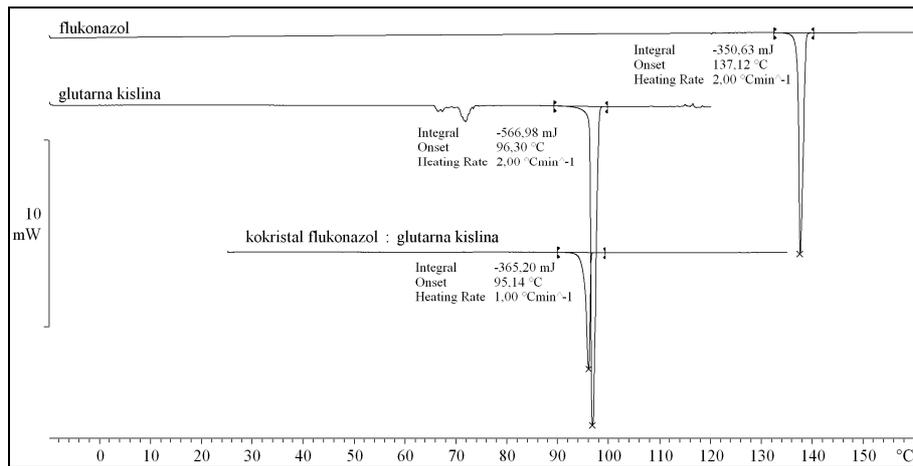
Iz termogramov, ki smo jih posneli, je razvidno, da imajo vsi nastali kokristali nižje tališče, kot sta tališči obeh posameznih komponent (flukonazola in pomožne snovi – tvorca kokristala) (slike 27-33). Ta ugotovitev se sklada z ugotovitvami Schultheissa in Newmana, da naj bi večina kokristalov imela tališče nižje od obeh komponent (2). V preglednici III so zbrani podatki o tališčih tvorcev kokristala in nastalih kokristalov.

Preglednica III. Tališča tvorcev kokristalov in nastalih kokristalov:

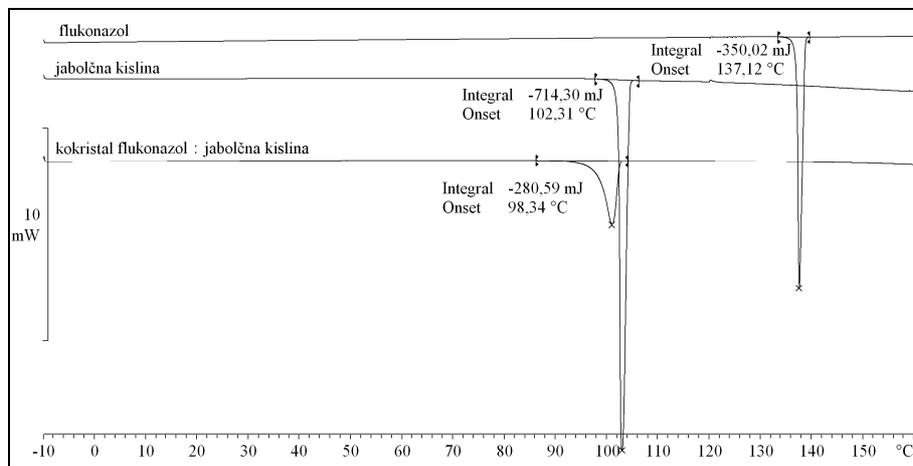
tvorec kokristala	tališče tvorca kokristala (°C)	tališče nastalega kokristala (°C)
fumarna kislina	287	130,5
glutarna kislina	98	95,1
jabolčna kislina	101-103	98,3
maleinska kislina	142-143	106
malonska kislina	132 - 135	100,2
salicilna kislina	157 - 159	106,8
vinska kislina	168 - 170	110,5
flukonazol	138-140	



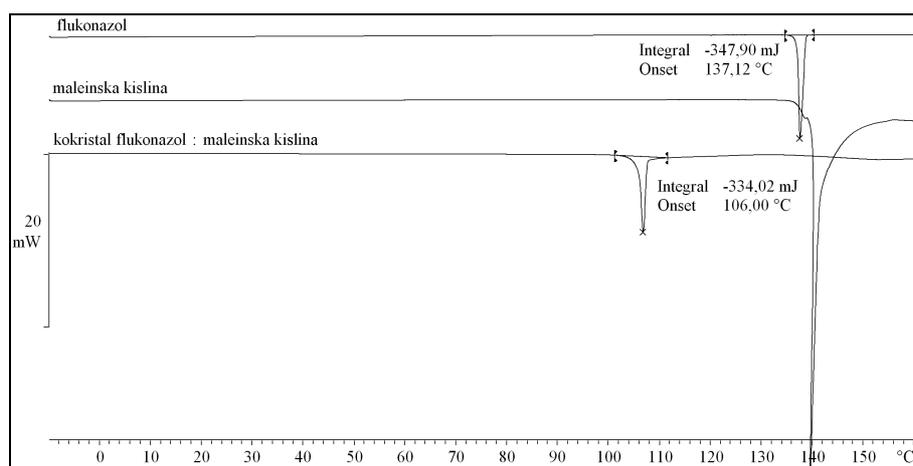
Slika 27. DSC-termogrami flukonazola, fumarne kisline in kokristala flukonazol : fumarna kislina.



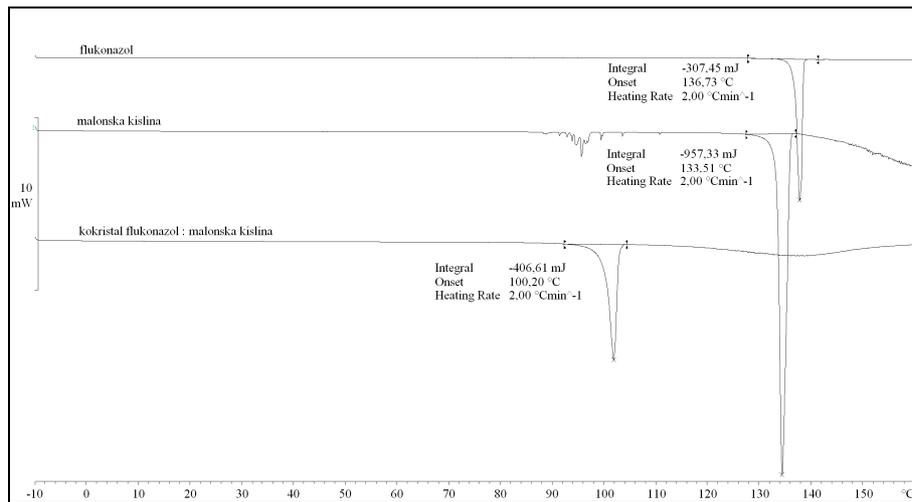
Slika 28. DSC-termogrami flukonazola, glutarne kisline in kokristala flukonazol : glutarna kislina.



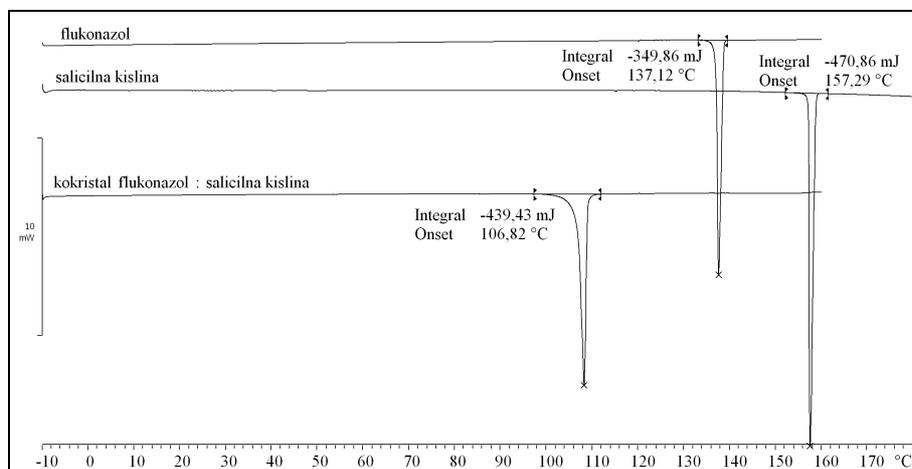
Slika 29. DSC-termogrami flukonazola, jabolčne kisline in kokristala flukonazol : jabolčna kislina.



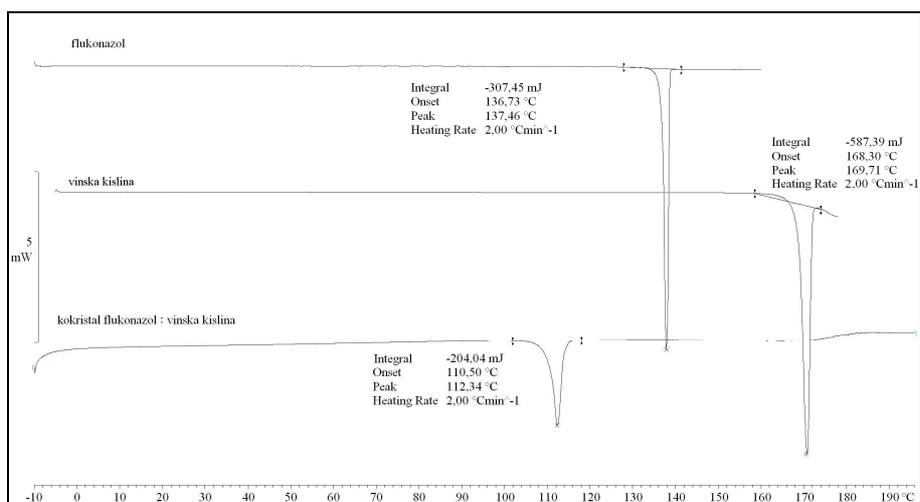
Slika 30. DSC-termogrami flukonazola, maleinske kisline in kokristala flukonazol : maleinska kislina.



Slika 31. DSC-termogrami flukonazola, malonske kisline in kokristala flukonazol : malonska kislina.

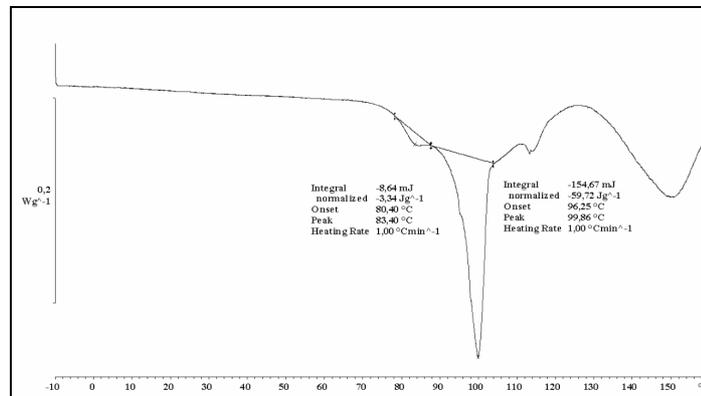


Slika 32. DSC-termogrami flukonazola, salicilne kisline in kokristala flukonazol : salicilna kislina.



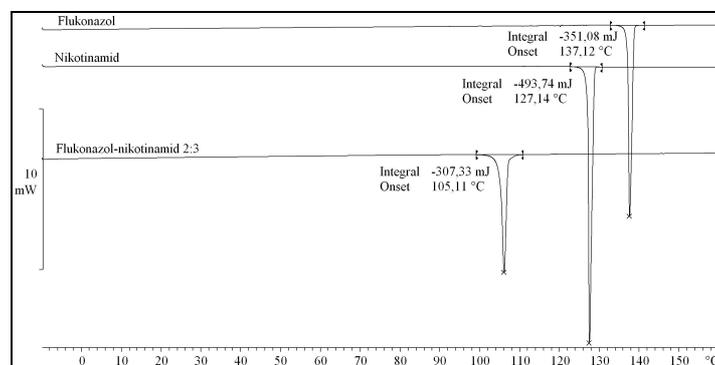
Slika 33. DSC-termogrami flukonazola, vinske kisline in kokristala flukonazol : vinska kislina.

Omeniti velja tudi dejstvo, da oblika termogramov kokristalov, pridobljenih z mletjem, dokazuje, da so vzorci čisti, saj ni nepravilnosti v obliki termogramov, kar se razlikuje od rezultatov analiz kokristalov, pridobljenih iz raztopine (slika 34).

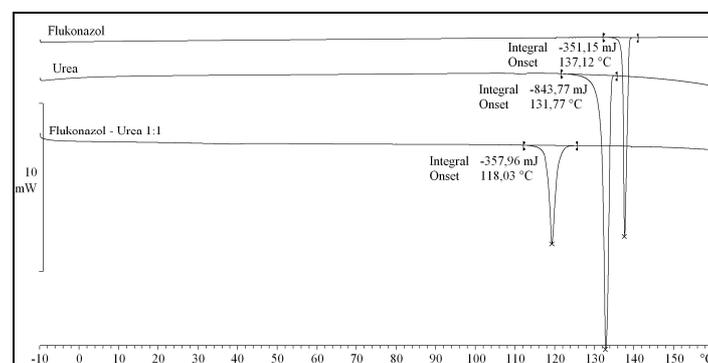


Slika 34. DSC-termogram kokristala flukonazol : maleinska kislina = 1:3 pridobljenega iz raztopine.

Vzorci, pripravljene z mletjem flukonazola in pomožnih komponent (nikotinamid, urea in metilparaben), po DSC-analizi kažejo le eno tališče, kot je prikazano na slikah 35 in 36, medtem ko podatki rentgenske praškovne difrakcije potrjujejo, da gre za fizikalne zmesi flukonazola z omenjenimi pomožnimi komponentami. V teh primerih gre najverjetneje za nastanek evtektičnih zmesi.



