

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NADJA SHOAIB

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NADJA SHOAI B

**PROUČEVANJE VPLIVA POMOŽNIH SNOVI NA
STEKLASTE PREHODE V ZAMRZNJENIH RAZTOPINAH
IN LIOFILIZATIH Z UPORABO MT DSC**

**STUDY OF EXCIPIENT'S INFLUENCE ON GLASS
TRANSITION TEMPERATURE IN FROZEN SOLUTIONS
AND LYOPHILIZATES WITH USAGE OF MT DSC**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, junij 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm.

Zahvala

Vljudno se zahvaljujem vsem, ki so mi pomagali pri nastajanju diplomskega dela; prof. dr. Stanetu Srčiču za potrpežljivo in skrbno vodenje skozi diplomsko delo, in za pomoč v laboratoriju in vzpodbudne besede izr. prof. dr. Odonu Planinšku, ter diplomski komisiji za pregled diplomske naloge. Posebej se zahvaljujem Mateju Avanzu, mag. farm., za dragoceni čas, ki ga je namenil za spremljanje poteka dela, pomoč pri eksperimentalnem delu diplomske naloge in strokovne nasvete.

Zahvaljujem se tudi za moralno podporo tekom študija in razumevanje ljubeči družini in vsem tistim, ki jih nisem omenila, a so mi v času študija stali ob strani in mi pomagali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja prof. dr. Staneta Srčiča, mag. farm.

Nadja Shoaib

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

Ljubljana, junij 2011

VSEBINA

| | |
|--|------------|
| VSEBINA..... | ii |
| POVZETEK..... | iii |
| ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV | iv |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 STEKLAST PREHOD – PRIMERI UPORABE | 1 |
| 1.1.1 TEMPERATURA STEKLASTEGA PREHODA PRI ZAMRZNJENIH TRDNIH (SUHIH) SNOVEH (T _g) | 2 |
| 1.1.2 TEMPERATURA STEKLASTEGA PREHODA PRI ZAMRZNJENIH VODNIH RAZTOPINAH KOMPONENT (T _g ') | 2 |
| 1.1.3 VPLIV DODATKA MEHČAL NA TEMPERATURO STEKLASTEGA PREHODA..... | 2 |
| 1.2 KALORIMERIJA..... | 4 |
| 1.2.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMetriJA (DSC)..... | 5 |
| 1.2.1.1 OVREDNOTENJE STEKLASTEGA PREHODA..... | 7 |
| 1.2.2 DSC Z MODULACIJO TEMPERATURE (MT DSC)..... | 9 |
| 1.2.2.1 TOPEM [®] - NOVEJŠA IZVEDBA METODE MT-DSC | 11 |
| 1.2.2.1.1 ZNAČILNOSTI IN PREDNOSTI TOPEM [®] | 12 |
| 1.2.2.1.2 UPORABA TOPEM [®] | 13 |
| 1.3 LIOFILIZACIJA | 14 |
| 1.3.1 PREDNOSTI IN SLABOSTI LIOFILIZACIJE..... | 14 |
| 1.3.2 TEMPERTATURA STEKLASTEGA PREHODA LIOFILIZATA..... | 16 |
| 2 NAMEN DELA | 17 |
| 3 EKSPERIMENTALNO DELO | 18 |
| 3.1 MATERIALI..... | 18 |
| 3.1.1 MAKROGOLI IN DERIVATI..... | 18 |
| 3.1.2 PREČIŠČENA VODA | 19 |
| 3.1.3 OCETNA KISLINA, BREZVODNA..... | 20 |
| 3.1.4 NATRIJEV HIDROKSID..... | 20 |
| 3.1.5 CITRONSKA KISLINA, BREZVODNA..... | 20 |
| 3.1.6 REAGENT ZA ZAMRZOVANJE | 21 |
| 3.2 APARATURE | 22 |
| 3.3 METODE | 23 |
| 3.3.1 PRIPRAVA VZORCEV RAZTOPIN..... | 23 |
| 3.3.2 VZORCI, NAMENJENI ANALITIKI Z MT DSC..... | 25 |
| 3.3.3 TERMIČNA ANALIZA Z MT-DSC | 26 |
| 4 REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 27 |
| 4.1 MERJENJE TEMPERATURE STEKLASTEGA PREHODA Z METODO MT DSC..... | 27 |
| 4.2 TABELARIČNI PRIKAZ T _g ' GLEDE NA KONCENTRACIJO IN MASO VZORCA | 29 |
| 4.3 INTERPRETACIJA MERITEV | 31 |
| 5 SKLEP | 33 |
| 6 LITERATURA | 34 |
| PRILOGA 1 | 39 |

POVZETEK

V nalogi smo proučevali temperaturo steklastega prehoda zamrznjenih raztopin, in sicer pufrov, z dodatkom polietilenglikolov (PEG). PEG z molekulsko maso 10000 smo pripravili v pufrih raztopinah različnih koncentracij. Pri tem smo se odločili za uporabo dveh pufrov – natrijevega (Na) acetata in citrata.

Naš cilj je bil proučevanje vpliva pomožnih snovi na temperaturo steklastega prehoda zamrznjenih raztopin, ki vsebujejo PEG z molekulsko maso 10000. Raztopine smo zamrzovali na temperaturo -75°C s hitrostjo -5 K/min ($\pm 0,5\text{ K/min}$) in segrevali s hitrostjo 2 K/min do temperature 0°C . Meritve smo izvajali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije z modulacijo temperature (MT-DSC, izvedba TOPEM[®]). Metodo smo poskušali ovrednotiti glede na izvedbo in način pridobivanja rezultatov ter tako skušali poiskati prednosti in slabosti same metode za proučevanje temperature steklastega prehoda komponent zamrznjenih raztopin. Pri tem smo želeli pokazati vpliv sestavin, procesa, mase in koncentracije na spremembo temperature steklastega prehoda.

Na osnovi meritev analiziranih vzorcev zamrznjenih raztopin in razpoložljivih literaturnih podatkov, smo zaključili, da sprememba koncentracije vzorcev zamrznjenih raztopin (Na-acetatnega in Na-citratnega pufru) vpliva na spremembo temperature steklastega prehoda (T_g'). T_g' pri vzorcih z višjo koncentracijo pufrov je višja, v primerjavi z vzorci z 10-kratno nižjo koncentracijo pufrov. Ugotavljamo, da spreminjanje mase analiziranih vzorcev nima bistvenega vpliva na spremembo položaja T_g' . Povečanje mase rahlo vpliva na boljši odziv na termogramu. Ob dodatku pomožnih snovi (1% PEG, 5% PEG, 10% PEG) Na-acetatnemu in Na-citratnemu pufru, se T_g' glede na sam pufer bistveno ne spremeni.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|--------------------|---|
| DSC | diferenčna dinamična kalorimetrija |
| MT DSC | diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature |
| PEG | polietilenglikol |
| T _g | temperatura steklastega prehoda trdnih (suhih) snovi |
| T _g ' | temperatura steklastega prehoda zamrznjenih raztopin |
| TOPEM [®] | modificirana izvedba MT DSC |
| T _{ONSET} | temperatura, pri kateri amorfna snov začne prehajati v steklasto, zmeščano stanje |
| TOTAL | celotna energija v termogramu |
| REV | reverzibilna komponenta v termogramu |
| NON-REV | ireverzibilna komponenta v termogramu |

1 UVOD

1.1 STEKLAST PREHOD – PRIMERI UPORABE

Steklast prehod je značilnost za vse amorfne in delno amorfne snovi. Je proces, pri katerem steklasta, amorfna faza ob segrevanju preide v zmehčano ali plastično stanje. Vrednotimo ga s temperaturo steklastega prehoda (T_g). Temperatura steklastega prehoda je pomembna značilnost snovi in pomemben parameter, ki odloča o končni uporabi oziroma rabi le-te. S poznavanjem temperature steklastega prehoda, lahko vplivamo na stabilnost snovi (pripravka) med shranjevanjem, na lastnosti snovi ter s tem posredno in neposredno na tehnološki proces in na končno kakovost oblike. Poznavanje temperature steklastega prehoda je tako pomembno v mnogih industrijah (prehrambena, kemična) kot tudi v farmaciji, kjer pogosto proučujemo zmesi različnih polimerov z namenom spreminjanja temperature steklastega prehoda.

Steklast prehod najpogosteje srečamo pri polimerih, za katere je značilno, da imajo velike molekulske mase. Imajo pa ga tudi mnoge zdravilne učinkovine, kljub majhnim molskim masam. V farmaciji uporabljamo polimere kot polnila, kot spojine za zgoščevanje in geliranje, v obliki ovojnin (polietilen, polipropilen, polivinilklorid,...), predvsem pa v procesih filmskega oblaganja. Gre za postopke, kjer z razprševanjem raztopine ali suspenzije polimera in ustreznih pomožnih snovi (mehčala) za tablete, pelete ali granule, nanašamo oblogo (1,2).

Steklo je trdno in lomljivo stanje snovi, v katerem ni urejenosti molekul (amorfno stanje), podobno kot pri tekočinah, od katerih se razlikuje v gibljivosti molekul. V tekoči fazi obstaja tako imenovano kooperativno gibanje molekul ali delov molekul, ki poteka v razdalji nekaj nanometrov. Razdalja, ki označuje takšno gibanje, se z nižanjem temperature manjša. Neurejena struktura tekoče faze postane imobilizirana. Prehod snovi, ki ne kristalizirajo pri ohlajanju, ampak se samo strdijo, izkazuje steklast prehod. Pod temperaturo steklastega prehoda gibanje omejujejo sekundarne van der Waalove vezi. Snov se nahaja v rigidnem steklastem stanju z minimalnim gibanjem polimernih verig. Z dovajanjem toplote nad temperaturo steklastega prehoda snov ostaja v zmehčanem stanju, za katerega je značilno povečano gibanje polimernih verig in elastičnost (1, 3, 4).

