

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA PAVLIN

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA PAVLIN

**MLETJE KARVEDILOLA S POMOŽNIMI SNOVMI KOT METODA
REŠETANJA ZA IZDELAVO KOKRISTALOV**
**SOLID-STATE GRINDING OF CARVEDIOL WITH EXCIPIENTS AS
A METHOD FOR COCRYSTAL SCREENING**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonaplaniška, mag. farm. Meritve rentgenske praškovne difrakcije so opravili na Oddelku za strukturne raziskave podjetja Krka, d.d., Novo mesto.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Odonu Planinšku, za posredovanje strokovnega znanja, usmerjanje pri eksperimentalnem delu ter pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem Borutu Kovačiču, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu in številne koristne nasvete ter Matjažu Pajku, dipl. inž. kem. teh., za izvedbo analiz rentgenske praškovne difrakcije.

Posebna zahvala je namenjena moji družini za podporo, razumevanje in spodbudo tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonaplaniška, mag. farm..

Teja Pavlin

VSEBINA

POVZETEK.....	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT	III
1 UVOD	1
1.1 KOKRISTALI	1
1.2 MEDMOLEKULSKE POVEZAVE V KOKRISTALIH.....	4
1.3 REŠETANJE IN NAČRTOVANJE KOKRISTALOV	5
1.4 RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE KOKRISTALOV	7
1.5 METODE IZDELAVE KOKRISTALOV	8
1.5.1 KOKRISTALIZACIJA IZ RAZTOPINE.....	8
1.5.2 PRIPRAVA KOKRISTALOV Z MLETJEM.....	10
1.5.3 MLETJE BREZ TOPILO.....	12
1.5.4 MLETJE S TOPILOM	17
1.6 METODE VREDNOTENJA KOKRISTALOV	20
1.7 POMEN IN LASTNOSTI FARMACEVTSKIH KOKRISTALOV	22
1.7.1 TEMPERATURA TALIŠČA	24
1.7.2 KEMIJSKA STABILNOST	24
1.7.3 TOPNOST.....	25
1.7.4 HITROST RAZTAPLJANJA.....	26
1.7.5 BIOLOŠKA UPORABNOST.....	27
1.7.6 HIGROSKOPNOST	28
1.7.7 POLIMORFIZEM KOKRISTALOV.....	28
1.7.8 FARMACEVTSKI KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA.....	29
1.8 KARVEDILOL.....	29
1.8.1 DELOVANJE IN UPORABA	29
1.8.2 OSNOVNI PODATKI	30
2 NAMEN DELA.....	31
3 MATERIALI IN METODE	32
3.1 MATERIALI	32
3.2 METODE.....	34
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	37
4.1 PREGLED REZULTATOV OPRAVLJENEGA REŠETANJA Z METODAMA DSC IN XRPD	37
4.2 MLETJE ZMESI KARVEDILOL : BENZOJSKA KISLINA = 1:1.....	40
4.2.1 DSC TERMIČNA ANALIZA	40
4.2.2 IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA.....	42
4.2.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRPD)	43
4.3 MLETJE ZMESI KARVEDILOL : OKSALNA KISLINA = 1:1	44
4.3.1 DSC TERMIČNA ANALIZA	44
4.3.2 IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA.....	46
4.3.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRPD)	47
4.3.4 ANALIZA DELCEV Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM	47
4.4 MLETJE ZMESI KARVEDILOL : SALICILNA KISLINA = 1 : 1.....	49
4.4.1 DSC TERMIČNA ANALIZA	49
4.4.2 IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA.....	51
4.4.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA.....	52
4.5 VREDNOTENJE HITROSTI RAZTAPLJANJA NASTALIH KOKRISTALOV	53
4.6 EVTEKTIČNE ZMESI KARVEDILOLA IN POMOŽNIH SNOVI.....	57
4.6.1 Karvedilol - metilparahidroksibenzoat.....	58
5 SKLEP.....	60
6 LITERATURA	62

POVZETEK

Znano je, da kristalinične snovi dosegajo svoje osnovne fizikalne lastnosti z ureditvijo molekul v trdnem agregatnem stanju; sprememba položaja ali interakcij med temi molekulami ima ponavadi neposreden vpliv na lastnosti posamezne snovi. Znanih je veliko postopkov, s katerimi aktivni učinkovini spremenimo fizikalno-kemijske lastnosti. To lahko dosežemo s tvorbo soli, polimorfov, hidratov, solvatov in kokristalov. V zadnjih letih so se farmacevtski kokristali pojavili kot dodatna možnost, ki lahko pomembno spremeni nekatere farmacevtske značilnosti zdravilne učinkovine ter predstavljajo tudi nove možnosti na področju intelektualne zaščite.

Priprava kokristalov z mletjem trdnih komponent je alternativna metoda kokristalizaciji iz raztopine in prinaša številne prednosti pri pripravi kokristalov. Velja za metodo prvega izbora pri rešetanju kokristalov, saj lahko na ta način eksperimentalno v kratkem času pripravimo veliko število potencialno novih kokristalov. Modifikacija metode mletja, kjer dodamo majhne količine ustreznega topila, je prav tako zanesljiva in učinkovita metoda za odkrivanje novih kokristalov.

V sklopu diplomske naloge smo z mletjem karvedilola in pomožnih snovi, ki so predstavljale potencialne tvorilce kokristalov, pripravili vzorce za rešetanje kokristalov. Kokristale smo poskušali pripraviti z dvajsetimi različnimi pomožnimi snovmi. Kemijsko gledano je večina pomožnih snovi, ki smo jih uporabljali, karboksilnih kislin, med njimi je tudi sol, ester, anhidrid, amid ter urea. Pripravljene mlete zmesi smo vrednotili z diferenčno dinamično kalorimetrijo, ki velja za učinkovito metodo pri rešetanju in odkrivanju novih kokristalov. V primerih, kjer smo v DSC spektru zaznali spremembo tališča v primerjavi s tališčem učinkovine ali pomožne snovi, smo mlete zmesi ovrednotili tudi z infrardečo spektroskopijo in rentgensko praškovo difrakcijo. Rezultati teh analiz kažejo na nastanek treh kokristalov karvedilola: karvedilol : benzojska kislina v razmerju 1:1, karvedilol : oksalna kislina v razmerju 1:1 in karvedilol : salicilna kislina v razmerju 1:1.

Izvedli smo tudi študijo raztapljanja ter primerjali hitrost raztapljanja kokristala s samo zdravilno učinkovino ter v primerjavi s fizikalno zmesjo. Ugotovili smo, da kokristalizacija karvedilola s pomožnimi snovmi izboljša raztapljanje te učinkovine, tako v mediju s pH 1,2, kakor tudi v fosfatnem pufru s pH 6,8. Rezultati so pokazali, da se najhitreje raztopijo kokristali, nato sam nemleti karvedilol, najslabše pa fizikalne zmesi.

ABSTRACT

It is well-known that crystalline materials obtain their fundamental physical properties from the molecular arrangement within the solid, and altering the placement or interactions between these molecules can have direct impact on the properties of the particular solid. There is variety of different strategies when attempting to alter the chemical and physical solid-state properties of APIs. This can be traditionally achieved with the formation of salts, polymorphs, hydrates, solvates and cocrystals. In recent years, pharmaceutical cocrystals have emerged as an additional option with the potential to regulate important pharmaceutical properties and also to provide highly relevant intellectual property implications.

The solid-state grinding approach to prepare cocrystals is an alternative method to solution-based method of cocrystallization and possesses several advantages. It is well established as a method of first choice; experimentally it offers preparation of many potential cocrystals in a short time. Modification of solid state grinding, where small quantities of appropriate solvent are introduced, it is also reliable and efficient method for cocrystal screening.

In the scope of this disertation, we used solid-state grinding of carvedilol and excipients as cocrystal formers, and prepared samples for cocrystal screening. We used twenty different pharmaceutically acceptable excipients. Prepared samples were characterized with established methods for characterization of cocrystals including differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and X-ray powder diffraction. Results of all analyses indicate that we have succeeded in preparing following cocrystals: carvedilol : benzoic acid = 1:1, carvedilol : oxalic acid = 1:1 and carvedilol : salicylic = 1:1.

We also performed dissolution studies and compared dissolution rates of cocrystals and physical mixtures in comparison with pure active ingredient. We concluded that cocrystallization of carvedilol with excipients improves it's dissolution in medium with pH 1,2 and in phosphate buffer.

SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT

Å	- Angstrom
ATR	- oslabljena popolna odboljnost (attenuated total reflectance)
BU	- biološka uporabnost
cm ⁻¹	- recipročni centimeter
CYP	- citokrom P450
CSD	- podatkovna baza CSD (Cambridge Structural Database)
DSC	- diferenčna dinamična kalorimetrija (differential scanning calorimetry)
EAFUS	- vse, kar se dodaja k hrani v ZDA (everything added to food in the United States)
GIT	- gastrointestinalni trakt
GRAS	- splošno varne substance (generally recognized as safe)
IR	- infrardeče/-a
K_{sp}	- topnostni produkt
MPHB	- metilparahidroksibenzoat
NIRS	- bližnja infrardeča spektroskopija (near-infrared spectroscopy)
NMR	- jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
RV	- relativna vlažnost
SEM	- vrstični elektronski mikroskop (scanning electron microscope)
SSNMR	- jedrska magnetna resonanca v trdnem (solid-state NMR)
Tg	- temperatura steklastega prehoda (glass transition temperature)
THF	- tetrahidrofuran
XRD	- rentgenska difrakcija
XRPD	- rentgenska praškovna difrakcija (X-ray powder diffraction)
ZU	- zdravilna učinkovina

1 UVOD

Zdravilne učinkovine so pri sobni temperaturi večinoma v trdnem agregatnem stanju v kristalni obliki in so najpogostejše vgrajene v trdne farmacevtske oblike – tablete in kapsule. Njihove farmakokinetične lastnosti so pogosto odvisne od fizikalno-kemijskih lastnosti. Zato je za popolno razumevanje povezave med strukturo in lastnostmi učinkovine pomembna pravilna izbira najustreznejše oblike, ki jo vgrajujemo v farmacevtsko obliko. Lastnosti trdne snovi namreč niso odvisne le od molekul, ki jo sestavljajo, temveč tudi od razporeditve molekul v prostoru (1).

Posamezna zdravilna učinkovina obstaja v različnih oblikah, kristalnih ali amorfni, lastnosti različnih oblik pa se lahko med seboj bistveno razlikujejo. Razporeditev molekul v kristalni strukturi določa njene fizikalne in kemijske lastnosti, kot sta raztapljanje in stabilnost, ter pomembno vpliva na formulacijo in izdelavo zdravila. Kristalinične snovi imajo atome, molekule ali ione razporejene v urejeno kristalno rešetko, ki se periodično ponavlja v celotnem prostoru kristala. Snov se lahko nahaja v več kristalnih oblikah, in sicer poznamo soli, solvate (hidrate), prav tako je za kristalne oblike značilen polimorfizem. Različne kristalne oblike (polimorfi) zdravilne učinkovine se lahko med seboj razlikujejo v temperaturi tališča, topnosti, stabilnosti, hitrosti raztapljanja, intrinzični topnosti, biološki uporabnosti, obliki delcev, gostoti, barvi in stisljivosti. Termodinamično bolj stabilna oblika je slabše topna od termodinamično manj stabilne oblike. Amorfnna oblika zdravilnih učinkovin se hitreje in bolje raztaplja od kristalnih oblik, vendar jo redko zasledimo v farmacevtskih izdelkih zaradi slabše kemijske in fizikalne stabilnosti oziroma težnje po kristalizaciji (2).

Variiranje kristalne oblike zdravilne učinkovine je eden od načinov za prirejanje njenih fizikalno-kemijskih lastnosti. Kokristalizacija ponuja dodatne možnosti in ima velik potencial za pripravo novih, stabilnih struktur, s katerimi lahko izboljšamo lastnosti zdravilnih učinkovin, kot so temperatura tališča, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost, mehanske lastnosti, biološka uporabnost in higroskopnost (3).

1.1 KOKRISTALI

Kot smo že omenili, lastnosti trdne snovi niso odvisne le od vrste gradnikov, temveč tudi od njihove razporeditve. Kristali lahko v svoji kristalni rešetki vsebujejo več različnih molekul, povezanih z medmolekulskimi interakcijami. Takšni kristali imajo drugačne lastnosti kot kristali, grajeni le iz ene vrste gradnikov, imenujemo pa jih kokristali.

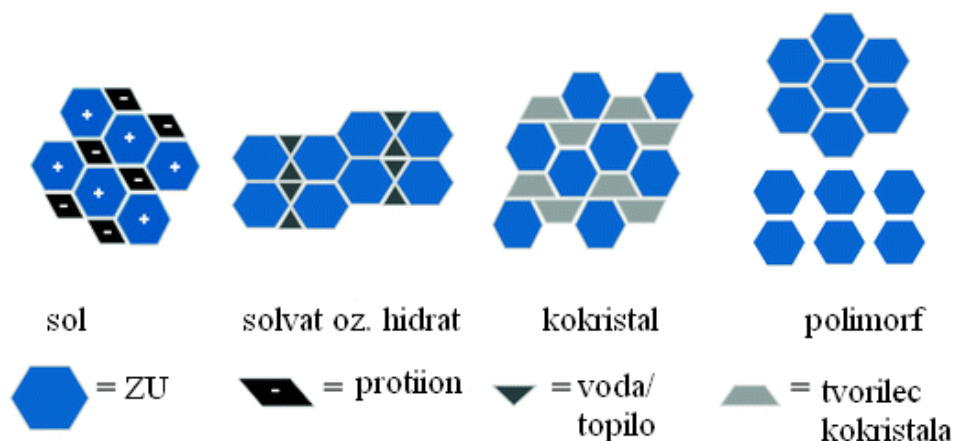
Uporaba pojma kokristal z namenom izboljšanja farmacevtsko aktivnih spojin sega v leto 1946, ko je Krantz (4) s sodelavci odkril kokristal natrijeve soli teofilina in glicina v stehiometrijskem razmerju 1:1, pri čemer je opazil izboljšanje vodotopnosti ZU (5).

V literaturi ne najdemo enotne definicije kokristala. Različni viri (preglednica I) v svoje definicije o kokristalih vključujejo različne parametre, ki opredeljujejo termin kokristal.

Preglednica I. Definicije kokristala s strani različnih avtorjev

Avtor	Definicija kokristala	Referenca
Stahly, G. P.	»molekulski kompleks, ki vsebuje dva ali več različnih molekul v isti kristalni rešetki«	5
Nangia, A.	»večkomponentna tvorba v trdnem agregatnem stanju, sestavljena iz dveh ali več komponent, povezanih z različnimi medmolekulskimi interakcijami«	6
Childs, S. L.	»kristaliničen material, sestavljen iz dveh ali več komponent, ponavadi v stehiometrijskem razmerju, pri čemer je komponenta lahko atom, ion ali molekula«	7
Aakeröy, C. B.	»sestavljene so iz reaktantov, ki so trdni pri sobnih pogojih« »strukturno homogena kristalinična snov, ki vsebuje dve ali več nevtrálnih komponent v stehiometrijskem razmerju« »spojina, ki je zgrajena iz nevtrálnih molekul, ioni in ioni kovin prehoda so izključeni«	8
Bond, A.	»sinonim za večkomponentni molekulski kristal«	9
Jones, W.	»kristalinični kompleks dveh ali več nevtrálnih molekularnih komponent, povezanih med seboj v kristalno rešetko z nekovalentnimi interakcijami, pogosto so to vodikove vezi«	10
Zaworotko, M. J.	»sestavljene so iz molekularne ali ionske zdravilne učinkovine in tvorilca kokristala, ki je v trdnem agregatnem stanju pri sobnih pogojih« - farmacevtski kokristal	11
Desiraju G. R.	»večkomponentni kristali, v katerih so molekule povezane med seboj s specifičnimi nekovalentnimi interakcijami, imenujemo jih molekulski kompleksi«	12
Dunitz J. D.	»kristalinični molekulski kompleksi, hidrati, solvati, inkluzijske spojine, klatrati in druge vrste večkomponentnih kristalov, v katerih so raznovrstne molekule med seboj povezane močnejše kot v enostavnih zmeseh«	13

Splošno sprejeto in skupno različnim definicijam pa je to, da so kokristali kristalinične snovi, sestavljene iz vsaj dveh različnih komponent (t.i. večkomponentni kristali), tarčne molekule in tvorilca kokristala. Večkomponentni kristali so sestavljeni iz dveh ali več komponent (atom, ion ali molekula), ki so povezane z medmolekulskimi interakcijami, mednje pa spadajo kokristali, soli, hidrati, solvati, klatrati in inkluzijski kompleksi (slika 1) (14).



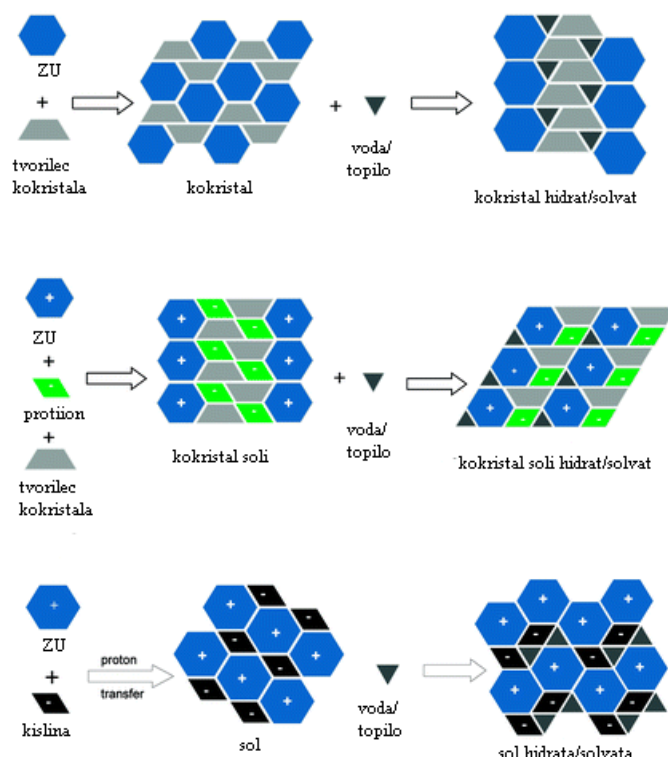
Slika 1. Večkomponentni kristali (14)

Solvati so večkomponentni kristali, kjer je ena od sestavin tekočina pri sobni temperaturi. Klatrati so kristali, kjer je ena izmed komponent ujeta v prostorih znotraj kristalne strukture druge komponente (14).

Kadar v večkomponentnem kristalu nastopajo ioni ali ionizirane molekule, govorimo o solih. Soli in kokristale lahko ločimo med seboj na podlagi dejstva, ali je izmenjava protonov med kislino in bazo prisotna ali ne. Če je izmenjava protonov popolna, kar pomeni, da je prišlo do prenosa protona in se proton nahaja na bazi, kristalinični kislinsko-bazični kompleks imenujemo sol. V kokristalu pa je izmenjava protonov odsotna in ta ostane na kislini. Kljub temu pa je obseg prenosa protona ter položaj protona težko predvideti oz. definirati, ker se ta nahaja nekje vmes med obema skrajnostma. To velja predvsem za kristalinične kislinsko-bazične komplekse, pri katerih sta pK_a vrednosti kisline in baze blizu skupaj. Splošno sprejeto je dejstvo, da je pri reakciji kisline z bazo pričakovan nastanek soli, če je ΔpK_a večja kot 2 – 3, ($\Delta pK_a = pK_a(\text{baze}) - pK_a(\text{kisline})$) oziroma kokristala, če je ΔpK_a manjši. Pri ΔpK_a vrednostih med 0 in 3, je ta parameter neprimeren za napovedovanje tvorbe soli ali kokristala. Večina kristalinično kislinsko-bazičnih kompleksov ima ΔpK_a vrednosti manj kot 1 ali več kot 3, vendar jih je kljub temu

težko absolutno kategorizirati med soli ali med kokristale. Študije kristalne strukture pojasnjujejo, da je prenos protona z ene komponente na drugo v kristaliničnem kislinso-bazičnem kompleksu odvisen od kristaliničnega okolja in ne more biti preprosto napovedan samo s ΔpK_a vrednostjo. Postavitev meje med soljo in kokristalom je tako še vedno predmet nadaljnjih znanstvenih raziskav (15, 16, 17).

Kokristal je lahko sestavljen tudi iz treh ali več molekul, poznamo tudi kompleksne večkomponentne kristale: kokristale hidratov/solvatov, soli kokristalov, soli hidratov/solvatov (slika 2) (14).



Slika 2. Kompleksni večkomponentni kristali (14)

Kokristale, ki vsebujejo zdravilno učinkovino, imenujemo farmacevtski kokristali. Farmacevtski kokristal vsebuje kot tarčno molekulo zdravilno učinkovino, tvorilec kokristala pa je neaktivna snov (netoksična sestavina, farmacevtsko sprejemljiva pomožna snov) ali druga zdravilna učinkovina (18).

1.2 MEDMOLEKULSKE POVEZAVE V KOKRISTALIH

Raznovrstne molekule v kokristalu povezujejo nekovalentne interakcije, med katere spadajo vodikove vezi, koordinacijske vezi, hidrofobne interakcije, van der Waalsove vezi, π - π interakcije in elektrostatske vezi (npr. dipol – dipol) (18).

Zaradi jakosti in usmerjenosti je vodikova vez najpomembnejša interakcija v kokristalni formaciji (18). Poznamo vodikove vezi različnih jakosti, njihova moč pada počasi z razdaljo. Razdelimo jih na močne vodikove vezi (20-40 kJ/mol) $\text{OH}\cdots\text{O}$, $\text{OH}\cdots\text{N}$, $\text{NH}\cdots\text{O}$ in na šibke vodikove vezi (2-20 kJ/mol) $\text{CH}\cdots\text{O}$, $\text{OH}\cdots\pi$, $\text{CH}\cdots\text{N}$, $\text{NH}\cdots\pi$. Vodikovo vez $\text{NH}\cdots\text{N}$ uvrščamo vmes, med močne in šibke vezi (19).

Pogostost vodikove vezi in drugih pomembnih interakcij v kristalni rešetki lahko preučujemo in predvidevamo z uporabo CSD (angl. Cambridge Structural Database – Cambridgova strukturna podatkovna baza), z iskanjem specifičnih molekul, funkcionalnih skupin in sintonov (18).

Pri predvidevanju položaja vodikove vezi v kokristalu, nam je lahko v pomoč pravilo, ki ga je uvedel Donohue (20) in pravi, da bodo vsi v molekuli prisotni kisli vodiki udeleženi pri tvorbi vodikovih vezi v kristalni strukturi določene spojine. Etter-inina pravila pa to pravilo še dopolnjujejo:

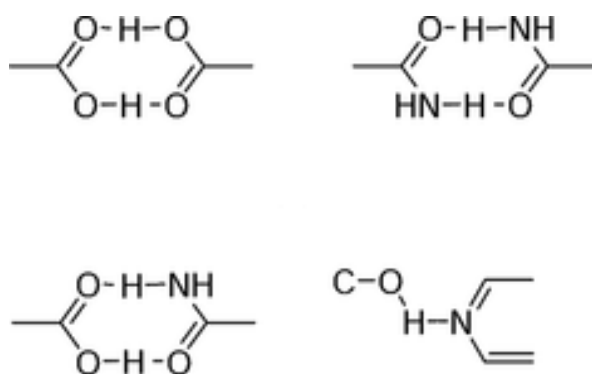
- i. Vsi dobri proton donorji in akceptorji sodelujejo pri tvorbi vodikove vezi
- ii. Šestčlenske ciklične intramolekularne vodikove vezi nastajajo prednostno pred intermolekularnimi vodikovimi vezmi
- iii. Najboljši proton donorji in akceptorji, ki ostanejo na voljo po tvorbi intramolekularnih vodikovih vezi, tvorijo intermolekularne vodikove vezi med seboj (21).

Kot zelo pogosto uporabljeno in primerno funkcionalno skupino za tvorbo medmolekulskih interakcij študije navajajo karboksilno skupino. Nahaja se v 30 od 100 najbolj prodajanih zdravil na recept v ZDA in je zaradi tega odlična izhodna funkcionalna skupina za načrtovanje in izdelavo farmacevtskih kokristalov s pomočjo kristalnega inženiringa (11).

1.3 REŠETANJE IN NAČRTOVANJE KOKRISTALOV

Kristalizacija večkomponentnih kristalov v stehiometrijskem razmerju je rezultat različno močnih povezav, ki povzročajo agregacijo istovrstnih molekul – homomeri in med različnimi molekulami – heteromeri. Farmacevtske kokristale lahko pripravimo s pomočjo t.i. inženiringa kristalov oz. načrtovane priprave farmacevtskih kokristalov, ki se fokusira na intermolekularne povezave, ki vodijo do urejene zgradbe molekul. Inženiring kokristalov ponavadi temelji na uporabi Cambridgove strukturne podatkovne baze (Cambridge Structural Database – CSD) in lastnosti zdravilne učinkovine, pri čemer

preučujemo molekule ali ione ter njihove funkcionalne skupine, ki so udeležene pri tvorbi vodikove vezi za namen medmolekulskega prepoznavanja prek supramolekulskih sintonov. Sintoni so strukturne enote, ki povezujejo molekule med seboj s temi nekovalnetnimi interakcijami. V farmacevtskih in bioloških sistemih sta pomembna sintona karboksi dimer $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ pri karboksilnih kislinah in karboksamidni dimer $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O}$ pri amidih, drugi pomembni sintoni pa so še $\text{N}-\text{H}\cdots\text{N}$, $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$, $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}-\text{N}$ ter $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ (18). Supramolekularni sintoni, ki so ugodni za tvorbo kokristalov, so heterosintoni karboksilna kislina-aromatski dušik, karboksilna kislina-amid in alkohol-piridin. Medmolekulske interakcije so dober ključ medmolekulskega prepoznavanja pri tvorbi kristaliničnih multikomponentnih sistemov, kakršni so tudi kokristali.



Slika 3. Primeri homosintonov in heterosintonov (18)

Sposobnost zdravilne učinkovine, da tvori kokristal, je odvisna od številnih spremenljivk, in sicer vrste pomožne snovi (tvorilca kokristala), stehiometrijskega razmerja ZU:pomožna snov, uporabljenega topila, temperature, tlaka, kristalizacijske tehnike idr.

Načrtovanje kokristala združuje naslednje korake:

1. predvideti, ali bodo ZU ter pomožna(e) snov(i) kokristalizirale; izbrati moramo ustrezno ZU, kateri bomo s tvorbo kokristala izboljšali lastnosti ter preučiti njene osnovne lastnosti
2. identifikacija ter načrtovanje medmolekulskih povezav znotraj načrtovane kokristalne strukture
3. predstava celotne kristalne rešetke ter ureditev komponent v končni kokristalni strukturi (3).