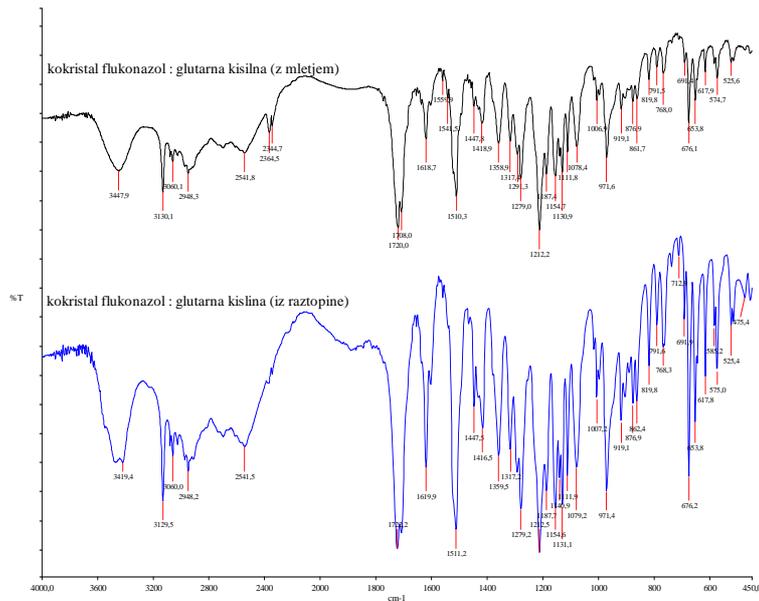
Slika 35. DSC-termogrami flukonazola, nikotinamida in zmesi flukonazola z nikotinamidom.



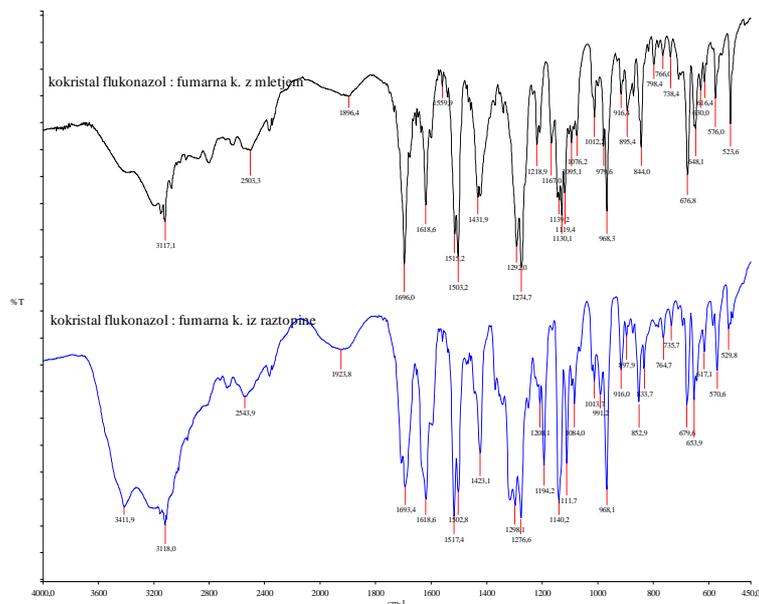
Slika 36. DSC-termogrami flukonazola, uree in zmesi flukonazola z ureo.

5.3. IR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

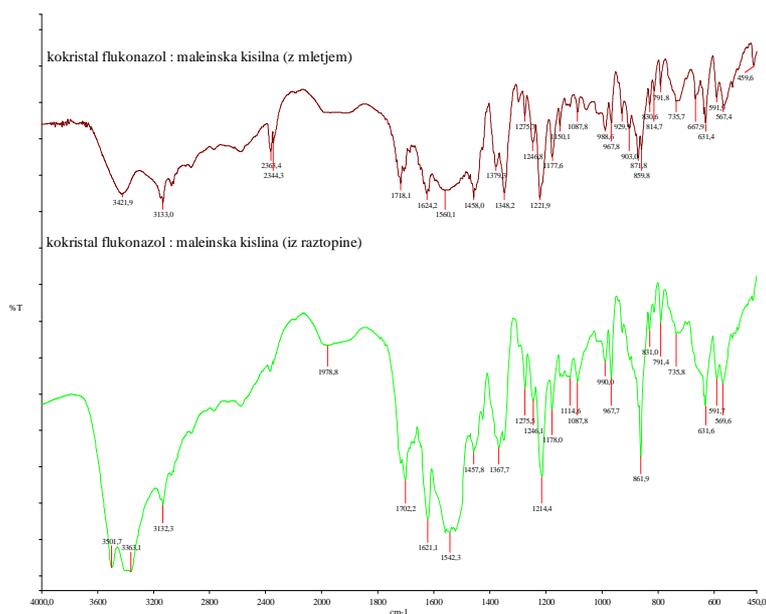
Primerjali smo IR-spektre kokristalov pripravljenih iz raztopine, ki so jih pripravili Kastelic in sodelavci (90), z IR-spektri kokristalov pripravljenih z mletjem. Iz slik (slike 37-39) opazimo, da se oblike spektrov dobro ujemajo, le pri maleinski kislini opazimo manjše razlike. Ker so Kastelic in sodelavci že opravili podrobno analizo IR-spektrov kokristalov flukonazola z glutarno, fumarno in maleinsko kislino, bomo v našem delu to izpustili (90).



Slika 37. Primerjava IR-spektrov kokristala flukonazol : glutarna kislina.

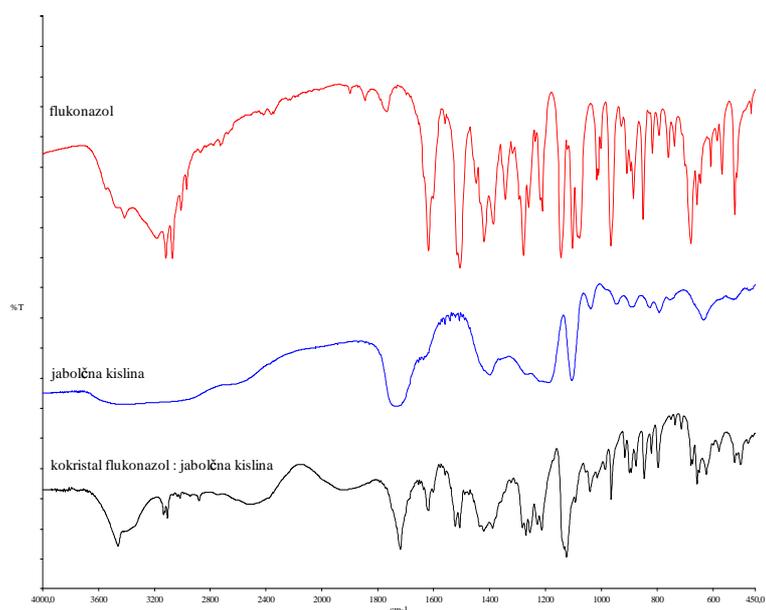


Slika 38. Primerjava IR-spektrov kokristala flukonazol : fumarna kislina.



Slika 39. Primerjava IR-spektrov kokristala flukonazol : maleinska kislina.

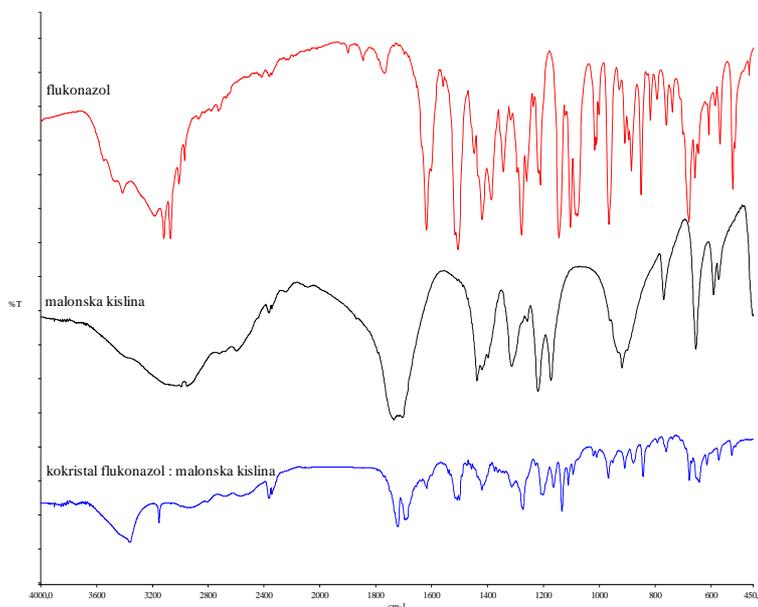
IR-spektri kokristalov flukonazola z jabolčno, malonsko, salicilno in vinsko kislino se razlikujejo od vsote spektrov flukonazola (slike 40-43) in tvorcev kokristalov. Da ne gre le za zmes, temveč za kokristale, potrjujejo spremembe oblik, intenzitet in položajev več absorpcijskih trakov v spektrih kokristalov.



Slika 40. IR-spektri jabolčne kisline, flukonazola in kokristala flukonazol : jabolčna kislina.

V IR-spekttru kokristala flukonazol : jabolčna kislina je vidnih več razširjenih absorpcijskih trakov, ki lahko nakazujejo nastanek vodikovih vezi. Vidni so razširjeni absorpcijski trakovi pri 3462, 2450 in 1950 cm^{-1} . Položaji teh absorpcijskih trakov se ne skladajo s položaji absorpcijskih trakov v spektrih flukonazola in jabolčne kisline, iz teh

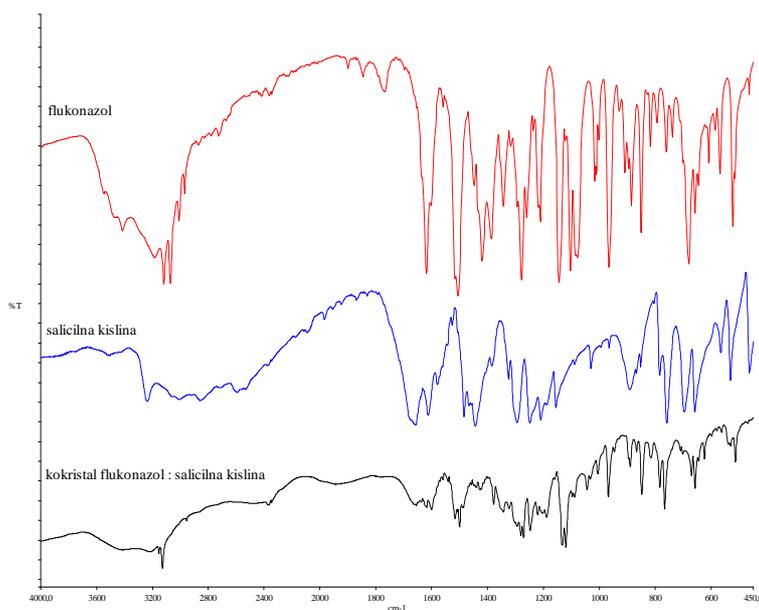
podatkov lahko sklepamo, da je prišlo do tvorbe drugačnih vodikovih vezi, kot v obeh izhodnih komponentah. Široka absorpcijska trakova pri 2450 in 1950 cm^{-1} nakazujeta, da se je tvorila nevtralna intermolekularna vodikova vez $\text{O-H}\cdots\text{N}$ med dvema komponentama (2). Trak pri 3462 cm^{-1} je viden tudi pri flukonazolu, vendar je pri kokristalu bolj intenziven (slika 40).



Slika 41. IR-spektri malonske kisline, flukonazola in kokristala flukonazol : malonska kislina.

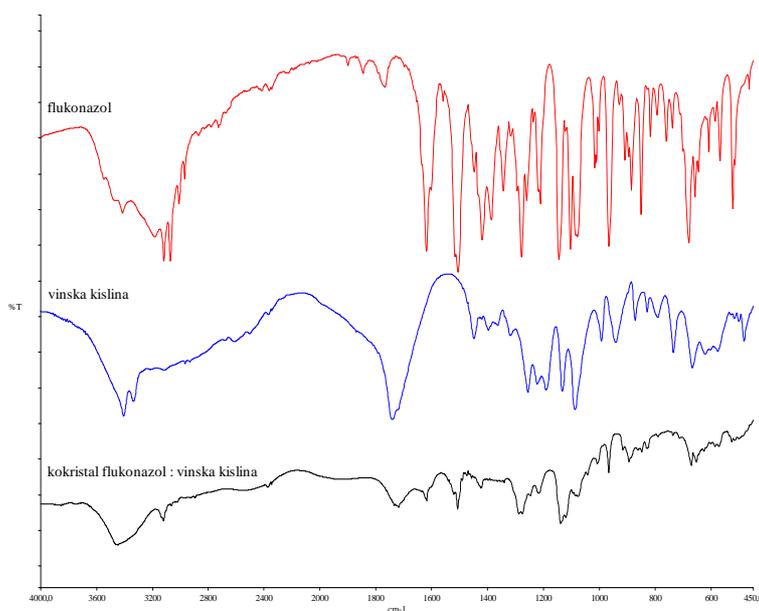
V IR-spektru kokristala flukonazol : malonska kislina je viden razširjen absorpcijski trak pri 3361 cm^{-1} , ki ga v IR spektru izhodnih komponent ne vidimo, to lahko nakazuje nastanek nove vodikove vezi. Na spektru kokristala ni vidnih razširitev absorpcijskih trakov v območju med 1800 in 500 cm^{-1} , ki so vidne v spektru malonske kisline, kar nakazuje na odsotnost intermolekularnih vodikovih vezi $\text{OH}\cdots\text{O}$ med molekulami malonske kisline, kar prav tako nakazuje nastanek kokristala (slika 41).

V IR spektru kokristala flukonazol : salicilna kislina lahko vidimo več razširjenih absorpcijskih trakov, ki lahko nakazujejo nastanek vodikove vezi. Najbolj izrazita sta dva razširjena trakova pri 3440 in 1950 cm^{-1} . Položaj slednjega se ne sklada s položaji razširjenih absorpcijskih trakov v spektrih flukonazola in salicilne kisline. Nakazan je tudi vrh pri 2450 cm^{-1} , kar bi znova lahko pomenilo nastanek intermolekularnih vodikovi vezi $\text{O-H}\cdots\text{N}$. Položaj absorpcijskega traku pri 3440 cm^{-1} se sklada s položajem podobnega absorpcijskega traku v spektru flukonazola, vendar sta oblika in intenziteta različni (slika 42).



Slika 42. IR-spektri salicilne kisline, flukonazola in kokristala flukonazol : salicilna kislina.

V IR-spektru kokristala flukonazol : vinska kislina opazimo več razširjenih absorpcijskih trakov, ki lahko nakazujejo nastanek vodikovih vezi. Najbolj izraziti so pri 3448, 2450 in 1950 cm⁻¹. Položaji trakov se ne skladajo s položaji trakov v spektrih flukonazola in vinske kisline, kar nakazuje torbo vodikove vezi v kokristalu. Pojav dveh širokih absorpcijskih trakov pri 2450 in 1950 cm⁻¹ lahko pomeni, da se je tvorila nevtralna intermolekularna vodikova vez O-H...N med obema komponentama (slika 43).