Steklast prehod zamrznjenih raztopin je temperaturni razpon, v katerem snov prehaja iz steklastega stanja v plastično v okviru zamrznjenega stanja. Lahko ga obravnavamo kot

»tališče« amorfne stanja. Upoštevati je potrebno, da gre za prehod 2. reda; steklast prehod je odvisen od strukture in molekulske mase materiala, nanj vplivamo s prisotnostjo drugih snovi, ki se imenujejo plastifikatorji. Steklast prehod je temeljna lastnost polimerov.

1.1.1 TEMPERATURA STEKLASTEGA PREHODA PRI ZAMRZNJENIH TRDNIH (SUHIH) SNOVEH (T_g)

Temperatura steklastega prehoda amorfne trdne (suhe) snovi (T_g) je fizikalna lastnost kritičnega pomena. Ima ključen vpliv na kemijsko stabilnost, fizikalno stabilnost in viskozne ter elastične lastnosti snovi. Pogosto je voda udeležena kot plastifikator za omenjene snovi. Glede na to, da mnoge amorfne trdne snovi spontano absorbirajo vodo iz svojega okolja, je zelo pomembno razmerje med T_g in količino vode v teh snoveh (5, 6).

1.1.2 TEMPERATURA STEKLASTEGA PREHODA PRI ZAMRZNJENIH VODNIH RAZTOPINAH KOMPONENT (T_g')

Steklo ne more kristalizirati, ker je nenasičena raztopina blizu temperature evtektika (T_e), pri temperaturi steklastega prehoda, v termodinamskem stabilnem stanju.

Pomembno je tudi odkritje pri koncentriranih raztopinah natrijevih soli, to je močan učinek aniona na temperaturo steklastega prehoda glede na podano ekvivalentno koncentracijo. Močnejša, ko je vodikova vez z anionom, višja je temperatura steklastega prehoda. To predstavlja prednost pri trenutnem razvoju dostavnih sistemov za učinkovine. Ugotovljeno je, da so citrati v obliki soli najbolj učinkoviti zaradi visoke temperature steklastega prehoda, ki vodi do večje odpornosti proti kristalizaciji pri enaki koncentraciji (7).

1.1.3 VPLIV DODATKA MEHČAL NA TEMPERATURO STEKLASTEGA PREHODA

Mehčala

To so težko hlapne tekočine (imajo visoko temperaturo vrelišča), v nekaterih primerih tudi polimerne snovi, z majhno molekulsko maso, ki interagirajo s polimernim tvorivom in spremenijo določene fizikalne in mehanske lastnosti polimera. Poznamo dve glavni skupini mehčal:

- **notranja mehčala** spremenijo kemijsko strukturo polimera in s tem njegove fizikalne lastnosti. Spremembe stopnje substitucije, vrste substitucije, dolžine verige polimera vplivajo na fizikalne lastnosti polimernega filma.
- **zunanja mehčala** spremenijo interakcije polimer-polimer tako, da izboljšajo gibljivost verig in zmanjšajo molekulsko riginost polimera. Ob dodatku mehčala v disperzijo za oblaganje, postane polimerni film bolj elastičen in bolj odporen na mehanske obremenitve.

Najbolj pogosto uporabljena mehčala so: propilenglikol, glicerol, estri glicerola, PEG, trietilcitrát, triacetin, nekatere površinsko aktivne snovi.

Voda tudi deluje kot mehčalo, vendar pa se njena vsebnost, na primer v polimerni oblogi, spreminja glede na temperaturo in relativno vlažnost v okolici (4, 8).

Kot smo že omenili, je uporaba mehčal v farmacevtski tehnologiji, ena izmed najbolj učinkovitih metod za spreminjanje termičnih in mehanskih lastnosti polimerov.

Učinkovitost mehčala določa predvsem njegova kemijska struktura. Ta mora biti takšna, da mu omogoča porazdeljevanje med polimernimi verigami in vstopanje v interakcije s funkcionalnimi skupinami polimera, pri čemer se vzpostavi dimamično ravnotežje med molekulami mehčala in posameznimi odseki polimera. Posledica nastalih interakcij je oslabitev povezav med polimernimi verigami in znotraj polimerne verige same (zunanja mehčala) ali sprememba konformacije polimerne verige (notranja mehčala), kar poveča prosti volumen polimera. Polimerne verige postanejo bolj gibljive in temperatura steklastega prehoda polimera se zniža. Znižanje temperature steklastega prehoda je odvisno od vrste in koncentracije dodanega mehčala.

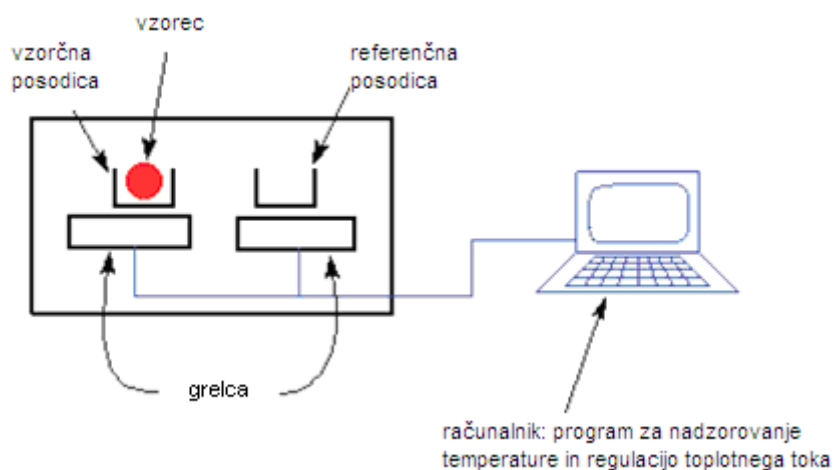
Na učinkovitost mehčala vpliva tudi molekulska masa. Čim manjše so molekule mehčala, večja je njihova učinkovitost. Manjše molekule lažje vstopajo med polimerne verige in zato bolj zrahljajo polimerno mrežo. Posledica je večje znižanje temperature steklastega prehoda. Prav iz tega razloga je zelo učinkovito mehčalo tudi voda. Večja topnost pomeni boljšo porazdelitev molekul mehčala med polimerne verige in s tem večjo učinkovitost.

1.2 KALORIMERIJA

Kalorimetrijo uporabljamo za merjenje sproščene ali absorbirane toplote, ki je posledica kemijske reakcije ali fizikalnega procesa.

S kalorimetrijo lahko ugotavljamo hirost, obseg in temperaturo procesa (na primer temperaturo steklastega prehoda) (9). Kalorimetrija je neinvazivna v načinu zbiranja informacij ter večstranska (z različnimi aparaturami lahko merimo v širokem območju od nW do MW). Omogoča nam analizo vzorcev, ki se lahko nahajajo v katerikoli fazi ali mešanici faz, z maso nekaj mg.

Kalorimetrija je nespecifična tehnika, zato z njo zabeležimo vse spremembe, ki se sočasno pojavijo v vzorcu in katere je glede na svojo občutljivost kalorimeter sposoben zaznati.



Slika 1: Shema prikaza povezave DSC aparature z računalnikom

V grobem lahko kalorimetrijo razdelimo glede na temperaturni program kalorimetra (10) na:

- izotermno kalorimetrijo; izotermni kalorimeter meri razliko v toplotnem toku kot funkcijo časa.
- dinamično kalorimetrijo; dinamični kalorimeter meri razliko v toplotnem toku kot funkcijo temperature (11).

Poznamo vrsto termičnih metod, ki se med seboj razlikujejo v merjenem parametru in v temperaturnem programu:

- diferenčna termična analiza (DTA),
- termogravimetrija (TG),

- termomikroskopija (HSM),
- termomehanska analiza (TMA),
- diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC), ki pa je v farmaciji tudi ena izmed najpogosteje uporabljenih.

1.2.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA (DSC)

DSC je v farmaciji ena izmed najpogosteje uporabljenih termičnih analitskih metod. Obsega nadzorovano segrevanje, hlajenje vzorca ali vzdrževanje konstantne temperature ter opazovanje fizikalnih in kemičnih sprememb, ki medtem potekajo. S to metodo merimo različne lastnosti snovi, kot so tališče, toplotna kapaciteta, entalpija reakcije, kinetika reakcije in druge. Uporabljamo jo za analizo zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi, v kompatibilnostnih študijah, v nadzoru različnih farmacevtskih procesov in pri proučevanju farmacevtskih oblik.