Prvi korak pri rešetanju in načrtovanju kokristalov izbrane učinkovine pa vključuje še eno pomembno stopnjo, in sicer izbrati moramo ustrezen tvorilec kokristala (partner, pomožna snov), ki se bo v kokristalni rešetki povezal z zdravilno učinkovino.

Tvorilci kokristala so ponavadi izbrani na podlagi naslednjih kriterijev:

- i. pomožna snov je farmacevtsko sprejemljiva in je že bila uporabljena v komercialnih farmacevtskih izdelkih. To so lahko tudi substance, ki jim je FDA podelil oznako GRAS (angl. Generally Recognized As Safe – splošno varne substance), v Združenih državah pa tudi substance z oznako EAFUS (angl. Everything Added to Food in the US – vse, kar se dodaja k hrani).
- ii. pomožna snov je netoksična
- iii. med kislino in bazo ne sme biti več kot 2 ΔpK_a enoti razlike (v nasprotnem primeru pride do nastanka soli)
- iv. velikost molekule pomožne snovi je sorazmerna velikosti ZU (5).

Pri izbiri tvorilca kokristala (pomožne snovi) je potrebno upoštevati strukturne značilnosti ZU. Te so naslednje: število, razporeditev in vrsto funkcionalnih skupin, ki so potencialno lahko udeležene pri tvorbi vodikove vezi, kakor tudi simetrijo in konformacijsko fleksibilnost molekule zdravilne učinkovine. Poleg tega so nam pri izbiri tvorilca kokristala v pomoč Etter-inina pravila o tvorbi vodikovih vezi, na podlagi katerih lahko predvidimo interakcije ter uporabnost posamezne pomožne snovi (14).

1.4 RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE KOKRISTALOV

Z uporabo sodobnih pristopov kot je uporaba računalniških programov, ki na osnovi eksperimentalnih podatkov omogočajo modeliranje ureditve molekul v kristalno rešetko, lahko teoretično napovemo pojav tvorbe kokristalov. Tvorba kokristala je pričakovana, če je to s termodinamskega vidika ugodnejše in bolj stabilno od kristalne oblike vsake od posameznih komponent kokristala. Izkazalo se je, da lahko teoretično napovemo tvorbo najstabilnejše oblike kokristala in ureditev molekul v kristalni rešetki na podlagi izračuna minimalne energije kristalne rešetke. Napovedovanje tvorbe najstabilnejše oblike kokristalov je primerljivo z napovedovanjem pojava polimorfizma (22).

Kljub hitremu razvoju računalniške tehnologije je uporaba v farmacevtski industriji, zanesljivost in uporabnost rezultatov zelo omejena, saj na ureditev molekul v kristalno rešetko vplivajo številni dejavniki, ki jih z modelom ni možno opisati in zmanjšujejo zanesljivost rezultatov, zato je eksperimentalno delo še vedno najpomembnejši del raziskovalnega dela in ima prednost pred modeliranjem (23, 24, 25, 26).

1.5 METODE IZDELAVE KOKRISTALOV

Kokristale lahko pripravimo s kokristalizacijo iz topila, mletjem sestavin v krogličnem mlinu in kokristalizacijo iz zelo goste suspenzije. Poznamo tudi pridobivanje kokristalov s sublimacijo sestavin, kokristalizacijo iz taline in pridobivanje kokristalov z delikvescenco sestavin pri visoki relativni vlažnosti (27, 28).

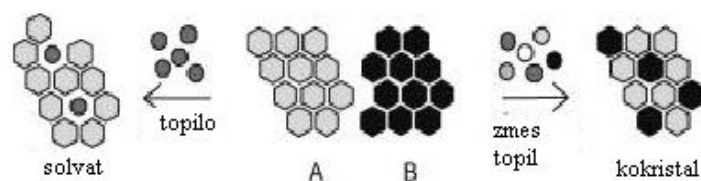
1.5.1 KOKRISTALIZACIJA IZ RAZTOPINE

Kokristale lahko iz raztopine pridobivamo z različnimi tehnikami kot so: odparevanje topila, dodajanje netopila in ohlajanje raztopine. Pomembna je izbira topila oz. zmesi topil, v katerem sta obe sestavini kokristala primerljivo in dovolj topni. Tehnike se razlikujejo po nujnosti uporabe stehiometrijskega razmerja med komponentami, ki so prisotne v nastajajočem kokristalu (29). Ustrezno stehiometrijsko razmerje je zelo pomembno in ključno pri metodi odparevanja topila, predvsem, kadar pustimo topilo odpareti do suhega. Pri ohlajanju raztopine ter ostalih metodah, kjer topila ne odstranimo popolnoma iz sistema, uporaba ustreznega stehiometrijskega razmerja ni nujna (5). Rodriguez-Hornedo in sodelavci so opisali tehniko, kjer raztopini sestavin dodajamo eno od sestavin, zaradi česar pade topnost kokristala pod nivo topnosti obeh sestavin. Posledica je obarjanje kokristala iz raztopine. Pri tej tehniki je pomembna izbira topila, v katerem bomo lahko zagotovili presežno topnost ene sestavine v primerjavi z drugo. V primeru, da takšno topilo ni na voljo, je dovolj tudi dodajanje raztopine bolj topne komponente k gosti suspenziji manj topne komponente (sestavine). Tak postopek tudi privede do želenega koncentracijskega razmerja, ki bo vodilo do pretvorbe neraztopljene snovi v kokristal (30). Kokristalizacijo iz raztopine najpogosteje izvajamo s počasnim odparevanjem topila iz raztopine z ekvimolarnim oz. stehiometrijskim razmerjem koncentracij komponent kokristala (18). Pri kokristalizaciji iz raztopine morata imeti obe komponenti, ki sta udeleženi pri tvorbi kokristala, podobno topnost, sicer se lahko obori komponenta s slabšo topnostjo. Kljub temu pa samo podobna topnost ne zagotavlja uspešne kokristalizacije. Predlagano je tudi, da bi bilo uporabno za uspešno kokristalizacijo preučiti obstoj več polimorfnih oblik spojine. Če molekula izkazuje polimorfizem, ima boljšo strukturno fleksibilnost ter ni omejena le na eno ureditev kristalne rešetke. To pomeni večjo verjetnost, da se molekula postavi v primerno konformacijo za hkraten obstoj v kristalni rešetki z drugo molekulo. Polimorfizem sam po sebi ne zagotavlja funkcionalnost spojine,

da se bo obnašala kot udeleženec pri tvorbi kokristala, medtem ko ima sposobnost molekule pri tvorbi intermolekularnih povezav očitno večjo vlogo (27).

Pri kokristalizaciji iz raztopine kot produkt nastajajo veliki, dobro oblikovani posamezni monokristali kokristalov. Glavna prednost kokristalizacije iz topila (raztopine) je možnost priprave kokristalov takšne kakovosti, da so primerni za analizo z rentgensko difrakcijo na monokristalih, ki predstavlja najpomembnejšo metodo za kristalno strukturno karakterizacijo. Nadaljnja prednost metode je tudi ta, da postopek sam po sebi predstavlja uveljavljen in učinkovit način čiščenja (29).

Tvorba solvatov je pogosto reakcija, ki tekmuje z reakcijo nastanka kokristalov. Veliko vlogo pri tem, v katero smer bo dejansko reakcija potekla, ima vrsta topila. Zmesi topil lahko odigrajo pomembno vlogo tako, da preprečijo nastanek solvatov in tehtnico prevesijo v smer nastanka kokristalov (slika 4), saj obe reakciji tekmujeta med seboj pri metodi kokristalizacije iz raztopine. To tezo so uspešno dokazali s študijo kokristalizacije karbamazepina in saharina v prisotnosti do devet različnih topil, ki tvorijo solvate. Tvorba solvatov je odvisna od aktivnosti topila, kar je v sorazmerju s koncentracijo topila v raztopini. Z zmanjšanjem koncentracije topila zmanjšamo tudi tveganje za nastanek solvata. Lahko bi rekli, da se podobno zgodi tudi, če izberemo topilo z visoko topnostjo obeh komponent kokristala. Zmesi topil naj bi zmanjšale možnost nastanka solvatov s katerimkoli topilom v zmesi, saj naj bi bila aktivnost vsakega nadaljnje uporabljenega topila zmanjšana. Kar nekaj topil in zmesi topil je v eksperimentu kazalo manjšo molarno topnost saharina v primerjavi s topnostjo karbamazepina. Ne zadostna količina saharina je lahko prispevala k prevladi solvatov nad kokristali v eksperimentih.



Slika 4. Koncept kokristalizacije iz zmesi topil kot možnost preprečitve nastanka solvatov (31)

Zmesi topil naj bi tudi izboljšale kinetiko pretvorbe posameznih komponent v skupno kokristalno obliko. Eksperimentalno so za nekaj zmesi topil dokazali, da je stopnja nastanka kristalizacijskih jeder v zmesih topil v splošnem višja kot v čistih topilih. Zmesi topil naj bi v splošnem priskrbele večje število, manj dominantnih interakcij. Kristalizacija iz kompleksne zmesi topil ima kar nekaj pomanjkljivosti, še posebej z industrijskega

vidika. V industrijskem merilu namreč težko kontroliramo in zagotovimo popolnoma enako sestavo zmesi topil skozi celoten proces. Imamo lahko tudi težave s toksikološkega vidika. Prednost zmesi topil je zagotovo ta, da zmanjšajo razlike v topnosti komponent v primerjavi s topnostmi v posameznih topilih. Univerzalno topila ali zmes topil za reševanje soli in kokristalov naj bi bila izbrana na podlagi kriterija, ki vključuje aktivnost posameznega topila, topnost komponent v topilu, kemična reaktivnost, hlapnost in viskoznost zmesi (31).

1.5.2 PRIPRAVA KOKRISTALOV Z MLETJEM

Mletje trdnih sestavin z namenom priprave kokristalov inducira kemijske spremembe, kar imenujemo mehanokemija (32). Prva omemba mehanokemije v znanstveni literaturi sega več kot 160 let nazaj, ko je leta 1844 Wöhler pripravil kokristal kinona in hidrokinona v stehiometrijskem razmerju 1:1 z mletjem (33). Mletje je alternativna metoda kokristalizaciji iz raztopine in prinaša številne prednosti pri pripravi kokristalov. Pri tej metodi ni potrebno upoštevati topnosti posameznih komponent v določenih topilih, kar močno olajša izvedbo kokristalizacije. Izognemo se tudi možnosti nastanka nezaželenih solvatov. Za enokomponentne sisteme so evidentirani primeri, ko z mletjem nastanejo termodinamsko stabilni polimorfi z visokim tališčem. Ker gre pri tej metodi za odsotnost večjih količin topila, jo lahko uvrstimo med t.i. "zeleno kemijo", kar je tudi z ekološkega vidika zelo ugodno in sprejemljivo (34).

Primarni cilj pri dokazovanju kokristalov je pojasnitev kristalne strukture. Kokristale, ki jih pripravimo z mletjem, ne moremo identificirati z rentgensko difrakcijo na monokristalih. Rentgenska difrakcija na monokristalih zahteva določeno velikost kristalov za analizo, mletje pa je znano kot metoda, ki zmanjšuje velikost delcev. Produkti te metode so slabše čistote kot produkti kokristalizacije iz raztopine, opazen je tudi porast kristalinične neurejenosti. Spremembe v stopnji kristaliničnosti, povzročene z mletjem, se lahko odražajo tudi v spremembi fizikalno-kemijskih lastnostih (29).

Za uspešno kokristalizacijo z mletjem naj bi bila vsaj ena od komponent hlapna pri temperaturi, pri kateri izvajamo mletje. Dimerni produkti, nastali z mletjem, pa naj bi imeli močnejše intermolekularne vodikove vezi kakor vsaka posamezna komponenta. Kokristalizacijo v trdnem lahko izboljšamo tudi s segrevanjem zmesi pred mletjem, kjer zmes segrejemo s temperaturo, ki je vsaj 50 °C pod temperaturo tališča posameznih

komponent. Metodo mletja lahko izvajamo v možnarju (terilnici s pestilom) ali krogličnem mlinu, kjer lažje zagotovimo konstante in kontrolirane pogoje (29).

Pomemben napredek pri mletju se je pojavil, ko so Shan in sodelavci ugotovili, da lahko kinetiko nastanka kokristalov znantno izboljšamo z dodatkom nekaj kapljic topila med mletjem. Z dodatkom majhne količine topila ustrezne polarnosti lahko tako tudi kontroliramo nastanek polimorfov (32, 35).

Kokristali, pripravljeni z mletjem, so v splošnem skladni s tistimi, pripravljenimi iz raztopine, vendar obstajajo tudi izjeme (29). Kuroda in sodelavci so dokazali, da lahko z metodo mletja pripravimo tudi kokristale, ki so z drugimi metodami nedosegljivi. Na podlagi študije poročajo o različnih kokristalnih produktih bis- β -naftola (BN) in benzokinona (BK), če uporabijo za pripravo različne metode. Z mletjem v možnarju (s pestilom) nastane kokristal BN:BK 2:3. Če uporabimo za pripravo kokristalov metodo iz raztopine etra in heksana, nastane kokristal BN:BK 1:1. Pri ohlajanju zmesi obeh komponent pa nastane tretja oblika kokristala, z drugačnim stehiometrijskim razmerjem (36).

Mnoge kokristale lahko pripravimo tako s kokristalizacijo iz raztopine, kakor tudi z mletjem trdnih komponent, udeleženih pri tvorbi kokristala. Nekatere kokristale je možno pripraviti le z mletjem trdnih komponent. Dober primer je kokristalizacija 2,4,6-trinitrobenzojske kisline in indol-3-ocetne kisline, kjer nastanejo različne kristalne oblike, ko uporabimo za pripravo kokristalov metodo kokristalizacije iz raztopine ali metodo mletja (27).

Hollingsworth in sodelavci so dokazali uporabnost mletja pri pripravi kokristalov, ki jih sprva niso uspeli pripraviti z metodo priprave kokristalov iz raztopine. Raziskovalci so želeli pripraviti serijo kokristalov α,ω -dinitrilov z različno dolgimi alifatskimi verigami (n) s formulo $\text{NC}(\text{CH}_2)_n\text{CN}$ z ureo. Kokristala z glutaronitrilom ($n=3$) iz raztopine niso uspeli pripraviti, medtem ko si bili pri drugih derivatih dinitrilov uspešni, zato so ga pripravili z mletjem. Ko so poskus rasti kokristalov iz raztopine ponovili z dodatkom kokristalnih jeder, pridobljenih z metodo mletja, so bili pri tem uspešni, saj so pridobili monokristale, ugodne za določitev kristalne strukture. Ta primer dokazuje, da je metoda mletja primerna tudi za pripravo kokristalov, ki služijo kot kristalizacijska jedra, s pomočjo katerih iz raztopine nato zrastejo kokristali (37).

Tako mletje brez topila kot mletje s topilom predstavljata visoko učinkoviti metodi za reševanje pri izdelavi kokristalov, soli in polimorfnih oblik zdravilnih učinkovin.

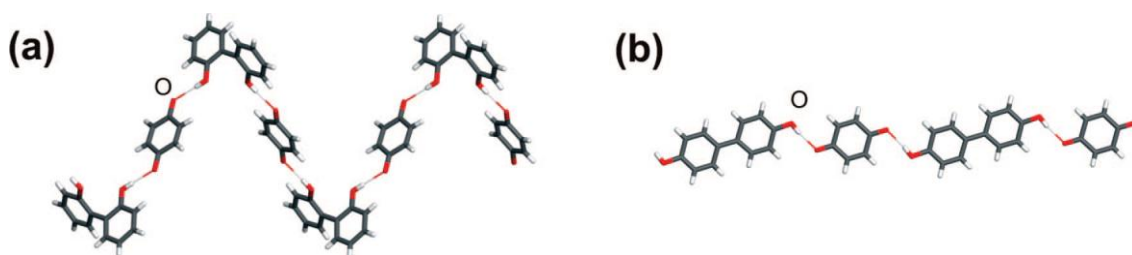
1.5.3 MLETJE BREZ TOPILA

Študije makroskopskih mehanizmov suhega mletja nakazujejo, da kokristalizacije v trdnem stanju ne moremo opisati le z enim mehanizmom. Priprava kokristalov s suhim mletjem lahko poteka po različnih mehanizmih, pri čemer vsak vključuje različen tip vmesnega stanja: molekularno difuzijo, tvorbo evtektika in kokristalizacijo z amorfnim intermedijatom. Skupno vsem trem različnim mehanizmom je, da molekule v vmesni fazi izkazujejo povečano mobilnost in/ali višjo energijo glede na njihove začetne kristalinične oblike. V praksi lahko kokristali nastajajo hkrati z nekaj ali vsemi predstavljenimi mehanizmi (38).

Priprava kokristalov s suhim mletjem preko molekularne difuzije

Kokristalizacija preko molekularne difuzije med dvema trdnima snovema je značilna za reaktante, ko ima eden ali oba visok parni tlak. V takšnem sistemu je pričakovano, da je nastanek produkta hiter, tudi ob odsotnosti mešanja ali mletja. Rastogi in sodelavci so ugotovili, da je površinski premik in difuzija skozi plinasto fazo glavni mehanizem za tvorbo kokristalov pikrinske kisline z aromatskimi ogljikovodiki (39). Podobni mehanizmi so vpleteni tudi pri tvorbi dvo- in trikomponentnih kokristalov z mletjem hlapnega trdnega p-benzokinona z različnimi fenolnimi derivati (40).

Kuroda in sodelavci so dokazali, da je tudi tvorba kokristalov p-benzokinona z 2,2'-bifenolom ali 4,4'-bifenolom (slika 5) posredovana preko mehanizma molekularne difuzije. Mletje trdnih komponent p-benzokinona ter bifenolnih spojin rezultira v hitrem nastanku obarvanih kokristalov, pri čemer so komponente povezane med seboj s prenosom naboja in vodikovimi vezmi, kot kaže slika.



Slika 5. Kokristal p-benzokinona in (a) 2,2'-bifenola in (b) 4,4'-bifenola s prikazanimi vodikovimi vezmi

Opazovali so tudi tvorbo kokristala p-benzokinon-2,2'-bifenol (4,4'-bifenol) ob izpostavitvi bifenola param p-benzokinona, pri čemer tvorba poteka preko mehanizma molekularne difuzije skozi plinsko fazo. Tvorba kokristalov je obsežnejša v primeru uporabe 2,2'-bifenola kot v primeru njegovega 4,4'-analoga. Razlika v reaktivnosti med

obema fenolnima spojinama je posledica različnega omrežja vodikovih povezav v kristalni strukturi 4,4'-bifenola, ki ovirajo površinsko difuzijo molekul. Izvedli so tudi poskus, pri katerem so uprašenemu p-benzokinonu dodali 2,2'-bifenol, brez kakršnega koli mešanja trdnih reaktantov. V roku 60 ur nastanejo kokristali, reakcijo lahko dokončamo in izboljšamo izkoristek tudi z rahlim mletjem reakcijske zmesi, pri čemer je tvorba kokristalov omejena z dostopnostjo novih površin za molekularno difuzijo na kristalu reaktanta. Ta interpretacija je podprta tudi z eksperimenti difuzije s parami, kjer so opazovali nastanek kokristalov na površini bifenolnih kristalnih reaktantov, ki so jih izpostavili param p-benzokinona. Posledično so ugotovili, da je vloga mehanokemijskega mletja p-benzokinona in 2,2'- ali 4,4'-bifenola ta, da poveča obseg reakcije kokristalizacije v trdnem z izpostavljanjem svežih površin reaktantov in mešanjem trdnih reaktantov (41).

Pomembnost molekularne difuzije s površine so prvi prepoznali Rastogi in sodelavci. Na podlagi rezultatov kokristalizacije pikrinske kisline z različnimi aromatskimi tvorilci kokristalov so ugotovili, da tvorbo kokristalov omogočajo tako hlapci (para), kakor tudi difuzija molekul s površine. Za kokristal pikrinska kislina-naftalen so ugotovili, da je mehanizem kokristalizacije difuzija par, za kokristale pikrinska kislina-večji aromatski ogljikovodiki pa molekularna površinska difuzija. Opazovali so tudi obliko in simetrijo molekul. Eksperimenti so pokazali, da je prevladujoč mehanizem površinska difuzija, ki je v različnem obsegu spremljana z difuzijo skozi plinsko fazo. V tovrstnih sistemih je vloga mletja povečanje površinske difuzije tekom mešanja reaktantov, da naredimo nove površine reaktantov dostopne za reakcijo. To naredimo tako, da odstranjujemo produkt (39).

Difuzija molekul pa ni nujno omejena samo na površinski sloj, ampak lahko penetrira tudi v notranjost, še posebej če je združena in podprta z gibanjem molekul. To so dokazali Atwood in sodelavci, ki so preučevali privzem hlapov in plinov v neporozni organski material v trdnem stanju (38).

Priprava kokristalov s suhim mletjem preko vmesne tekoče faze

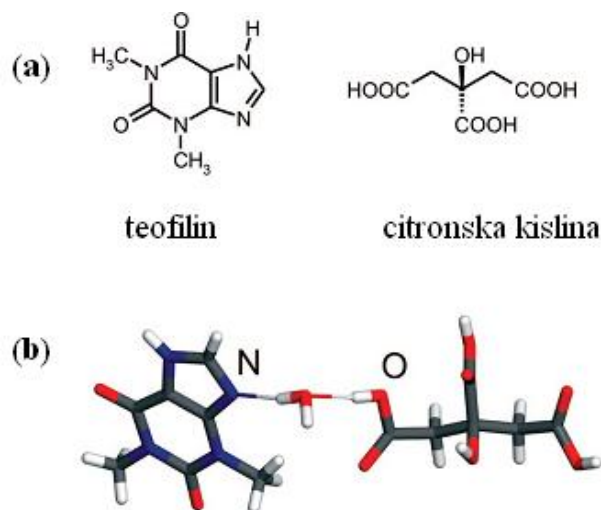
Kadar poteka proces nastanka kokristalov s suhim mletjem preko mehanizma z vmesno tekočo fazo, le-ta posledično postane del produkta in postopoma izgine kot čista spojina, ko se reakcija konča. Najosnovnejši primer tovrstnega mehanizma je v primeru, kadar je en od reaktantov tekočina pri sobnih pogojih, kar se pravzaprav ne sklada z osnovno definicijo kokristala. Obstaja kar nekaj primerov kokristalov, v katerih prevladujejo

vodikove vezi, in vključujejo vsaj eno komponento, ki je tekočina pri sobnih pogojih. Trask in sodelavci (42) so s suhim mletjem uspešno pripravili kokristale kofeina z mravljično, ocatno in trifluorocetno kislino. Vse tri uporabljene kisline so pri sobnih pogojih tekočine.

Alternativni primeri so tudi primeri mletja z dodatkom tekočine, kjer je osnovni namen dodatka tekočine izboljšanje in olajšanje tvorbe kokristala, vendar lahko nastane kokristalna solvatna struktura. Kokristalizacija z mletjem lahko poteka preko vmesne tekoče faze tudi v primerih, kadar kokristalne komponente tvorijo podhlajen, metastabilen evtektik, ki naknadno preide v kokristal (38).

Tvorba kokristalov hidratov

Dodatek topila k zmesi komponent za tvorbo kokristalov, ki jo meljemo, lahko pomembno vpliva na potek kokristalizacije. Nastane lahko produkt, ki vključuje molekule topila kot sestavni del kokristala. Zato je mletje s tekočimi komponentami ugodna tehnika za iskanje in pripravo tri-komponentnih kokristalov. Nastanek trikomponentnega kokristala hidrata lahko v nekaterih primerih dosežemo bodisi z dodatkom vode kot tekočega reaktanta ali dodatkom kristaliničnega hidrata. Z mletjem brezvodnega teofilina in brezvodne citronske kisline z majhnimi količinami vode dobimo kokristal hidrat (slika 6), ki sestoji iz teofilina, citronske kisline in vode v enakih stehiometrijskih deležih (43).



Slika 6. (a) Molekulski diagram teofilina in citronske kisline in (b) skeletna predstavitev asimetrične enote kokristala hidrata teofilina in citronske kisline (38)

Enak kokristal hidrat lahko pridobimo tudi s suhim mletjem teofilin hidrata z brezvodno citronsko kislino, mletjem brezvodnega teofilina s citronsko kislino monohidratom, kakor

tudi z mletjem teofilin monohidrata s citronsko kislino monohidratom. Suho mletje brezvodnega teofilina z brezvodno citronsko kislino pa rezultira v brezvodnem kokristalu, kjer sta komponenti v stehiometrijskem razmerju 1:1 (43).

Tvorba kokristala preko evtektične zmesi

Chadwick in sodelavci so preučevali nastanek difenilamin-benzofenon kokristala, ki nastane iz metastabilne evtektične tekoče faze. Iz kokristalne strukture je razvidno, da so komponente med seboj povezane z N-H $\cdots$ O vodikovo vezjo (44).

Z mešanjem dveh trdnih brezbarvnih komponent opazimo v zelo kratkem času (znotraj ene minute) nastanek rumenih kokristalov na stiku med obema komponentama. Mikroskopsko opazovanje medfaze med posameznima kristaloma difenilamina in benzofenona razkriva, da pride do površinskega taljenja, ki poteka toliko časa, dokler se večina zmesi ne pretvori v tekočino pri sobni temperaturi. Celotna talina nato preide v trdno agregatno stanje in tvori kokristalno fazo (44).

Vloga mletja, ki poteka preko mehanizma s tvorbo evtektika, je dvojna:

- priskrbi mešanje in vzpostavitev novih površin reaktantov za tvorbo evtektika
- izboljša tvorbo kokristalov z induciranjem kokristalnih jeder v fazi evtektika (38).

Priprava kokristalov s suhim mletjem preko amorfnе faze

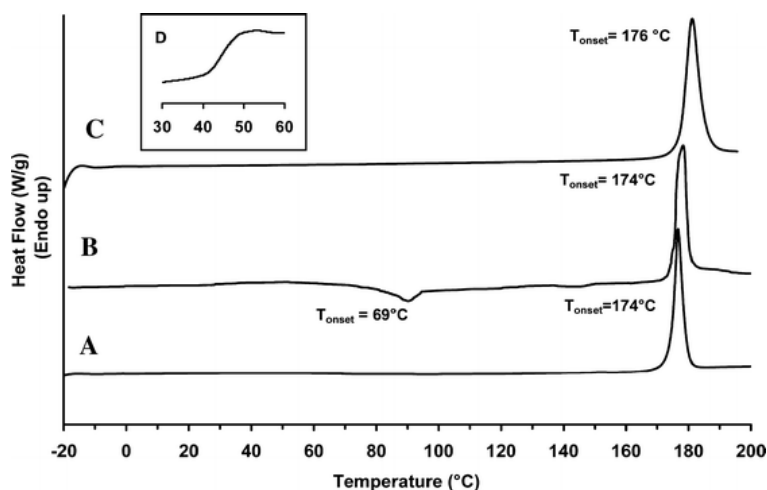
Mehanizem mletja preko amorfnе faze je značilen za trdne snovi, ki niso hlapne in so povezane med seboj z močnimi intermolekularnimi povezavami, kot je vodikova vez. Različni farmacevtski procesi lahko povzročijo tvorbo amorfnih intermediatov, ti pa lahko privedejo do tvorbe kokristalov pod pogoji, ko je povečana mobilnost molekul ter njihova komplementarnost (45).