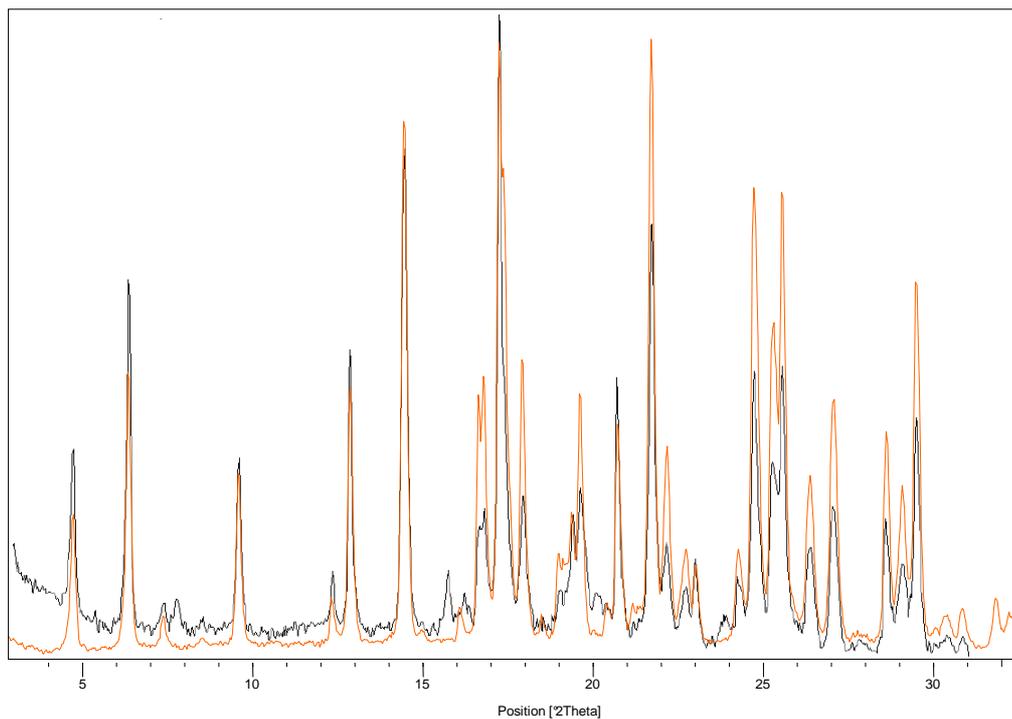
Slika 43. IR-spektri vinske kisline, flukonazola in kokristala flukonazol : vinska kislina.

5.4. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRPD)

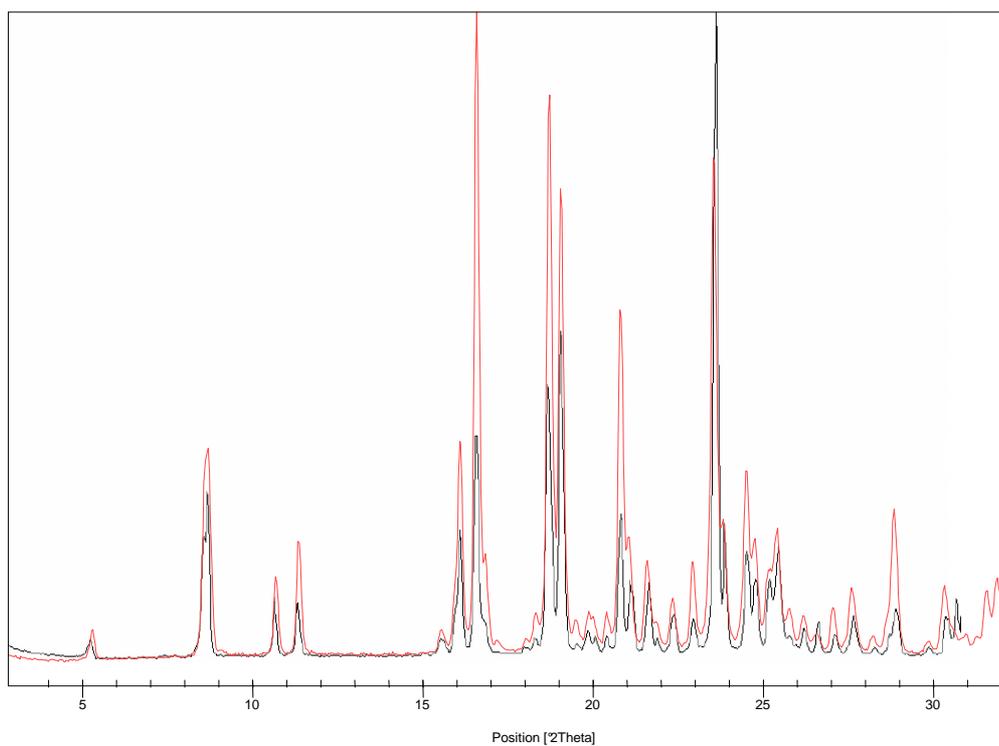
S primerjanjem difraktogramov flukonazola, flukonazola monohidrata, tvorcev kokristalov in kokristalov ugotovimo, da se dobljeni difraktogrami med seboj razlikujejo (slika 48). Razlike v superpoziciji difraktogramov flukonazola in tvorcev kokristala glede na kokristal (slika 48) potrjujejo, da je z mletjem nastala nova kristalna oblika.

Hodnik je v svoji diplomski nalogi v sodelovanju s Kastelicem pripravil in podrobno okarakteriziral kokristale flukonazola s fumarno, glutarno in maleinsko kislino (90). Kokristale je pripravil iz raztopine z odparevanjem topila, iz pripravljenih monokristalov je določil tudi kristalno strukturo kokristalov. Te podatke lahko izkoristimo pri identifikaciji kokristalov, pripravljenih z mletjem. Primerjali smo praškovne difraktograme kokristalov pripravljenih z obema metodama in potrdili istovetnost (slike 44-46). Tako smo potrdili, da smo z mletjem pripravili identične kokristale, kot so jih je pripravili Kastelic in sodelavci in katerih kristalno strukturo poznamo.

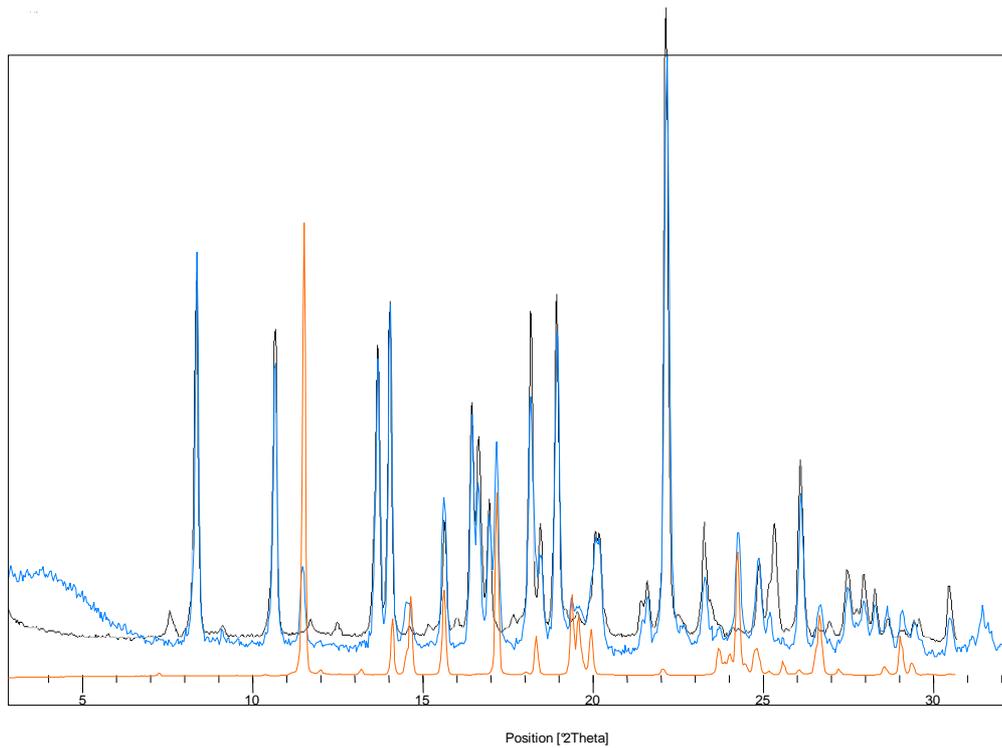
Iz difraktogramov na sliki 44 je razvidno, da so kokristali flukonazola z maleinsko kislino, pripravljeni z mletjem, bolj čisti, saj ni nekaj slabše intenzivnih uklonov kot pri difraktogramih kokristalov, pridobljenih iz raztopine. Najbolje se ujemata difraktograma kokristala flukonazola z glutarno kislino (slika 45). Pri difraktogramu kokristala flukonazola s fumarno kislino, pridobljenega z mletjem, pa opazimo nekaj manj intenzivnih uklonov, ki jih pri difraktogramu kokristala pripravljenega iz raztopine ni opaziti. Če ga primerjamo z difraktogramom flukonazola oblike II, vidimo, da dodatni ukloni pripadajo flukonazolu oblike II, to pomeni, da je po mletju ostalo nekaj čistega flukonazola, ki ni prešel v kokristalno obliko (slika 46). To težavo bi lahko odpravili z dodatkom večje količine topila ali s podaljšanjem časa mletja.



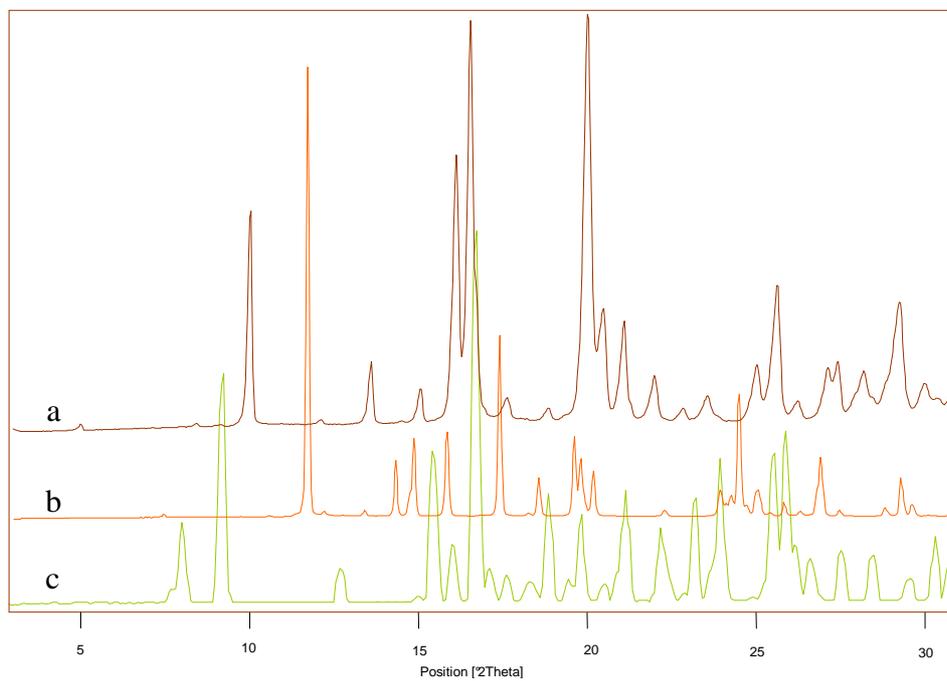
Slika 44. Prekrivanje praškovnih difraktogramov kokristala flukonazola z maleinsko kislino. Difraktogram kokristala iz raztopine je črne barve, difraktogram kokristala pridobljenega z mletjem je oranžne barve.



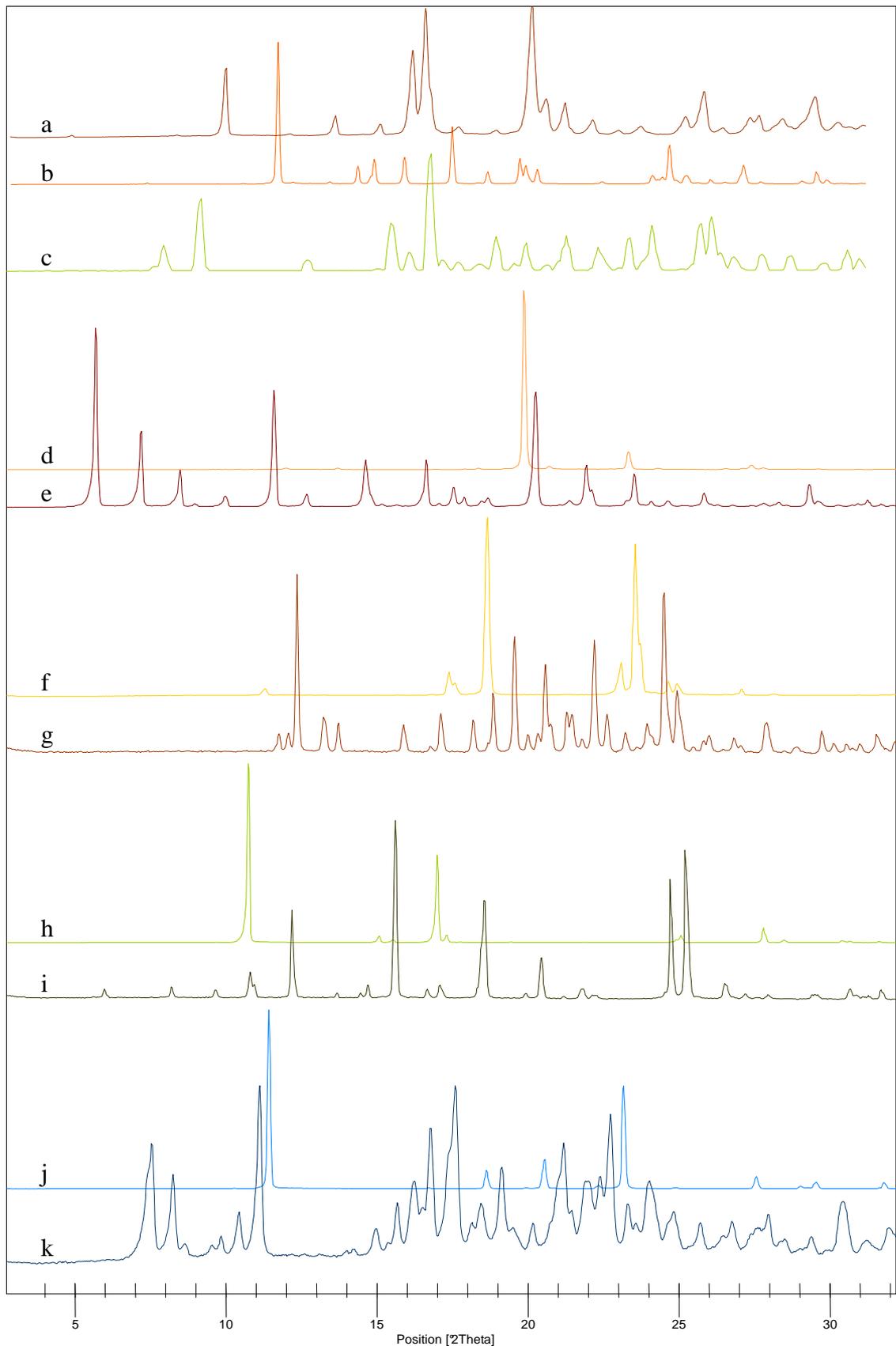
Slika 45. Prekrivanje praškovnih difraktogramov kokristala flukonazola z glutarno kislino. Difraktogram kokristala iz raztopine je črne barve, difraktogram kokristala pridobljenega z mletjem je rdeče barve.