Z DSC merimo razliko v toplotnem toku med vzorcem in referenco, kot funkcijo temperature in časa, medtem ko sta izpostavljena nadzorovanemu temperaturnemu programu (Slika 1). Z DSC lahko proučujemo naslednje fizikalno-kemične lastnosti snovi (1, 4, 12):

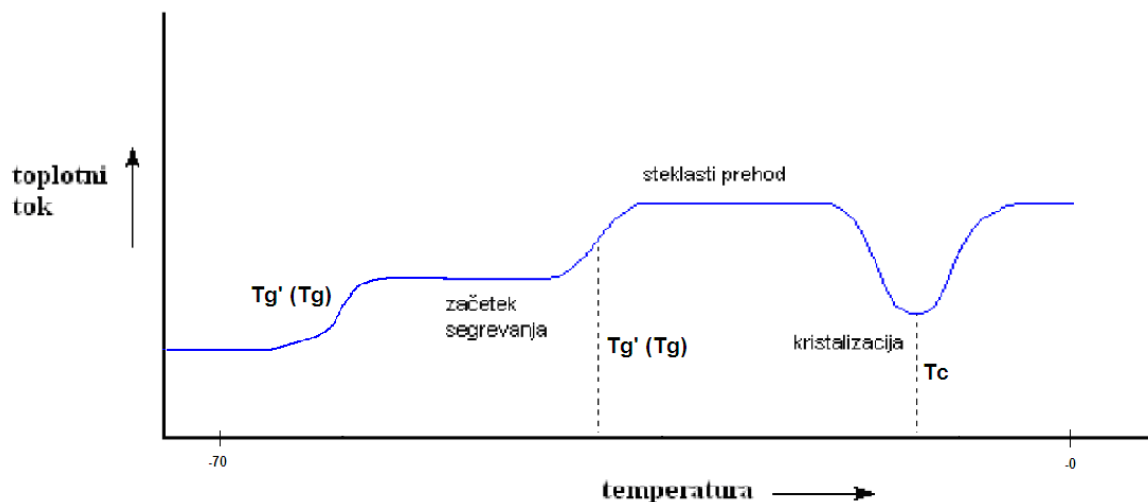
- tališče, temperaturno območje taljenja, temperaturo kristalizacije,
 - entalpijo taljenja,
 - toplotno kapaciteto,
 - izparevanje, desorpcijo,
 - steklast prehod,
 - termično stabilnost,
 - staranje, oksidacijske razpade,
 - kinetiko reakcije razpada in nekaterih drugih reakcij,
 - vsebnost nečistot,
 - polimorfizem.
- Prednosti DSC (13):
 - enostavna priprava vzorca;
 - kratek čas analize;
 - možnost analiziranja tako trdnih snovi kot tekočin v širokem temperaturnem območju.

- Pomanjkljivosti DSC (13):
 - zaradi nespecifičnosti lahko pride do merjenja napačne fizikalne oziroma kemijske interakcije;
 - nekontrolirani pogoji med pripravo vzorca in analizo (vlaga);
 - z večjo hitrostjo segrevanja in večjo maso vzorca povečamo občutljivost (razmerje signal/šum), toda zmanjšamo ločljivost;
 - z manjšo hitrostjo in manjšo maso vzorca povečamo ločljivost in zmanjšamo občutljivost;
 - ukrivljenost bazne linije zmanjša realno občutljivost;
 - toplotne kapacitete ne moremo izmeriti pri izotermnih pogojih, pri majhni hitrosti segrevanja ali medtem, ko potekajo reakcije;
 - kadar v vzorcu sočasno poteka več toplotnih sprememb različnega izvora, je toplotni tok težko opredeliti (npr. v enokomponentnem sistemu se lahko prekrivata taljenje in rekristalizacija, pri steklastem prehodu sprememba toplotne kapacitete in relaksacijska entalpija ali dehidracija, v več komponentnih sistemih pa se lahko prekrivajo termični prehodi, ki pripadajo različnim komponentam v zmesi).

Rezultat DSC meritev so kvalitativne in kvantitativne informacije kot funkcija časa in temperature. Pri segrevanju lahko vzorec energijo absorbira (endotermna reakcija) ali pa jo sprošča (eksotermna reakcija). Z vrhovi (»piki«) označujemo spremembo entalpije in temperaturno območje, v katerem je do spremembe prišlo. Pomembna je tudi atmosfera nad vzorcem. V uporabi so inertni plini (N_2 , He) ali oksidirajoči plini (O_2 , zrak). Položaj vrha in površina pod njim kvantificirata konkretno termično spremembo. Tako lahko proučujemo npr. taljenje, ki se kaže kot endotermni odklon v DSC termogramu. Površina pod talilnim vrhom je sorazmerna s spremembo entalpije taljenja. Z DSC lahko izračunamo toplotno kapaciteto snovi, kar pomeni, da lahko opazujemo termične pojave, ki so posledica le spremembe toplotne kapacitete (npr. steklasti prehod) (1), kar prikazuje Slika 5.

1.2.1.1 OVREDNOTENJE STEKLASTEGA PREHODA

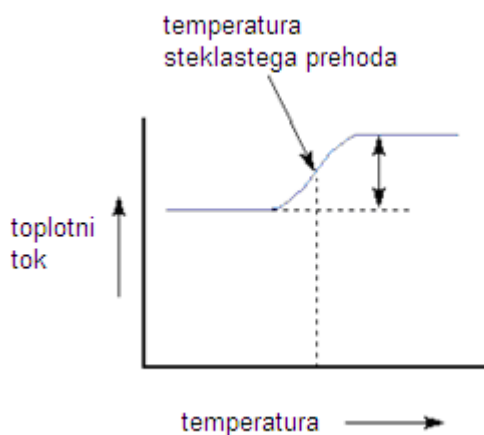
Na termogramu (odvisnost toplotnega toka od časa oz. temperature) opazimo steklast prehod kot endotermno spremembo toplotnega toka, oziroma stopničast dvig bazne linije (1, 2) (Slika 2).



Slika 2: Teoretični termogram z najpogostejšimi prehodi pri analizi trdnega vzorca.

Slika 2 prikazuje modelni termogram, v katerem lahko jasno vidimo tri osnovne tipe procesov, ki jih lahko raziskujemo s pomočjo DSC analiz. Negativni odklon od bazne linije prikazuje proces kristalizacije, ki je primer eksotermne reakcije. Pozitivni odklon od bazne linije potrjuje endotermno naravo tega procesa. DSC torej omogoča ugotavljanje eksotermnih, endotermnih reakcij, kot tudi reakcij, ki so posledica le spremembe toplotne kapacitete (steklasti prehod) (14).

Za ovrednotenje steklastega prehoda določamo več parametrov. Poleg Tg ali Tg' določamo še velikost spremembe specifične toplote in temperaturno območje steklastega prehoda. Obstaja več metod, s katerimi lahko določamo Tg / Tg'. Le-te nam dajejo različne rezultate, zato je pomembno, da vedno ob rezultatu navedemo še metodo, s katero smo Tg / Tg' izračunali in parametre meritve (hitrost ohlajanja/segrevanja, temperaturno območje, pretok dušika, masa vzorca, tesnost lončka) (15). Najpogosteje uporabljamo metodo polovice dviga termograma (Slika 3). Razlika med vzporednicama (višina dviga termograma) predstavlja spremembo specifične toplote. Tg' je temperaturna točka, pri kateri termogram seka polovico dviga krivulje (1, 15).



Slika 3: Določitev dviga T_g / T_g' z metodo polovice dviga krivulje.

Relaksacija

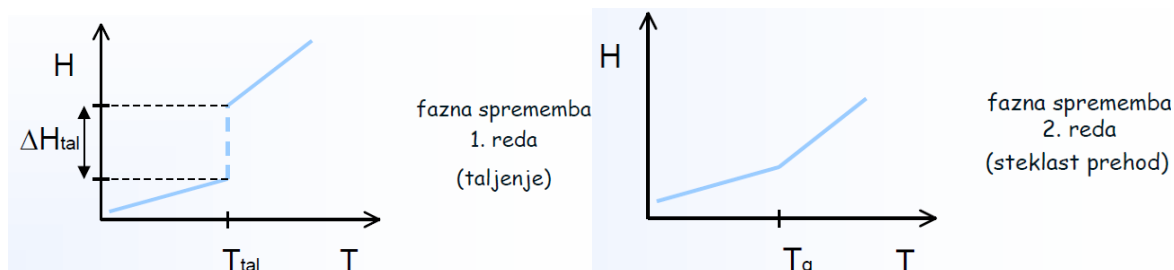
Pri segrevanju steklaste oblike pogosto opazimo na termogramu poleg steklastega prehoda v istem temperaturnem območju, tudi relaksacijski vrh. Slednji je viden kot majhen endotermni naklon in je posledica fizikalnega staranja, ki nastopi pri shranjevanju amorfnega polimera pod njegovo temperaturo steklastega prehoda. S podaljševanjem časa shranjevanja se večja tudi jakost relaksacijskega vrha. Ta lahko doseže tako velikost, da steklast prehod lahko zmotno obravnavamo kot taljenje.

Če starano snov z metodo DSC segrejemo nad T_g / T_g' , nato ohladimo pod T_g / T_g' in ponovno segrejemo z enako hitrostjo kot pri ohlajanju, dobimo na termogramu klasično spremembo toplotnega toka, ki ponazarja steklast prehod brez relaksacijskega vrha. Pri prvem segrevanju sta na termogramu prisotna reverzibilen steklast prehod in ireverzibilna relaksacija, pri ponovnem segrevanju pa le steklast prehod. Iz razlike obeh termogramov lahko izračunamo relaksacijsko entalpijo. Ta je odvisna od mehanskih in termičnih pogojev ob izdelavi in shranjevanju snovi (2, 15, 16, 17).