Mletje reaktantov pri znižani temperaturi stabilizira amorfnо fazo na ta način, da zniža mobilnost molekul, kar ima za posledico manjši obseg nastalih kokristalov. Amorfizacija pri mletju pri hladnejših pogojih (4°C) je bila dokazana za indometacin. Podobno lahko pričakujemo za vsako drugo mletje, ki poteka pri temperaturi, ki je bistveno nižja od temperature steklastega prehoda (45).

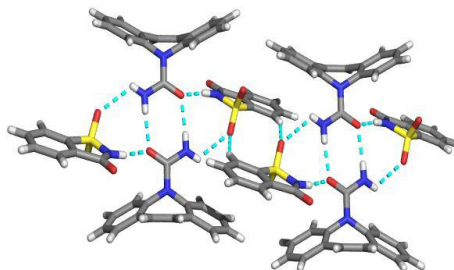
Temperatura steklastega prehoda amorfnе snovi je pomembna lastnost, ki določa mobilnost molekul in njihovo reaktivnost. Dodatek pomožne snovi z visoko temperaturo steklastega prehoda deluje kot mehčalo, saj zviša temperaturo steklastega prehoda zmesi,

ker poveča mobilnost molekul in reaktivnost ter obseg kokristalizacije v trdnem stanju (45).

Rodriguez-Hornedo in sodelavci so na podlagi študije tvorbe kokristalov karbamazepina (CBZ) in saharina (SAC) z mletjem dokazali, da je nastanek kokristalov posredovan preko tvorbe amorfnе faze. To so potrdili s pomočjo DSC analize (slika 7). Slika 7 prikazuje prisotnost amorfnе faze v zmletem vzorcu pri hladnejših pogojih s temperaturo steklastega prehoda okoli 41°C, čemu sledi kristalizacija pri 69°C ter taljenje pri 174°C, ki se sklada s tališčem kokristala pri 176°C. Določili so temperaturo steklastega prehoda za izhodni spojini, in sicer za karbamazepin znaša 52 °C in za saharin 85 °C. Mletje pri hladnejši temperaturi stabilizira amorfnо fazo z zmanjševanjem molekulske gibljivosti, kar zniža stopnjo tvorbe kokristalov. V nasprotju s tem pa mletje obeh komponent pri sobni temperaturi zviša mobilnost molekul amorfnе faze, kar ima za posledico hitrejšo kristalizacijo, v tem primeru nastanek kokristalov karbamazepin-saharin (slika 8) (45).



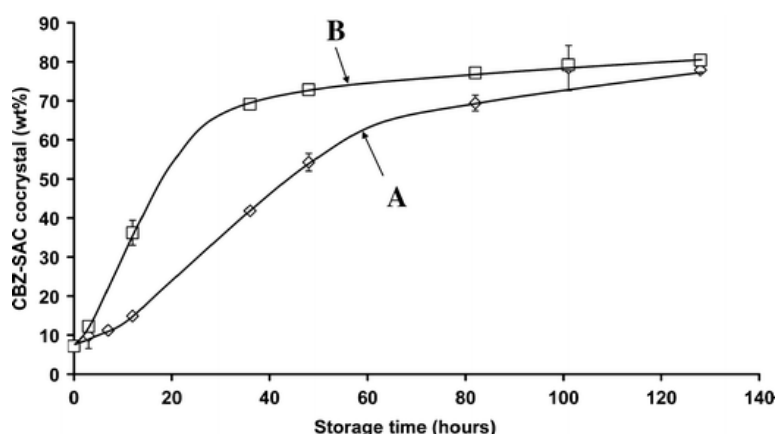
Slika 7. DSC analiza kokristala karbamazepin-saharin, ki so ga pripravili z mletjem (30 minut) pod naslednjimi pogoji: (A) sobna temperatura, (B) hladnejši pogoji, (C) kokristal karbamazepin-saharin, pripravljen iz raztopine, (D) prikaz T_g (45).



Slika 8. Kokristal karbamazepin-saharin (45)

Nastanek kokristalov z metodo mletja ni odvisen le od temperature, pri kateri izvajamo mletje, temveč na to lahko vpliva tudi solvatirana kristalna oblika reaktantov. Hitrejši

nastanek kokristalov pri mletju karbamazepin dihidrata in saharina nakazuje na odločilen pomen vode v kristalni rešetki karbamazepina, ki ima vlogo mehčala in zniža temperaturo steklastega prehoda zmesi. S tem je povezana boljša mobilnost molekul, kar pospeši kokristalizacijo. Dokazali so, da tvori karbamazepin dihidrat tekom dehidracije v brezvodni karbamazepin amorfno fazo pri mletju pri sobni temperaturi. Na podlagi dognanj, da mletje pri sobni temperaturi povzroči amorfizacijo, so preučevali tudi obnašanje amorfnega intermediata med shranjevanjem pri 0% in 75% relativni vlažnosti po mletju pri sobni temperaturi, ki je trajalo 5 minut. Izkazalo se je, da se pospeši tvorba kokristala karbamazepina, ki so ga hranili pri 75 % relativni vlažnosti v primerjavi s tistim, ki so ga hranili pri 0 % relativni vlažnosti. To prikazuje tudi slika 9. Absorpcija vlage poveča mobilnost molekul in kristalizacijo amorfnega intermediata. Vzrok je tako kot v primeru mletja karbamazepin dihidrata v vodi (vlagi), ki ima temperaturo steklastega prehoda pri -138°C in dokazano zniža temperaturo steklastega prehoda zmesi (45).



Slika 9. Nastanek kokristala med shranjevanjem pri 0% RV in 75% RV ter sobni temperaturi po 5 min mletja karbamazepina in saharina pri sobni temperaturi. (A) shranjevanje pri 0% RV (B) shranjevanje pri 75% RV (45)

1.5.4 MLETJE S TOPILOM

Priprava kokristalov z mletjem z majhnimi količinami ustreznega topila je prav tako obetajoča metoda. Velja za učinkovito, lahko, poceni in zanesljivo metodo za odkrivanje novih kokristalov, kakor tudi pripravo že znanih kokristalov. Metoda predstavlja ekološko alternativo uporabi relativno velikih količin topil, ki so potrebne pri pripravi kokristalov iz raztopine (29).

Dodatek majhnih količin topila vpliva na proces kokristalizacije: poveča kinetiko nastanka kokristalov in možnost kontrole nastanka polimorfov. Shan, Jones in sodelavci so dokazali, da mletje cikloheksan-1,3cis-5cis-trikarboksilne kisline in 4,4'-bipiridina povzroči nastanek kokristala. Če med mletjem omenjenih substanc dodamo zraven še nekaj kapljic

metanola, le-ta olajša tvorbo kokristala in skrajša čas, potreben za nastanek kokristalov z 1 ure na 20 minut. Če so k zmesi za mletje dodali topilo cikloheksan, v katerem nobena od komponent ni bila topna, izboljšanje kinetike nastanka kokristalov niso opazili, saj kokristali niso nastali niti po 90 minutah mletja obeh komponent (27, 35).

V nasprotju s suhim mletjem, ki je posredovano preko mehanizma s tekočo vmesno fazo, kjer se tekoča faza med potekom kokristalizacije pretvori v trdno, pri mletju s topilom igra slednje pomembno katalitično vlogo. Količina topila, ki jo uporabimo pri mletju, naj tekom reakcije ne bi izginila (se izločila) razen, če se to zgodi naključno z izhlapevanjem (38).

Trenutno še ni popolnoma pojasnjeno, kako tekoča faza prispeva k večji učinkovitosti mletja s topilom v primerjavi s suhim mletjem kakor tudi z metodami priprave iz raztopine (38). Predvidevajo, da ima majhna količina topila v nekaterih primerih čisto fizikalno vlogo, saj se obnaša kot drsilo v reakciji, saj priskrbi medij za molekularno difuzijo. Po drugi strani pa ima sama narava mletja, v odvisnosti od vrste tekočine, ki je prisotna, lahko velik vpliv na potek kokristalizacije, med drugim tudi z vplivom na tvorbo multikomponentne rešetke (ogrodja) (34).

Topilo kot medij za molekularno difuzijo

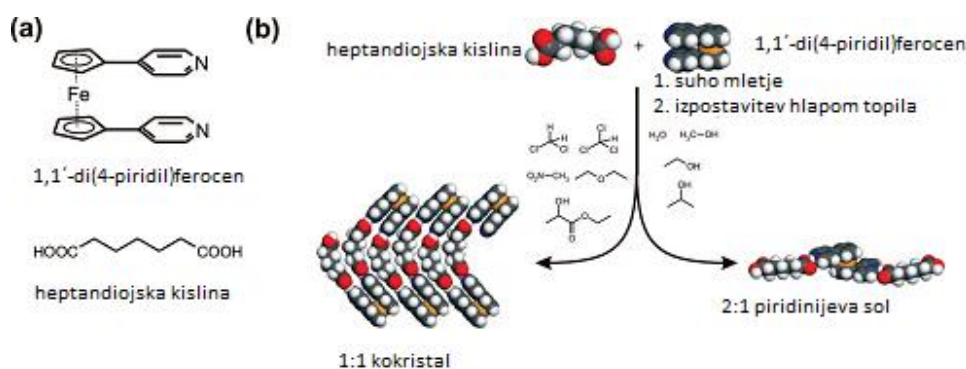
Raziskovalci Chiarella, Davey in Peterson so analizirali, kako kemijska narava tekočine, uporabljene pri mletju, vpliva na izid mletja trdnih komponent. Preučevali so trikomponentne fazne diagrame vključujoč nikotinamid in cimetno kislino kot komponenti za tvorbo kokristalov ter vodo ali metanol kot topilo. Analiza faznega diagrama razloži težavnost, ki je potrebna za doseg kokristalov iz eksperimentov, kjer je prisotna raztopina. Kokristalizacija iz raztopine, v kateri sta obe komponenti različno topni, ponavadi povzroči obarjanje posamezne komponente, medtem ko pri kokristalizaciji iz raztopine, v kateri imata obe komponenti kokristala podobno topnost, lahko privede do nastanka kokristala. Ker reakcija mletja z dodatkom topila običajno poteka v področju faznega diagrama, kjer je količina prisotnega topila zelo nizka, je nastanek kokristala tudi s termodinamskega vidika najstabilnejša faza, ki lahko nastane (46). Poleg tega je pri mletju z dodatkom topila količina prisotnega topila majhna kar pomeni, da topnost obeh komponent kokristala v tem topilu nima bistvenega pomena na izid mletja. Predvidevamo, da ima prisotno topilo velik vpliv na povečanje molekularne difuzije (47).

Primer, kako lahko mletje s topilom prepreči probleme, povezane s topnostjo kokristalnih komponent, je kokristalizacija teobromina z malonsko kislino. Tvorba kokristala med

obema komponentama iz raztopine je bila praktično nemogoča zaradi nizke topnosti ter hitre precipitacije teobromina. Mletje ekvimolarnega razmerja teobromina in malonske kisline v prisotnosti topila pa rezultira v nastanku kokristalov v času 20 minut (48).

Vpliv vrste topila na izid mletja

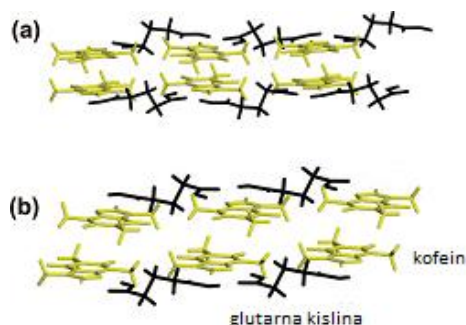
Braga in sodelavci so raziskovali, kako lahko vrsta tekoče faze vpliva na potek mehanokemijske reakcije 1,1'-di(4-piridil)ferocena in heptandiojske kisline (angl. pimelic acid) (slika 10a). Samo mletje obeh komponent skupaj ne prinaša nove kristalne oblike. Če zmleto suho zmes izpostavimo hlapom diklorometana, kloroforma, dietiletra, nitrometana ali etilaktata, dobimo kokristal s stehiometrijskim razmerjem obeh trdnih komponent 1:1. Ob izpostavitvi zmlate zmesi hlapom metanola, etanola, vode ali izopropilnega alkohola pa dobimo piridinijevo sol, kjer sta glavni komponenti v stehiometrijskem razmerju 1:2 (slika 10b). Kokristalno obliko in sol lahko ločimo (razlikujemo) z uporabo ^{14}N NMR v trdnem. Mletje 1,1'-di(4-piridil)ferocena in heptandiojske kisline z dodatkom metanola ali diklormetana vedno povzroči nastanek kokristala s stehiometrijskim razmerjem 1:1. Rezultati raziskave kažejo na to, da lahko tekoča faza (torej topilo) s svojimi lastnostmi močno vpliva na potek kokristalizacije, tudi če so prisotne le mikroskopske količine topila (49).



Slika 10: (a) Molekulski diagram komponent kokristala 1,1'-di(4-piridil)ferocena in heptandiojske kisline in (b) tvorba kokristala oz. piridinijeve soli 1,1'-di(4-piridil)ferocena in heptandiojske kisline s suhim mletjem in izpostavitvijo hlapom topila (38)

Kako je lahko tvorba kokristalov z mletjem s topilom kontrolirana s kemijsko naravo topila, so dokazali pri kokristalizaciji kofeina in glutarne kisline. Kokristalizacija obeh komponent iz čistega kloroforma ali čistega metanola je težavna zaradi signifikantno različnih topnosti obeh komponent v vsakem posameznem topilu. Mletje obeh komponent

v prisotnosti majhne količine cikloheksana privede do tvorbe kokristala oblike A, medtem ko mletje obeh komponent s kloroformom proizvede kokristal oblike B (slika 11) (34).



Slika 11. Skeletna predstavitev polimorfnih oblik kokristala kofeina (rumeno) in glutarne kisline (črno), dobljeno z (a) mletjem s cikloheksanom in (b) mletjem s kloroformom (38)

1.6 METODE VREDNOTENJA KOKRISTALOV

Kokristalne komponente so v kristalu med seboj povezane in orientirane drugače, kot sicer vsaka komponenta posebej. Zato so za karakterizacijo primerne vse metode, ki nam podajo informacijo o kristalni strukturi. Pri procesu izdelave kokristalov nas najprej zanima, ali je kokristalizacija uspešno potekla. To lahko preverimo z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), rentgensko praškovo analizo (XRPD), Ramansko in infrardečo (IR) spektroskopijo (14). Razultati, ki jih dobimo pri posamezni analizi metodi, so spektri. V primeru, da kokristal ne nastane, so spektri vzorcev vsota spektrov izhodnih komponent. Če pa komponente pri procesu priprave tvorijo skupno kristalno strukturo, so pripadajoči spektri drugačni:

- V DSC spektru vidimo eno samo tališče
- V XRPD spektru se pojavijo odkloni pri tistih kotih, ki jih ni v XRPD spektrih izhodnih komponent
- V Ramanskem in IR spektru zaznamo signale, ki so rezultati novih interakcij ter drugačno »fingerprint« območje (50).

Kljub temu pa s temi metodami ne moremo zagotovo potrditi nastanka in prisotnosti kokristala, saj tudi pri nastanku soli in solvatov nastanejo edinstveni spektri. Potrebne so metode, ki zaznajo stopnjo prenosa protona med dvema komponentama in s tem podajo informacijo o tvorbi ionske interakcije ali vodikove vezi, kar nam omogoči ločbo kokristalov od soli.

Sodobne analize metode, katerih večina so spektroskopske, omogočajo popolno karakterizacijo spojine na molekularnem nivoju v zelo kratkem času. Kljub temu pa je

podrobna informacija o molekularni rešetki v trdnem stanju težje dostopna. Neposredna informacija o ureditvi molekul v trdnem agregatnem stanju je možna le z uporabo rentgenske difrakcije, ki jo izvedemo na monokristalih. Omenjena metoda daje najbolj kompletno, natančno in točno informacijo o molekuli in njeni kristalni strukturi, vendar je njena uporaba pogosto omejena, saj so za analizo potrebni monokristali ustrezne velikosti in kvalitete (48). Zato je za karakterizacijo potencialnih kokristalov najbolje uporabiti kombinacijo več različnih tehnik (XRPD, IR, NMR v trdnem), ki ne zahtevajo priprave monokristalov.

Kar nekaj raziskovalnih skupin, med njimi tudi Karki s sodelavci, je dokazalo, da so mehanokemijske metode (predvsem suho mletje in mletje s topilom) za pripravo kokristalov zmogljivejše od metod priprave iz raztopine. Vendar pa mehanokemijske metode ne omogočajo, da bi pridobljene kokristale karakterizirali z rentgensko analizo na monokristalu, ker so le-ti premajhni za to analizo (48).

Rentgenska praškovna analiza (XRPD) velja za analizno metodo, ki omogoča hitro karakterizacijo organskih trdnih spojin brez potrebe po monokristalu. XRPD detektira spremembe v kristalni rešetki in je zato učinkovito orodje pri preučevanju polimorfizma, farmacevtskih soli in kokristalov, loči tudi kristale od amorfnih snovi. XRPD je lahko uporabljena tudi kot del avtomatskega robotskega sistema pri visokozmogljivostnem rešetanju (48).

Infrardeča spektroskopija je močno spektroskopsko orodje za detekcijo nastanka novih kokristalov, še posebej kadar je kot pomožna snov uporabljena karboksilna kislina in/ali kadar se tvori O-H...N vodikova vez med kislino in bazo. Jasne razlike znotraj IR spektra lahko opazujemo, če primerjamo nevtralno karboksilno kislino in karboksilatni anion. Karboksilna skupina (-COOH) kaže močno C=O vibracijsko nihanje pri dolžini 1700 cm^{-1} in šibkejše C-O okoli 1200 cm^{-1} . Karboksilatni anion (-COO⁻) pa izraža le C-O nihanje v »fingerprint« območju med $1000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$. V splošnem velja, da pri tvorbi intermolekularne O-H...N vodikove vezi v IR spektru opazimo dva razširjena vrhova pri približno 2450 ter 1950 cm^{-1} . Stanje karboksilne skupine (nevtralno ali ionsko) lahko razlikujemo z merjenjem dolžine vezi C-O ter C=O z XRPD na monokristalu. Tipična dolžina vezi C=O je okoli 1.2 Å , medtem ko je dolžina vezi C-O okoli 1.3 Å ; če pride do deprotonacije, bodo dolžine resonančno stabiliziranih C-O vezi zelo podobne (14).

Tudi Ramanska spektroskopija se je izkazala za zelo uporabno pri karakterizaciji kokristalov, nekateri raziskovalci jo namreč ocenjujejo kot alternativo rentgenski difrakciji.

Ramanska spektroskopija preučuje kristalno strukturo na podlagi vibracijskih energij vezi in je potencialno zmožna razlikovati med polimorfnimi oblikami zdravilne učinkovine. Meritve so neinvazivne, nedestruktivne in hitre, zato je tudi Ramanska spektroskopija primerna za avtomatske visokozmogljivostne sisteme. Slaba stran Ramanske spektroskopije je povezana s fluorescenco, ki lahko opazno zatemni vrhove v dobljenem spektru. Tudi IR spektroskopija omogoča enake prednosti glede vzorčenja kot Ramanska spektroskopija, problem fluorescenca pa tukaj zaradi drugačne tehnike ni prisoten. Inštrumenti za IR spektroskopijo so cenejši kot tisti za Ramansko spektroskopijo. IR spektroskopija omogoča identifikacijo kokristalov na osnovi »fingerprint« območja v IR spektru. Poleg tega lahko na osnovi sprememb položajev ter oblik absorpcijskih trakov funkcionalnih skupin sklepamo na morebitne interakcije med funkcionalnimi skupinami. Pri bližnji IR spektroskopiji (NIRS) pa se je pokazalo, da ni dovolj specifična za identifikacijo kompleksnih trdnih vzorcev (51).

Jedrska magnetna resonanca v trdnem stanju (SSNMR; angl. Solid-State NMR) je analizna tehnika, ki omogoča pridobitev podrobne strukturne informacije o organskih in farmacevtskih kokristalih in kompleksih. Je zelo diskriminatorna in omogoča potrditev, ali je dejansko prišlo do tvorbe kokristala ali ne. NMR je nedestruktivna metoda, ki za izvedbo analize potrebuje le majhne količine uprašenega materiala, ima jedrno specifičnost, je občutljiva za vodikove interakcije in lokalne konformacijske spremembe, lahko določi tudi mešano fazne komplekse ter solvate. SSNMR nedestruktivno analizira majhne količine uprašenega materiala in da v splošnem podrobnejše informacije kot vibracijska spektroskopija in XRD na monokristalih. Te prednosti lahko s pridom izkoristimo pri karakterizaciji farmacevtskih kokristalov, ki so na začetku pogosto pridobljeni z metodami mletja z majhnimi količinami topila in ne vodijo do nastanka ustreznih monokristalov za rentgensko praškovo difrakcijo (52).

DSC termična analiza je uporabna za natančno določitev talilnega intervala kokristalov in drugih termično pogojenih procesov, kot so razpad, rekristalizacija, prehajanje med polimorfnimi modifikacijami, izguba topila v primeru solvatov idr. (53, 54).

1.7 POMEN IN LASTNOSTI FARMACEVTSKIH KOKRISTALOV

Farmacevtski kokristali izkazujejo drugačne fizikalno-kemijske lastnosti v primerjavi s čistimi kristalnimi oblikami zdravilne učinkovine. Največji potencial kokristalov so možnosti za izboljšanje lastnosti zdravilnih učinkovin brez kemijske spremembe molekule

(55). Pregled nekaterih primerov kokristalov in lastnosti, ki so jih izboljšali s kokristalizacijo ZU prikazuje preglednica II.

Obstaja veliko število potencialnih tvorilcev kokristalov za posamezno zdravilno učinkovino, kar ponuja veliko možnosti za prirejanje fizikalno-kemijskih lastnosti. Spremenjene lastnosti lahko večinoma razložimo kot posledico spremenjene lege molekule v kristalni rešetki in medmolekulskih povezav ter so odvisne tudi od lastnosti tvorilca kokristala.

Lastnosti, ki jih lahko spremenimo s tvorbo kokristalov, so (14):

- temperatura tališča
- stabilnost
- topnost
- raztapljanje
- biološka uporabnost.

Preglednica II. Pregled nekaterih v literaturi opisanih farmacevtskih kokristalov in vpliv na lastnosti zdravilne učinkovine

Zdravilna učinkovina	Tvorilec kokristala	Metoda priprave kokristalov	Izboljšana lastnost	Literaturni vir
Fluoksetinijev klorid	benzojska kislina jantarna kislina fumarna kislina	Iz raztopine	intrinzična hitrost raztapljanja	56
Ibuprofen	4,4'-dipiridil nikotinamid	Iz raztopine	topnost	57
Indometacin	saharin	Iz raztopine, mletje s topilom	stabilnost, hitrost raztapljanja	57
Itrakonazol	jabolčna, jantarna, vinska kislina	Iz raztopine	hitrost raztapljanja	58
Kofein	oksalna kislina glutarna kislina	Mletje s topilom	stabilnost (fizikalna)	59
Karbamazepin	nikotin saharin	Iz raztopine	stabilnost, hitrost raztapljanja in biološka uporabnost	60
Nofloksacin	izonikotinamid, jantarna, malonska, maleinska kislina	Iz raztopine	topnost	57
Teofilin	oksalna, maleinska, malonska, glutarna kislina	Iz raztopine, mletje	higroskopsnost	61

1.7.1 TEMPERATURA TALISČA

Temperatura tališča je fizikalna lastnost, ki je opredeljena s temperaturo, pri kateri je trdna faza v ravnotežju s tekočo fazo. Kokristali imajo temperaturo tališča različno od temperature tališča posameznih komponent. Zanimivo je, da pod to temperaturo ne opazimo drugih termičnih prehodov. Sprememba temperature tališča kokristala v farmacevtskem procesu prinaša določene prednosti; če s tvorbo kokristala znižamo temperaturo tališča nove kristalne oblike v primerjavi z zdravilno učinkovino, se lahko izognemo težavam, povezanim s termolabilnostjo zdravilne učinkovine v procesih pri višjih temperaturah ter tako preprečimo njen kemijski razpad (14).

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC, angl. Differential Scanning Calorimetry) je metoda, ki je zelo uporabna za določanje temperature tališča. Obstaja kar nekaj dejavnikov, ki vplivajo na temperaturo tališča kristalinične snovi, kot so molekulska ureditev znotraj kristalne rešetke, molekularna simetrija, intermolekularne interakcije in konformacijska gibljivost molekule (14).

Schultheiss in Newman sta izvedla obsežno raziskavo, kjer sta preučevala temperature tališča kokristalov v primerjavi s temperaturo tališča zdravilnih učinkovin ter tvorilcev kokristalov. Namen raziskave je bil določiti, ali obstaja kakršnakoli povezava med temperaturo tališča kokristala, ZU in tvorilcem kokristala. V raziskavo so vključili 50 vzorcev različnih kokristalov. Rezultati raziskave pa so naslednji: 26/50 (51%) kokristalov ima temperaturo tališča med posameznima temperaturama tališča obeh komponent, pri 19/50 (39%) je temperatura tališča nižja od obeh temperatur komponent, samo pri 3/50 (6%) je temperatura tališča višja od obeh tališč, pri 2/50 (4%) pa je temperatura tališča kokristala skladna bodisi s temperaturo tališča ZU bodisi s temperaturo tališča pomožne snovi. Ta statistika nazorno prikazuje, da lahko s postopki kokristalizacije spremenimo tališče kokristala v primerjavi s tališčem zdravilne učinkovine, izid pa je ponavadi tak, da je tališče kokristala med tališčema ZU in pomožne snovi ali nižje od tališč ZU in pomožne snovi (14).

1.7.2 KEMIJSKA STABILNOST

Tvorba kokristalov lahko v določenih primerih izboljša kemijsko stabilnost zdravilne učinkovine, kadar kemijska reaktivnost zahteva, da so reaktanti v ustreznih konformacijskih položajih v trdnem stanju. V primeru kokristala karbamazepina je fotokemijska stabilnost molekule odvisna od strukture kristala in ureditve molekul v njem.

Tvorba kokristala tako prepreči fotodegradacijo karbamazepina s spremembo molekularne ureditve (konformacijska sprememba) (18).

1.7.3 TOPNOST

Eden glavnih razlogov za pripravo ter karakterizacijo kokristalov je izboljšanje topnosti v primerjavi s topnostjo v vodi slabo topnih zdravilnih učinkovin. Za prosto bazo ali prosto kislino velja, da lahko tako soli kot kokristali, ki jih tvorimo, izboljšajo topnost, zato ni tako enostavno le na podlagi izboljšane topnosti določiti, kateri sistem je nastal. Potrebno je več tehnik za celotno razumevanje sistema (62).