Slika 46. Prekrivanje praškovnih difraktogramov kokristala flukonazola s fumarno kislino. Difraktogram kokristala iz raztopine je črne barve, difraktogram kokristala pridobljenega z mletjem je modre barve. Z oranžno barvo je označen difraktogram flukonazola oblike II.



Slika 47. Praškovnih difraktogrami: a) flukonazola oblike I, b) flukonazola oblike II, c) flukonazola monohidrata.



Slika 48. Praškovni difraktogrami XRPD izhodnih spojin in kokristalov flukonazola od zgoraj navzdol: a) flukonazola oblike I b) flukonazola oblike II c) flukonazol monohidrata, d) jabolčne kisline, e) kokristala z jabolčno kislino, f) malonske kisline, g) kokristala z malonsko kislino, h) salicilne kisline, i) kokristala s salicilno kislino, j) vinske kisline, k) kokristala z vinsko kislino.

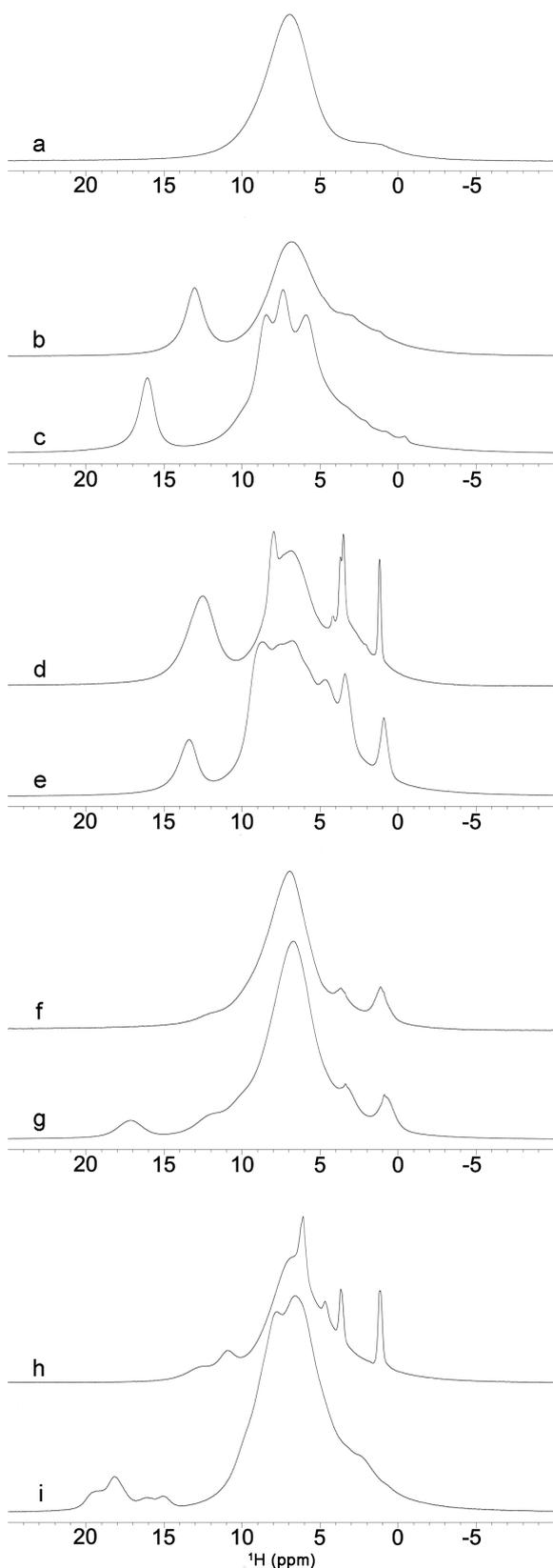
5.5. JEDRSKA MAGNETNA REZONANCA V TRDNEM

Z jedrsko magnetno resonanco v trdnem stanju smo analizirali le nove kokristale, saj smo s praškovno rentgensko difrakcijo dokazali, da imajokokristali flukonazola s fumarno, glutarno in maleinsko kislino enake strukture kot kokristali, ki so jih pripravili Kastelic in sodelavci in so jih že analizirali z jedrsko magnetno resonanco (87).

Iz rezultatov analiz ^1H MAS NMR, ^{13}C CPMAS NMR in ^{15}N CPMAS novih kokristalov flukonazola z jabolčno, malonsko, salicilno in vinsko kislino je razvidno, da so interakcije v kokristalih drugačne od interakcij v izhodnih spojinah, kar pomeni, da ne gre le za fizikalne zmesi. Ker ne poznamo kristalnih struktur novih kokristalov, bolj podrobna interpretacija ni mogoča. Lahko le sklepamo, da se pri kokristalih pojavijo nove interakcije.

V ^1H MAS NMR-spektru flukonazola ni prisotnih signalov, ki bi lahko pomenili prisotnost močnih vodikovih vezi. V ^1H MAS NMR-spektru jabolčne kisline je prisoten signal pri 13,06 ppm, ki predstavlja intermolekularno vodikovo vez med karboksilnimi skupinami jabolčnih kislin. Pri kokristalu flukonazol : jabolčna kislina se pojavi signal pri 16,06 ppm, iz česar lahko sklepamo na nastanek nove vodikove vezi med flukonazolom in jabolčno kislino, ki je močnejša od prej omenjene vodikove vezi, prisotne v kristalni strukturi jabolčne kisline. V ^1H MAS NMR-spektru so namreč močnejše vodikove vezi vidne pri višjih vrednostih ppm, šibkejše pa pri nižjih. Ostali signali v spektru pa pripadajo vodikovim atomom v kokristalu, ki niso udeleženi v vodikovih vezeh. Tudi iz spremembe oblike teh signalov lahko zaključimo, da je prišlo do interakcije med flukonazolom in jabolčno kislino in spremembe okolja, v katerem se nahajajo vodikovi atomi obeh molekul v kokristalu (slika 49).

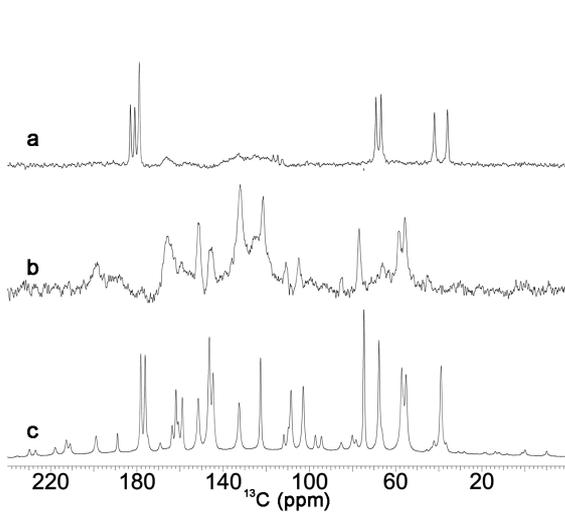
Iz ^{13}C CPMAS NMR-spektra kokristala flukonazol : jabolčna kislina je razvidno, da sta v kokristalu prisotna dva signala za karboksilna C-atoma, s kemijskima premikoma 178,17 in 176,15 ppm. Vsak signal predstavlja po en v različno okolje umeščen karboksilni C-atom jabolčne kisline. Negativne spremembe kemijskih premikov signalov glede na kemijske premike v jabolčni kislini (182,95, 181,0, 178,9 ppm) pomenijo, da so s karboksilnimi skupinami v kokristalu nastale drugačne vodikove vezi, ni pa prišlo do ionizacije oz. prenosa protona. Deprotonirana karboksilna skupina bi namreč vsebovala manj zasenčen C-atom glede na neionizirano karboksilno skupino in ta bi bil posledično viden pri višjih vrednostih ppm.



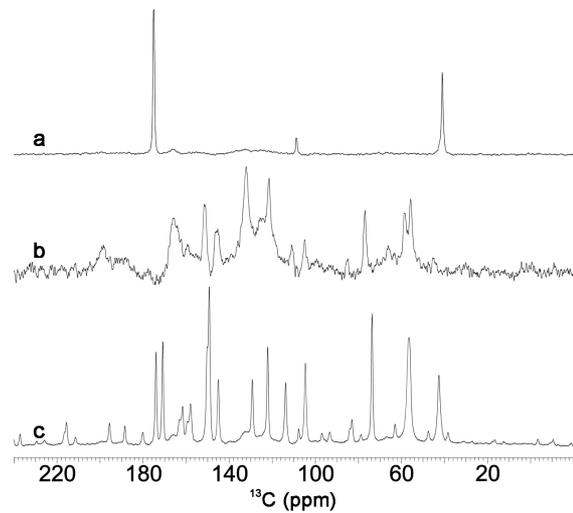
Slika 49. ^1H MAS NMR-spektri: a) flukonazola, b) jabolčne kisline, c) kokristala flukonazol : jabolčna kislina, d) malonske kisline, e) kokristala flukonazol : malonska kislina, f) salicilne kisline, g) kokristala flukonazol : salicilna kislina, h) vinske kisline i) kokristala flukonazol : vinska kislina.

Ostale spremembe kemijskih premikov signalov v spektru kokristala je mogoče razložiti kot posledico interakcij na bližnjih funkcionalnih skupinah in kot posledico splošno drugačnega okolja, v katerem se nahajajo C-atomi v kokristalu, glede na kristale izhodnih komponent.

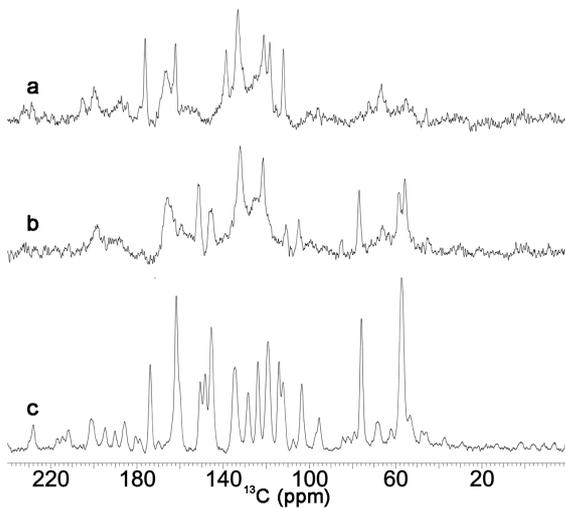
Podobne spremembe kemijskih premikov opazimo tudi v primerih kokristalov z malonsko, salicilno in vinsko kislino, če jih primerjamo s spektri izhodnih komponent, kar je razvidno iz slik (slike 49-53). Zaradi preobsežnosti teh primerov tukaj ne bomo podrobneje obravnavali. Iz sprememb med spektri lahko zaključimo, da so v kokristalih atomi v drugačnem okolju oz. tvorijo nove vodikove vezi. Spremembe kemijskih premikov in podatki praškovne rentgenske difrakcije nam potrjujejo nastanek nove kristalne strukture.



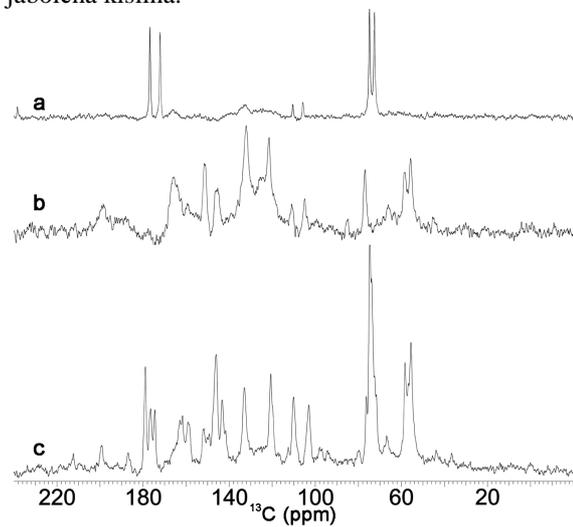
Slika 50. ^{13}C CPMAS NMR-spektri: a) jabolčne kisline, b) flukonazola, c) kokristala flukonazol : jabolčna kislina.



Slika 51. ^{13}C CPMAS NMR-spektri: a) malonske kisline, b) flukonazola, c) kokristala flukonazol : jabolčna kislina.



Slika 52. ^{13}C CPMAS NMR-spektri: a) salicilne kisline, b) flukonazola, c) kokristala flukonazol : salicilna kislina.



Slika 53. ^{13}C CPMAS NMR-spektri: a) vinske kisline, b) flukonazola, c) kokristala flukonazol : salicilna kislina.