Primerjava steklastega prehoda in taljenja

Taljenje je proces razpada kristalov snovi. Označujemo ga s temperaturo tališča oziroma zmrzišča. Pri snoveh, ki nimajo tališča in so amorfne, lahko določimo temperaturo steklastega prehoda (T_g ali T_g'). Snovem, ki so le delno kristalne (polimeri), lahko določimo tako temperaturo tališča kot temperaturo steklastega prehoda (1).

Pri steklastem prehodu polimerov se vsa dovedena toplota porabi samo za spremembo toplotne kapacitete in nič v obliki latentne toplote. Segrevanje vzorca se ne ustavi tako kot pri taljenju kristalne snovi pri temperaturi tališča, temveč se nadaljuje s spremenjeno hitrostjo. Govorimo o faznem prehodu drugega reda (1) (Slika 4).



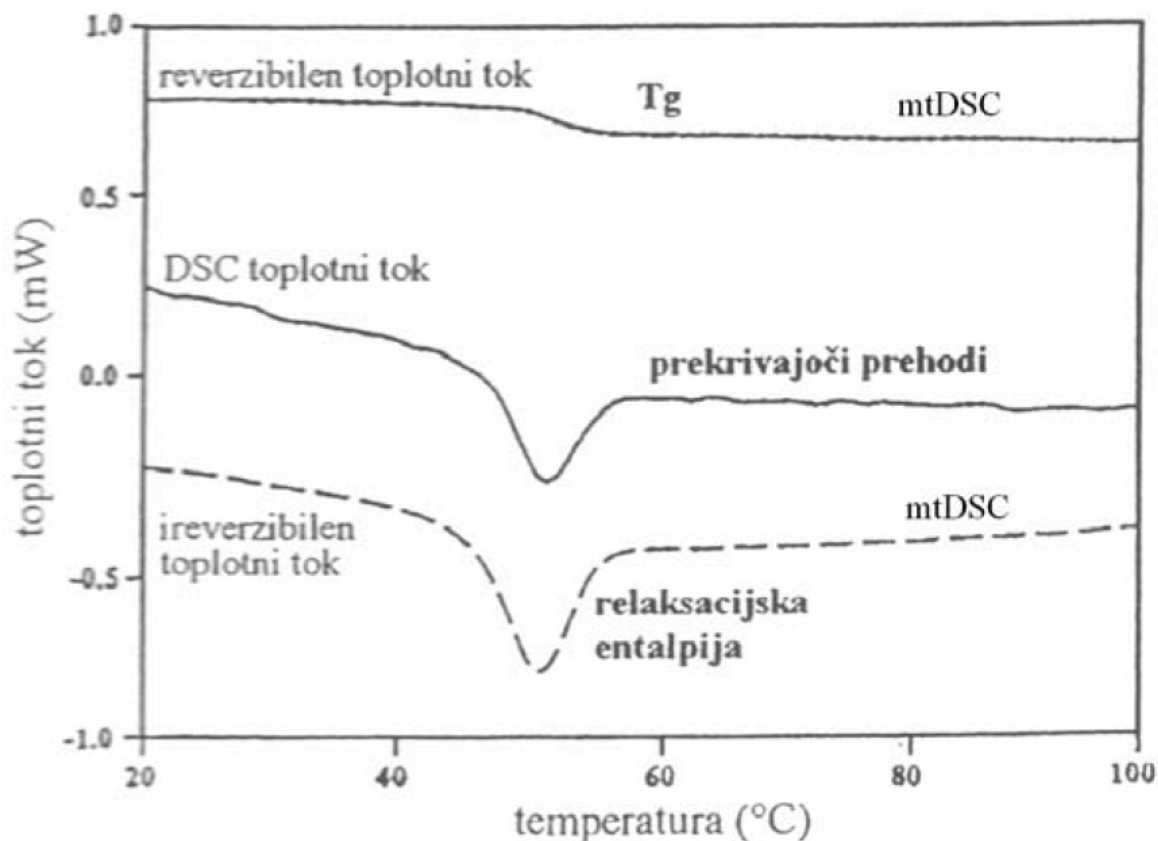
Slika 4: Razlika med taljenjem, kot prehodom prvega reda in steklastim prehodom.

1.2.2 DSC Z MODULACIJO TEMPERATURE (MT DSC)

Premagovanje naštetih omejitev DSC omogoča MT DSC (TOPEM[®] – posebna izvedba MT DSC) in s tem prispeva k natančnejšemu spoznavanju lastnosti materialov. Pri klasični DSC vzdržujemo konstantno temperaturo (izotermni pogoji) ali pa jo s časom linearno spreminjamo (dinamični pogoji). Princip delovanja instrumenta MT DSC je podoben klasični DSC, le da pri MT DSC osnovnemu temperaturnemu programu (dinamičnemu ali izotermnemu) dodamo še sinusoidno nihanje temperature. Rezultat nihanja temperature je periodično (modulirano) nihanje hitrosti segrevanja – govorimo o modulirani hitrosti spremembe temperature (Slika 6). Posledično periodično niha tudi toplotni tok – imenujemo ga modulirani toplotni tok. MT DSC omogoča ločitev dobljenega signala toplotnega toka na (Slika 5):

- reverzibilno (REV) komponento,
- ireverzibilno (NON-REV) komponento,
- prekrivajoče prehode komponent označuje na termogramu celotna energija (TOTAL).

Na podlagi ločenih komponent, je možno predpostavljati, kateri pojavi spadajo k posamezni pomožni snovi v raztopini. Pri tem pa je tudi iz termograma razvidno, za katere pojave gre, oziroma bi lahko sklepali, kateri so.

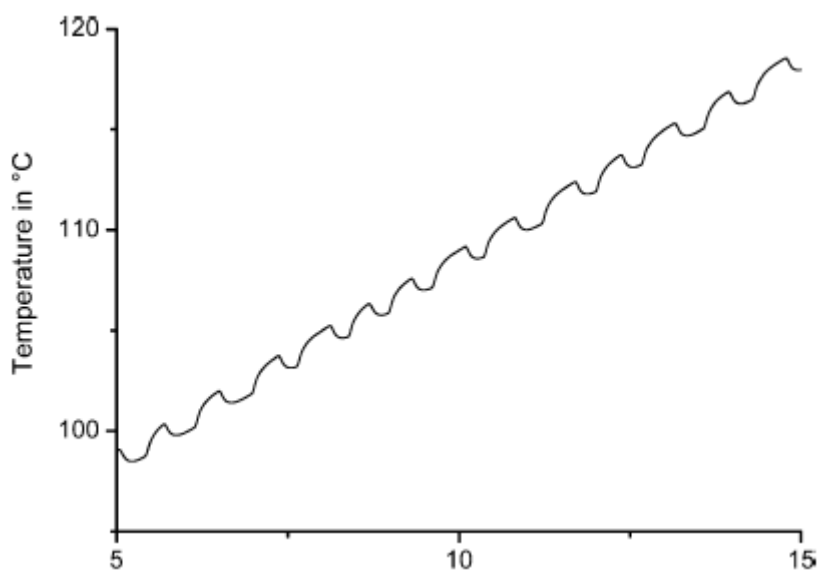


Slika 5: Ločitev steklastega prehoda in relaksacijske entalpije z MT DSC meritvijo.

Toplotna kapaciteta je v povezavi z reverzibilno komponento, zato lahko steklaste prehode opazujemo na termogramu reverzibilnega toplotnega toka. Proces kot so relaksacija, kristalizacija, izparevanje in razpad, se odražajo na termogramu ireverzibilnega toplotnega toka. Taljenja ne moremo strogo opredeliti. Zaznamo ga lahko tako na signalu reverzibilnega kot tudi ireverzibilnega toplotnega toka, deleži prispevkov obeh komponent pa so odvisni od eksperimentalnih pogojev.

- MT DSC uporabljamo pri analizi prekrivajočih se dogodkov.
- MT DSC omogoča:
 - ločevanje prekrivajočih se prehodov in s tem neodvisno optimizacijo občutljivosti in ločljivosti, kar izboljša zaznavanje šibkih prehodov (13);
 - omogoča ločevanje steklastega prehoda od relaksacije in
 - ločevanje simultane taljenja od kristalizacije.

Glavna pomanjkljivost metode so dolgotrajne meritve.



Slika 6: Periodično (modelirano) nihanje hitrosti segrevanja

1.2.2.1 TOPEM[®] - NOVEJŠA IZVEDBA METODE MT-DSC

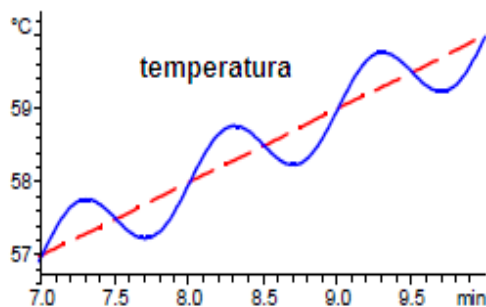
Metode MT-DSC omogočajo ločevanje tako od temperature odvisnih kot tudi časovno odvisnih procesov.

Pri metodi TOPEM[®] gre na splošno za prekrivanje temperature s časovno vrsto stohastičnih (naključnih) temperaturnih impulzov, ki trajajo različno dolgo (Slika 7b).