Topnost kokristala je odvisna od koncentracije komponent ter od pH, če je katera od komponent ionizirana (62). Razvili so matematične modele, ki opisujejo topnost binarnih kokristalov, ki vsebujejo neionizirane komponente. Ti matematični modeli temeljijo na ravnotežju med kokristalom in kokristalnimi komponentami v raztopini. Pri tem je pomemben topnostni produkt kokristala, K_{sp} . Mnogo kokristalov je sestavljenih tudi iz nevtrálnih komponent, ki lahko ionizirajo tekom raztapljanja. V tem primeru topnost kokristala ne bo odvisna le od topnostnega produkta, temveč tudi od pK_a vrednosti komponent ter od pH raztopine (18).

Na topnost lahko vpliva tako vrsta medija, kakor tudi pH vrednost, ki jo ustvarim v vodni raztopini molekule z kislimi ali bazičnimi skupinami. Sprememba pH medija, v katerem poteka raztapljanje, je lahko razlog za povečano topnost kokristala. Še posebej to velja za učinkovine, ki ionizirajo v vodi ali imajo od pH odvisno topnost in ko je izbrani medij nepufirana raztopina ali kar voda sama. V pufranih medijih pa je povečana topnost zdravilne učinkovine v kokristalu lahko posledica solubilizacijskega učinka raztopljenega kokristalnega partnerja oz. tvorbe bolj topnega kompleksa; slabša topnost pa je lahko posledica doseženega topnostnega produkta zaradi raztapljanja kokristalnih komponent (18, 62, 63).

Rodriguez-Hornedo in sodelavci so določali topnosti kokristalov karbamazepina v vodi, etanolu, izopropanolu in etilacetatu. Vodotopnost za sedem različnih kokristalov karbamazepina je bila ocenjena za od 2 - do 152- krat večja od topnosti stabilne oblike karbamazepin dihidrata. Pri kokristalih karbamazepina so dokazali tudi, da je topnost kokristalov direktno proporcionalna topnosti kokristalnih komponent (62, 63).

1.7.4 HITROST RAZTAPLJANJA

Znano je, da se mora zdravilna učinkovina iz trdne farmacevtske oblike najprej raztopiti, preden je na voljo za absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta. Pogosto je za nizko biološko uporabnost peroralno apliciranih učinkovin bolj kot omejena permeabilnost skozi epitelije gastrointestinalnega trakta odgovorna nizka topnost ter hitrost raztapljanja (64). Zato sta topnost in raztapljanje zdravilne učinkovine, skupaj s permeabilnostjo pomembna parametra njene biološke uporabnosti (10).

Obstaja več različnih metod za izboljšanje hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin: zmanjšanje velikosti delcev ter posledično zvečanje površine delcev, tvorba vodotopnih kompleksov, solubilizacija z dodatkom površinsko aktivnih snovi, derivatizacija ZU, kot je tvorba soli, sprememba trdnega stanja ZU za izboljšanje raztapljanja (sem spada tvorba kokristalov) ter tvorba trdnih disperzij. Velikost delcev je pomemben parameter zdravilnih učinkovin, tudi kokristalov, saj ne vpliva le na raztapljanje, ampak tudi na absorpcijo (64).

Hitrost raztapljanja lahko opišemo z Noyes–Whitney-evo enačbo :

$$DR = \frac{dX}{dt} = \frac{A \cdot D}{h} \left(C_s - \frac{X_d}{V} \right),$$

kjer DR predstavlja hitrost raztapljanja, A je površina, ki je na voljo za raztapljanje, D je difuzijski koeficient učinkovine, h je debelina difuznega sloja, ki je blizu površine delca, C_s je nasičena topnost učinkovine, X_d je količina učinkovine, raztopljene v času t, V pa je prostornina medija za raztapljanje. Površina učinkovine, ki je na voljo za raztapljanje, je odvisna od velikosti delcev učinkovine ter sposobnosti za močljivost. Velikost delcev je kritičen parameter za hitrost raztapljanja in je odvisna od pogojev kristalizacije (kokristalizacije) ter metode priprave (ko-) kristalov (27).

Študije so pokazale, da je profil raztapljanja kokristala celekoksib-nikotinamid (65) odvisen od medija raztapljanja ter dodanih farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi. Raztapljanje kokristala z ionizirajočo učinkovino, indometacin-saharin, je bilo odvisno od jakosti pufra v vodnem mediju (18).

Remenar in sodelavci so raziskovali in določali hitrost raztapljanja kokristalov z modelno učinkovino itakonazol. Sintetizirali so štiri različne kokristale s stehiometrijskim razmerjem 2:1 (učinkovina : ligand), kjer so kot ligande uporabili fumarno, jantarno, jabolčno in vinsko kislino. Izkazalo se je, da se pri raztapljanju težko topna zdravilna

učinkovina v kokristalu obnaša podobno kot čista amorfna oblika zdravilne učinkovine in lahko doseže od 4- do 20 – krat višjo koncentracijo kot čista kristalinična oblika učinkovine, v tem primeru itrakonazol. Pomembna je tudi tvorba prenasičene raztopine, ki ima lahko velik vpliv na absorpcijo učinkovine in biološko uporabnost. McNamara in sodelavci so dokazali, da tvorba kokristala modelne zdravilne učinkovine z glutarno kislino poveča vodotopnost ter hitrost raztapljanja kokristala za več kot 18 – krat v primerjavi s čisto kristalinično obliko (58).

Childs in sodelavci so izdelali kokristale fluoksetinijevega klorida z benzojsko, jantarno in fumarno kislino. Ker gre v tem primeru za sol zdravilne učinkovine, kloridni ion deluje kot akceptor vodikove vezi za karboksilne skupine vseh treh ligandov. Izsledki raziskave kažejo, da sta topnost in hitrost raztapljanja kokristalizirane učinkovine v veliki meri odvisni tudi od tvorilca kokristala. Kokristal fluoksetinijevega klorida z benzojsko kislino je slabše topen in se počasneje raztaplja kot sama ZU, kokristal s fumarno kislino je približno enako topen kot kristaliničen fluoksetinijev klorid, medtem ko ima kokristal fluoksetinijevega klorida z jantarno kislino trikrat večjo hitrost raztapljanja in zelo hitro doseže ravnotežno topnost čiste zdravilne učinkovine (56).

1.7.5 BIOLOŠKA UPORABNOST

Biološka uporabnost (BU) je merilo deleža zdravilne učinkovine, ki je v nespremenjeni obliki na razpolago v sistemske krvnem obtoku. V razvoju zdravil potekajo mnoge raziskave na živalih. Biološka uporabnost pri živalih je pomemben parameter, ki ga je potrebno upoštevati, kadar pripravljamo nove oblike učinkovin, rezultati teh študij pa so lahko v veliko pomoč pred prehodom na testiranja pri ljudeh. Za raziskave BU na živalih uporabljamo naslednje živalske vrste: podgane, zajce, pse, prašiče in opice. Pri relativnih in primerjalnih študijah biološke uporabnosti merimo količino (koncentracijo) ZU v krvi po peroralni aplikaciji čiste oblike ZU ter nato kokristala (14).

Farmakokinetične študije na psih so pokazale, da lahko s tvorbo kokristala slabo topne in dobro permeabilne učinkovine, ki spada v razred 2 biofarmacevtske klasifikacije, izboljšamo raztapljanje, absorpcijo ter biološko uporabnost v primerjavi s samo učinkovino (66).

Študija biološke uporabnosti kokristala L- 883555 s hemivinsko kislino na rhesus opicah je pokazala v primeru kokristala kar 15-kratno povečanje biološke uporabnosti v primerjavi s čisto izhodno spojino (14).

1.7.6 HIGROSKOPNOST

Molekule so v kokristalu med seboj povezane v enotno kristalno rešetko na način, ki temelji na komplementarnosti funkcionalnih skupin in vodikovih vezi, kar v nekaterih primerih inhibira proces vgradnje molekule topila. Stabilnost trdne učinkovine v prisotnosti atmosferske vlage je zelo pomembna za farmacevtsko industrijo, tudi zaradi neželene tvorbe hidratov med procesom izdelave, shranjevanja ter transportom.

Kokristalne ZU so lahko oblikovane tako, da ne tvorijo hidratov ter drugih solvatov. Dober dokaz tovrstne stabilnosti je kokristal karbamazepina z nikotinamidom ali saharinom, ki so ga izpostavili visoki relativni vlažnosti. Ugotovili so, da se pri teh pogojih čisti brezvodni kristalinični karbamazepin pretvori v karbamazepin dihidrat, medtem ko kokristal ne veže vlage ter ostane nespremenjen (18). Podobna študija na kofeinu, ki so jo izvedli Trask in sodelavci (59) kaže, da kokristal kofeina z oksalno kislino, če je izpostavljen visoki relativni vlažnosti, tekom eksperimenta ne tvori hidratov kofeina in ni higroskopen. Kokristali kofeina z malonsko in maleinsko kislino pa vežejo vodo, pride do razpada kokristala in nastanka hidrata kofeina.

1.7.7 POLIMORFIZEM KOKRISTALOV

Za polimorfe je znano, da lahko imajo različne fizikalne in kemijske lastnosti. Ni presenetljivo, da obstajajo tudi polimorfi kokristalov, zanje pa so značilne različne fizikalno-kemijske lastnosti.

Trask in sodelavci so proučevali polimorfne oblike kokristalov kofeina in glutarne kisline v razmerju 1:1, ki so jih pripravili iz raztopine kloroforma s počasnim odparevanjem. Ugotovili so, da sočasno kristalizirata dve različni polimorfni obliki, oblika 1 in oblika 2, ki imata identične medmolekulske povezave. Razlike med oblikama so opazne pri torzijskih kotih pri metilenskem ogljiku v kislinskem delu kokristala. Zanimiva je ugotovitev, da lahko vsako od oblik pripravimo posamično z mehanskim mletjem. V odsotnosti topila, ali ob uporabi nepolarne topila, pride do tvorbe oblike 1, ob uporabi bolj polarne topila pa se tvori oblika 2. Ugotovili so, da je oblika 2 bolj stabilna kar se tiče higroskopske lastnosti; oblika 1 se namreč po izpostavitvi 43 % RV po 24 urah delno pretvori v obliko 2 in popolnoma pretvori v obliko 2 po enodnevni izpostavitvi 75 % RV. Ta primer jasno predstavlja razlike v stabilnosti, ki jih lahko izkazujejo različne polimorfne oblike kokristalov (59).

1.7.8 FARMACEVTSKI KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA

Da je kokristalu dodeljen patent, mora biti tako kot vsi ostali izumi, ki so predmet patentne zaščite, nov, inventiven ter industrijsko uporaben (67). Kokristal je posebna oblika trdne snovi z unikatno in nepredvidljivo strukturo ter svojevrstnim profilom fizikalno kemijskih lastnosti. Kokristalizacija predstavlja alternativen način modifikacije zdravilne učinkovine v trdnem agregatnem stanju, kar pomeni, da ima podobno funkcijo in z njo dosežemo podobno spremembo, kot jo ima bolj uveljavljena tehnika tvorbe soli. Kokristali kot nove in drugačne trdne strukture, ki še niso bili opisani, zadovoljijo zahtevam in kriteriju po novosti za patentibilnost. Kokristali ponujajo tudi možnost ustreznosti kriteriju inventivnosti z ozirom na izboljšanje fizikalnih lastnosti (68).

Farmacevtski kokristali z zdravilno učinkovino imajo večinoma enako terapevtsko uporabnost, kot jo ima sama zdravilna učinkovina in je patentno zaščiten z originatorjevo prijavo. Industrijska uporabnost se v primeru kokristalov dokazuje v prednostih, ki jih imajo kokristali zaradi izboljšanih fizikalno-kemijskih lastnosti v primerjavi s samostojno zdravilno učinkovino. Industrijska uporabnost se nanaša tudi na izvedljivost postopka v industrijskem merilu (68).

Kakor drugi patenti za nove molekulske entitete, so tudi patenti za farmacevtske kokristale pomembni za farmacevtsko industrijo iz več vidikov. Raziskovalne organizacije v splošnem dokaj kmalu izpolnijo patentno prijavo, ki pokriva (se nanaša na) novo kemijsko strukturo zdravilne učinkovine, ko prepoznajo njeno terapevtsko uporabnost ter se na ta način zaščitijo pred konkurenčnimi organizacijami. Patentni zahtevki, ki se nanašajo na kemijsko strukturo zdravilne učinkovine, ponavadi predstavljajo primarni nivo, na katerem patentno zaščitijo farmacevtski produkt (68).

Kot del obširnega patentnega portfelja trdnih snovi, kokristali nudijo izrazito komercialno prednost z ozirom na tržno ekskluzivnost. Kokristali predstavljajo tudi široko področje patentne zaščite z vidika, da obstaja veliko število potencialnih tvorilcev kokristalov s seznama EAFUS in GRAS (68).

1.8 KARVEDILOL

1.8.1 DELOVANJE IN UPORABA

Karvedilol je učinkovina, ki spada v skupino zaviralcev adrenergičnih receptorjev alfa in beta; neselektivno inhibira β -adrenergične receptorje ter selektivno α_1 -adrenergične receptorje (69). Karvedilol širi žile, s tem pa zniža krvni tlak. Ima tudi antioksidativne

lastnosti (70). Kemijsko gledano je ariloksipropanolamin ter racemna zmes R(+) in S(-) enantiomerov, pri čemer ima S(-) enantiomer učinek zaviranja na β -adrenergične receptorje, oba enantiomera pa enako inhibirata α_1 -adrenergične receptorje (71). Karvedilol vsebuje α -hidroksi sekundarno aminske skupino, katere pKa je 7,8. Topnost karvedilola v nevtralnem in alkalnem pH je razmeroma nizka, pri pH 9,0 znaša $<1 \mu\text{g/mL}$.

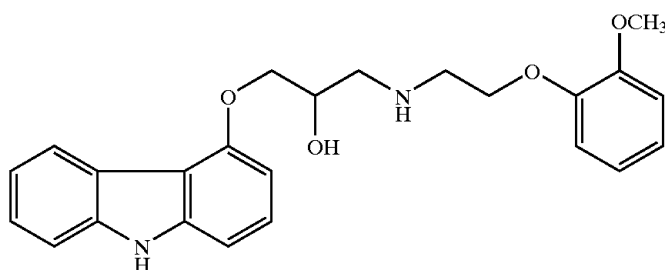
Več kot 98% učinkovine se veže na plazemske proteine, dobro se absorbira iz gastrointestinalnega trakta in se pri prehodu skozi jetra metabolizira s citokromskimi P450 izoencimi CYP2D6 ter CYP2C9. Absolutna biološka uporabnost učinkovine v telesu je okoli 25%. Biološki razpolovni čas učinkovine znaša 6 do 10 ur (72).

Karvedilol se uporablja pri zdravljenju zvišanega krvnega tlaka (esencialna hipertenzija) ter za preprečevanje napadov za prsnico (angina pectoris). Uporablja se tudi za zmanjšanje smrtnosti pri bolnikih z levo ventrikularno disfunkcijo, ki sledi miokardnemu infarktu. Priporočeni največji dnevni odmerek učinkovine je 2x 25 mg (70).

1.8.2 OSNOVNI PODATKI

IUPAC poimenovanje: 1-(karbazol-4-iloksi)-3-[[2-(2-metoksifenoksi)etil]amino]-2-propanol

Strukturna formula:



Molekulska formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$

Molekulska masa: $406,48 \text{ g mol}^{-1}$

Temperatura tališča: $114\text{-}115^\circ\text{C}$ (odvisno od polimorfne modifikacije) (71)

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je priprava kokristalov v vodi težko topne učinkovine, karvedilola, s farmacevtsko sprejemljivimi pomožnimi snovmi. Z mletjem karvedilola in potencialnimi tvorilci kokristalov v določenem stehiometrijskem razmerju želimo pripraviti čim več vzorcev za reševanje kokristalov. Metoda, ki jo bomo izbrali za reševanje kokristalov, je mletje, saj velja za metodo prvega izbora pri reševanju kokristalov.

Kot potencialne tvorilce kokristalov bomo uporabili nabor različnih farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi, ki jih tudi v literaturi najpogosteje zasledimo kot tvorilce kokristalov: 4-aminobenzojska kislina, adipinska kislina, benzojska kislina, biotin, cimetna kislina, citronska kislina, fumarna kislina, glutarna kislina, jabolčna kislina, maleinska kislina, malonska kislina, metilparahidroksibenzoat, natrijev saharinat, nikotinamid, oksalna kislina, salicilna kislina, sukcinski anhidrid, sukcinjska kislina, urea, vinska kislina. Vzorce bomo mleli brez topila in z dodatkom majhnih količin različnih topil. Za primerjavo pri karakterizaciji in vrednotenju bomo pripravili tudi fizikalne zmesi vseh kombinacij karvedilola s pomožnimi snovmi.

Vse izdelane zmesi bomo analizirali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC). Metoda DSC je hitra, enostavna in učinkovita pri reševanju in odkrivanju novih kokristalov, vendar z njo ne moremo potrditi nastanka nove kristalne oblike, saj pozitivne odzive dajejo tudi evtektične zmesi in soli. V primerih, kjer bomo v DSC krivulji zaznali spremembo tališča v primerjavi s tališčem učinkovine oziroma pomožne snovi, bomo vzorce ovrednotili še z metodama IR spektroskopije in rentgenske praškovne difrakcije.

V primeru, da bomo uspešno izdelali kokristal, bomo preučevali tudi njegovo raztapljanje ter primerjali hitrost raztapljanja kokristala s samo zdravilno učinkovino ter v primerjavi s fizikalno zmesjo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje spojine:

- karvedilol (Krka, Slovenija)
- 4-aminobenzojska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- adipinska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- benzojska kislina (Riedel de Haën, Nemčija)
- biotin (Merck, Nemčija)
- cimetna kislina (Merck, Nemčija)
- citronska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- fumarna kislina (Merck, Nemčija)
- glutarna kislina (Merck, Nemčija)
- jabolčna kislina (Merck, Nemčija)
- klorovodikova kislina; HCl, 37% (Merck, Nemčija)
- maleinska kislina (Merck, Nemčija)
- malonska kislina (Merck, Nemčija)
- metilparahidroksibenzoat (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid; NaOH (Merck, Nemčija)
- natrijev saharinat (Merck, Nemčija)
- nikotinamid (Merck, Nemčija)
- oksalna kislina (Merck, Nemčija)
- salicilna kislina (Sigma Aldrich, Nemčija)
- sukcijska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- sukcijski anhidrid (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- urea (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- vinska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)

topila:

- aceton (Merck, Nemčija)
- acetonitil (Riedel de Haën, Nemčija)

- etanol (Merck, Nemčija)
- prečiščena voda
- tetrahidrofur (Merck, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)

ter laboratorijski pribor:

- steklovina (čase, merilni valji, epruvete, erlenmajerice)
- pipete
- 70% EtOH v pršilki
- filtri Minisart® RC 25 0,45µm (Sartorius, Nemčija)
- parafilm® M (Pechiney Chicago, USA)
- škarje, ura

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje aparature:

- Analizna tehtnica, A-150-sx, Cobos, Španija
- Tehtnica Exacta 300 EB, Železniki, Slovenija
- Analizna tehtnica Mettler Toledo AG 245, Švica
- Vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija
- IR spektroskop Thermo Nicolet SMART DuraSampl IR, Nexus FT-IR
- Naprava za raztapljanje Erweka DT6
- Spektrofotometer Hewlett Packard, HP8453, UV-Visible spectroscopy system, Nemčija
- Osebni računalnik Hewlett Packard Vectra XA povezan z UV spektrofotometrom
- Naprava za merjenje pH raztopin: pH meter Mettler Toledo MA235, Švica
- Diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STAR^e Software v9.30, Švica
- Magnetno mešalo MM-531, Železniki, Slovenija
- Vrstični elektronski mikroskop (SEM): FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija

3.2 METODE

Priprava vzorcev za rešetanje kokristalov z metodo mletja

Potencialne kokristale smo izdelovali z mletjem v vibracijskem mlinu Pulverisette 0, proizvajalca Fritsch (Idar-Oberstein, Nemčija) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani (slika 12). V možnar smo nasuli zatehtane količine predhodno zmletih učinkovine ter pomožne snovi v določenem stehiometrijskem razmerju v skupni masi 2g. Najprej smo metodo mletja izvedli brez dodatka topila, nato pa še z dodatkom 100 μL topila. Vsak vzorec smo nato mleli 20 min, pri 3,000-3,600 nihajev/min pri amplitudi 1-3 mm. Vse posamezne uporabljene snovi smo posamično predhodno mleli v vibracijskem mlinu po 15 minut pri istih nastavitvah.

Vibracijski mlin melje vzorec s trenjem, drgnjenjem in zadevanjem krogle ob vzorec v možnarju. Možnar vibrira elektromagnetno, s pomočjo elektromotorja, vibracije pa se prenesejo iz krogle na mleti material in obratno. Na začetku mletja je manjšanje grobih delcev posledica udarcev krogle ob delce, kasneje pa so drobni delci zmleti z drgnjenjem materiala med kroglo in dnom možnarja. Material se nenehno poseda zaradi vibracij, zato se tudi dobro premeša. Energijo udarca in trka krogle ob steno možnarja lahko poljubno nastavljamo, kar dovoljuje precizno prilagajanje pogojev mletja vzorca, ki ga meljemo (73).



Slika 12. Vibracijski mlin Pulverisette 0 Fritsch (73)

Priprava fizikalnih zmesi

Fizikalne zmesi smo pripravili tako, da smo najprej vsako posamezno čisto snov mleli 15 minut v vibracijskem mlinu Pulverisette 0 Fritsch. Nato smo zatehtali količini učinkovine in pomožne snovi v določenem stehiometrijskem razmerju in ju nasuli v ahatno terilnico, kjer smo ju s pestilom rahlo zmešali.

DSC termična analiza

DSC krivulje so bile izdelane z instrumentom Mettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.30 na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi, pretok dušika je znašal 40 mL/min. Hitrost segrevanja je znašala 3K/min.

IR spektroskopija

IR spektre vzorcev smo posneli s spektrofotometrom Thermo Nicolet (Norcross ZDA) SMART DuraSampl IR, Nexus FT-IR z uporabo ATR metode (angl. Attenuated Total Reflectance – oslABLjena popolna odbojnost) in diamantnega kristala na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Meritve smo izvedli direktno na posameznih substancah oz. na kokristalih brez predpriprave vzorcev, pri sobni temperaturi.

Rentgenska praškovna difrakcija

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

Preskus raztapljanja

Preskus raztapljanja smo izvedli po Ph. Eur. 6thEd, poglavje 2.9.3 (74), pri čemer smo uporabili napravo z vesli Erweka DT6 na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Raztapljali smo maso kokristalov, ki je vsebovala 25 mg učinkovine, kar ustreza največjemu enkratnemu odmerku te učinkovine. Za preskus raztapljanja smo uporabili dva različna medija, in sicer fosfatni pufer (pH 6,8) ter kisel medij (pH 1,2).

Ob določenih časovnih intervalih (1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) smo ročno z brizgo odvzeli 10 mL vzorca iz raztopine ter ga filtrirali z uporabo filtra Minisart® RC 25

0,45 μm (Sartorius, Nemčija). Prostornine odvzetega vzorca nismo nadomeščali, zato smo pri računanju upoštevali njeno izgubo. Poskus smo izvedli v treh paralelah, v 900 mL ustreznega pufra, temperatura medija je znašala $37 \pm 0,5$ °C, hitrost mešanja pa 50 obratov na minuto.

Koncentracijo učinkovine iz odvzetih vzorcev smo določili spektrofotometrično z UV-VIS spektrofotometrom Hewlett Packard, HP8453 (Nemčija) na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani z merjenjem absorbance pri 332 nm in računanjem na osnovi umeritvene premice. Absorbanco smo pomerili v kiveti iz kvarčnega stekla in potjo žarka 1,0 cm.

Priprava medijev za raztapljanje

- a) Fosfatni pufer pH 6,8 : 6,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija) in 0,9 g NaOH (Merck, Nemčija) smo natehtali v 1000 mL bučko ter dopolnili s prečiščeno vodo do oznake ter vsebino mešali na magnetnem mešalu MM-531. Nato smo preverili pH z napravo za merjenje pH raztopin pH meter Mettler Toledo MA235 (Švica).
- b) HCl pH 1,2 : 8,5 ml 37% HCl (Merck, Nemčija) smo zlili v 1000 mL bučko ter s prečiščeno vodo dopolnili do oznake.

Vrstični elektronski mikroskop

Kokristale smo analizirali z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM, angl. Scanning Electron Microscope). Praškaste delce kokristalov smo pripeli na obojestranski ogljikov lepilni trak (premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, UK). Slike smo posneli na sistemu Supra 32VP (Zeiss, Oberkochen, Nemčija) s pospeševalno hitrostjo 1,0 kV in sekundarnim detektorjem na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 PREGLED REZULTATOV OPRAVLJENEGA REŠETANJA Z METODAMA DSC IN XRPD

Namen rešetanja kokristalov je bil najti pomožne snovi, ki dajo kristalno obliko s spremenjenimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi v primerjavi z lastnostmi karvedilola. V ta namen smo uporabili 20 potencialnih tvorilcev kokristala, ki so široko uporabljene in znane farmacevtsko sprejemljive pomožne snovi. Z vsakim potencialnim tvorilcem kokristala smo pripravili 6 različnih vzorcev, in sicer fizikalno zmes, vzorec, kjer smo komponenti mleli brez topila, ter 4 vzorce, kjer smo komponenti mleli s 100 μ L posameznega topila (EtOH, aceton, tetrahidrofuran (THF), acetonitril). Rezultati mletja so prikazani v preglednicah III in IV.

Vzorci, ki smo jih pripravili z mletjem, smo analizirali z metodo DSC. Metoda DSC je zelo uporabna pri rešetanju in odkrivanju nastalih kokristalov, vendar metoda ni selektivna, saj samo na podlagi rezultatov te analize ne moremo potrditi nastanka nove kristalne oblike. Določene odzive na DSC spektru kažejo tudi evtektične zmesi in nastale soli. V primerih, kjer smo v DSC krivuljah zaznali interakcije, smo vzorce analizirali še z rentgensko praškovno difrakcijo, s katero je mogoče potrditi nastanek nove kristalne oblike.

Na podlagi DSC ter XRPD analiz smo izbrali vzorce, ki so kazali možnost nastanka kokristala. Te vzorce smo okarakterizirali še z IR spektroskopsko analizo. Vzorce, ki že pri DSC analizi niso kazali nobene spremembe na DSC spektru, smo izločili iz nadaljnje raziskave.