5.6. ANALIZA DINAMIČNE SORPCIJE PARE (DVS)

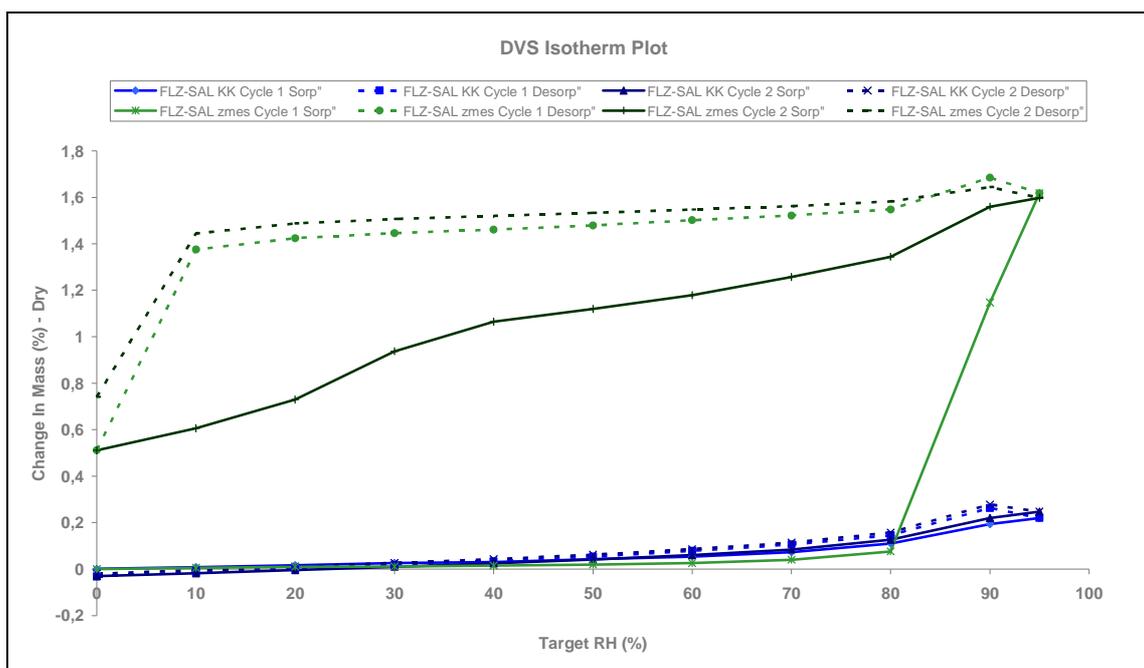
Dinamična sorpcija pare je hiter in enostaven način za določitev sorpcijsko-desorpcijskih izoterm. Temelji na zelo natančnem gravimetričnem sistemu, ki meri sorpcijo in desorpcijo majhnih količin vode (tudi organskih topil), v odvisnosti od relativne vlažnosti (relativne nasičenosti par). Sorpcijske eksperimente izvajamo prvenstveno z vodo, lahko pa tudi z organskimi topili. Uporaba metode DVS nam zagotavlja kvalitativne in kvantitativne podatke o vezavi vode na učinkovino, pomožne snovi ali na različne farmacevtske formulacije.

Z analizo DVS smo želeli primerjati obnašanje kokristalov in fizikalnih zmesi flukonazola s tvorci kokristalov. Analizirali smo naslednje praškaste snovi: nemlet flukonazol, flukonazol, ki smo ga pred tem mleli 10 minut in kokristale flukonazola s fumarno, glutarno, meleinsko, salicilno in vinsko kislino ter njihove fizikalne zmesi. Analize so potekale v dveh ciklih, sorpcije in desorpcije od 0 % do 95 % relativne vlage (RH). Zaradi preobsežnosti smo se odločili, da v diplomski nalogi predstavimo le najbolj zanimive ugotovitve.

Analize DVS so pokazale zelo dobre lastnosti flukonazola, saj je v obeh ciklih do 95 % relativne vlage (RH) slabo vezal vodo. Pri zmletem flukonazolu so bili rezultati po prvem ciklu primerljivi z rezultati nemletega flukonazola, v drugem ciklu pa je zmleti flukonazol pri 80 % RH vezal vodo in nastal je monohidrat, ki je pri desorpciji ohranjal monohidratno obliko vse do 10 % RH.

Kokristal flukonazola s fumarno kislino in fizikalna zmes enake sestave sta pokazala nizko tendenco do vezave vode. Pri 95 % RH sta vzorca kokristala (0,2 % vezane vode) in fizikalne zmesi (0,1 % vezane vode) vezala podobno količino vode kot sam flukonazol (0,07 % vezane vode).

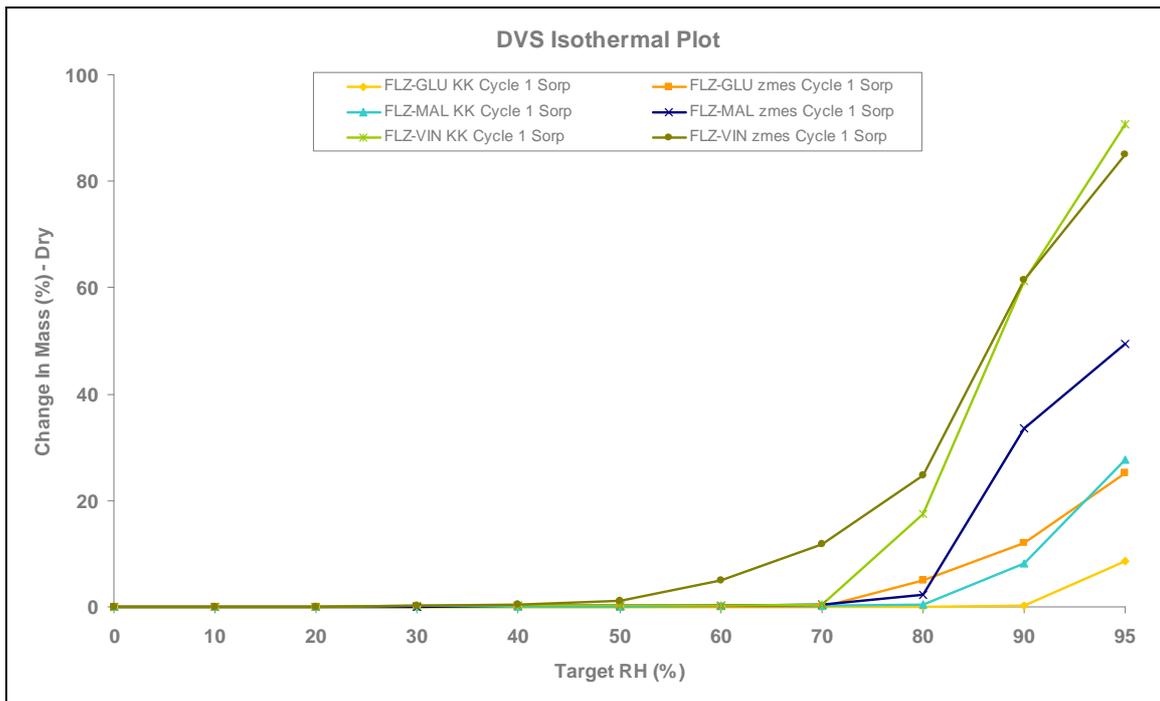
Kokristal flukonazola s salicilno kislino je pokazal nizko tendenco do vezave vode (0,25 % vezane vode). Fizikalna zmes enake sestave pa je že v prvem ciklu sorpcije pri RH večji kot 80 % pokazala močno tendenco do vezave vode, kar je razvidno iz sorpcijsko-desorpcijskih izoterm (slika 54). Iz dobljenih podatkov lahko sklepamo, da v fizikalni zmesi del flukonazola veže vodo in nastane hidrat flukonazola (1,5 % vezane vode). Med sorpcijsko-desorpcijskimi izotermami kokristala flukonazola s salicilno kislino in fizikalne zmesi enake sestave so vidne razlike.



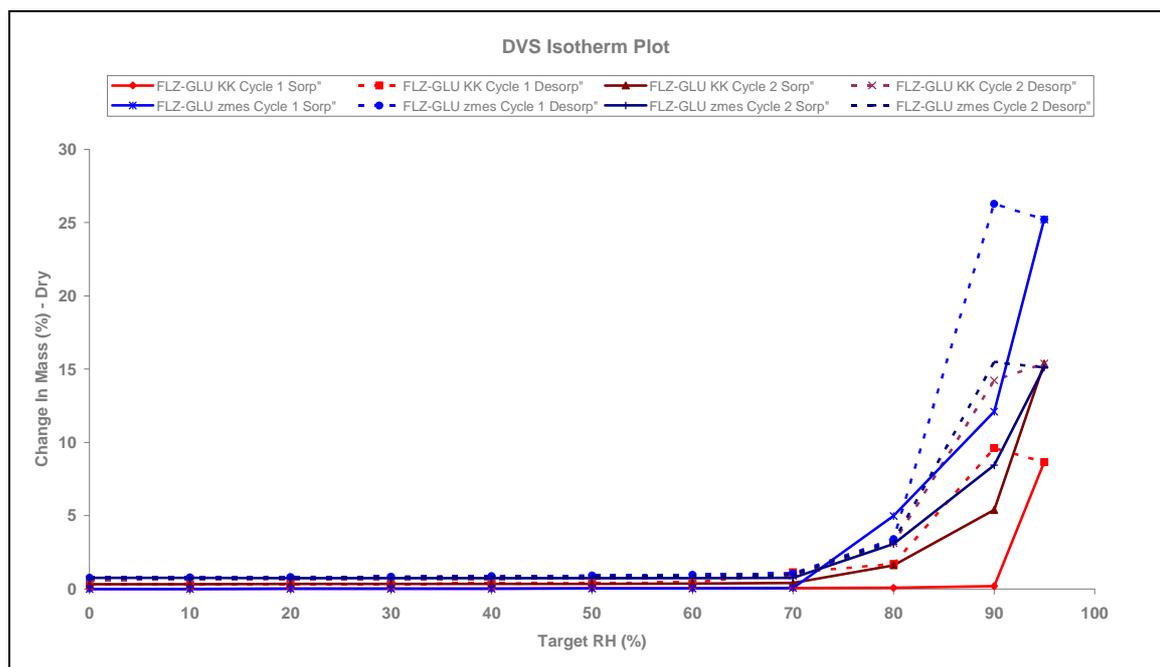
Slika 54. Sorpcijsko-desorpcijske izoterme kokristala (KK) in fizikalne zmesi (zmes) flukonazola (FLZ) s salicilno kislino (SAL).

V primerih kokristalov in fizikalnih zmesi flukonazola z glutarno, maleinsko in salicilno kislino opazimo močno vezavo vode pri višjih RH, v tolikšni meri, da vzorci zvodenijo. Pri vseh treh opazimo tudi, da imajo fizikalne zmesi večjo tendenco do vezave vode kot kokristali, saj začnejo vezati vodo pri nižjih RH (slika 55). Rezultati desorpcije vzorcev, ki zvodenijo, niso relevantni zaradi nastanka skorje na površini vzorcev pri desorpciji. Skorja zadržuje vodo v notranjosti vzorca, kar se kaže v ohranjanju povečane mase pri desorpciji vzorcev. Razloge za takšno močno vezavo vode lahko povežemo z veliko topnostjo tvorcev kokristalov v teh primerih (Preglednica IV). Ti podatki nakazujejo povezavo med topnostjo komponente v kokristalu s higroskopnostjo kokristala, višja je topnost tvorca kokristala, večja je tendenca istega kokristala do vezave vode.

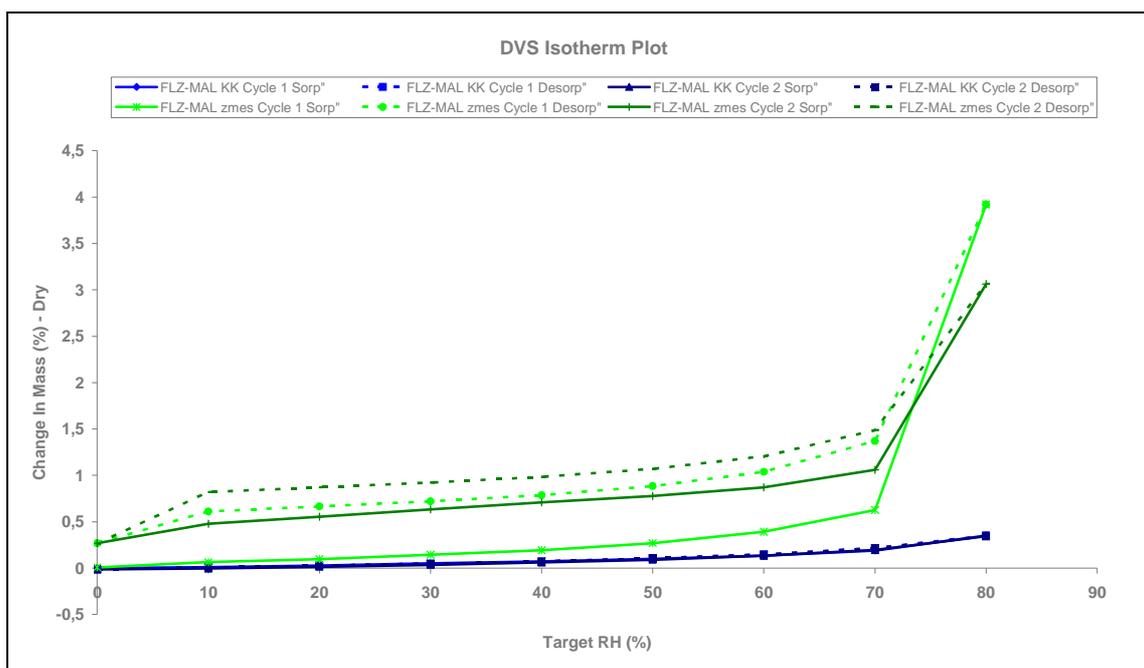
Zanimiv je primer kokristala in fizikalne zmesi z glutarno kislino, kjer opazimo, da se fizikalna zmes po prvem ciklu sorpcije in desorpcije zelo verjetno spremeni v kokristal, to sklepamo iz podobnega obnašanja obeh vzorcev (kokristala in fizikalne zmesi) v drugem ciklu (slika 56). V primeru fizikalne zmesi voda najverjetneje deluje kot mehčalo in zniža temperaturo steklastega prehoda (T_g) fizikalne zmesi, kar privede do prekrystalizacije in tako nastane kokristal.