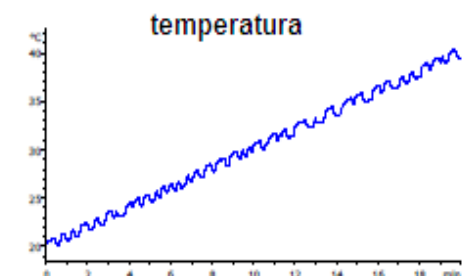
Uporabljene metode do sedaj so omogočale prekrivanje temperature z (običajno) sinusoidno modulacijo temperature z eno frekvenco (Slika 7a). V nasprotju z omenjenimi metodami, TOPEM[®], novejša in naprednejša večfrekvenčna izvedba z modulacijo temperature, uporablja število različnih frekvenc.

Kot rezultat je osnovna hitrost segrevanja modulirana s širokopasovnimi frekvencami. Bistvo modulacije je razmeroma hitro spreminjanje signala. Lastnosti vzorca se lahko določijo v odvisnosti od časa in temperature v širokem frekvenčnem območju. Zahvaljujoč pogostnosti informacij, je možno učinke, ki se premikajo s frekvenco, jasno razlikovati od učinkov, ki so neodvisni od frekvence. To zelo poenostavi interpretacijo vzorcev, kjer se kažejo prekrivajoči učinki (18).

a) **Periodična (enofrekvenčna) modulacija**



b) **TOPEM[®]**



Temperaturni profil dveh različnih MT-DSC izvedb

Slika 7a: Sinusoidna modulacija temperature z eno frekvenco

Slika 7b: TOPEM[®] izvedba

Izvedba metode in nastavitve parametrov

MT DSC metode se izvajajo na isti aparaturi, edina razlika pri izvedbi teh metod je uporaba različnih ukazov v računalniškem programu.

Pri TOPEM[®] je obvezna določitev nekaterih eksperimentalnih parametrov (19):

- temperaturni razpon območja meritve: s tem so zajeti temperaturni intervali (npr. steklast prehod),
- hitrost ohlajanja in segrevanja: s tem se je mogoče izogniti strukturni relaksaciji,
- amplituda (naključnih) temperaturnih impulzov,
- preklaplajoči časovni razpon, ki omejuje trajanje impulzov.

1.2.2.1.1 ZNAČILNOSTI IN PREDNOSTI TOPEM[®]:

- *Ena meritev* – istočasno merjenje lastnosti vzorca kot funkcije v odvisnosti od časa in temperature pri širokem frekvenčnem območju.
- *Hkratna visoka občutljivost in visoka ločljivost* – omogoča merjenje nizkoenergijskih prehodov in/ali blizu ležečih od temperature odvisnih učinkov.

- *Ločevanje reverzibilnih in ireverzibilnih procesov* – določevanje z neprimerljivo kakovostjo, tudi, če se učinki prekrivajo.
- *Poenostavlja interpretacijo* – frekvenčno odvisne učinke (npr. steklaste prehode), se lahko zelo enostavno loči od učinkov, ki so od frekvence neodvisni (npr. izgubo vlage, kristalizacijo, taljenje) (18, 19).

1.2.2.1.2 UPORABA TOPEM[®]:

Povzetek uporabe TOPEM[®] je prikazan v spodnji tabeli (Tabela 1) (18):

Tabela 1

| Industrija | Učinki, ki jih je možno analizirati s TOPEM[®] |
|---|---|
| Avtomobilaska in letalska | Vpliv vlage, steklasti prehodi, vitrifikacija. |
| Kemična | Eksotermne reakcije (varnostne preiskave), steklast prehod, kinetika, kristalizacija, polimorfizem, sušenje, toplotna kapaciteta. |
| Elektronika | Steklast prehod, vitrifikacija. |
| Barvna | Vpliv vlage, steklast prehod, sušenje, vitrifikacija. |
| Gum (elastomerov) | Steklast prehod, ločevanje faz, taljenje, vulkanizacija. |
| Plastičnih mas (termoplasti, duroplasti, vlakna, filmi, tekstil, lepila, embalaža in kabli) | Vpliv vlage, relaksacijska entalpija, steklast prehod, kristalizacija, ločevanje faz, taljenje, vitrifikacija, toplotna kapaciteta. |
| Živilska | Vpliv vlage, geliranje, steklast prehod, lepljivost, polimorfizem, sušenje. |
| Farmacevtska | Vpliv vlage, steklast prehod, taljenje, kristalizacija, polimorfizem, sušenje, toplotna kapaciteta, stabilnost. |
| Raziskave in razvoj | Vse zgoraj naštetu in fizikalna narava prehodov. |

1.3 LIOFILIZACIJA

Liofilizacija je proces sušenja, pri katerem vzorec v tekočem stanju najprej zamrzne, temu sledi odstranitev vode iz vzorca v prvem koraku s sublimacijo in kasneje z desorpcijo vode do količine, ki ne bo več omogočala mikrobiološke rasti ali kemičnih reakcij. Liofilizacija je torej proces, ki zagotavlja stabilizacijo labilnih molekul (npr. termolabilne molekule) v vzorcu za čas distribucije in shranjevanja izdelka (20, 21).

Zamrzovanje raztopine je kritičen proces pri izdelovanju ustreznega liofiliziranega izdelka. Gre za imobilizacijo učinkovine in pomožnih snovi. Po zamrznitvi ostanejo struktura, oblika in debelina vzorca na videz nespremenjeni (22).

Proces zamrzovanja in sestava raztopine vplivajo na morfologijo ledenih kristalov, na poroznost pogače, hitrost primarnega in sekundarnega sušenja, morebitno agregacijo pri proteinih, obseg kristalizacije pomožnih snovi in na površino liofilizata (22).

Na proces zamrzovanja vplivajo tudi narava komponent in toplotni tok ter hitrost zamrzovanja oz. temperaturni program. Zamrzovanje naj bi bilo izvedeno pod temperaturo steklastega prehoda amorfnih komponent vzorca ali pod temperaturo kristalizacije evtektika, da zagotovimo popolno solidifikacijo vzorca.

1.3.1 PREDNOSTI IN SLABOSTI LIOFILIZACIJE

Prednosti:

- **Ohranitev aktivnosti zdravilne učinkovine:** Proces liofilizacije je priznan kot primeren postopek sušenja, saj poteka pri nizki temperaturi in tako ščiti termolabilne substance. Poleg tega se stabilnost substance poveča, če je v vzorcu prisotne manj vode, kar je cilj liofilizacije. Med postopkom zamrzovanja pride do imobilizacije vzorca in prepreči se kontakt med posameznimi kemično reaktivnimi molekulami. Liofilizacija je vakuumski proces, pri katerem ni prisotnega kisika in so s tem preprečene oksidativne reakcije, kar je še dodaten faktor pri zagotavljanju ohranitve aktivnosti zdravilne učinkovine (23).
- **Ohranitev oblike vzorca:** Imobilizacija vzorca, do katere pride med postopkom zamrzovanja, omogoči, da je prostornina pogače liofilizata enaka prostornini začetne raztopine, polnjene v vialo. Ta lastnost je zaželena predvsem iz vizualno-kakovostnega vidika (23).

- **Enostavna rekonstitucija vzorca:** Liofilizirani izdelek je zelo porozen suhi produkt z liofilnimi lastnostmi. To pomeni, da ob dodatku vnaprej določene količine topila (najpogosteje vode), tega zelo hitro reabsorbira in vzorec obnovi v začetno originalno stanje, raztopino (20).
- **Daljši rok uporabnosti:** Za liofilizat je zaželeno, da ima končno vsebnost vode manjšo od 2% m/m. Rezultat tega je večja stabilnost zdravila med shranjevanjem in daljši rok uporabnosti. Zaradi tega je možna izdelava večjih serij zdravila, olajšana je distribucija in shranjevanje zdravila, kar pomeni nižje stroške za izdelavo zdravila (23).
- **Natančno odmerjanje:** Zdravila morajo biti natančno odmerjena, da so doseženi želeni učinki in hkrati preprečeni stranski kot posledica prekomernega odmerjanja. Pred liofilizacijo se točen odmerek zdravila pripravi v vialo v obliki raztopine. Temu sledi proces odstranjevanja vode in rezultat je suhi liofilizat. Pred aplikacijo zdravila se liofilizatu doda znana količina topila (npr. vode) in zdravilo je pripravljeno za apliciranje (23).
- **Sterilna proizvodnja:** Sterilnost je eden izmed pogojev, ki mora biti izpolnjen, če želimo aplicirati zdravilo parenteralno (24). Sterilnost liofiliziranega izdelka dosežemo z aseptičnim načinom priprave vzorca in s predhodno sterilizacijo liofilizatorja (23).

Slabosti:

- **Hitrost procesa liofilizacije:** Liofilizacijski proces je zelo počasen. Že sam cikel zamrzovanja in sušenja redko traja manj kot 24 ur. Temu potem sledi še odmrzovanje kondenzatorja, čiščenje in sterilizacija liofilizatorja, kar pomeni, da se na teden lahko izdajo le približno tri serije (23).
- **Stroški opreme in obratovanja:** Farmacevtskemu podjetju, ki želi razviti proizvodnjo liofiliziranih izdelkov, predstavlja nakup opreme veliko finančno investicijo. Poleg tega so tudi operativno stroški liofilizatorja visoki, saj je zelo neučinkovit v izrabi energije (23).

Vse naštetih pomanjkljivosti liofilizacijskega procesa, predvsem cena in omejena proizvodnja, lahko delno zasenčijo prednosti liofilizacije. Dejstvo je, da v primeru, če se lahko pripravi stabilno raztopino za parenteralno uporabo, ki ni občutljiva na termično obdelavo v procesu sterilizacije, potem je liofilizacija tega vzorca nepotrebna. Kadar pa je pripravljena raztopina termično nestabilna, ima prednost liofilizacijski proces in priprava produkta v trdni obliki. Potrebno je upoštevati, da je zaradi vseh naštetih specifičnosti

procesa, vrednost končnega liofilizata toliko višja. Poleg tega je neprecenljivo dejstvo, da se s tem procesom zelo poveča stabilnost produkta (21, 23).