Pri vzorcih, kjer smo kot potencialni tvorilec kokristala uporabili benzojsko, oksalno in salicilno kislino, zaznamo tako pri DSC, kakor tudi pri XRPD analizi spremembe, kar nakazuje nastanek nove kristalne oblike. Pri vzorcih z biotinom, natrijevim saharinatom, nikotinamidom, metilparahidroksibenzoatom in ureo pa spremembe zaznamo le pri DSC analizi (znižanje tališča), pri XRPD pa ne. Na podlagi tega lahko sklepamo, da ne gre za nastanek nove kristalne oblike, temveč za nastanek evtektične zmesi.

Preglednica III. Pregled uporabljenih potencialnih tvorilcev kokristalov za reševanje z metodo mletja s karvedilolom ter prikaz zaznanih interakcij z DSC ter XRPD analizami

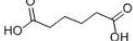
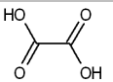
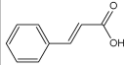
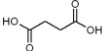
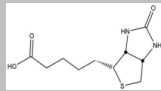
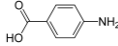
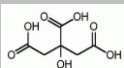
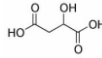
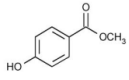
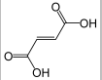
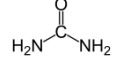
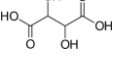
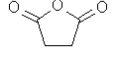
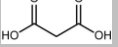
Potencialni tvorilec kokristala	Zaznane interakcije v mleti zmesi karvedilola in pomožne snovi	
	DSC	XRPD
benzojska kislina	+	+
oksalna kislina	+	+
salicilna kislina	+	+
biotin	+	-
natrijev saharinat	+	-
nikotinamid	+	-
metilparahidroksibenzoat	+	-
urea	+	-
adipinska kislina	-	/
4-aminobenzojska kislina	-	/
cimetna kislina	-	/
citronska kislina	-	/
fumarna kislina	-	/
glutarna kislina	-	/
jabolčna kislina	-	/
maleinska kislina	-	/
malonska kislina	-	/
sukcinski anhidrid	-	/
sukcinska kislina	-	/
vinska kislina	-	/

+ zaznamo interakcije med komponentama

- interakcije niso zaznane

/ : XRPD analize nismo izvajali, ker z DSC analizo nismo zaznali spremembe

Preglednica IV. Rezultati eksperimentov rešetanja za pripravo kokristalov karvedilola (✓ označuje interakcije v mleti zmesi, X pa odsotnost interakcij)

TVORILEC KOKRISTALA	Stehiomet rijsko razmerje	UPORABLJE NA TOPILO PRI MLETJU					TVORILEC KOKRISTALA	Stehiomet rijsko razmerje	UPORABLJENA TOPILO PRI MLETJU				
		Brez toplila	EtOH	Aceton	THF	Acetonitril			Brez toplila	EtOH	Aceton	THF	Acetonitril
Salicilna kislina 	1:1 1:2 [*] , 2:1 [*] 3:2 [*] , 2:3 [*]	✓	✓	✓	✓	✓	Adipinska kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Oksalna kislina 	1:1 1:2 [*] , 2:1 [*]	✓	✓	✓	✓	✓	Cimetna kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Benzojska kislina 	1:1 1:2 [*] , 2:1 [*] 3:2 [*] , 2:3 [*]	✓	✓	✓	✓	✓	Sukcinska kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Biotin 	1:1	X	X	X	X	X	Glutarna kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Maleinska kislina 	1:1	X	X	X	X	X	PABA 	1:1	X	X	X	X	X
Natrijev saharinat 	1:1	X	X	X	X	X	Citronska kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Nikotinamid 	1:1	X	X	X	X	X	Jabolčna kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Metilparaben 	1:1	X	X	X	X	X	Fumarna kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Urea 	1:1	X	X	X	X	X	Vinska kislina 	1:1	X	X	X	X	X
Sukcinski anhidrid 	1:1	X	X	X	X	X	Malonska kislina 	1:1	X	X	X	X	X

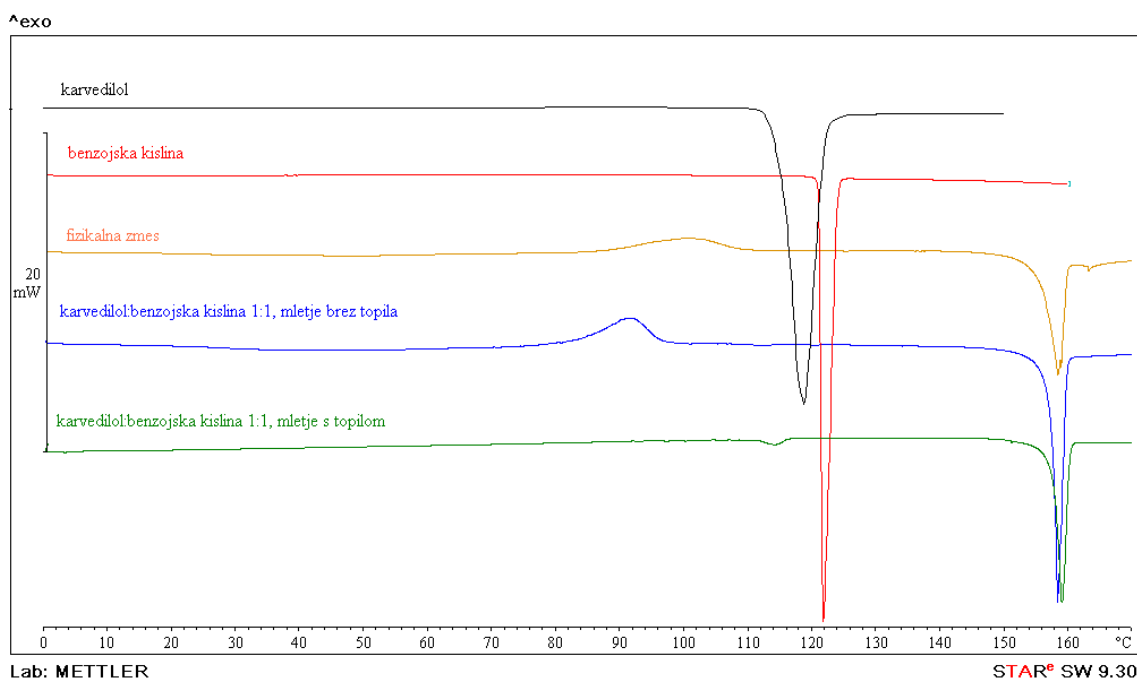
*: eksperimenti z stehiometrijskimi razmerji 1:2, 2:1, 2:3, 3:2 kažejo, da pri danih pogojih mletja nastane samo 1:1 kokristal; saj pri naštetih razmerjih v DSC krivulji vidimo še talilne vrhove presežnih količin nezreagiranih komponent.

V nadaljevanju so predstavljeni rezultati mletih zmesi, kjer smo s termično analizo zaznali interakcije med komponentama v mleti zmesi. Pri teh vzorcih smo izvedli dodatne analize (XRPD, IR) in poskusili razložiti, do kakšnih interakcij je prišlo.

4.2 MLETJE ZMESI KARVEDILOL : BENZOJSKA KISLINA = 1:1

4.2.1 DSC TERMIČNA ANALIZA

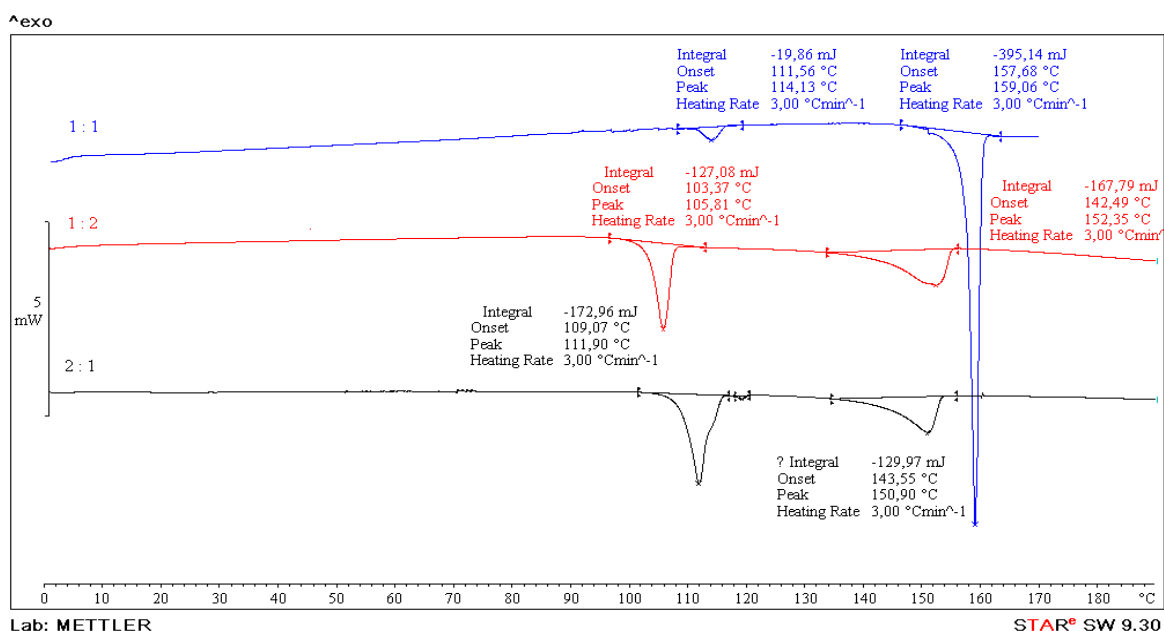
Slika 13 prikazuje DSC krivulje čistega karvedilola ter benzojske kisline v primerjavi s fizikalno zmesjo in z vzorci, ki smo jih pripravili z mletjem. Razvidno je, da ima mleta zmes višje tališče kot obe posamični komponenti. Zanimivo je, da opazimo tudi pri fizikalni zmesi v DSC krivulji podobno obnašanje kot pri mleti zmesi. Rezultati nakazujejo interakcije, do katerih pride že po kratkem mešanju obeh komponent s pestilom v ahatni terilnici, kar kaže tudi na veliko mobilnost molekul.



Slika 13. DSC krivulje karvedilola, benzojske kisline, fizikalne zmesi ter mletih zmesi karvedilol : benzojska kislina brez in z dodatkom topila v molskem razmerju 1:1

V DSC krivulji mlete zmesi karvedilol-benzojska kislina, pripravljenega z mletjem brez topila je viden endotermen in eksotermen vrh. Izrazit endotermni vrh najverjetneje predstavlja tališče kokristala, ki znaša 157,4°C. Tališče je ozko in se razlikuje od tališč karvedilola (115°C) in benzojske kisline (121°C). Opazimo tudi, da pride pri mletju brez dodatka topila do rekristalizacije bodisi amorfne oblike učinkovine, ki se lahko tvori pri mletju ali rekristalizacije kokristala, lahko pa pride tudi do prehoda kokristala trdno-trdno.

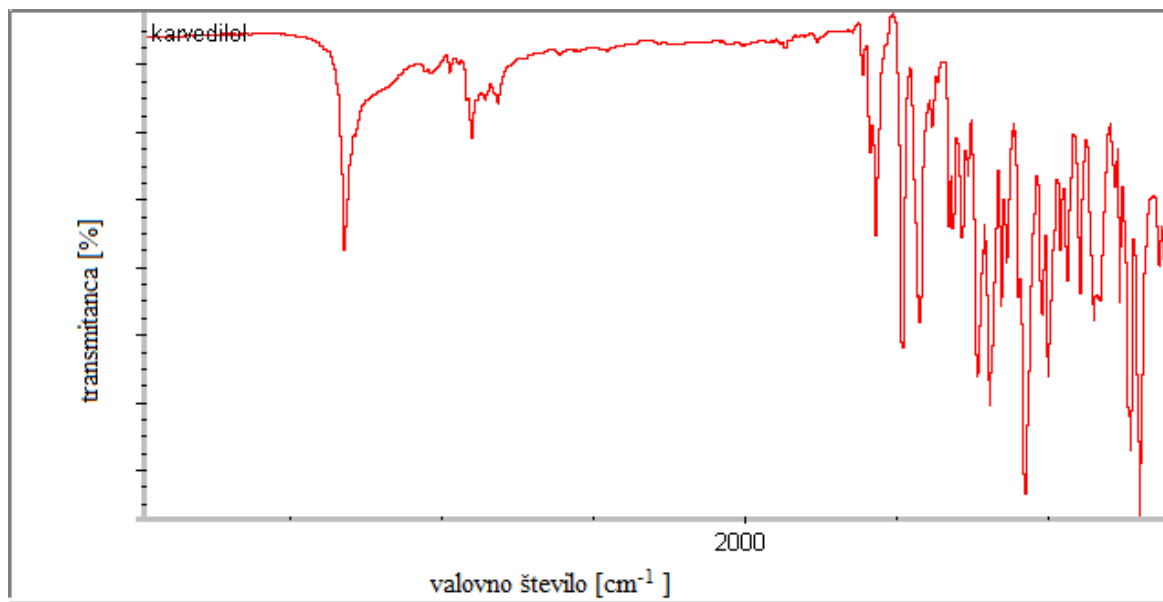
Omenjen pojav je v DSC krivulji viden kot eksotermni vrh pri pribl. 90°C. Podoben pojav opazimo tudi pri fizikalni zmesi kar nakazuje možen mehanizem kokristalizacije z difuzijo in/ali preko amorfnе faze. Preverili smo tudi, ali mletje povzroči spremembo tališča benzojske kisline in ugotovili, da se tališče same benzojske kisline z mletjem ne spremeni, medtem ko lahko z mletjem izdelamo amorfnо obliko karvedilola. DSC krivulja mlete benzojske kisline se popolnoma sklada z DSC krivuljo nemlete benzojske kisline in zaradi preglednosti na sliki 13 ni prikazana. Tudi če mleto zmes pripravimo z dodatkom 100 μ L topila (EtOH, aceton, THF, acetonitril), tališče le-te ostane nespremenjeno in znaša 157,7°C, medtem ko rekristalizacije ne zaznamo. Pri pripravi mlete zmesi z dodatkom 100 μ L topila (EtOH; acetonitril; THF) opazimo v DSC krivulji (vse krivulje zaradi preglednosti niso podane) poleg tališča kokristala pri 157°C še en majhen endotermni vrh pri približno 111°C, kar je zelo blizu tališča čistega karvedilola. Predvidevamo, da reakcija kokristalizacije ni potekla do konca. Da nastane nova kristalna oblika v stehiometrijskem razmerju obeh komponent 1:1, potrjujejo DSC analize vzorcev s stehiometrijskim razmerjem komponent 1:2 in 2:1. Na DSC krivuljah omenjenih vzorcev (slika 14) namreč poleg talilnega vrha mlete zmesi opazimo še talilne vrhove presežnih količin ene od komponent. Znižanje tališča kokristala je posledica njegovega raztapljanja v prebitni komponenti.



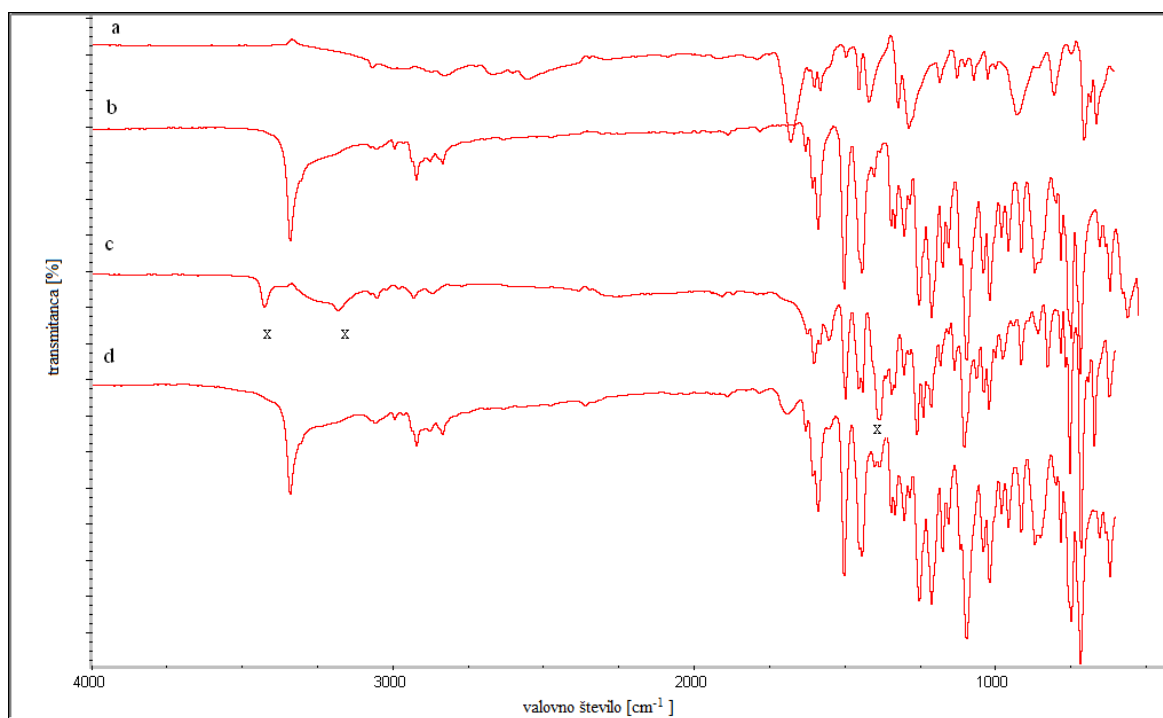
Slika 14. Vzroci, pripravljene z mletjem s topilom, z različnimi stehiometrijskimi razmerji karvedilola in benzojske kisline

4.2.2 IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

IR spekter karvedilola (slika 15) predstavlja specifične absorpcijske trakove z vrhovi pri 3344,3 (O-H in N-H valenčna nihanja skupaj), 2922, 2879,5 in 2839 cm^{-1} (C-H valenčno nihanje), 1591,2 cm^{-1} (N-H deformacijsko nihanje) in 1255,6 cm^{-1} (O-H deformacijsko in C-O valenčno nihanje) (69).



Slika 15. IR spekter karvedilola

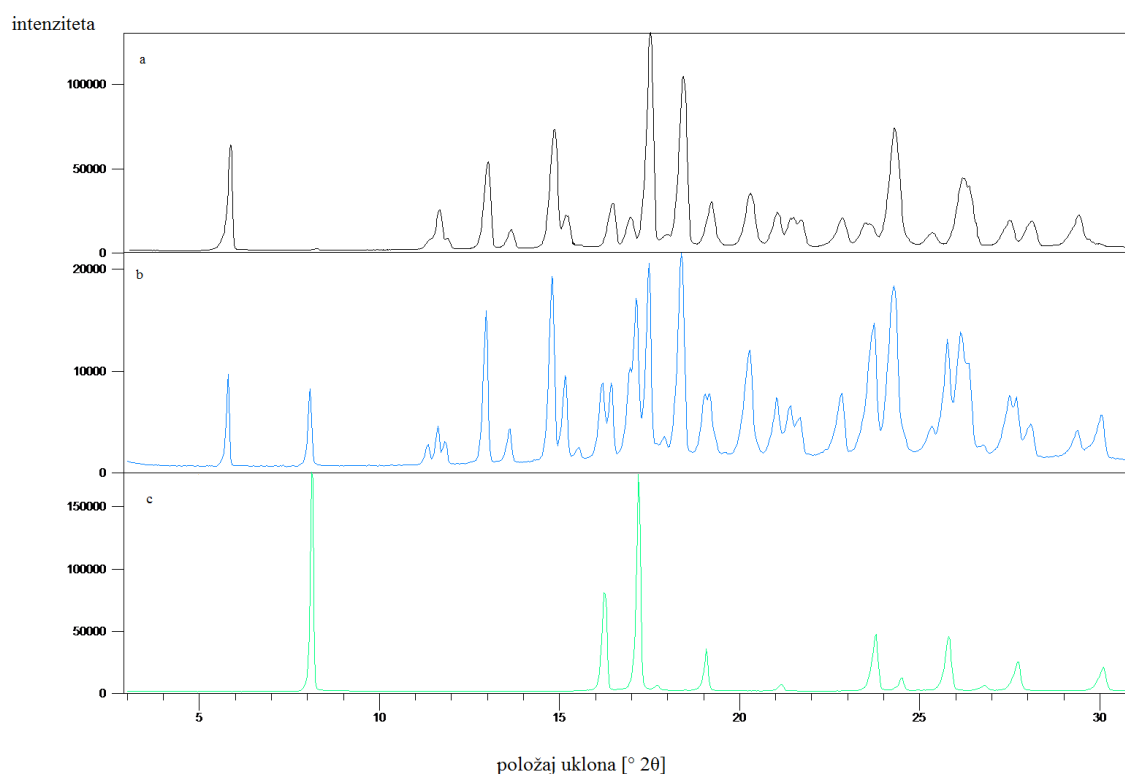


Slika 16. IR spekter (a) benzojska kislina; (b) karvedilol; (c) mleta zmes karvedilol : benzojska kislina = 1:1 z 100 μl EtOH; (d) fizikalna zmes karvedilol:benzojska kislina = 1:1

IR spekter mlete zmesi karvedilol-benzojska kislina se razlikuje od spektrov karvedilola in benzojske kisline ter od fizikalne zmesi obeh komponent (slika 16). V IR spektru mlete zmesi (slika 16, c) so označeni trije dodatni absorpcijski trakovi, ki jih v spektru karvedilola in benzojske kisline ne zaznamo, in sicer pri 3424 , 3175 in 1379 cm^{-1} . Na podlagi teh podatkov lahko sklepamo, da je prišlo do tvorbe drugačnih vezi, kot so prisotne v obeh čistih izhodnih komponentah. Opazimo tudi, da v spektru mlete zmesi izgine izrazit absorpcijski trak karvedilola pri cca. $3344,3\text{ cm}^{-1}$.

4.2.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRPD)

Iz difraktogramov karvedilola, benzojske kisline in mlete zmesi karvedilol : benzojska kislina (slika 17) je razvidno, da se difraktogram mlete zmesi razlikuje od superpozicije difraktogramov karvedilola in benzojske kisline. To potrjuje, da je pri poizkusu priprave kokristalov z metodo mletja s topilom nastala nova kristalna struktura.

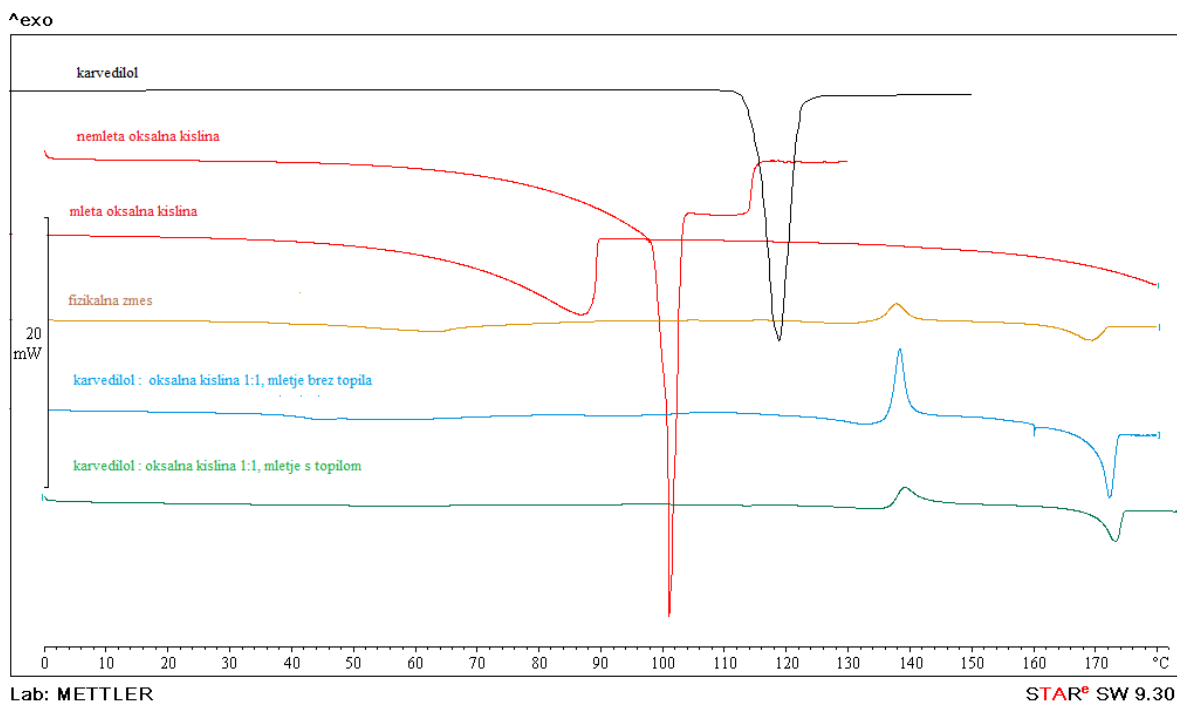


Slika 17. Praškovni difraktogrami (a) karvedilol; (b) mleta zmes karvedilol:benzojska kislina = 1:1 ob dodatku topila; (c) benzojska kislina; y-os predstavlja relativno intenziteto

4.3 MLETJE ZMESI KARVEDILOL : OKSALNA KISLINA = 1:1

4.3.1 DSC TERMIČNA ANALIZA

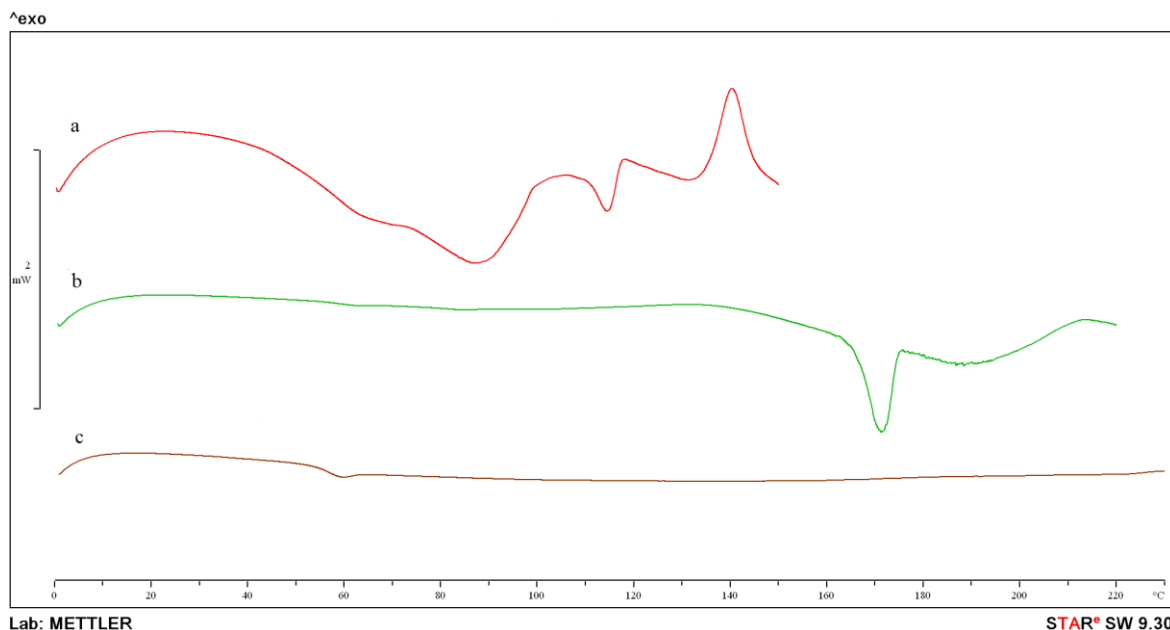
Slika 18 prikazuje razlike v DSC krivuljah čistega karvedilola ter benzojske kisline v primerjavi s fizikalno zmesjo in z vzorci, ki smo jih pripravili z mletjem. Pri vzorcu, pripravljenim z mletjem opazimo eksotermni in endotermni vrh. Endotermni vrh predstavlja tališče nove kristalne oblike, ki znaša 169,5°C in se razlikuje od tališča karvedilola (pribl. 115°C) ter tališča oksalne kisline (100,3°C). Razvidno je, da ima vzorec, pripravljen z mletjem, višje tališče kot obe posamični komponenti. Tališče same oksalne kisline se z mletjem spremeni (slika 18). Vzroki za spremembo tališča snovi so lahko naslednji: sprememba kristalne oblike (oksalna kislina obstaja v dveh polimorfnih oblikah), sprememba velikosti delcev zaradi mletja ali sprememba tališča zaradi prisotnosti vlage.