Slika 55. Primerjava sorpcijskih izoterm prvega cikla kokristalov (KK) in fizikalnih zmesi (zmes) flukonazola (FLZ) z glutarno (GLU), maleinsko (MAL) in vinsko (VIN) kislino.



Slika 56. Sorpcijsko-desorpcijske izoterme kokristala (KK) in fizikalne zmesi (zmes) flukonazola (FLZ) z glutarno kislino (GLU).



Slika 57. Sorpcijsko-desorpcijske izoterme kokristala (KK) in fizikalne zmesi (zmes) flukonazola (FLZ) z maleinsko kislino (MAL). Sorpcijo ustavimo pri 80 % RH, ker nismo želeli, da pride do zvođenitve vzorca.

Ker pride v primeru kokristalov in fizikalne zmesi z maleinsko kislino do zvođenitve vzorcev, smo poskus ponovili. Da bi se izognili ponovni zvođenitvi, smo v drugo izvajali test le do 80 % RH. Iz slike 57 vidimo, da fizikalna zmes močno veže vodo nad 70 % RH, medtem pa kokristal kaže slabo tendenco do vezave vode tudi pri 80 % RH. Pri fizikalni zmesi obstaja možnost, da je že prišlo do nastanka skorje na površini vzorca, saj se pri desorpciji masa vezane vode ohranja pri povišani vrednosti.

Iz podatkov analize DVS lahko zaključimo, da pri različnih relativnih vlažnostih kokristali izkazujejo precej manjšo tendenco do vezave vode kot fizikalne zmesi. Med samimi kokristali pa so tudi razlike v higroskopnosti. Najmanjšo tendenco do vezave vode kaže sam flukonazol, slabo tendenco do vezave vode pri vseh relativnih vlažnostih kažeta tudi kokristala flukonazola s fumarno in salicilno kislino, ki sta tudi slabše topni kot ostali tvorci kokristalov (preglednica IV).

5.7. INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA (IDR)

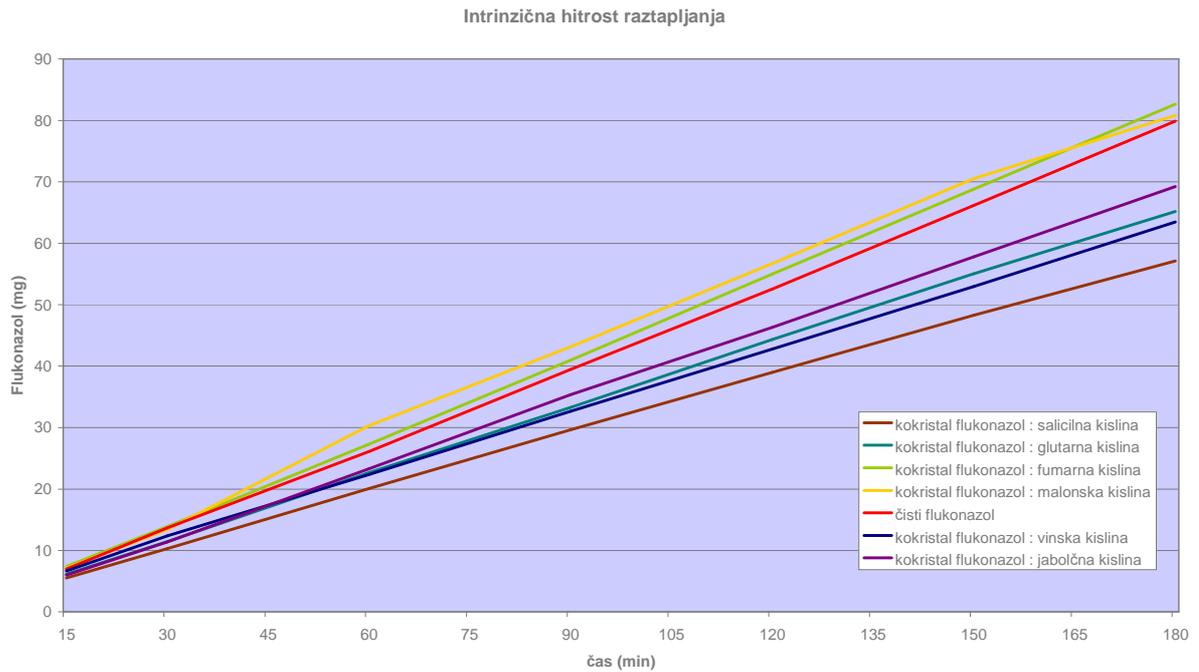
Rezultati določanja IDR različnih kokristalov flukonazola so razvidni iz slike 58. Podatki kažejo, da ni prišlo do bistvenega izboljšanja topnosti, razen pri kokristalu flukonazola z maleinsko kislino.

V kokristalu flukonazol : maleinska kislina naj bi, po podatkih rentgenske analize monokristala, nastal kokristal soli, saj pride do prenosa protona med maleinsko kislino in flukonazolom. To in dejstvo, da se maleinska kislina v kokristalu s flukonazolom nahaja v stehiometrijskem razmerju 3:1, pripomore k večji hitrosti raztapljanja in pojasni takšno veliko odstopanje od ostalih rezultatov.

Kokristali flukonazola s fumarno in kokristali flukonazola z malonsko kislino imajo rahlo večjo IDR kot sam flukonazol, medtem ko imajo ostali kokristali nekoliko manjšo IDR. Pričakovali bi, da bodo tvorci kokristalov vplivali na hitrost raztapljanja kokristala glede na svojo topnost. Večja kot je topnost tvorca kokristala, večja naj bi bila hitrost raztapljanja kokristala. Vendar po analizi rezultatov iz preglednice III ugotovimo, da ni tako. Pri nekaterih kokristalih bi ta trditev držala, a se na to pravilo ne moremo zanašati.

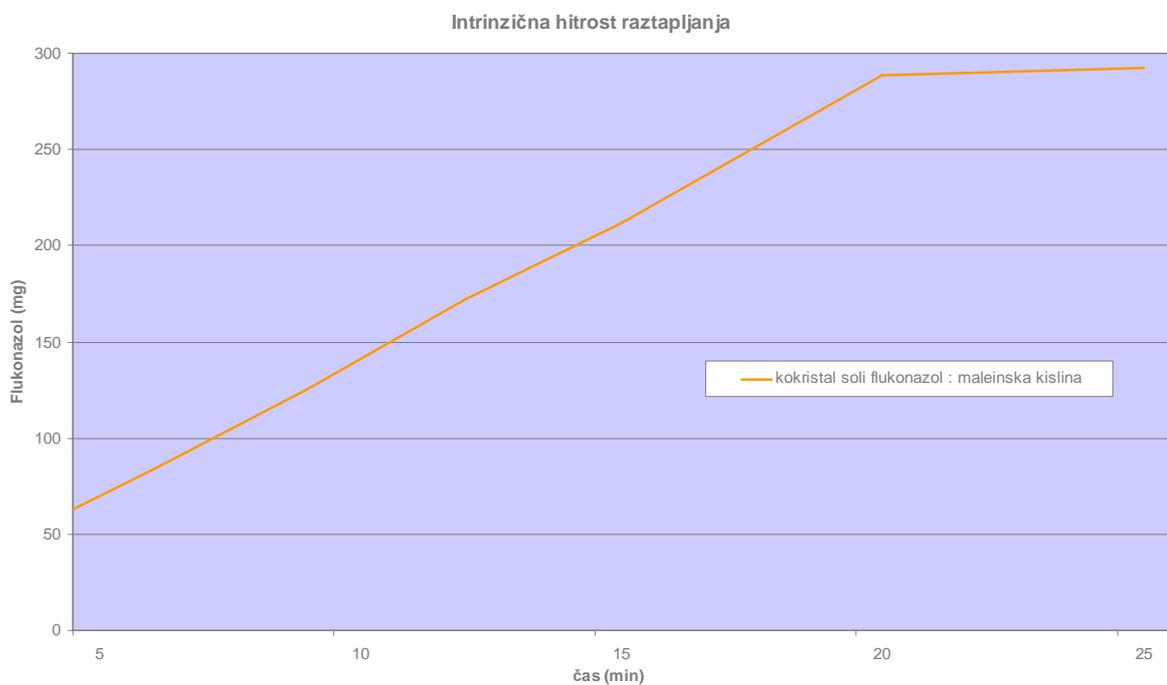
Za majhne razlike med vrednostmi IDR med kokristali in flukonazolom lahko iščemo vzroke tudi v dejstvu, da flukonazol ni tako slabo topen (8 g/L pri 37 °C) in mu zato s tehnologijo kokristalov ne moremo bistveno izboljšati hitrosti raztapljanja. Razlike so tako majhne tudi zato, ker smo raztapljanje izvajali pri 37 °C, pri nižjih temperaturah so procesi raztapljanja počasnejši in so zato lahko večje razlike v IDR vrednostih (91).

Po podatkih iz preglednice III opazimo, da se kokristal flukonazola s fumarno kislino hitreje raztaplja, kot kokristal flukonazola z glutarno kislino, kljub dejstvu, da je topnost glutarne kisline veliko večja od topnosti fumarne kisline. Lahko sklepamo, da pri omenjenima kokristaloma veliko večjo vlogo pri raztapljanju igra urejenosti molekul v kristalni rešetki. Če pogledamo kristalno strukturo kokristala flukonazola s fumarno kislino (slika 14), opazimo veliko več prostora med molekulami, kot pri kokristalu flukonazola z glutarno kislino (slika 15). Za odcepitev in difuzijo molekul v kokristalu flukonazola z glutarno kislino zato potrebujemo več energije, posledično pa se ti pri enakih pogojih počasneje raztapljajo.



Slika 58. Intrinzična hitrost raztapljanja kokristalov flukonazola in čistega flukonazola.

*Kokristal flukonazola z meleinsko kislino (kokristal soli) se je tako hitro raztopil, da se IDR profil nahaja izven meja tega digrama. Profil maleinske kisline vidimo na sliki 59.



Slika 59. Intrinzična hitrost raztapljanja kokristala flukonazola z maleinsko kislino (kokristal soli).

Preglednica IV. Topnosti tvorcev kokristala in intrinzične hitrosti raztapljanja kokristalov flukonazola z danim tvorcem kokristala.

tvorec kokristala	topnost tvorcev kokristala	IDR kokristala
	pri 20 °C	flukonazol : tvorec kokristala
glutarna kislina	640 mg/ml	0,72 mg/ml/cm ²
maleinska kislina	780 mg/ml	28,1 mg/ml/cm ²
fumarna kislina	4,9 mg/ml	0,92 mg/ml/cm ²
malonska kislina	735 mg/ml	0,90 mg/ml/cm ²
salicilna kislina	2,2 mg/ml	0,62 mg/ml/cm ²
vinska kislina	1390 mg/ml	0,68 mg/ml/cm ²
jabolčna kislina	558 mg/ml	0,77 mg/ml/cm ²
flukonazol (oblika II)	4,6 mg/ml	0,88 mg/ml/cm ²

Pri proučevanju topnostnih lastnosti kokristalov se pojavi tudi vprašanje primernosti metode določanja intrinzične hitrosti raztapljanja. Hitrost raztapljanja se pri IDR meri s konstantne površine, kadar pa imamo učinkovino v kokristalu, se površina učinkovine, ki je v stiku s topilom, relativno zmanjša za delež tvorca kokristala. Zato lahko v nekaterih kokristalih opazimo tudi znižanje hitrosti raztapljanja, kljub dejstvu, da je tvorec kokristala bolj topen kot zdravilna učinkovina.

Nikjer v literaturi nismo zasledili, da bi topnostne lastnosti kokristalov primerjali z pripadajočimi fizikalnimi zmesmi, zato smo želeli določiti tudi IDR samim fizikalnim zmesem flukonazola in pomožne snovi, a smo ugotovili, da metoda IDR za takšno merjenje ni primerna. Pri fizikalnih zmeseh je prišlo do hitrejšega raztapljanja ene izmed komponent, v našem primeru tvorca kokristala. Tako je izplavljanje pomožne snovi izoblikovalo porozen flukonazol, ki je ostal v matrici. S tem se je površina iz katere se je raztapljal flukonazol občutno povečala in tako podatki o IDR niso smiselni (slika 60).

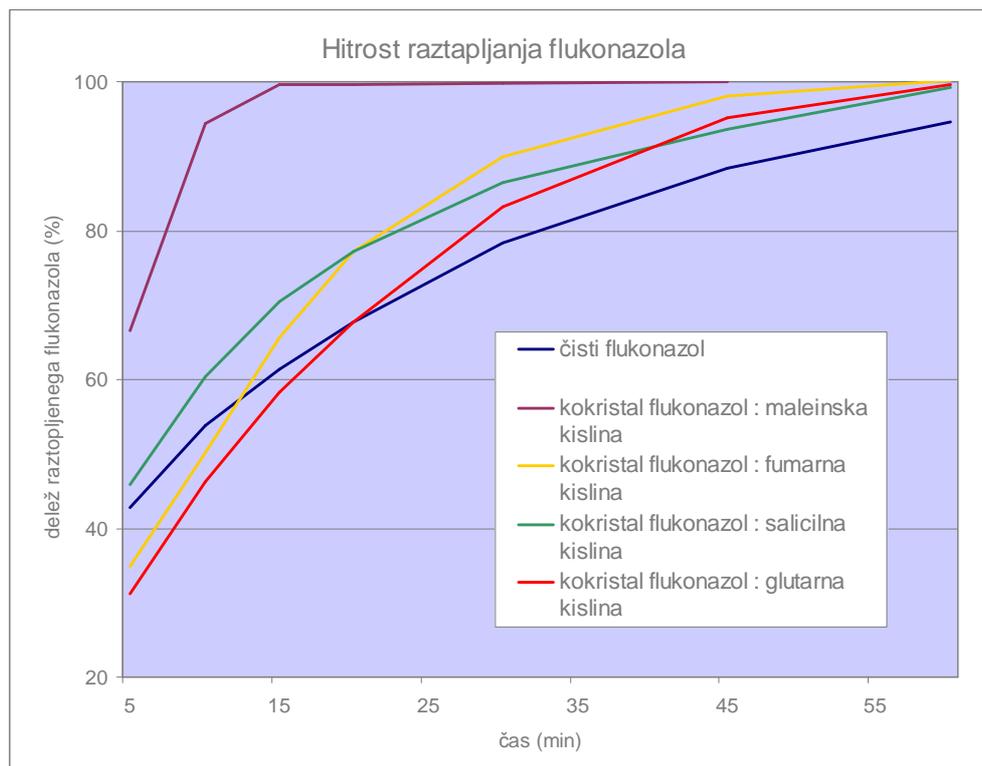


Slika 60. Levo - disk kokristala po določanju IDR, z ravnim dnom. Desno - porozen ostanek, ki je ostal po poskusu določanja intrinzične hitrosti raztapljanja fizikalne zmesi.