1.3.2 TEMPERTATURA STEKLASTEGA PREHODA LIOFILIZATA

Za doseganje daljše stabilnosti liofiliziranega izdelka je pomembna določitev Tg njegove amorfne faze npr. z metodo DSC. Tg mora biti višji od temperature, pri kateri se bo suhi izdelek shranjeval. Glede na to, da voda znižuje Tg amorfne faze, je potrebno doseči čimmanjšo končno vsebnost vode v liofilizatu. S tem je zagotovljena višja Tg liofilizata in zagotovljeno shranjevanje pri sprejemljivih temperaturah (25).

2 NAMEN DELA

➤ Izbira metode

MT DSC metoda za proučevanje vpliva pomožnih snovi na steklaste prehode zamrznjenih raztopin.

➤ Natančneje nas je zanimal vpliv različnih kombinacij pomožnih snovi:

- polietilenglikola (1%, 5% in 10% PEG) in
- pufrov (Na-acetatnega in Na-citratnega) na temperaturo steklastega prehoda (T_g') zamrznjenih raztopin:
 - različnih koncentracij in
 - različnih mas.

➤ Prikaz rezultatov meritev v tabeli, in sicer ločeno za Na-acetatni in Na-citratni pufer; pH raztopin je 4,5.

➤ Primerjava T_{ONSET} in T_g' glede na spreminjanje mase in koncentracije vzorcev zamrznjenih raztopin. T_{ONSET} je temperatura, pri kateri amorfna snov začne prehajati v steklasto, zmehčano stanje.

Temperaturni program

Na podlagi predhodnih preskusov, smo se odločili za naslednji temperaturni program:

- ohlajanje na -75°C s hitrostjo -5 K/min ($\pm 0,5\text{ K/min}$) in
- segrevanje s hitrostjo 2 K/min do temperature 0°C .

Naš cilj je bil potrditev, da je citratni pufer bolj primeren od acetatnega pri postopku globokega zamrzovanja (26) ter da imata koncentracija in masa PEG v raztopinah (27, 28, 29) pomembno vlogo pri spremembah, ki jih zaznavamo na termogramih.

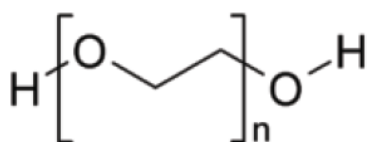
3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 MATERIALI

3.1.1 MAKROGOLI IN DERIVATI

Makrogoli (polietilenglikoli) oziroma njihovi derivati so pogosto uporabljane pomožne snovi. Med derivati so pogosti zlasti estri z maščobnimi kislinami in etri z dolgoverižnimi alkoholi, vključenih pa je različno število monomernih oksietilenskih enot.

Makrogol ali polietilenglikol je homopolimer iz oksietilenskih enot. Številka v imenu podaja povprečno molekulsko maso spojine. Včasih je v imenu podana tudi vrednost monomernih enot.



Slika 8: Splošna formula PEG z molekulsko maso n

S: polietilenglikol; polietilenoksid; polioksietilen; PEG

lat.: Macrogolum

ang.: Macrogol

ang. S: Polyethyleneglycol; PEG; Carbowax; Pluracol E; Poly(ethylene oxide); Ploy-G;

Polyglycol E; Polyoxyethyleneglycol; Polyoxyethylene

Makrogoli so podlaga za kreme in mazila, supozitориjska podlaga, emulgator, solubilizator, vezivo, mazivo pri tabletiranju, drsilo v tabletah in kapsulah, plastifikator pri filmskih oblogah, za oblikovanje farmacevtskih oblik z nadzorovanim sproščanjem, v kremah in mlečnih losjonih, polietilenglikol, polimer etilenoksida, polioksietilen, tekoči in trdni polimeri s splošno formula $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, pri čemer je $n > 3$, brezbarvna, viskozna tekočina ($M_r = 200\text{-}400$), bela poltrdna snov ($M_r = 400\text{-}1000$), trdna snov ($M_r = 1000 - 6000$) brez vonja (30, 31, 32).

Kemijsko je PEG 10000 polietilenglikol s povprečno molekulsko maso 10000. Pri delu smo uporabljali makrogol s povprečno molekulsko maso $M_r = 9000 - 11250$, bela ali skoraj bela trdna snov z voskastim ali parafinskim videzom in $T_{tal} 58-63^{\circ}C$. PEG 10000 se nahaja v obliki belih voskastih lusk ali praška. Gre za kristalinični polimer, ki je dobro topen v vodi. Na podočju liofilizacije se uporablja kot pospeševalec topnosti, uporablja se za doseganje primerne pogače liofiliziranega izdelka in kot krioprotektant, kar pomeni, da ščiti protein v procesu zamrzovanja (22, 29). Skupina pomožnih snovi, ki imajo krioprotektivni učinek že pri koncentraciji manjši od 1% m/v, so PEG. To so polimeri z zelo različnimi molekulskimi masami in posledično z različnimi fizikalnimi lastnostmi, vendar so topni v vodi. Njihov krioprotektivni učinek je odvisen od njihove molekulske mase in koncentracije. PEG z višjo molekulsko maso (npr. PEG 8000) ščitijo med procesom liofilizacije protein tako, da povežejo tetramerno strukturo proteina in ga tako stabilizirajo in ohranijo aktivnost proteina. PEG polimeri so strukturno fleksibilni in lahko preuredijo konfiguracijo z namenom, da zaščitijo protein preko povezave z njim. Drugače se kombinacija PEG različnih molekulskih mas na splošno zelo pogosto uporablja v farmacevtskih izdelkih kot osnova za svečke, sredstvo za uravnavanje viskoznosti raztopin in stabilizatorji emulzij. PEG višjih molekulskih mas se uporabljajo tudi kot sredstvo za povečanje učinkovitosti veziv ali kot mazivo pri tabletiranju (33).

3.1.2 PREČIŠČENA VODA

lat.: Aqua purificata

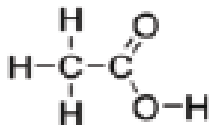
ang.: Purified Water

H₂O

Če ni drugače utemeljeno in dovoljeno, je prečiščena voda namenjena izdelavi zdravil, razen za tista, za katera sta zahtevani sterilnost in apirogenost. Prečiščeno vodo za nadaljnjo uporabo pridobivamo z destilacijo, ionsko izmenjavo, reverzno osmozo ali s katerimkoli drugim ustreznim postopkom iz uradno neoporečne pitne vode. Gre za bistro, brezbarvno tekočino, brez vonja in okusa.

Je topilo, ki se uporablja za pripravo raztopin. Pri postopku liofilizacije se voda odstrani.

3.1.3 OCETNA KISLINA, BREZVODNA



Slika 9: Strukturna formula etanojske (ocetne) kisline

Etanojska ali ocetna kislina je v tekočem agregatnem stanju, brez barve in vonja po jedkem. Brezvodna ocetna kislina se imenuje tudi ledocet, saj že pri temperaturi pod 16,7°C tvori ledu podobne kristale.

Pri delu smo uporabljali brezvodno ocetno kislino kot snov za uravnavanje pH v pufernih raztopinah. Kot komponenta pufru ima vlogo šibke kisline.

3.1.4 NATRIJEV HIDROKSID

ang.: Sodium hydroxide

Natrijev hidroksid, NaOH, MM=40 g/mol

Gre za belo kristalinično snov, ki se nahaja v obliki pelet ali palčk (34). Je higroskopen in absorbira ogljikov dioksid iz zraka. V vodi je dobro topen in se raztaplja eksotermno. Je zelo koroziven in v stiku s kožo povzroči hude opekline. NaOH je jedka baza, ki raztopljena v vodi tvori močno alkalno raztopino. Danes je najpogosteje uporabljena baza v kemijskih laboratorijih kot sredstvo za nevtralizacijo kislih raztopin in pri titracijah za določanje koncentracij kislin v raztopini (35, 36).

Pri delu smo uporabljali NaOH kot komponento pufru.

3.1.5 CITRONSKA KISLINA, BREZVODNA

S: E330

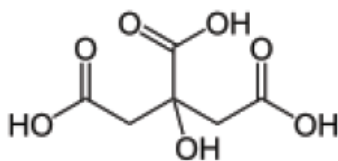
lat.: Acidum citricum anhydricum

ang.: Citric acid, anhydrous

ang. S: β -Hydroxytricarboxylic acid; 2-Hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid

2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilna kislina;

$C_6H_8O_7$



Slika 10: Formula brezvodne očetne kisline

Brezvodna citronska kislina je sredstvo za uravnavanje kislosti, kelator, korigens okusa, v šumečih zrnih ali tabletah, brezbarvni, monoklinski kristali ali zrnca ali bel kristaliničen prah brez vonja in z močno kislim okusom.

Citronska kislina se pogosto uporablja za pripravo farmacevtskih izdelkov. Znana je po tem, da tvori amorfne strukture, glede na način postopka izdelave. Tvori amorfne mešanice z učinkovinami, ki so običajno težko vodotopne (37).

Pri delu smo uporabljali brezvodno citronsko kislino kot snov za uravnavanje pH v pufernih raztopinah. Kot komponenta pufra ima vlogo šibke kisline.