Slika 18. DSC krivulje karvedilola, oksalne kisline, fizikalne zmesi in mletih zmesi karvedilol : oksalna kislina brez in z dodatkom topila v molskem razmerju 1:1

Na DSC krivuljah (slika 18), ki prikazujeta vzorec, ki smo ga pripravili z mletjem, lahko poleg endotermnega talilnega vrha nove kristalne oblike opazimo še eksotermen vrh. Slednji je lahko posledica amorfizacije karvedilola ali kokristala (mlete zmesi), do česar pride podobno kot v primeru benzojske kisline že v fizikalni zmesi. Zmes kristalizira pri temperaturi približno 135°C. Tudi v tem primeru smo ugotovili, da nastane nova kristalna

oblika v stehiometrijskem razmerju obeh komponent 1:1, saj smo pri ostalih razmerjih opazili taljenje presežnih količin ene od komponent.



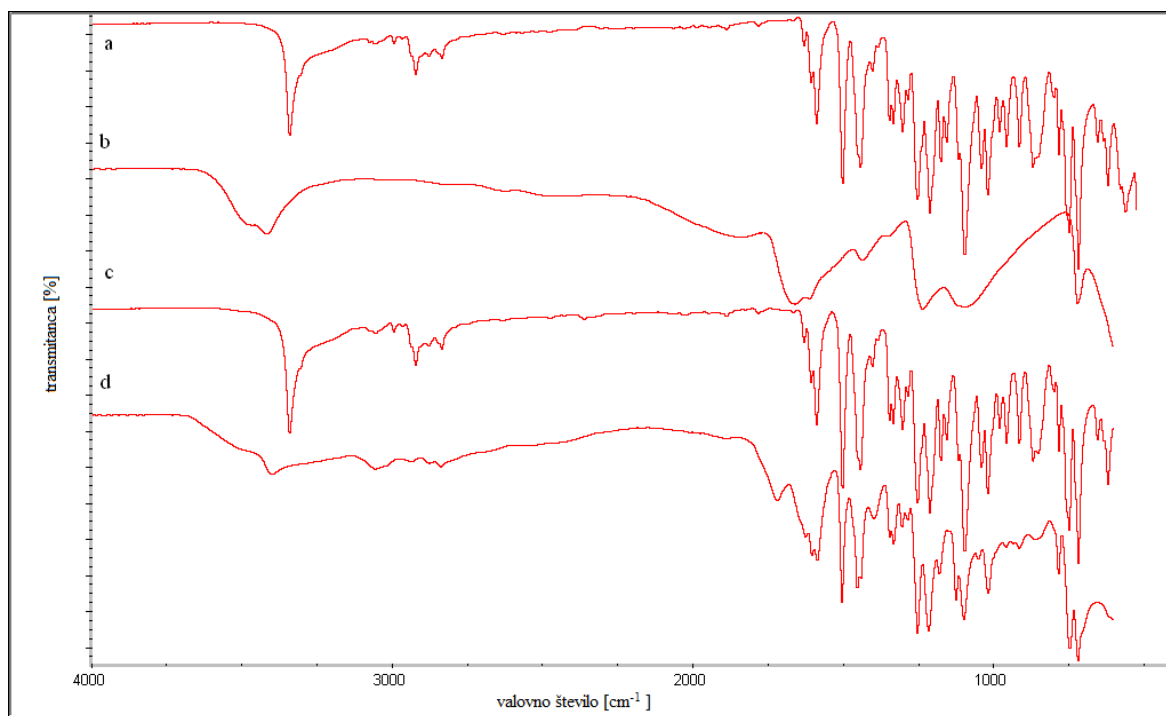
Slika 19. DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in oksalne kisline v stehiometrijskem razmerju 1 : 1, trikratno segrevanje (a) prvo segrevanje; (b) drugo segrevanje; (c) tretje segrevanje

Z namenom razjasnitve mehanizma tvorbe kokristala med karvedilolom in oksalno kislino smo opravili tudi trikratno segrevanje fizikalne zmesi obeh komponent z vmesnimi ohlajanji. Iz DSC krivulje segrevanja fizikalne zmesi (slika 19) lahko predpostavimo, da med obema komponentama nastane evtektična zmes, ki kristalizira pri pribl. 140 °C. V krivulji a opazimo tudi talilni vrh, ki najverjetneje predstavlja taljenje prebitnega karvedilola. Možni mehanizmi, ki sodelujejo pri tvorbi kokristala so difuzija molekul v trdnem in nastanek amorfnе zmesi komponent. Ohlajanje rekristalizirane zmesi in njeno ponovno segrevanje kaže odsotnost prej opisanih termičnih efektov in taljenje kokristala pri približno 170 °C (slika 19, krivulja b). Ko to talino ohladimo, pride z ohlajanjem taline do tvorbe amorfnе oblike obeh komponent v zmesi. Nastanek amorfnega stanja potrjuje krivulja c, na kateri opazimo steklasti prehod zmesi pri pribl. 60 °C, kar je višje od steklastega prehoda same učinkovine (T_g karvedilola znaša 39 °C). Pojav je zanimiv zaradi možne stabilizacije amorfnе oblike učinkovine ob dodatku oksalne kisline.

4.3.2 IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

IR spekter mlete zmesi se razlikuje od spektrov karvedilola in oksalne kisline. Da ne gre le za zmes, temveč za kokristal, potrjujejo spremembe oblik, intenzitete in položajev več absorpcijskih trakov v spektru kokristala (slika 20) (75). V IR spektru mlete zmesi karvedilol:oksalna kislina vidimo več razširjenih absorpcijskih trakov, ki lahko nakazujejo na nastanek vodikove vezi. Tako so vidni razširjeni absorpcijski trakovi pri 3394, 3056 in 1716 cm^{-1} . Položaji teh absorpcijskih trakov se ne skladajo s položaji absorpcijskih trakov v spektrih karvedilola in oksalne kisline.

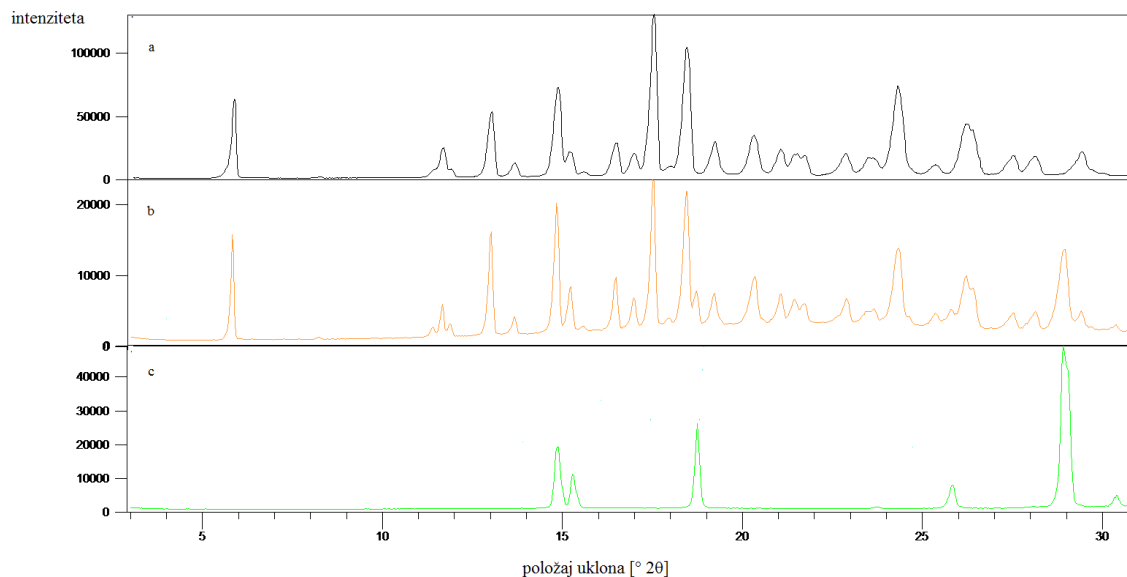
Predvsem IR spektroskopska analiza omogoča tudi razlikovanje med soljo in kokristalom, kar temelji na podlagi lokacije protona med kislino in bazo (76). Karboksilna skupina kaže močno vibracijsko nihanje C=O vezi pri pribl. 1700 cm^{-1} (1700 – 1725), pri soleh pa je nihanje te vezi premaknjeno k nižjim valovnim številom (75, 76), in sicer pri 1550 – 1610 cm^{-1} . V IR spektru oksalne kisline opazimo nihanje C=O vezi karboksilne kisline pri pribl. 1700 cm^{-1} . Absorpcijski trak, ki predstavlja nihanje te vezi v vzorcu karvedilol:oksalna kislina, se nahaja pri 1716 cm^{-1} . Ker ni prišlo do signifikantnega premika tega absorpcijskega traku k nižjim valovnim številom lahko predpostavimo, da ni prišlo do prenosa protona iz oksalne kisline na karvedilol, nastali kristal karvedilola in oksalne kisline pa je kokristal.



Slika 20. IR spekter (a) karvedilol; (b) oksalna kislina; (c) fizikalna zmes karvedilol in oksalna kislina; (d) karvedilol : oksalna kislina = 1:1, mletje s topilom

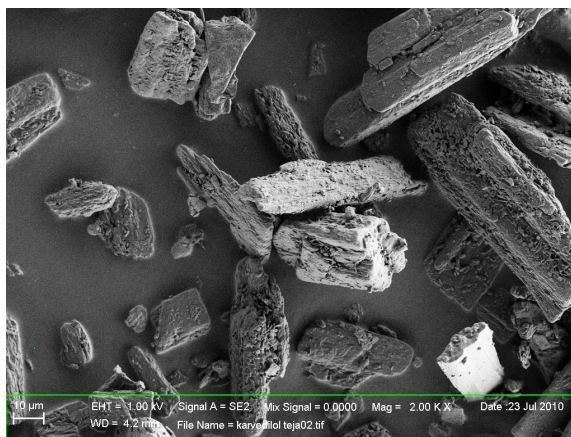
4.3.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (XRPD)

Iz difraktogramov karvedilola, oksalne kisline in mlete zmesi karvedilol : oksalna kislina (slika 21) je razvidno, da se difraktogram mlete zmesi malo razlikuje od superpozicije difraktogramov karvedilola in oksalne kisline.

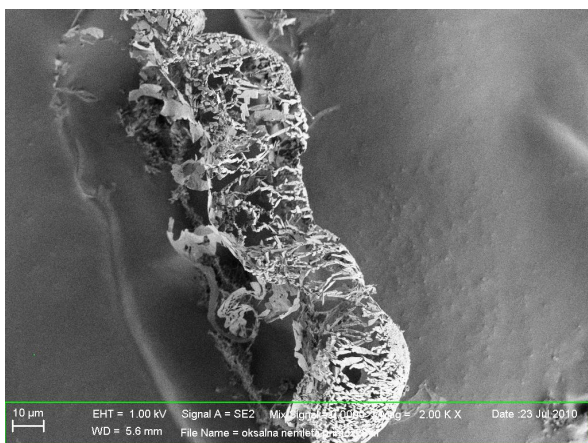


Slika 21. Praškovni difraktogram (a) karvedilol; (b) mleta zmes karvedilol:oksalna kislina = 1:1 ob dodatku topila; (c) oksalna kislina; y-os predstavlja relativno intenziteto

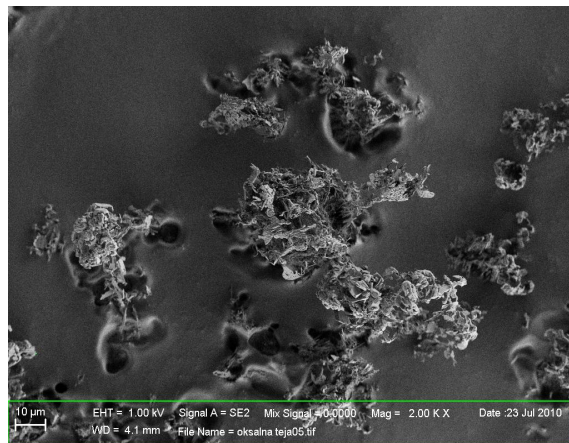
4.3.4 ANALIZA DELCEV Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM



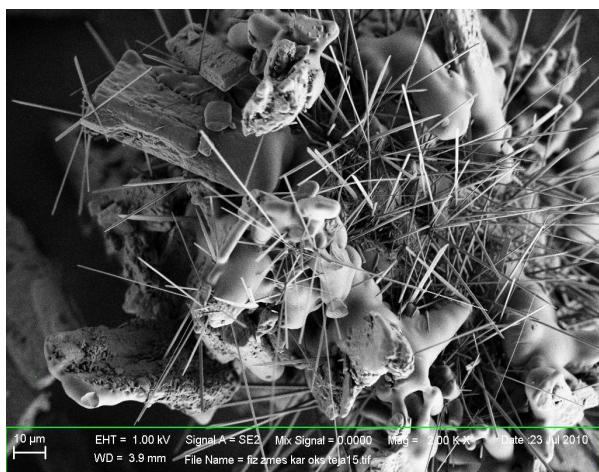
Slika 22. Karvedilol pred mletjem (2000-kratna povečava)



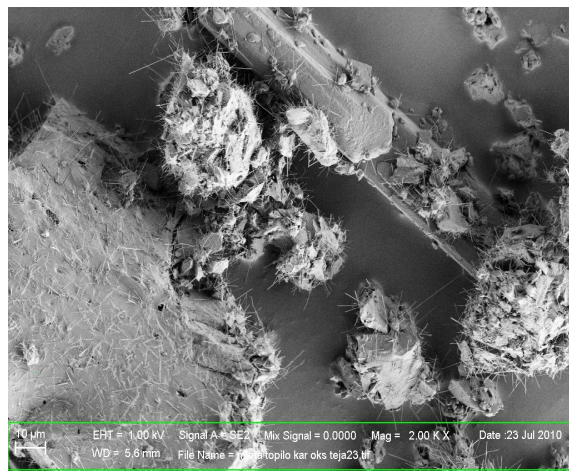
Slika 23. Nemleta oksalna kislina



Slika 24. Oksalna kislina po 15 min mletju



Slika 25. Fizikalna zmes karvedilola in oksalne kisline



Slika 26. Mleta zmes karvedilol : oksalna kislina, mletje s topilom

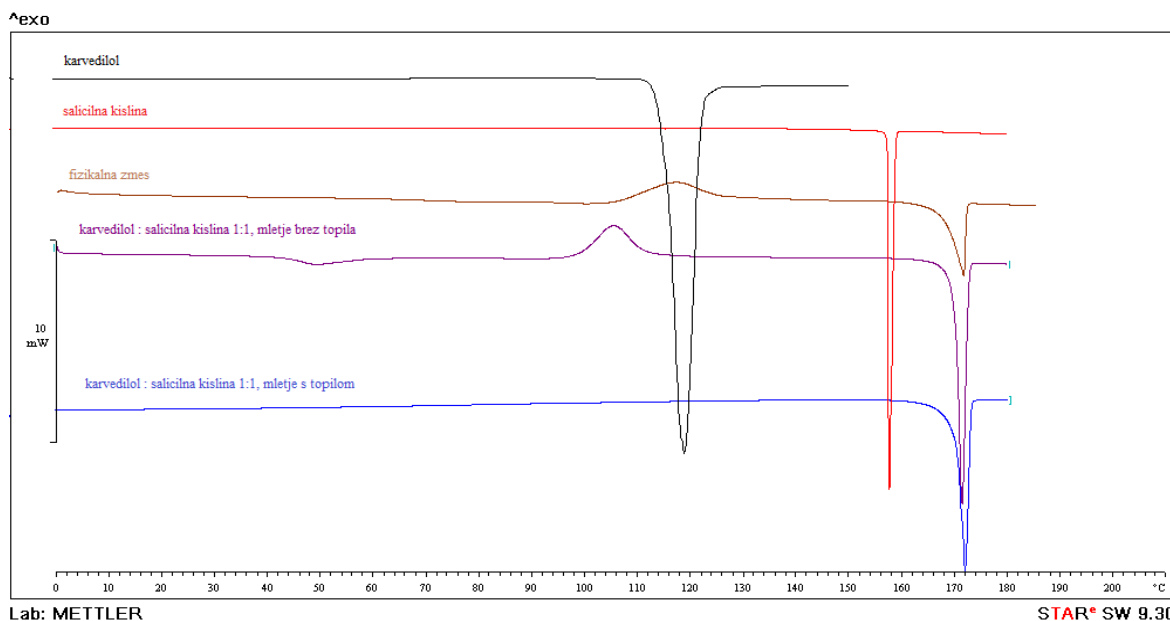
Slike 23 – 26 so posnete z 2000-kratno povečavo.

S pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa smo želeli preveriti, kako mletje vpliva na velikost nastalih kokristalov. Primerjali smo velikost in strukturo izhodnih komponent ter nastalih kokristalov. Iz slik je razvidno, da se pri mletju zmanjša velikost delcev, kar opazimo če primerjamo sliki nemlete in mlete oksalne kisline (sliki 23 in 24). Slika fizikalne zmesi pojasnjuje, da že po kratkočasnem stiku obeh komponent pride do interakcij med njima (pojav iglic, slika 25). Podobno sliko dobimo tudi po mletju (slika 26).

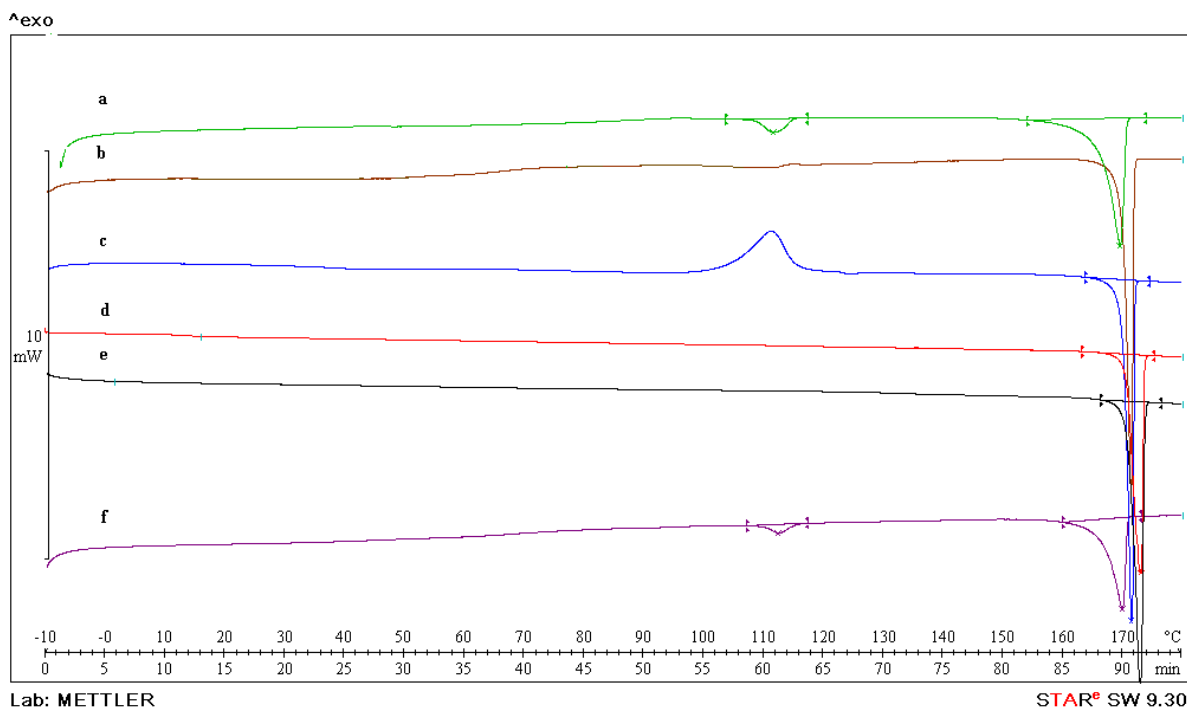
4.4 MLETJE ZMESI KARVEDILOL : SALICILNA KISLINA = 1 : 1

4.4.1 DSC TERMIČNA ANALIZA

Slika 27 prikazuje DSC krivulje čistega karvedilola ter salicilne kisline v primerjavi s fizikalno zmesjo in z vzorci, ki smo jih pripravili z mletjem. Pri vzorcu, ki smo ga pripravili z mletjem s topilom opazimo izrazit oster endotermen vrh, ki najverjetneje predstavlja tališče nove kristalne oblike (170°C), ki je višje od posameznih komponent in se razlikuje od tališča karvedilola (115°C) in salicilne kisline (159°C). DSC krivulja mlete zmesi, kjer smo obe komponenti mleli z dodatkom topila, se razlikuje od DSC krivulje mlete zmesi, brez dodatka topila. DSC krivulja mlete zmesi karvedilola in salicilne kisline brez dodatka topila (vijolična črta na sliki 27) prikazuje poleg endotermnega talilnega vrha še eksotermen vrh pri 105°C . Možno je, da pride do rekristalizacije amorfne oblike učinkovine, ki se tvori pri mletju zmesi brez dodatka topila ali rekristalizacije kokristala, ali pa pride do prehoda trdno-trdno.



Slika 27. DSC krivulje karvedilola, salicilne kisline, fizikalne zmesi in mletih zmesi karvedilol : salicilna kislina brez in z dodatkom topila v molskem razmerju 1:1



Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.30

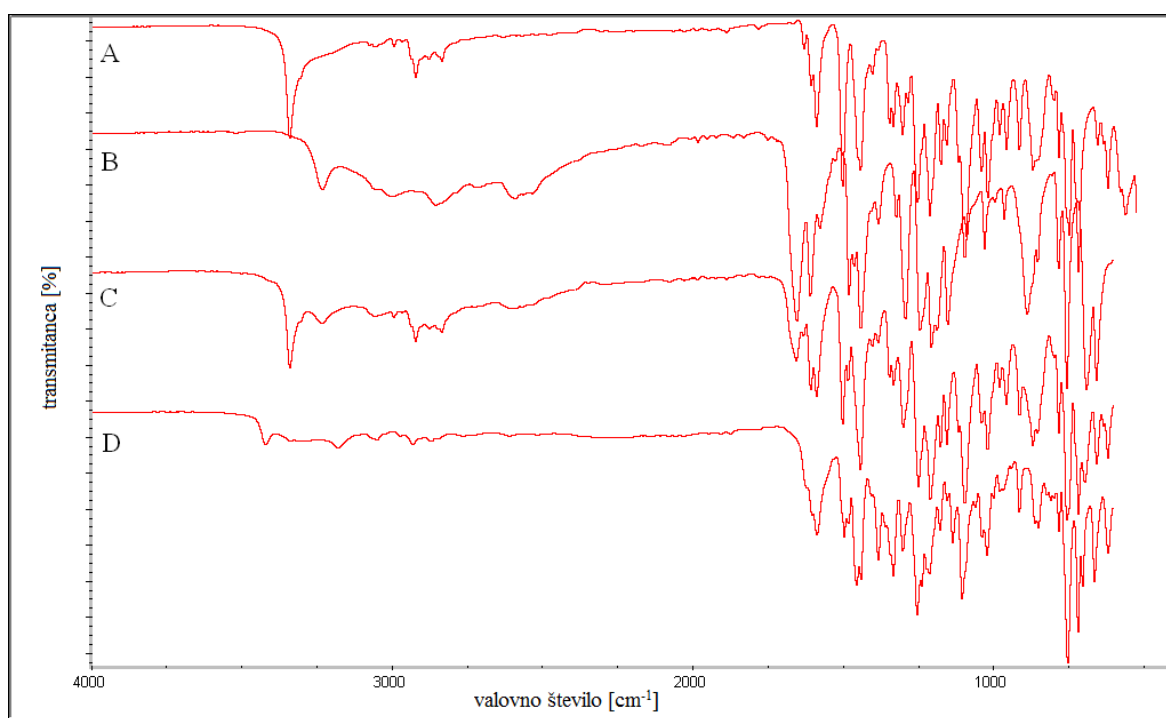
Slika 28. DSC krivulje karvedilol : SA = 1:1, mletje s topilom (a)EtOH, (b)acetone, (c)heksan, (d)acetonitril, (e)metanol, (f)THF

Pri vzorcih, kjer smo komponenti kokristala mleli z dodatkom topila v DSC krivuljah (slika 28) opazimo izrazit ozek endotermni vrh, ki predstavlja tališče nove kristalne oblike. Iz DSC krivulj lahko opazimo, da ima izbira topila velik pomen pri nastanku in čistoti kokristala. Če uporabimo pri mletju etanol ali THF, v DSC krivulji opazimo še en majhen endotermni vrh. Predvidevamo, da pride do taljenja ene od komponent. Ker je talilni vrh bližje tališču karvedilola sklepamo, da pride do taljenja karvedilola. Če pri mletju uporabimo acetone, acetonitril ali metanol, do tega pojava ne pride, v DSC krivulji pa je jasno viden le izrazit in ozek talilni vrh nove kristalne oblike. Poseben efekt je opazen, če pri mletju uporabimo nepolarno topilo heksan – v DSC krivulji mlete zmesi ob dodatku heksana vidimo poleg endotermnega talilnega vrha nove kristalne oblike še en eksotermen kristalizacijski vrh. V tem primeru je poleg nove kristalne oblike nastal tudi amorfen vzorec. Ti rezultati kažejo, da ima pri mletju s topilom pomembno vlogo tudi polarnost topila.