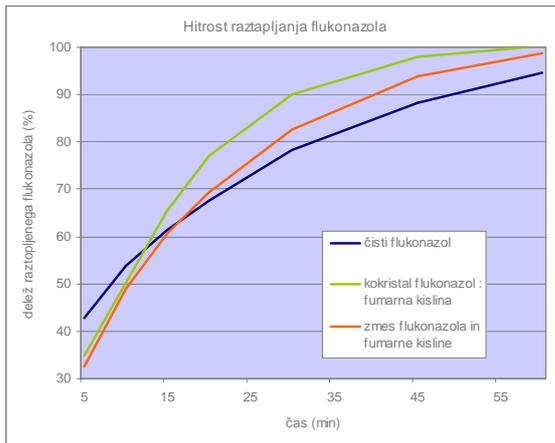
5.8. DOLOČANJE HITROSTI RAZTAPLJANJA Z UPORABO KOŠARIC

Ker z metodo intrinzične hitrosti raztapljanja nismo mogli primerjati hitrosti raztapljanja kokristalov s fizikalnimi zmesmi, smo se odločili, da uporabimo metodo s košaricami. Primerjali smo hitrost raztapljanja kokristalov flukonazola s fumarno, glutarno, maleinsko in salicilno kislino s hitrostjo raztapljanja fizikalnih zmesi. Fizikalne zmesi smo pripravili tako, da smo zmlete komponente flukonazol in pomožno snov v stehiometrijskem razmerju dobro premešali s pestilom v pateni.

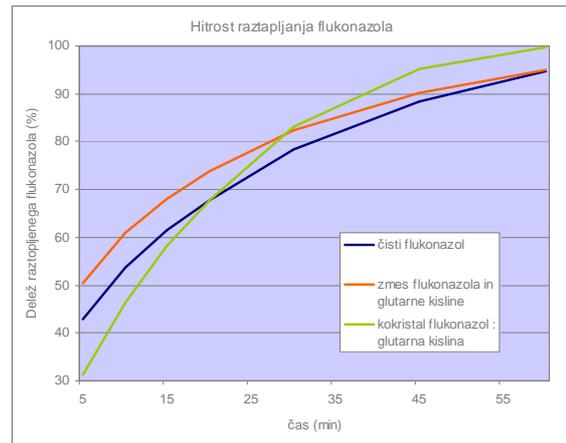
Košarice smo rahlo priredili, na dno smo namestili plastično folijo, da smo lažje prenesli zatehtano količino materiala v posodo, oz. da ni prihajalo do izgub pri prenosu. V vsako košarico smo zatehtali količino materiala, ki je vsebovala enako količino flukonazola (150 mg). Poskus je trajal 60 minut, v tem času sta se v večini primerov raztopili obe komponenti zmesi.



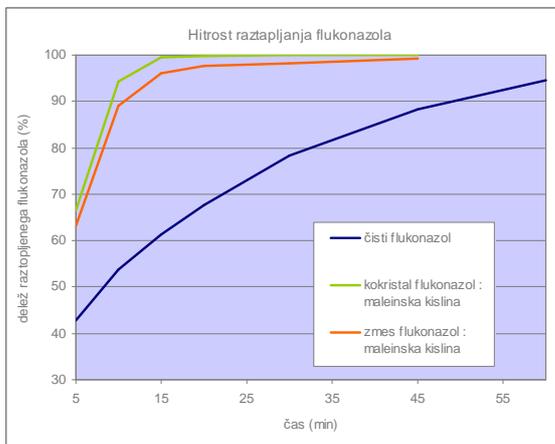
Slika 61. Profili raztapljanja kokristalov flukonazola in čistega flukonazola, določeni z metodo s košaricami.



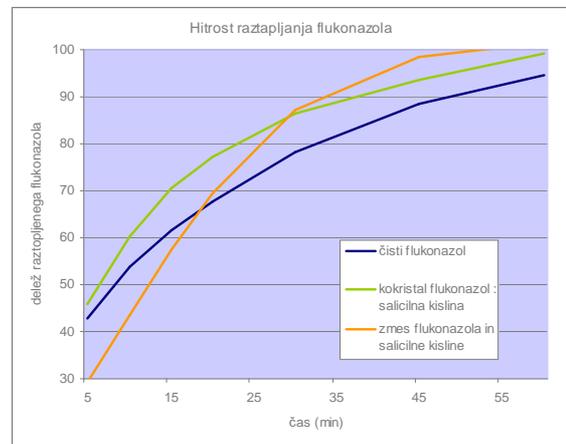
Slika 62. Profili raztapljanja kokristala flukonazola s fumarno kislino, zmesi flukonazola in fumarne kisline in čistega flukonazola.



Slika 63. Profili raztapljanja kokristala flukonazola z glutarno kislino, zmesi flukonazola in glutarne kisline in čistega flukonazola.



Slika 64. Profili raztapljanja kokristala flukonazola z maleinsko kislino, zmesi flukonazola in maleinske kisline in čistega flukonazola.



Slika 65. Profili raztapljanja kokristala flukonazola s salicilno kislino, zmesi flukonazola in salicilne kisline in čistega flukonazola.

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da tako kokristali kot fizikalne zmesi izboljšajo hitrost raztapljanja flukonazola. Če primerjamo kokristale in fizikalne zmesi opazimo, da se kokristali hitreje raztapljajo. Iz grafov raztapljanja se opazi, da se najhitreje raztopijo kokristali, malce slabše se raztapljajo fizikalne zmesi, najpočasneje se pa raztaplja sam flukonazol (slike 61-65). Lahko opazimo tudi spremembe v profilih raztapljanja, kar nakazuje na različno kinetiko raztapljanja med kokristali in fizikalnimi zmesmi.

Da bi lažje ponazorili hitrosti raztapljanja, smo za vsak vzorec ocenili čas v katerem se raztopi 90 % učinkovine ($t_{90\%}$). Podatki so zbrani v preglednici V.

Preglednica V. Ocena časa v katerem se raztopi 90% flukonazola ($t_{90\%}$) iz različnih vzorcev kokristalov flukonazola in čistega flukonazola.

	$t_{90\%}$	IDR
kokristal flukonazol : fumarna	31min	0,92
fizikalna zmes flukonazol : fumarna	40min	
kokristal flukonazol : glutarna	39min	0,72
fizikalna zmes flukonazol : glutarna	45min	
kokristal flukonazol : maleinska	10min	28,1
fizikalna zmes flukonazol : maleinska	11min	
kokristal flukonazol : salicilna	38min	0,62
fizikalna zmes flukonazol : salicilna	34min	
flukonazol	49min	0,88

Po hitrosti raztapljanja izstopa maleinska kislina, ki se zelo hitro raztopi, tudi fizikalna zmes flukonazola in maleinske se raztopi podobno hitro kot kokristal (slika 64), kar kaže na velik vpliv same maleinske kisline pri raztapljanju v zmesi.

Poudariti velja, da se je tudi kokristal salicilne kisline hitreje raztapljal kot flukonazol, česar v eksperimentu z IDR nismo ugotovili. Če primerjamo vrednosti IDR in $t_{90\%}$, te nakazujejo povezavo med rezultati ene in druge metode, vendar bi za kakršenkoli zaključek potrebovali veliko več meritev.

6. SKLEP

Glavni cilj diplomske naloge je bil pripraviti kokristale flukonazola z novo tehniko, ki se čedalje bolj uveljavlja – z mletjem. Tako smo pripravili večje količine kokristalov in poleg standardnih analiz smo opravili tudi študije topnosti in higroskopnosti. Z mletjem smo pripravili kokristale, ki so jih s kokristalizacijo iz raztopine pripravili in strukturno določili že Kastelic in sodelavci (87). Pripravili so sledeče kokristale: flukonazol : maleinska kislina v razmerju 1:3, flukonazol : fumarna kislina v razmerju 2:1 in flukonazol : glutarna kislina v razmerju 1:1. Mi smo jih pripravili z mletjem in z analizami DSC, IR, in jedrske magnetne resonance (NMR) v trdnem in predvsem rentgenske praškovne difrakcije (XRPD) uspešno potrdili, da gre za kokristale iste strukture. Tako smo potrdili, da mletje omogoča hitrejšo in enostavnejšo pripravo kokristalov v večjih količinah kot priprava kokristalov iz raztopine. Potrdili smo tudi ugotovitve, da dodatek majhne količine topila pri mletju izboljša proces.

Poleg omenjenih kokristalov smo poskusili pripraviti še nekaj novih kokristalov flukonazola z različnimi tvorci kokristalov. Z mletjem nam je uspelo pripraviti nove kokristale: flukonazol : jabolčna kislina v razmerju 1:1, flukonazol : malonska kislina v razmerju 1:1 in flukonazol : salicilna kislina v razmerju 1:1, iz raztopine pa smo pripravili večje količine kokristala flukonazol : vinska kislina v razmerju 1:1. Da ne gre samo za zmes izhodnih spojin in da so nastale nove kristalne strukture, smo potrdili z termično analizo DSC, IR-spektroskopsko analizo, rentgensko praškovno difrakcijo (XRPD) in jedrsko magnetno resonanco (NMR) v trdnem. Za popolno strukturno karakterizacijo pa bi potrebovali monokristale ustrezne kakovosti in velikosti. Ker je priprava novih kokristalov v obliki monokristalov precej težavna in zahtevna, smo po začetnih poskusih to prizadevanje opustili in se odločili za vrednotenje fizikalno-kemijskih lastnosti, ki so najbolj zanimive za farmacevtsko industrijo. Tako smo kokristalom določali intrinzično hitrost raztapljanja, hitrost raztapljanja z metodo s košaricami in higroskopnost.

Ugotovili smo, da je metoda določanja intrinzične hitrosti raztapljanja pri kokristalih precej omejena, saj je površina flukonazola, ki je v direktnem stiku s topilom odvisna od tvorca kokristala in se zmanjša za delež površine pomožne molekule v kokristalu. Tako se rezultati med sabo lahko razlikujejo že samo zaradi različne ploščine zdravilne učinkovine, ki je v neposrednem stiku s topilom, kar kaže na neprimernost te metode za vrednotenje kokristalov. Primerjava s fizikalnimi zmesmi pa prav tako ni mogoča, ker se oblika diska med poskusom spremeni v porozen material, ki nima več konstantne površine.

Pri merjenju hitrosti raztapljanja kokristalov in fizikalnih zmesi z metodo s košaricami smo opazili, da se kokristali hitreje raztapljajo kot sam flukonazol, a smo prav tako ugotovili, da fizikalne zmesi pripomorejo k povečanju hitrosti raztapljanja. Da bi preučili sam vpliv kokristalizacije in izvzeli vpliv pomožnih snovi na hitrost raztapljanja, bi se morali bolje poglobiti in izbrati bolj specifično metodo.

Pri preučevanju higroskopsnosti fizikalnih zmesi v primerjavi s kokristali smo opazili, da so kokristali bolj higroskopni kot sam flukonazol, razlike variirajo in so odvisne predvsem od topnosti tvorca kokristala. Pri primerjanju higroskopsnosti kokristalov in fizikalnih zmesi enake sestave smo ugotovili, da fizikalne zmesi občutno bolj vežejo vodo pri nižjih relativnih vlažnostih. Opazili smo tudi, da je higroskopsnost kokristalov odvisna od topnosti pomožne molekule (tvorca kokristala).

V nadaljevanju raziskovalnega dela bi se posvetili optimiranju priprave kokristalov z mletjem, predvsem pri pripravi kokristalov z maleinsko kislino. Potrebno bi bilo tudi določiti vsebnost kokristala v materialu po mletju. Nadaljevenje raziskovalnega dela bi obsegalo tudi pripravo novih kokristalov v obliki monokristalov, ki bi bili primerni za analizo z rentgensko difrakcijo na monokristalih, da bi dobili popolno kristalno strukturo. Pri tem bi si lahko pomagali s sejanjem drobnih zmletih kokristalov v nasičeno raztopino flukonazola in tvorca kokristala, da bi vzpodbudili rast kokristalov zahtevane oblike. V primeru kokristala flukonazola s salicilno kislino nam je to celo deloma uspelo, vendar je to predmet nadaljnjih raziskav.