3.1.6 REAGENT ZA ZAMRZOVANJE

Dušik, >99,999 vol.%, Messer, Slovenija

Pri MT DSC metodi smo pri zamrzovanju uporabljali tekoči dušik. To je dušik v tekočem stanju pri zelo nizkih temperaturah (pri atmosferskem tlaku se utekočini pri temperaturi -196°C).

3.2 APARATURE

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje aparature:

- analizna tehtnica: A-150-sx, Cobos, Španija
- analizna tehtnica: AG 245, razred točnosti I, Mettler Toledo, Švica
- tehtnica: Exacta 300 EB, Železniki, Slovenija
- naprava za merjenje vrednosti pH raztopin: pH METER, Mettler Toledo MA235, Švica
- magnetno mešalo MM-531, Železniki, Slovenija
- aluminijski lončki, Perkin-Elmer, ZDA
- stiskalnica, Perkin.Elmer, ZDA
- diferenčni dinamični kalorimeter: Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1 (Slika 11), opremljen s programsko opremo STARe System, Software v9.10, Švica

DSC je oprema, ki omogoča kvalitativno in kvantitativno vrednotenje fizikalnih in kemijskih procesov v trdnih, poltrdnih in tekočih sistemih (vzorcih).

- Lastnosti: temperaturno območje od -100 do 450 °C; občutljivost od 0,04 μ W do 0,01 μ W; možnost uporabe kot klasičnega DSC ali kot MT DSC.
- Pogosta uporaba v farmaciji: določanje faznih prehodov 1. (npr. taljenje) ali 2. reda (temperatura steklastega prehoda), študije polimorfizma in amorfne stanja trdnih snovi, oksidativna stabilnost, kompatibilnostne študije, idr.



Slika 11: Diferenčni dinamični kalorimeter: Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1

3.3 METODE

3.3.1 PRIPRAVA VZORCEV RAZTOPIN

- V prvi stopnji pripravimo pufre, ki predstavljajo topilo za pomožne snovi.

➤ **Priprava 1 M NaOH:**

$M(\text{NaOH})=40,0 \text{ g/mol}$

$m(\text{NaOH})=4,0 \text{ g}$

$V(\text{voda za injekcije})=100 \text{ mL (0,1 L)}$

V merilni čolnič zatehtamo z analitsko tehtnico 4,0 g NaOH. V 100 mL bučko nalijemo manjšo količino vode za injekcije, dodamo trden NaOH in dopolnimo do oznake. Pri tem pride so segrevanja raztopine, zato bučko med mešanjem ohlajamo. Bučka med mešanjem ne sme biti zaprta, da ne odnese pokrovčka.

➤ **Kalibracija pH metra:**

Elektrodo speremo s prečiščeno vodo. Nato potopimo elektrodo v pufer s pH 4,005 in izmerimo $\text{pH}=4,00$ ($T=23,6^\circ\text{C}$). Temu sledi potopitev elektrode v pufer s pH 7,00 in izmerimo $\text{pH}=7,00$. pH meter določi pH ničelno točko 6,64 in občutljivost 97,1%. Vrednosti so v mejah sprejemljivega (pH ničelna točka je med 5,80 in 7,50, občutljivost je med 90 in 103%) in kalibracija je končana.

➤ **Priprava acetatnega pufra**

$m(\text{CH}_3\text{COOH})=7,5 \text{ g}$

prečiščena voda

raztopina 1 M NaOH

V čaši raztopimo očetno kislino v prečiščeni vodi, med mešanjem na električnem mešalu. Izmerimo začetni $\text{pH}=2,97$ ($T=22,3^\circ\text{C}$). Med mešanjem postopoma dodajamo po 5 mL 1 M raztopine NaOH in ob vsakem dodatku izmerimo vrednost pH raztopine. V končni fazi dodamo toliko raztopine NaOH, da dosežemo želeno vrednost pH raztopine = 4,5, oziroma v našem primeru 4,519.

Za pripravo 0,5 M acetatnega pufra s $\text{pH}=4,5$, v 250 mL bučki, smo porabili približno 30 mL NaOH. Dodatek raztopine NaOH se lahko razlikuje od ene do druge priprave pufra.

Nato smo pripravili 0,05 M acetatni pufer tako, da smo 25 mL 0,5 M acetatnega pufera redčili 10-kratno v 250 mL bučko. pH se pri tem ni bistveno spreminjal (pH=4,54).

➤ **Priprava citratnega pufera**

$m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7)=9,6 \text{ g}$

prečiščena voda

ratopina 1 M NaOH

V čaši raztopimo citrsko kislino v prečiščeni vodi, med mešanjem na električnem mešalu. Izmerimo začetni pH=2,082 ($T=23,4 \text{ }^\circ\text{C}$). Med mešanjem postopoma dodajamo po 4 mL 1 M raztopine NaOH in ob vsakem dodatku izmerimo vrednost pH raztopine. V končni fazi dodamo toliko raztopine NaOH, da dosežemo želeno vrednost pH raztopine = 4,5, oziroma v našem primeru 4,56.

Za pripravo 0,5 M citratnega pufera s pH=4,5, v 100 mL bučki, smo porabili približno 76 mL NaOH.

Nato smo pripravili 0,05 M citratni pufer tako, da smo 10 mL 0,5 M citratnega pufera redčili 10-kratno v 100 mL bučko. pH se pri tem ni bistveno spreminjal (pH=4,55).

➤ **Priprava vodnih raztopin različnih koncentracij, s PEG 10000**

- $m(\text{PEG } 10000)=100 \text{ mg}$; voda za injekcije

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnimo z vodo do oznake. Dobimo 1% raztopino PEG.

- $m(\text{PEG } 10000)=500 \text{ mg}$; voda za injekcije

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnimo z vodo do oznake. Dobimo 5% raztopino PEG.

- $m(\text{PEG } 10000)=1000 \text{ mg}$; voda za injekcije

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnimo z vodo do oznake. Dobimo 10% raztopino PEG.

➤ **Priprava raztopin acetatnega pufera s PEG 10000 različnih koncentracij**

- $m(\text{PEG } 10000)=100 \text{ mg}$; 0,05 M in 0,5 M Na-acetatni pufer

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnimo s posameznim Na-acetatnim pufrom do oznake. Dobimo 1% raztopino PEG v 0,05 M in v 0,5 M Na-acetatnem pufu.

- $m(\text{PEG } 10000)=500 \text{ mg}$; 0,05 M in 0,5 M Na-acetatni pufer

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnemo s posameznim Na-acetatnim pufrom do oznake. Dobimo 5% raztopino PEG v 0,05 M in v 0,5 M Na-acetatnem pufru.

- m (PEG 10000)=1000 mg; 0,05 M in 0,5 M Na-acetatni pufer

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnemo s posameznim Na-acetatnim pufrom do oznake. Dobimo 1% raztopino PEG v 0,05 M in v 0,5 M Na-acetatnem pufru.

➤ **Priprava raztopin citratnega puфра s PEG 10000 različnih koncentracij**

- m (PEG 10000)=100 mg; 0,05 M in 0,5 M Na-citratni pufer

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnemo s posameznim Na-citratnim pufrom do oznake. Dobimo 1% raztopino PEG v 0,05 M in v 0,5 M Na-citratnem pufru.

- m (PEG 10000)=500 mg; 0,05 M in 0,5 M Na-citratni pufer

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnemo s posameznim Na-citratnim pufrom do oznake. Dobimo 5% raztopino PEG v 0,05 M in v 0,5 M Na-citratnem pufru.

- m (PEG 10000)=1000 mg; 0,05 M in 0,5 M Na-citratni pufer

PEG raztopimo v 10 mL bučki in dopolnemo s posameznim Na-citratnim pufrom do oznake. Dobimo 1% raztopino PEG v 0,05 M in v 0,5 M Na-citratnem pufru.

3.3.2 VZORCI, NAMENJENI ANALITIKI Z MT DSC

- voda za injekcije
- Na-acetatni pufer 0,05 mol/L (M)
- Na-acetatni pufer 0,5 M
- Na-citratni pufer 0,05 M
- Na-citratni pufer 0,5 M
- vodna raztopina 1% PEG 10000
- vodna raztopina 5% PEG 10000
- vodna raztopina 10% PEG 10000
- raztopina Na-acetatnega puфра 0,05 M z 1% PEG 10000
- raztopina Na-acetatnega puфра 0,05 M s 5% PEG 10000
- raztopina Na-acetatnega puфра 0,05 M z 10% PEG 10000
- raztopina Na-citratnega puфра 0,05 M z 1% PEG 10000
- raztopina Na-citratnega puфра 0,05 M s 5% PEG 10000
- raztopina Na-citratnega puфра 0,05 M z 10% PEG 10000

- raztopina Na-acetatnega pufra 0,5 M z 1% PEG 10000
- raztopina Na-acetatnega pufra 0,5 M s 5% PEG 10000
- raztopina Na-acetatnega pufra 0,5 M z 10% PEG 10000
- raztopina Na-citratnega pufra 0,5 M z 1% PEG 10000
- raztopina Na-citratnega pufra 0,5 M s 5% PEG 10000
- raztopina Na-citratnega pufra 0,5 M z 10% PEG 10000

3.3.3 TERMIČNA ANALIZA Z MT-DSC

Termično analizo vzorčnih raztopin smo izvedli z diferenčnim dinamičnim kalorimetrom Mettler Toledo DSC1, opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.10. Vzorce smo ohlajali do $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato pa segrevali od -75°C do 0°C . Hitrost ohlajanja je bila -5 K/min ($\pm 0,5\text{ K/min}$), hitrost segrevanja pa je bila $+2\text{ K/min}$. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi, s pretokom dušika 40 mL/min .