Tudi v tem primeru smo ugotovili, da nastane nova kristalna oblika v stehiometrijskem razmerju obeh komponent 1:1, saj smo pri ostalih razmerjih opazili taljenje presežnih količin ene od komponent.

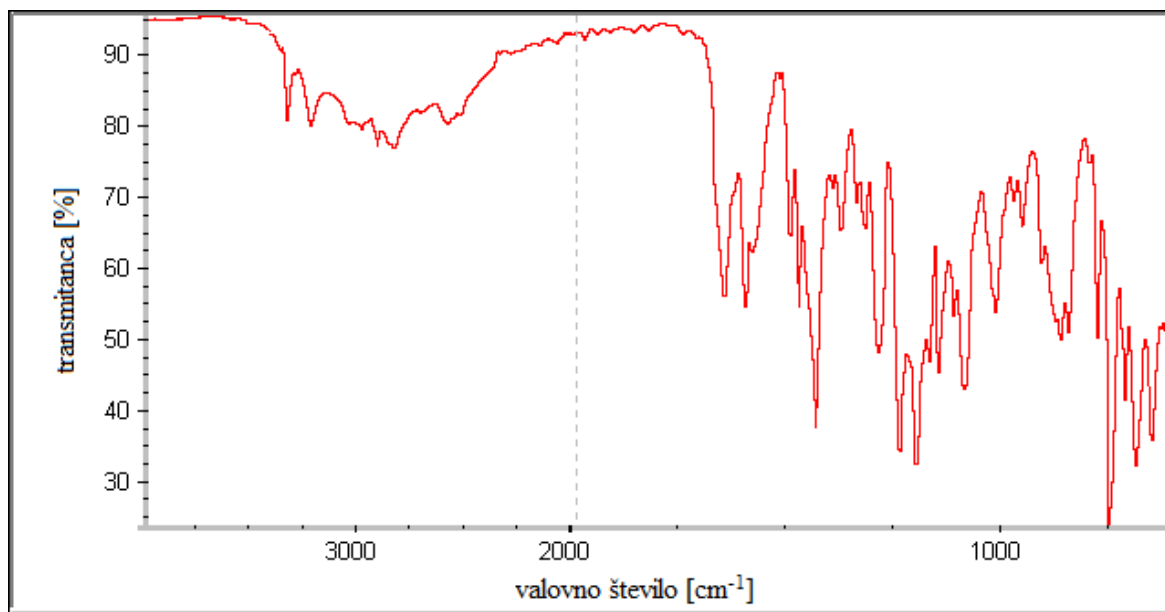
4.4.2 IR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA

IR spekter mlete zmesi ob prisotnosti topila se razlikuje od spektrov karvedilola in salicilne kisline (slika 29). Da ne gre le za zmes, temveč novo obliko, nakazuje razlika v spektrih fizikalne zmesi in vzorca, pripravljenega z mletjem. V spektru mlete zmesi ob dodatku topila opazimo spremembe oblik in intenzitet več absorpcijskih trakov. Odsotni so široki absorpcijski trakovi med 3200 in 2500 cm^{-1} , ki jih opazimo pri salicilni kislini. Dodatno opazimo absorpcijski trak z vrhom pri 3340 cm^{-1} . Njegov položaj se ne sklada s položaji absorpcijskih trakov karvedilola in SA, kar je mogoče razlagati, da je v kokristalu prišlo do tvorbe vodikove vezi.



Slika 29. IR spekter (a)karvedilola, (b) salicilne kisline, (c) fizikalne zmesi, (d) karvedilol : SA 1:1, mletje s topilom.

V IR spektru vzorca (slika 30), kjer smo komponenti mleli brez topila, ni vidnih razširitev nekaterih absorpcijskih trakov na območju med 1800 in 500 cm^{-1} , ki so vidne v spektru salicilne kisline, kar nakazuje na odsotnost intramolekularnih $\text{OH}\cdots\text{O}$ vodikovih vezi v molekulah salicilne kisline.

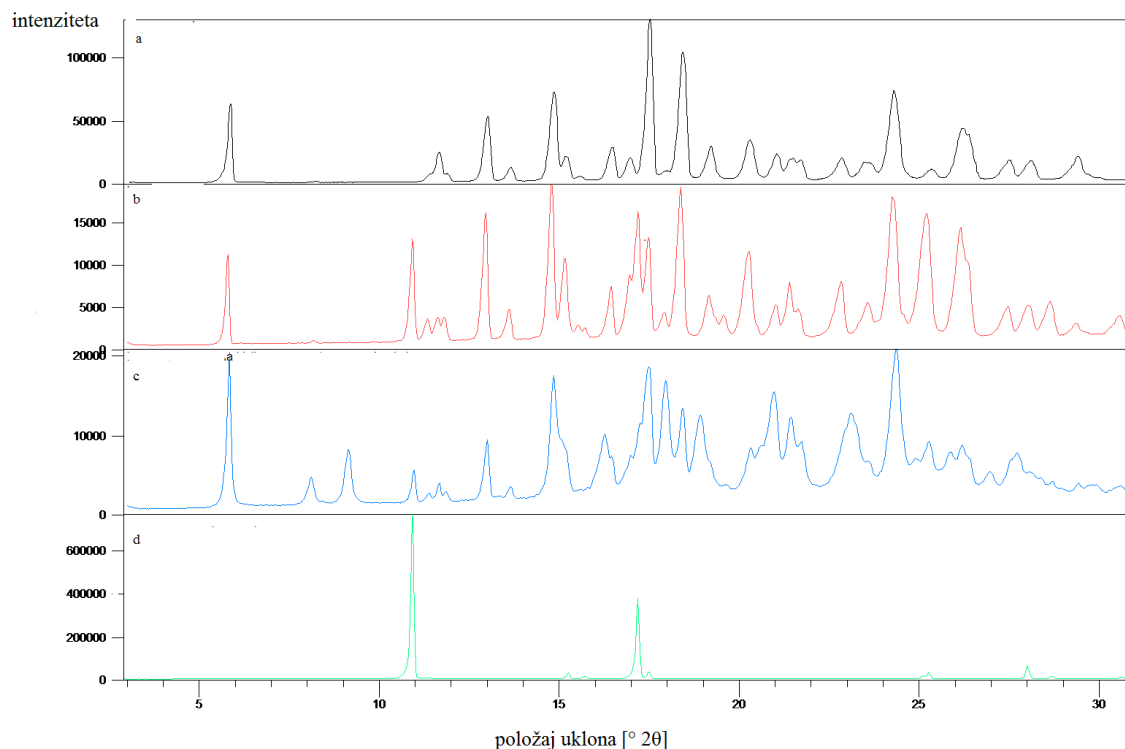


Slika 30. IR spekter karvedilol:SA, mletje brez topila

4.4.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

S primerjanjem difraktogramov karvedilola, salicilne kisline in mlete zmesi (slika 31) ugotovimo, da se dobljeni difraktogrami razlikujejo med seboj. Razlike v superpoziciji difraktogramov karvedilola in salicilne kisline glede na mleto zmes potrjujejo, da je z mletjem nastala nova kristalna oblika. Dodatni ukloni glede na izhodni komponenti so vidni predvsem pri mleti zmesi, ki smo jo mleli z dodatkom topila.

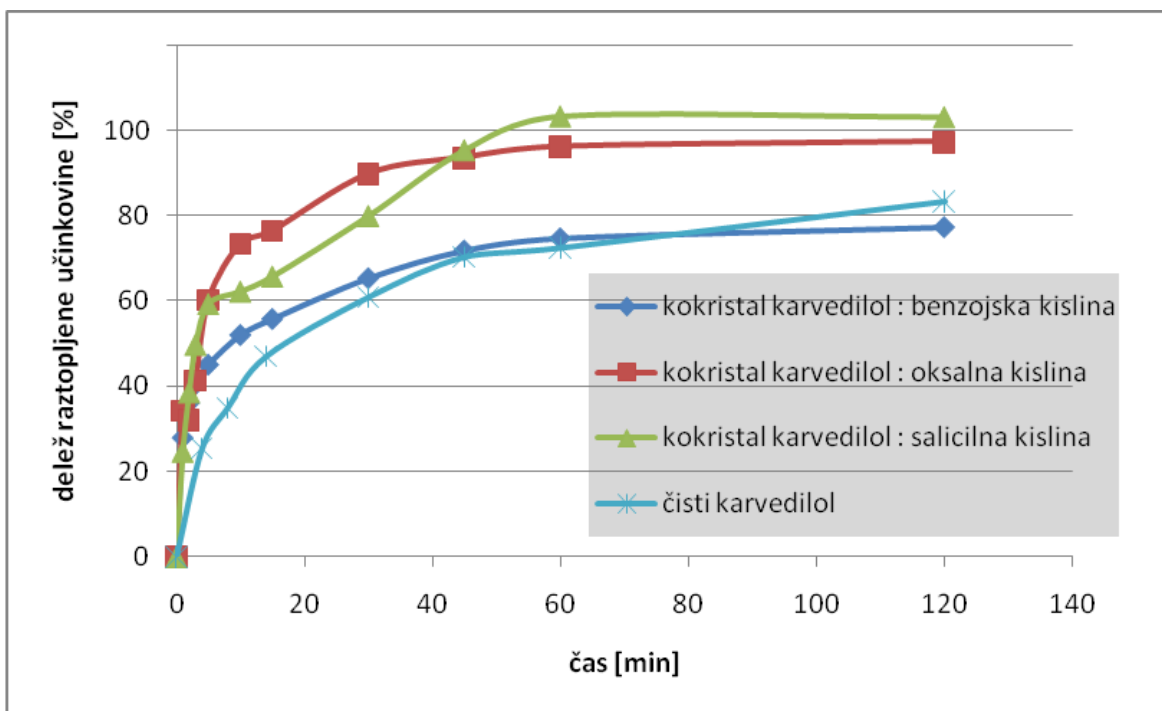
Uklon pri $\sim 6^\circ 2\theta$ je karakteristični uklon karvedilola. Kot se vidi na sliki, dodatna faza v vzorcu, ki smo ga pripravili z mletjem s topilom, predstavlja novo kristalno obliko, s karakterističnima uklonoma pri $8,1$ in $9^\circ 2\theta$.



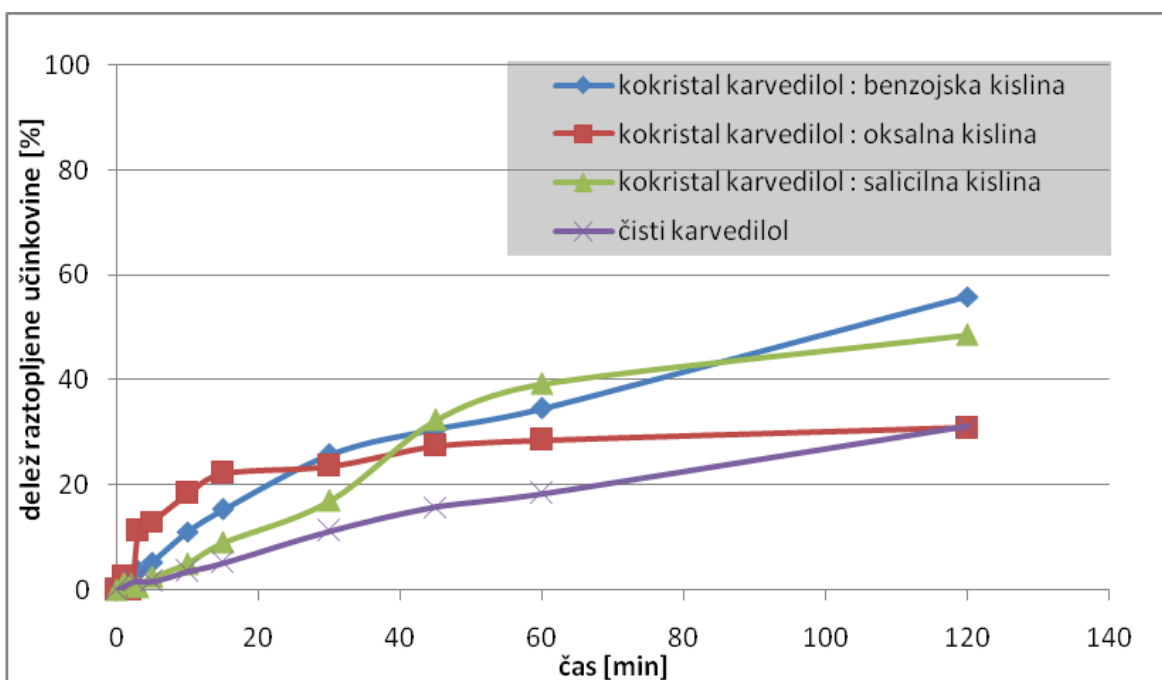
Slika 31. Praškovni difraktogram (a) karvedilol; (b) mleta zmes karvedilol:salicilna kislina = 1:1, mletje brez topila; (c) mleta zmes karvedilol:salicilna kislina = 1:1, ob dodatku topila; (d) salicilna kislina; y-os predstavlja relativno intenziteto

4.5 VREDNOTENJE HITROSTI RAZTAPLJANJA NASTALIH KOKRISTALOV

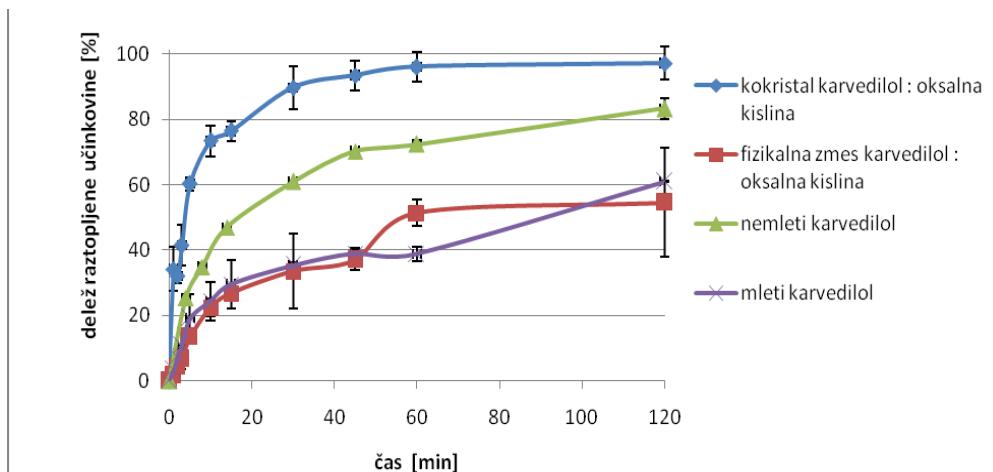
Dokazano je, da se mora aktivna učinkovina v trdni farmacevtski obliki raztopiti, da je potem na voljo za absorpcijo iz gastrointestinalnega trakta. Kokristali so vrsta trdnih kristaliničnih snovi, ki ponujajo možnosti za izboljšanje fizikalnih lastnosti v primerjavi z lastnostmi samih aktivnih učinkovin. Kokristalizacija je metoda, ki lahko pripomore k izboljšanju raztapljanja v vodi težko topnih aktivnih učinkovin v kokristalu, zato smo se tudi mi odločili, da to preverimo. Primerjali smo raztapljanje mletih zmesi karvedilola z benzojsko, oksalno in salicilno kislino z raztapljanjem fizikalnih zmesi. Fizikalne zmesi smo pripravili tako, da smo zmlete komponente, karvedilol in pomožno snov, v stehiometrijskem razmerju dobro premešali v ahatni terilnici s pestilom.



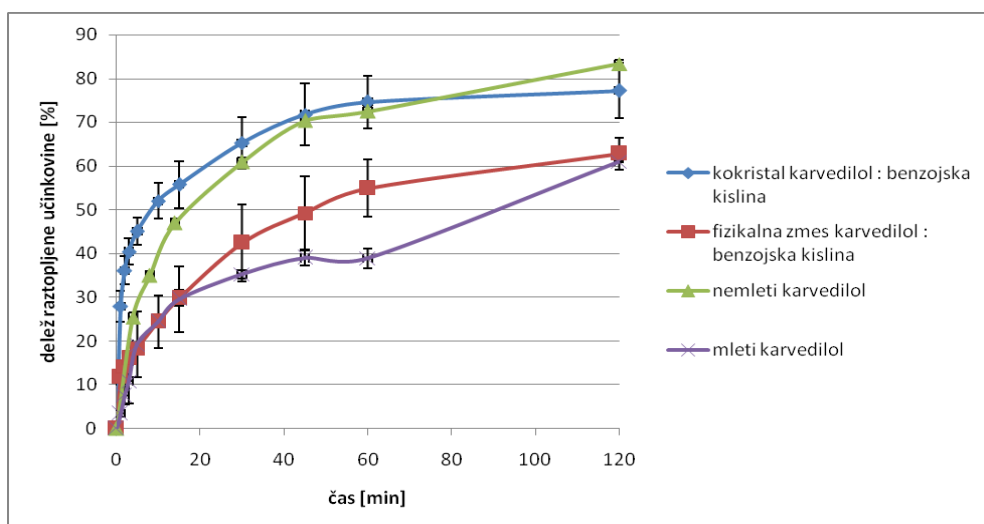
Slika 32. Profili raztapljanja kokristalov karvedilola in čistega karvedilola v pufru s pH 1,2



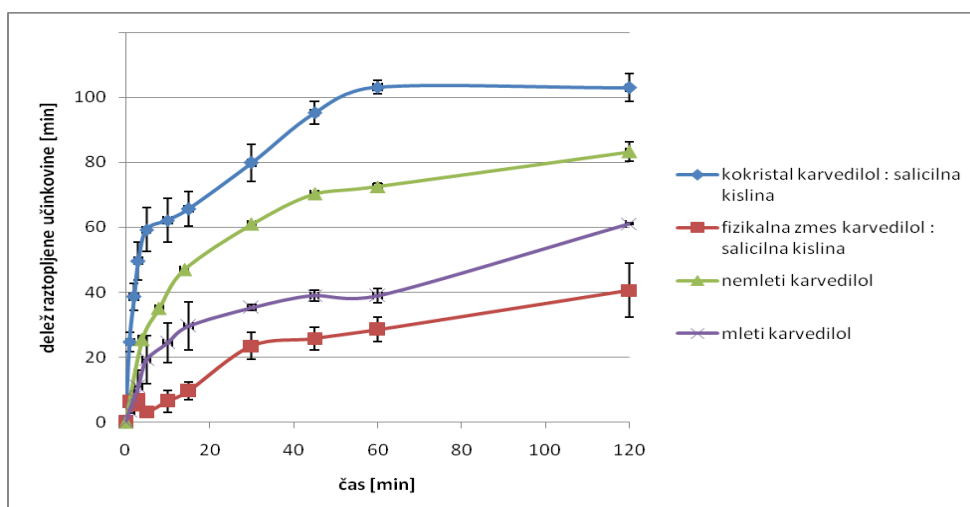
Slika 33. Profili raztapljanja kokristalov karvedilola in čistega karvedilola v pufru s pH 6,8



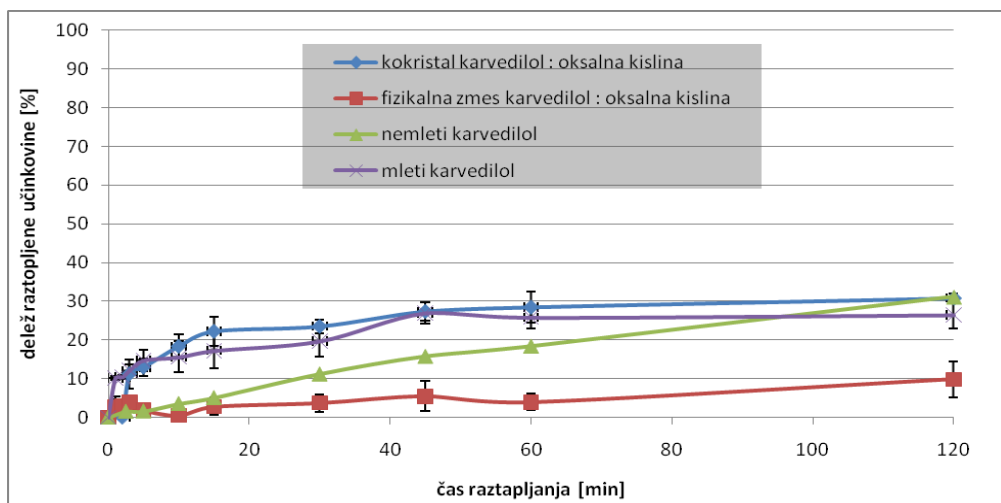
Slika 34. Profili raztapljanja kokristala karvedilola z oksalno kislino, fizikalne zmesi karvedilola in oksalne kisline ter čistega mletga in nemletga karvedilola v pufru s pH 1,2



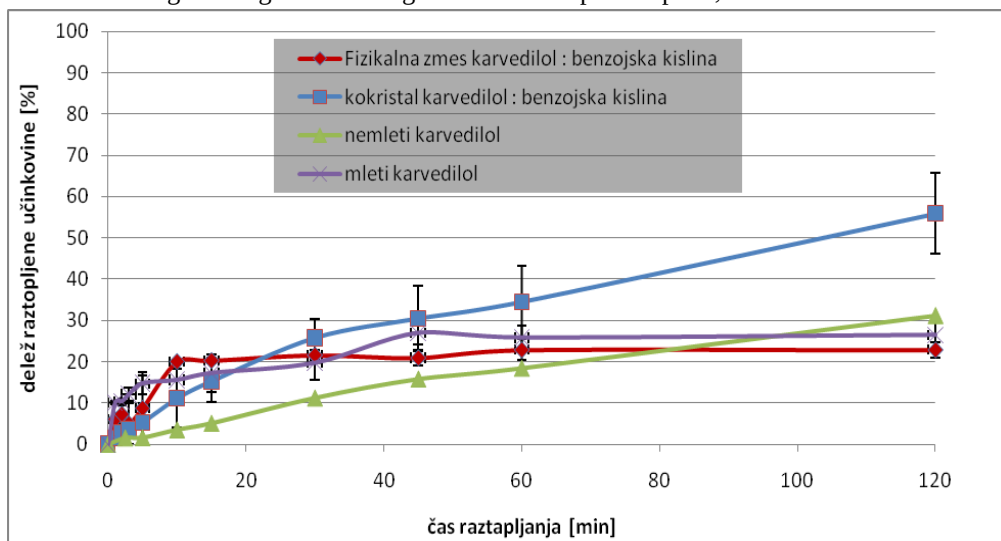
Slika 35. Profili raztapljanja kokristala karvedilola z benzojsko kislino, fizikalne zmesi karvedilola in benzojske kisline ter čistega mletga in nemletga karvedilola v pufru s pH 1,2



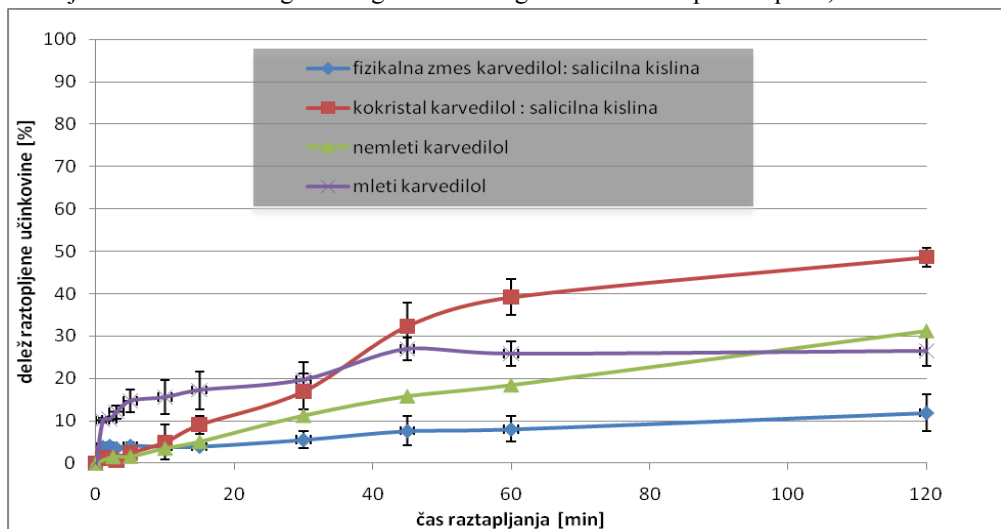
Slika 36. Profili raztapljanja kokristala karvedilola s salicilno kislino, fizikalne zmesi karvedilola in salicilne kisline ter čistega mletga in nemletga karvedilola v pufru s pH 1,2



Slika 37. Profili raztapljanja kokristala karvedilola z oksalno kislino, fizikalne zmesi karvedilola in oksalne kisline ter čistega mletega in nemletega karvedilola v pufru s pH 6,8



Slika 38. Profili raztapljanja kokristala karvedilola z benzojsko kislino, fizikalne zmesi karvedilola in benzojske kisline ter čistega mletega in nemletega karvedilola v pufru s pH 6,8



Slika 39. Profili raztapljanja kokristala karvedilola s salicilno kislino, fizikalne zmesi karvedilola in salicile kisline ter čistega mletega in nemletega karvedilola v pufru s pH 6,8

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da mletje zmesi s pomožnimi snovmi, ki s karvedilolom vstopajo v interakcije, izboljša raztapljanje te učinkovine, tako v kislem mediju s pH 1,2, kakor tudi v fosfatnem pufru s pH 6,8 (sliki 32 in 33). Že s predhodno opravljenimi študijami so potrdili, da modelna učinkovina karvedilol, ki je praktično netopna v vodi, izkazuje pH-odvisno topnost v gastrointestinalnih učinkovinah. V predhodno opravljeni študiji s stresanjem nasičene raztopine 72 h pri sobni temperaturi so ugotovili, da je topnost učinkovine bistveno slabša v fosfatnem pufru s pH vrednostjo 6,8 (0,027 mg/mL), kot v kislem mediju s pH vrednostjo 1,2 (0,105 mg/mL). Topnost učinkovine je bila najboljša pri pH vrednosti okoli 5,5, medtem ko je z višanjem pH vrednosti padala. (Vir: Meritve topnosti modelne učinkovine; Krka, D.D., Novo mesto).

Če primerjamo profile raztapljanja kokristalov in fizikalnih zmesi opazimo, da se kokristali bolje raztapljajo. Iz grafov s prikazanimi profili raztapljanja (slike 34-39) je razvidno, da se najhitreje raztopijo kokristali, nato sam nemleti karvedilol, najslabše in najpočasneje pa fizikalne zmesi. V primeru kokristala z benzojsko kislino smo ugotovili, da fizikalna zmes prav tako pripomore k povečani hitrosti raztapljanja. Slike prikazujejo tudi profile raztapljanja čistega mletega karvedilola v primerjavi s čistim nemletim karvedilolom. Opazimo lahko, da mletje snovi vpliva na delež raztopljene učinkovine, hkrati pa lahko na podlagi izvedenih eksperimentov raztapljanja in prikazanih profilov potrdimo, da izboljšanje raztapljanja ni samo posledica mletja, ampak ima vpliv tudi kokristalizacija. Pri primerjavi profilov raztapljanja mletega in nemletega karvedilola v pufru s pH 1,2 opazimo, da mletje presenetljivo ne izboljša raztapljanja samega karvedilola. Pri tem lahko potegnemo vzporednice s podobnimi rezultati, ki jih navaja literatura. Razlog za ta pojav je verjetno v tvorbi aglomeratov in nizki temperaturi steklastega prehoda, ki je skoraj enaka temperaturi medija, v katerem izvajamo preskus raztapljanja (77).