7. LITERATURA

1. Schmidt J, Snipes W: Free Radical Formation in a Gamma-irradiated Pyrimidine-purine Co-crystal complex. *Int J Radiat Biol* 1968; 13: 101-09.
2. Schultheiss N, Newman A: Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2950-67.
3. Aakeröy C B, Fasulo M E, Desper J: Cocrystal or Salt: Does It Really Matter?. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 317-22.
4. Zaworotko M J: Molecules to Crystal, Crystals to Molecules ... and Back Again?. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 4-9.
5. Childs S L, Zaworotko M J: The Reemergence of Cocrystals: The Clear Writing Is on the Wall Introduction to Virtual Special Issue on Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 4208–11.
6. Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F: Kokristali zdravilnih učinkovin. *Farm vestn* 2010 61: 30-36.
7. Stahly G P: A Survey of Cocrystals Reported Prior to 2000. *Cryst Growth Des* 2009, 9: 4212–29.
8. Childs S L, Stahly G P, Park A: The Salt-Cocrystal Continuum: The Influence of Crystal Structure on Ionization State. *Mol Pharmaceutics* 2007, 4: 323-38.
9. Mohamed S, Tocher D A, Vickers M, Karamertzanis P G, Price S L: Salt or Cocrystal? A New Series of Crystal Structures Formed from Simple Pyridines and Carboxylic Acids. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2881-89.
10. <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-gras.html>,
<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-appa.html>.
11. Vishweshwar P, McMahon J A, Zaworotko M J: Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-crystals, *Frontiers in Crystal Engineering*, John Wiley & Sons, 2006: 25-49.
12. Shan N, Zaworotko M J: The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Disc Today* 2008; 13: 440-46.
13. Trask A V, van de Streek J, Motherwell W D S, Jones W: Achieving Polymorphic and Stoichiometric Diversity in Cocrystal Formation: Importance of Solid-State Grinding,

- Powder X-ray Structure Determination, and Seeding. *Cryst Growth Des* 2005; 5: 2233-41.
14. Desiraju G R: Supramolecular Synthons in Crystal Engineering – A New Organic Synthesis. *Angew Chem Int Ed* 1995; 34: 2311-27
 15. Sarma B, Reddy L S, Nangia A: The Role of π -Stacking in the Composition of Phloroglucinol and Phenazine Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2008; 8: 4546-52
 16. http://www.ccdc.cam.ac.uk/about_ccdc/science_profile/
 17. Wright J D: *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*, Elsevier Ltd, 2001: 1852-56
 18. <http://www.ccdc.cam.ac.uk/500000.php>
 19. Shattock T R, Arora K K, Vishweshwar P, Zaworotko M J: Hierarchy of Supramolecular Synthons: Persistent Carboxylic Acid...Pyridine Hydrogen Bonds in Cocrystals That also Contain a Hydroxyl Moiety. *Cryst Growth Des* 2008; 8: 4533-45.
 20. Trask A V, Jones W: Crystal Engineering of Organic Cocrystals by the Solid-State Grinding Approach. *Top Curr Chem* 2005; 254: 41-70.
 21. Braga D, D'Addario, Maini L, Polito M, Giaffreda S, Rubini K, Grepioni F: *Frontiers in Crystal Engineering*, John Wiley & Sons, 2006: 1-22.
 22. Seefeldt K, Miller J, Alvarez-Nunez F, Rodriguez-Hornedo N: Crystallization Pathways and Kinetics of Carbamazepine-Nicotinamide Cocrystals From the Amorphous State by *In Situ* Thermomicroscopy, Spectroscopy and Calorimetry Studies. *J Pharm Sci* 2006; 96: 1147-57.
 23. Blagden N, de Matas M, Gavan P T, York P: Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv Drug Delivery Rev* 2007; 59: 617-30.
 24. Jayasankar A, Good D J, Rodriguez-Hornedo: Mechanisms by Which Moisture Generates Cocrystals. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 360-72.
 25. Portalone G, Colapietro M: First example of cocrystals of polymorphic maleic hydrazide. *J Chem Crystallogr* 2004; 34: 609-12.
 26. Aakeröy CB: Crystal engineering: strategies and architectures. *Acta Crystallogr Sect B* 1997; 53: 569-86.
 27. Braga D, Grepioni F: Reactions Between or Within Molecular Crystals. *Angew Chem Int Ed* 2004; 43: 4002-11.

28. McNamara D P, Childs S L, Giordano J, Iarriccio A, Cassidy J, Shet M S, Mannion R, O'Donnell E, Park A: Use of a Glutaric Acid Cocrystal to Improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. *Pharm Res* 2006; 23: 1888-96.
29. Barga D, Grepioni F, Maini L, Polito M: Crystal Polymorphism and Multiple Crystal Forms. *Struct Bond* 2009; 132: 25-50.
30. Wöhler F: *Annalen* 1844; 5: 153.
31. Matsuda H, Osaki K, Nitta I: Crystal Structure of Quinhydrone, C₁₂H₁₀O₄. *Bull Chem Soc Jpn* 1958; 31: 611-20.
32. Etter M C, Reutzel S M, Choo C G: Self-organization of Adenine and Thymine in the Solid State. *J Am Chem Soc* 1993; 115: 4411-12.
33. Friščić T, Jones W: Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 1621-37
34. Shan N, Toda F, Jones W: Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chem Commun* 2002; 2372-73.
35. Trask A V, Motherwell W D S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem Commun* 2004; 890-91.
36. Weyna D R, Shattock T, Vishweshwar P, Zaworotko M J: Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 1106-23.
37. Li Z, Yang B S, Jiang M, Eriksson M, Spinelli E, Yee N, Senanayake C: A Practical Solid Form Screen Approach to Identify a Pharmaceutical Glutaric Acid Cocrystal for Development. *Org Process Res Dev* 2009; 13: 1307-14.
38. Trask A V, Shan N, Motherwell W D S, Jones W, Feng S, Tan R B H, Carpenter K J: Selective polymorph transformation via solvent-drop grinding. *Chem Commun* 2005; 7: 880-82.
39. Cheney M L, Zaworotko M J, Beaton S, Singer R D: Cocrystal Controlled Solid-State Synthesis. A Green Chemistry Experiment for Undergraduate Organic Chemistry. *J Chem Educ* 2008; 85: 1649-51.
40. Rastogi R P, Bassi P S, Chadha L S: Mechanism of the Reaction Between Hydrocarbons and Picric Acid in the Solid State. *J Phys Chem* 1963; 67: 2569-73.
41. Imai Y, Tajima N, Sato T, Kuroda R: Visualization of Molecular Recognition: A Novel System Based on Charge-Transfer Complexes Composed of 1,1'-Bi-2-naphthol Derivatives and *p*-Benzoquinone. *Org Lett* 2006; 8: 2941-44.

42. Kuroda R, Higashiguchi K, Hasebe S, Imai Y: Crystal to crystal transformation in the solid state. *Cryst Eng Comm* 2004; 6: 463–68.
43. Rastogi RP, Singh NB: Solid-state reactivity of picric acid and substituted hydrocarbons. *J Phys Chem* 1968; 72: 4446–49
44. Karki S, Friščić T, Motherwell W D S, Jones W: Screening for Pharmaceutical Cocrystal Hydrates via Neat and Liquid-Assisted Grinding. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 347–54.
45. Chadwick K, Davey R J, Cross W: How does grinding produce co-crystals? Insights from the case of benzophenone and diphenylamine. *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 732–34.
46. Willart J F, Descamps M: Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. *Mol Pharmaceutics* 2008; 5: 905–20.
47. Seefeldt K, Miller J, Alvarez-Nunez F, Rodriguez-Hornedo N: Crystallization pathways and kinetics of carbamazepine–nicotinamide cocrystals from the amorphous state by in situ thermomicroscopy, spectroscopy, and calorimetry studies. *J Pharm Sci* 2007; 96: 1147–58.
48. Jayasankar A, Somwangthanaroj A, Shao Z J, Rodriguez-Hornedo N: Cocrystal Formation during Cogrinding and Storage is Mediated by Amorphous Phase. *Pharm Res* 2006; 23: 2381–92.
49. Jayasankar A, Good, D J, Rodriguez-Hornedo N. Mechanisms by Which Moisture Generates Cocrystals. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 360–72.
50. Braga D, Giaffreda S L, Rubini K, Grepioni F, Chierotti M R, Gobetto R: Making crystals from crystals: three solvent-free routes to the hydrogen bonded co-crystal between 1,1'-di-pyridyl-ferrocene and anthranilic acid. *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 39–45.
51. Friščić T, Jones W: Cocrystal architecture and properties: design and building of chiral and racemic structures by solid–solid reactions. *Faraday Discuss* 2007; 136: 167–78.
52. Chiarella R A, Davey R J, Peterson M L: Making Co-Crystals - The Utility of Ternary Phase Diagrams. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1223–26.
53. Friščić T, Childs S L, Rizvi S A, Jones W: The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *Cryst Eng Comm* 2009; 11: 418–26.
54. Karki S, Fabian L, Friščić T, Jones W: Powder X-ray Diffraction as an Emerging Method to Structurally Characterize Organic Solids. *Org Lett* 2007; 9: 3133–36.

55. Bučar D-K, Henry R F, Lou X, Borchardt T B, Zhang G G Z: A “hidden” co-crystal of caffeine and adipic acid. *Chem Commun* 2007; 5: 525–27.
56. Braga D, Giaffreda S L, Grepioni F, Chierotti M R, Gobetto R, Palladino G, Polito M: Solvent effect in a “solvent free” reaction. *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 879–81.
57. Friščić T, Trask A V, Jones W, Motherwell W D S: Screening for Inclusion Compounds and Systematic Construction of Three-Component Solids by Liquid-Assisted Grinding. *Angew Chem Int Ed* 2006; 45: 7546–50.
58. Berry D J, Seaton C C, Clegg W, Harrington R W, Coles S J, Horton P N, Hursthouse M B, Storey R, Jones W, Friščić T, Blagden N: Applying Hot-Stage Microscopy to Co-Crystal Screening: A Study of Nicotinamide with Seven Active Pharmaceutical Ingredients. *Cryst Growth Des* 2008; 8: 1697–1712.
59. Lu E, Rodríguez-Hornedo N, Suryanarayanan R: A rapid thermal method for cocrystal screening. *Cryst Eng Comm*, 2008; 10: 665-68.
60. Takata N, Shiraki K, Takano R, Hayashi Y, Terada K: Cocrystal Screening of Stanolone and Mestanolone Using Slurry Crystallization. *Cryst Growth Des* 2008; 8: 3032-37.
61. Vogt F G, Clawson J S, Strohmeier M, Edwards A J, Pham T N, Watson S A: Solid-State NMR Analysis of Organic Cocrystals and Complexes. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 912-37.
62. Elbagerma M A, Edwards H G M, Munshi T, Hargreaves M D, Matousek P, Scowen I J: Characterization of New Cocrystals by Raman Spectroscopy, Powder X-ray Diffraction, Differential Scanning Calorimetry, and Transmission Raman Spectroscopy. *Cryst Growth Des* 2010; 10: 2360-71.
63. Allesø M, Velaga S, Alhalaweh A, Cornett C, Rasmussen M A, van den Berg F, Lopez de Diego H, Rantanen J: Near-Infrared Spectroscopy for Cocrystal Screening. A Comparative Study with Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2008; 80: 7755–64.
64. Mirza S, Miroshnyk I, Heinämäki J, Yliruusi J: Co-crystals: An Emerging Approach for Enhancing Properties of Pharmaceutical Solids. *Dosis* 2008; 2: 90-96.
65. Trask A V, Motherwell W D S, Jones W: Pharmaceutical co-crystallization: Engineering a remedy for caffeine hydration. *Cryst Growth Des* 2005; 5: 1013–21.
66. Hickey M B, Peterson M L, Scoppettuolo L A: Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 112-19.
67. Basavoju S, Boström D, Velaga S P: Indomethacin saccharin cocrystal: design, synthesis and preliminary pharmaceutical characterization. *Pharm Res* 2008; 25: 530-41.

68. Surface measurements systems 3rd international DVS user group meeting, Imperial College, London, GB, 9th June, 1999 / 4th international DVS user group meeting, Colmar, France, 3-6. September 2003.
69. <http://www.pharmaterials.co.uk>
70. Good D J, Rodriguez-Hornedo N: Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2252-64.
71. Childs S, Rodríguez-Hornedo N, Reddy L S, Jayasankar A, Maheshwari C, McCausland L, Shipplett R, Stahly B C: Screening strategies based on solubility and solution composition generate pharmaceutically acceptable cocrystals of carbamazepine. *Cryst Eng Comm* 2008; 10: 856-64.
72. Yadav A V, Shete A S, Dabke A P, Kulkarni P V, Sakhare S S: Co-Crystals: A Novel Approach to Modify Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients. *Indian J Pharm Sci* 2009; 71: 359-70.
73. Walbrugh L: Amitraz Solid Dosage Form, Faculty of Engineering, Built Environment and Information Technology, University of Pretoria 2006: 14-15.
74. Dyas A M, Shah U U: Dissolution and Dissolution Testing. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Informa Healthcare USA, 2007: 908-16.
75. Yu L X, Carl A S, Gordon L, Amidon G L: Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs. *Int J Pharm* 2004; 270: 221-27.
76. *Intrinsic Dissolution Apparatus Operator's Manual*, Varian, North Carolina, 2004.
77. Trask A V: An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 301-09.
78. Zegarac M, Meštrović E, Dumbović A, Devčić M, Tudja P: Pharmaceutically acceptable co crystalline forms of sildenafil. *The World Intellectual Property Organization*, Pub. No.: WO/2007/080362, Publication Date 19. 7. 2007.
79. Devarakonda S N, Vyas K, Bommareddy S R, Padi P R, Raghupathy B: Aripiprazole co-crystals. *The World Intellectual Property Organization*, Pub. No.: WO/2007/092779, Publication Date 16. 8. 2007.
80. Dova E, Mazurek J M, Anker J: Tenofovir Disoproxil Hemi-Fumaric Acid Co-Crystal. *The World Intellectual Property Organization*, Pub. No.: WO/2008/143500, Publication Date 27. 11. 2008.
81. Childs S: CoCrystallization methods. *The World Intellectual Property Organization*, Pub. No.: WO/2007/038524, Publication Date 5. 4. 2007.

82. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC): Flukonazol, Baza podatkov o zdravilih (www.zdravila.net), Javni zdravstveni zavod Mariborske lekarne Maribor, 2010.
83. Natsch S, Steeghs M H M, Hekster Y A, Meis J F G M, van der Meer J W M, Kullberg B J: Use of fluconazole in daily practice: still room for improvement. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 303-10.
84. Sweetman S C: *Martindale: The complete drug reference*, 35th edition, Pharmaceutical Press, London, 2007, 479-81.
85. Caira M R, Alkhamis K A, Obaidat R M: Preparation and Crystal Characterization of a Polymorph, a Monohydrate, and an Ethyl Acetate Solvate of the Antifungal Fluconazole. *J Pharm Sci*, 2004; 93: 601-11.
86. Alkhamis K A, Obaida A A, and Nuseirat A F: *Pharmaceutical Development and Technology*, Marcel Dekker, New York, 2002: 491-03.
87. Kastelic J, Hodnik Ž, Šket P, Plavec J, Lah N, Leban I, Pajk M, Planinšek O, Kikelj D: Fluconazole Cocrystals with Dicarboxylic Acids. *Cryst Growth Des* 2010; 10: 4943–53.
88. The United States Pharmacopeia, USP29 – NF24, Maryland 2006, 2923-24.
89. The United States Pharmacopeia, USP29 – NF24, Maryland 2006, 2675-76.
90. Hodnik Ž: Priprava in karakterizacija kokristalov flukonazola, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2009.
91. Childs S L, Chyall L J, Dunlap J T, Smolenskaya V N, Stahly B C, Stahly G P: Crystal Engineering Approach To Forming Cocrystals of Amine Hydrochlorides with Organic Acids. Molecular Complexes of Fluoxetine Hydrochloride with Benzoic, Succinic, and Fumaric Acids. *J Am Chem Soc* 2004; 126, 13335-42.