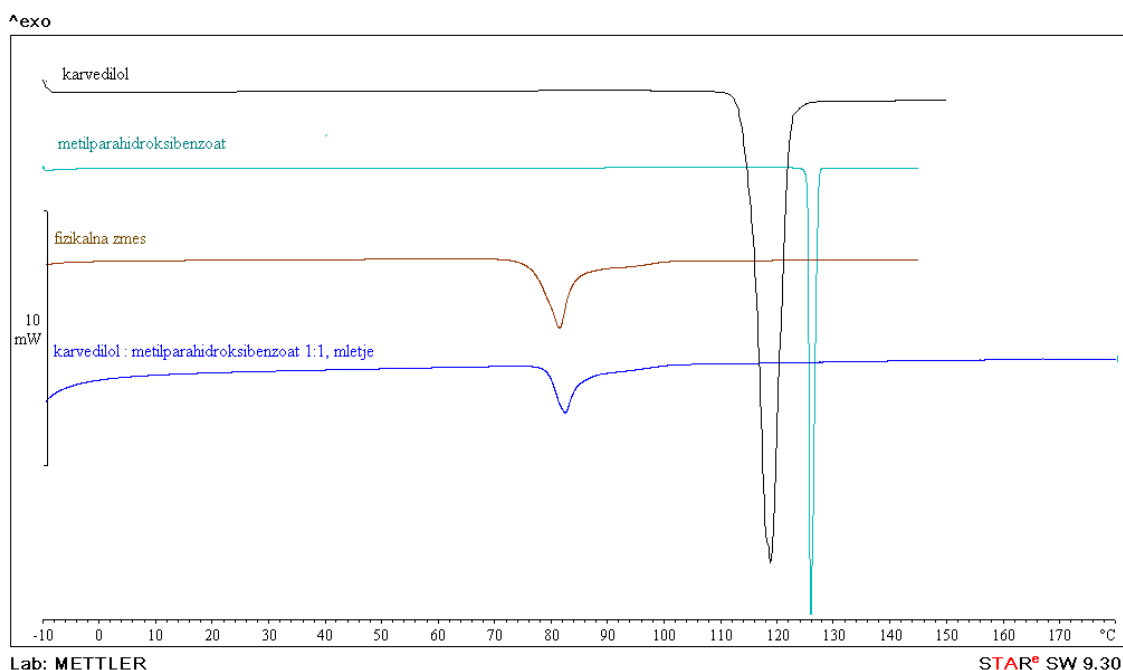
4.6 EVTEKTIČNE ZMESI KARVEDILOLA IN POMOŽNIH SNOVI

Evtektična zmes (eutektos gr.-snov z nizko temperaturo tališča) je razmerje komponent, ki imajo v sistemu najnižjo temperaturo kristalizacije. V binarni zmesi tvori komponenta, ki jo je manj s snovjo v prebitku zmes z evtektično sestavo. Pri evtektični temperaturi opazimo v DSC krivulji endotermni vrh, pri nadaljnjem segrevanju pa še taljenje komponente v prebitku. Iz določanja entalpije taljenja v odvisnosti od sestave lahko ugotovimo razmerje komponent v evtektični zmesi ali razmerje komponent v neznani zmesi (53).

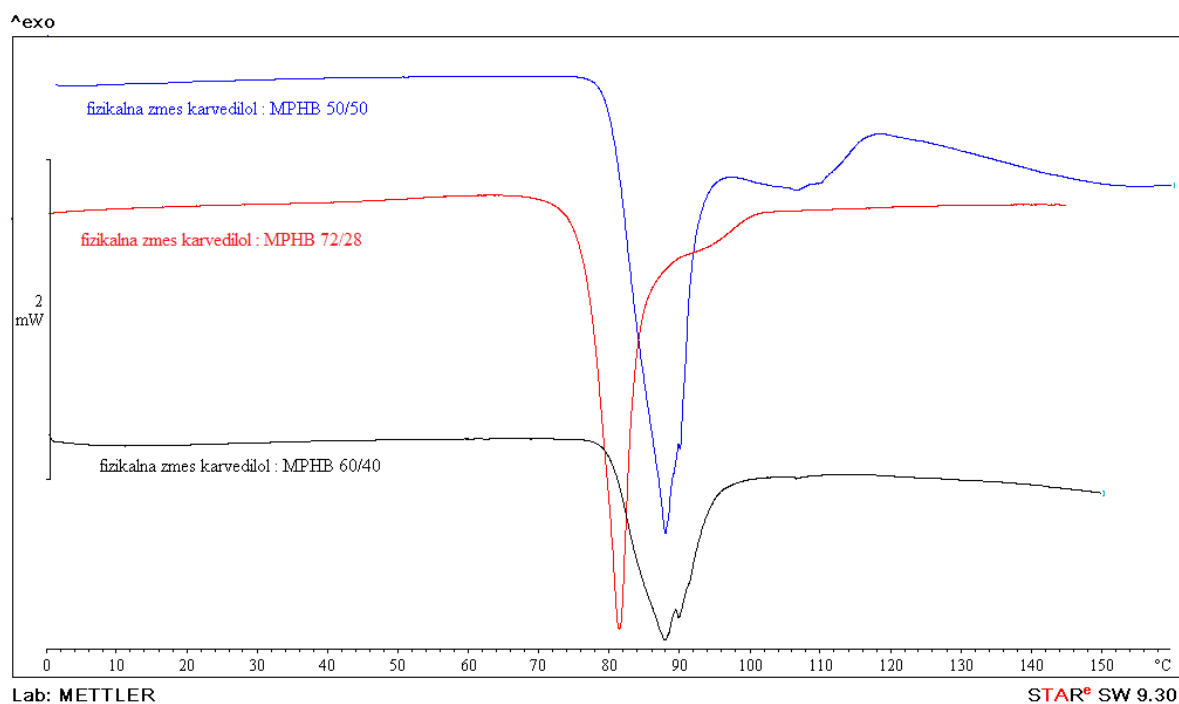
Za skupino mletih zmesi karvedilola s pomožnimi snovmi biotin, natrijev saharinat, nikotinamid, metilparahidroksibenzoat ter urea smo na podlagi rezultatov DSC ter XRPD analiz ugotovili, da gre za evtektične zmesi. V DSC krivuljah smo opazili talilne vrhove mletih zmesi, ki so se nahajali nižje od tališča posamezne komponente. Pri pregledu rezultatov XRPD pa na praškovnem difraktogramu opazimo le uklone karvedilola ter pomožne snovi, do interakcij med komponentama torej ne pride. Ker vse našete mlete zmesi kažejo iste trende, bomo v nadaljevanju prikazali rezultate le ene evtektične zmesi.

4.6.1 Karvedilol - metilparahidroksibenzoat

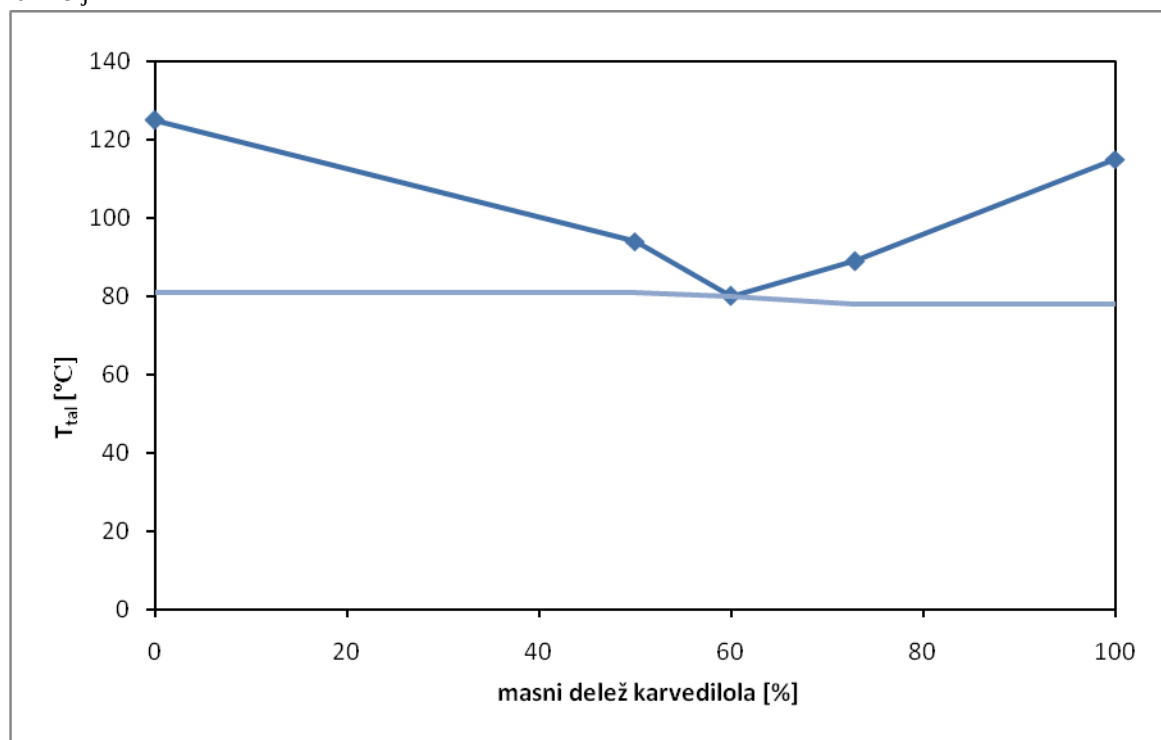
Iz DSC krivulj (slika 40) je razvidno, da tališče vzorca, pridobljenega z mletjem karvedilola in MPH in v stehiometrijskem razmerju 1:1 znaša 79,4°C in je nižje od tališča vsake posamezne komponente. Dodatek majhne količine topila pri mletju obeh komponent ne spremeni položaja talilnega vrha na DSC krivulji (DSC krivulje vzorcev, kjer smo komponente mleli z dodatkom topila na sliki niso prikazane). Na podlagi rezultatov, ki jih lahko razberemo iz DSC krivulj fizikalnih zmesi (slika 41), smo skonstruirali tudi fazni diagram evtektične zmesi karvedilol – MPH (slika 42).



Slika 40. DSC krivulje karvedilola, metilparahidroksibenzoata, fizikalne zmesi ter mlete zmesi



Slika 41. DSC krivulje fizikalnih zmesi karvedilola in metilparahidroksibenzoata (MPHB) v različnih razmerjih



Slika 42. Fazni diagram eutektične zmesi

5 SKLEP

Osnovni namen diplomske naloge je bila priprava kokristalov karvedilola s pomožnimi snovmi z metodo mletja.

Pri izboru pomožnih snovi kot potencialnih tvorilcev kokristalov smo upoštevali dosedanja dognanja o kokristalih ter izbrali tiste, ki so tudi iz literature znani kot ugodni tvorilci kokristalov. Literaturni viri navajajo, da je povezava karboksilne kisline in dušikovega heterocikla najpogostejše zastopana kombinacija v kokristalih. Poleg tega ima molekula karvedilola kar nekaj potencialnih mest v svoji strukturi, kjer lahko pride do tvorbe vodikove vezi, ki je najpogostejša in najpomembnejša interakcija v kokristalih. Kokristale smo poskušali pripraviti z dvajsetimi različnimi pomožnimi snovmi. Kemijsko gledano je večina pomožnih snovi, ki smo jih uporabljali, karboksilnih kislin, med njimi je tudi sol, ester, anhidrid, amid ter urea.

Mletje karvedilola s pomožnimi snovmi se je izkazalo kot ustrezna metoda za reševanje kokristalov v laboratorijskem merilu, saj omogoča enostavno in hitro pripravo mletih vzorcev v večjih količinah za nadaljnjo vrednotenje. Potrdili smo tudi ugotovitve, da pri mletju brez topila lahko pride do amorfizacije spojin, kar je eden od možnih mehanizmov nastanka kokristala. Prav tako smo potrdili, da dodatek majhne količine topila pri mletju pospeši tvorbo povezav med komponentama kokristala. Slabost metode je, da mletje zmanjšuje velikost delcev, ki so tako premajhni, da bi jih lahko karakterizirali z rentgensko difrakcijo na monokristalih.

Z mletjem karvedilola in pomožnih snovi nam je uspelo pripraviti tri kokristale karvedilola: karvedilol : benzojska kislina v razmerju 1:1, karvedilol : oksalna kislina v razmerju 1:1 in karvedilol : salicilna kislina v razmerju 1:1. Da ne gre samo za zmesi izhodnih spojin in da so nastale nove kristalne strukture, smo potrdili z diferenčno dinamično kalorimetrijo, IR-spektroskopsko analizo ter rentgensko praškovno difrakcijo (XRPD). Za natančno določitev kristalne strukture bi potrebovali monokristale ustrezne kakovosti in velikosti, ki jih zahteva vrednotenje z metodo rentgenske difrakcije na monokristalih. Ker je priprava monokristalov ustrezne velikosti s kristalizacijo iz raztopine zahtevna in precej težavna, smo jo po nekaj neuspešnih poskusih opustili.

Za skupino mletih zmesi karvedilola s pomožnimi snovmi biotin, natrijev saharinat, nikotinamid, metilparahidroksibenzoat ter urea smo na podlagi rezultatov DSC ter XRPD analiz ugotovili, da gre za evtektične zmesi.

Kokristalizacija je metoda, ki dokazano lahko pripomore k izboljšanju raztapljanja v vodi težko topnih aktivnih učinkovin v kokristalu, zato smo se odločili, da to tudi preverimo. Pri določanju raztapljanja kokristalov smo opazili, da mletje zmesi s pomožnimi snovmi, ki s karvedilolom vstopajo v interakcije, izboljša hitrost raztapljanja te učinkovine, tako v kislem mediju s pH 1,2, kakor tudi v fosfatnem pufru s pH 6,8. V primeru karvedilola in benzojske kisline smo ugotovili, da fizikalna zmes prav tako pripomore k izboljšanem raztapljanju v primerjavi s samo učinkovino. Ravno tako smo določili profil raztapljanja mletega in nemletega čistega karvedilola, da bi izvzeli vpliv mletja na raztapljanje. Za natančnejšo preučitev vpliva kokristalizacije na raztapljanje, bi morali študijo raztapljanja razširiti in uporabiti še katero drugo primernejšo metodo.

Opravljen raziskovalno delo odpira kar nekaj novih izhodišč za nadaljevanje in pojasnitev določenih pojavov interakcij med preučevano učinkovino in pomožnimi snovmi, ki smo jih opazili ter jih z opravljenim eksperimentalnim delom nismo podrobneje preučili. Nadaljevanje raziskovalnega dela bi obsegalo optimizacijo priprave kokristalov karvedilola z benzojsko, oksalno in salicilno kislino. Predvsem bi bilo potrebno najti metodo, s katero bi uspešno pripravili kokristale v obliki monokristalov, ki bi bili primerni za karakterizacijo z rentgensko difrakcijo na monokristalih, da bi dobili natančno kristalno strukturo. Prav tako bi lahko reševanje za pripravo novih kokristalov karvedilola še razširili, in sicer z novimi pomožnimi snovmi.

6 LITERATURA

1. Datta S, Grant DJW: Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3, 42-57.
2. Huang LF, Tong WQ: Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv Drug Deliver Rev* 2004; 56: 321-334.
3. Sekhon BS: Pharmaceutical co-crystals – a review. *Ars Pharm* 2009; 50: 99-117.
4. Krantz JC Jr, Holbert JM, Iwamoto HK, Carr CJ. 1947; 36: 248-250.
5. Stahly GP: Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1007-1026.
6. Bhogala BR, Nangia A: Ternary and quaternary co-crystals of 1,3-cis-5-cis-cyclohexanetricarboxylic acid and 4,4-bipyridines. *New J Chem* 2008; 32: 800-807.
7. Childs SL, Hardcastle KI: Cocrystals of Piroxicam with Carboxylic Acids. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1291-1304.
8. Aakeröy CB, Salmon DJ: Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. *Cryst Eng Comm* 2005; 7: 439-448.
9. Bond AD: What is a co-crystal?. *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 833-834.
10. Jones W, Motherwell WDS, Trask AV: Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. *MRS Bull* 2006; 31: 875-879.
11. Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ: Pharmaceutical Co-Crystals. *J Pharm Sci* 2006; 95: 499-516.
12. Desiraju GR: Crystal and co-Crystal. *Cryst Eng Comm* 2003; 5: 466-467.
13. Dunitz JD: Crystal and co-crystal: a second opinion. *Cryst Eng Comm* 2003; 5: 506.
14. Schultheiss N, Newman A: Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2950-2967.
15. Childs SL, Stahly GP, Park A: The Salt-Cocrystal Continuum: The influence of Crystal Structure on Ionization State. *Mol Pharm* 2007; 4: 323-38.

16. Aakeröy CB, Fasulo ME, Desper J: Cocrystal or Salt: Does it Really Matter?. *Mol Pharm* 2007; 4: 317-22.
17. Mohamed S, Tocher DA, Vickers M, Karamertzanis PG, Price SL: Salt or Cocrystal? A New Series of Crystal Structures Formed from Simple Pyridines and Carboxylic Acids. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2881-89.
18. Rodriguez-Hornedo N, Nehm SJ, Jayasankar A: Cocrystals: Design, Properties and Formation Mechanisms. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd Edition, Informa Healthcare, New York 2001: 615-635.
19. Desiraju GR: Supramolecular Synthons in Crystal Engineering - A New Organic Synthesis. *Angew Chem Int Ed* 1995; 34: 2311-2327.
20. Donohue J: The Hydrogen Bond in Organic Crystals. *J Phys Chem.* 1952; 56: 502-510.
21. Etter MC: Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. *J Phys Chem* 1991; 95: 4601-4610.
22. Issa N, Karamertzanis PG, Welch GWA, Price SL: Can the Formation of Pharmaceutical Cocrystals Be Computationally Predicted? I. Comparison of Lattice Energies. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 442-453.
23. Gavezzotti A: Are crystal structures predictable? *Accounts Chem Res* 1994; 27: 309-314.
24. Gavezzotti A: Ten years of experience in polymorph prediction: what next? *Cryst Eng Comm* 2002; 4: 343-347.
25. Dunitz JD: Are crystal structures predictable? *Chem Comm* 2003; 545-549.
26. Taskinen J, Yliruusi J: Prediction of physicochemical properties based on neutral network modelling. *Adv Drug Deliver Rev* 2003; 55: 1163-1183.
27. Blagden N, de Matas M, Gravan PT, York P: Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv Drug Deliver Rev* 2007; 59: 617-630.

28. Jayasankar A, Good DJ, Rodriguez-Hornedo N: Mechanisms by Which Moisture Generates Cocrystals. *Mol Pharmaceutics* 2007; 4: 360-372.
29. Trask AV, Jones W: Crystal Engineering of Organic Cocrystals by the Solid-State Grinding Approach. *Top Curr Chem* 2005; 254: 41-70.
30. Rodriguez-Hornedo N, Nehm SJ, Seefeldt KF, Pagan-Torres Y, Falkiewicz CJ: Reaction Crystallization of Pharmaceutical Molecular Complexes. *Mol Pharm* 2006; 3: 362-367.
31. Rager T, Hilfiker R: Cocrystal Formation from Solvent Mixtures. *Cryst Growth Des* 2010; 10: 3237-3241.
32. Weyna DR, Shattock T, Vishweshwar P, Zaworotko MJ: Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 1106-1123.
33. Wöhler F. *Annalen* 1844; 5: 153.
34. Trask AV, Motherwell S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem Commun* 2004; 890-891.
35. Shan N, Toda F, Jones W: Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chem Commun* 2002; 20: 2372-2373.
36. Kuroda R, Imai Y, Tajima N: Generation of a co-crystal phase with novel coloristic properties via solid state grinding procedures. *Chem Commun* 2002: 2848-2849.
37. Hollingsworth MD, Santarsiero BD, Oumar-Mahamat H, Nichols CJ: New series of 1:1 layered complexes of α,ω -dinitriles and urea. *Chem Mater* 1991; 3: 23-25.
38. Friščić T, Jones W: Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 1621-1637.
39. Rastogi RP, Bassi PS, Chadha LS: Mechanism of the Reaction Between Hydrocarbons and Picric Acid in the Solid State. *J Phys Chem* 1963; 67: 2569-2573.

40. 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 Derivates and p-Benzoquinone. *Org Lett* 2006; 8: 2941-2944.
41. Kuroda R, Higashiguchi K, Hasebe S, Imai Y: Crystal to crystal transformation in the solid state. *Cryst Eng Comm* 2004; 6: 463-468.
42. Trask AV, van der Streek J, Motherwell WDS, 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: 2233-2241.
43. Karki S, Friščić T, Jones W, Motherwell WDS: Screening for Pharmaceutical Cocrystal Hydrates via Neat and Liquid-Assisted Grinding. *Mol Pharm* 2007; 4: 347-354.
44. Chadwick K, Davey RJ, Cross W: How does grinding produce co-crystals? Insights from the case of benzophenone and diphenylamine. *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 732-734.
45. Jayasankar A, Somwangthanaroj A, Shao ZJ, Rodriguez-Hornedo N: Cocrystal Formation during Cogrinding and Storage is Mediated by Amorphous Phase. *Pharm Res* 2006; 23: 2381-2392.
46. Chiarella RA, Davey RJ, Peterson ML: Making Co-Crystals – The Utility of Ternary Phase Diagrams. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1223-1226.
47. Friščić T, Childs SL, Rizvi SA, 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: 418-426.
48. 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: 3133-3136.
49. Braga D, Giaffreda SL, Grepioni F, Chierotti MR, Gobetto R, Palladino G, Polito M: Solvent effect in a "solvent free" reaction. *Cryst Eng Comm* 2007; 9: 879-881.

50. Aaltonen J, Alleso M, Mirza S, Koradia V, Gordon CK, Rantanen J: Solid form screening – A review. *Eur J Pharm Biopharm* 2009; 71: 23-37.
51. Alleso M, Velaga S, Alhalaweh A, Cornett C, Rasmussen MA, van den Berg F, Lopez de Diego H, Rantanen J: Near-Infrared Spectroscopy for Cocrytal Screening. A Comparative Study with Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2008; 80: 7755- 7764.
52. Vogt FG, Clawson JS, Strohmeier M, Edwards AJ, Pham TN, Watson SA: Solid-State NMR Analysis of Organic Cocrytals and Complexes. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 912-937.
53. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm vestn* 2001; 52: 173-185.
54. Detoisien T, Arnoux M, Taulelle P, Colson D, Klein JP, Veessler S: Thermal analysis: A further step in characterizing solid forms obtained by screening crystallization of an API. *Int J Pharm* 2011; 403: 29-36.
55. Shan N, Zaworotko MJ: The role of cocrytals in pharmaceutical science. *Drug Discov Today* 2008; 13: 440-446.
56. Childs SL, Chyall LJ, Dunlap JT et al: Crystal Engineering Approach to Forming Cocrytals of Amine Hydrochlorides with Organic Acids. Molecular Complexes of Fluoxetine Hydrochloride with Benzoic, Succinic and Fumaric Acids. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 13335-13342.
57. Mirza S, Miroshnyk I, Heinämäki J, Yliruusi: Co-crytals: An emerging approach for enhancing properties of pharmaceutical solids. *Dosis* 2008; 24: 90-93.
58. Remenar JF, Morissette SL, Peterson ML et al: Crystal Engineering of Novel Cocrytals of a Triazole Drug with 1,4-Dicarboxylic Acid. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 8456-8457.
59. Trask AV, Motherwell WDS, Jones W: Pharmaceutical Cocrytallization: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. *Cryst Growth Des* 2005; 5: 1013-1021.

60. Hickey MB, Peterson ML, Scoppettuolo LA et al: Performance comparison of a co-crystal of carbamazepine with marketed product. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67: 112-119.
61. Trask AV, Motherwell WDS, Jones W: Physical stability enhancement of theophylline via cocrystalization. *Int J Pharm* 2006; 320: 114-123.
62. Bethune SJ, Huang N, Jayasankar A, Rodriguez-Hornedo N: Understanding and Predicting the Effect of Cocrystal Components and pH on Cocrystal Solubility. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 3976-3988.
63. Good DJ, Rodriguez-Hornedo N: Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2252-2264.
64. Barzegar-Jalali M, Valizadeh H, Shadbad MRS, Adibkia K et al: Cogrounding as an approach to enhance dissolution rate of poorly water-soluble drug (gliclazide). *Powder Technol* 2010; 197: 150-158.
65. Remenar JF, Peterson ML, Stephens PW et al: Celecoxib:Nicotinamide Dissociation: Using Excipients to Capture the Cocrystal's Potential. *Mol Pharm* 2007; 4: 386-400.
66. McNamara DP, Childs SL, Giordano J et al: Use of a Glutaric Acid to Improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. *Pharm Res* 2006; 23: 1888-1897.
67. <http://www.uil-sipo.si/uil/dejavnosti/patenti/>. Dostopano 12-2010.
68. Trask AV: An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. *Mol Pharm* 2007; 4: 301-309.
69. Pokharkar VB, Mandpe LP, Padamwar MN et al: Developement, characterization and stabilization of amorphous form of a low T_g drug. *Powder Technol* 2006; 167: 20-25.
70. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC): Coryol (uč. carvedilolum), Baza podatkov o zdravilih (www.zdravila.net), 2010.
71. Brook CS, Chen W, Spoors PG: Carvedilol phosphate salts and/or solvates thereof, corresponding compositions and/or methods of treatment. Patent No: US 7,268,156 B2, Pub. No.: WO2004/002419, Pub.Date: 8.1.2004.

72. Sweetman SC: MARTINDALE – The Complete Drug Reference, 34th Ed, The Pharmaceutical Press, 2004: 881.
73. <http://www.fritsch.de/en/sample-preparation/products/milling/ball-mills/pulverisette-0/description/>. Dostopano 12-2010.
74. European Pharmacopoea 6th Ed., 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms; 5811-5817.
75. Brittain HG: Vibrational Spectroscopic Studies of Cocrystals and Salts. 3. Cocrystal Product Formed by Benzenecarboxylic Acids and Their Sodium Salts. Cryst Growth Des 2010; 10: 1990-2003.
76. Arenas-Garcia JI, Herrera-Ruiz D, Mondragon-Vasquez K et al: Co-crystals of Active Pharmaceutical Ingredients – Acetazoleamide. Cryst Growth Des 2010; 10: 3732-3742.
77. Planinšek O et. al: Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. Int J Pharm 2011; 406: 41-48.