Meritve

Pripravili smo prazne aluminijaste posodice. Najprej smo stehali prazno aluminijasto posodico, nato pa še z vzorcem, ki smo ga nanegli tik pred meritvijo. Tako smo dobili maso vzorca. Pokrovčke smo s stiskalnico hermetično zaprli, da se izognemo izgubam zaradi hlapenja, kajti vzorce smo imeli v obliki raztopin. Posodico z vzorcem smo namestili v levo merilno celico, v desni pa je bila nameščena referenčna posodica.

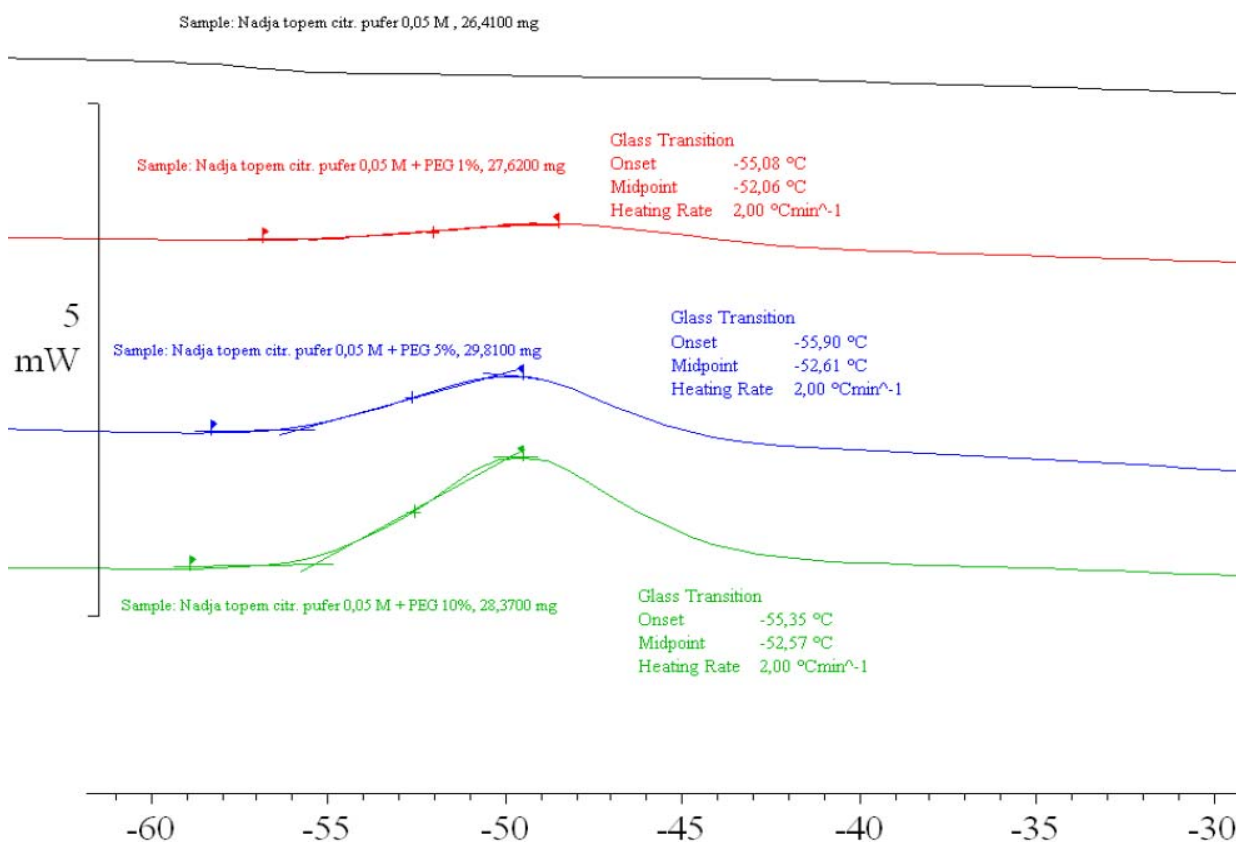
Termične lastnosti raztopin smo določali z MT DSC (TOPEM[®]) metodo. Najprej smo vključili hladilnik Intracooler 2P in odprli ventil za pretok N_2 . Prepihanje z dušikom je potrebno, da se prepreči kondenzacija vode na lonček. Nastavili smo kritične parametre v izbrani program (temperaturo, hitrost ohlajanja/segrevanja, masa vzorca) in začeli z meritvijo. Pomembno je, da s posodicami rokujemo le z uporabo pincete in da so popolnoma čiste, preden jih vstavimo v merilni celici.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

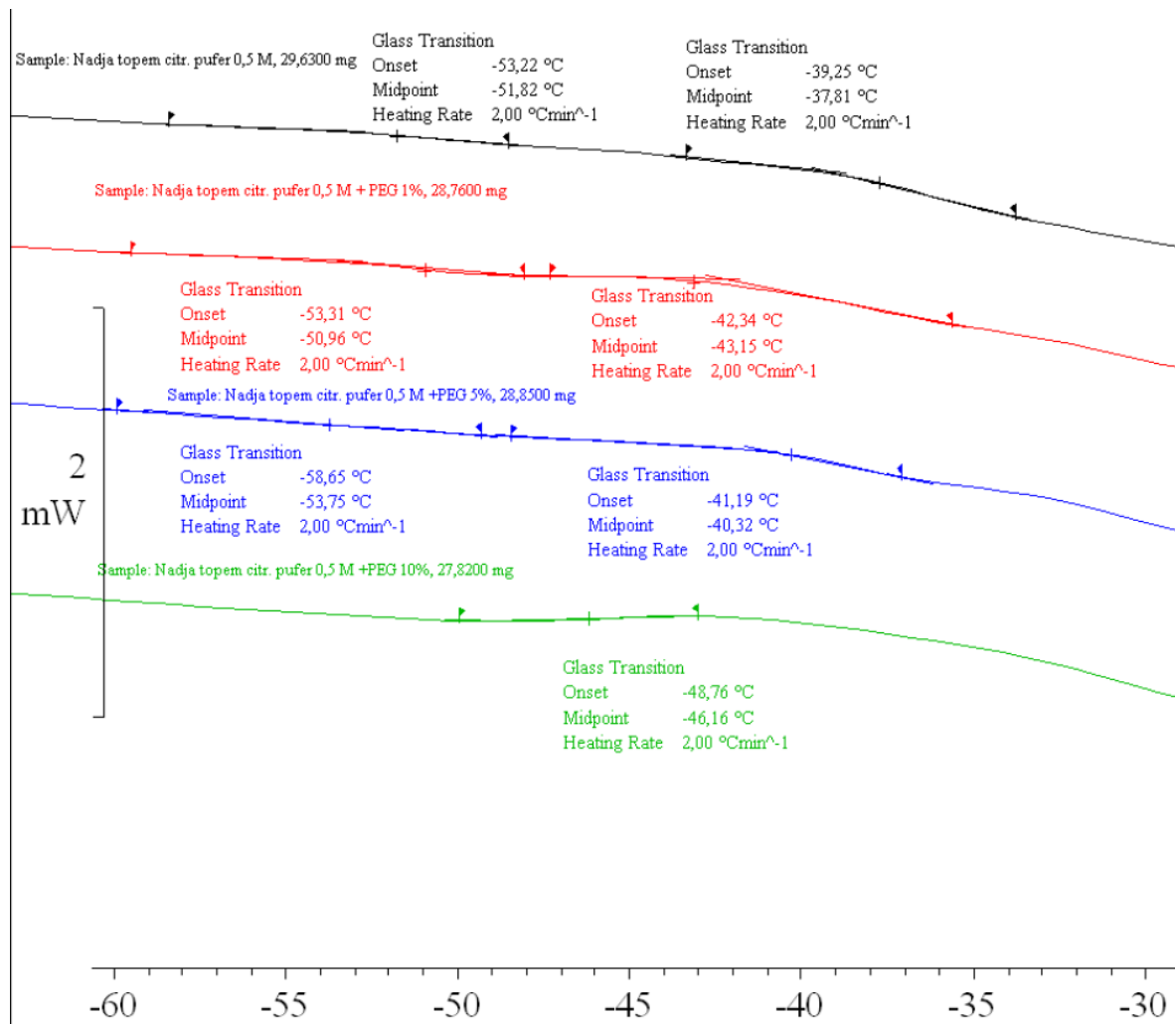
4.1 MERJENJE TEMPERATURE STEKLASTEGA PREHODA Z METODO MT DSC

V prilogi so predstavljeni termogrami, na katerih so izmed opaženih dogodkov steklasti prehodi (T_g') za raztopine PEG različnih koncentracij, v Na-acetatnem in Na-citratnem pufri.

Pri vsaki meritvi smo razčlenili termograme na tri komponente: TOTAL, REV, NON-REV. Na ta način se ločijo ireverzibilni pojavi od reverzibilnih ter celotna energija. Vsi termogrami izmerjenih raztopin se nahajajo na koncu, v prilogi (PRILOGA 1). Vsak termogram prikazuje reverzibilno komponento, kjer so jasno označene T_g' , T_{ONSET} in osnovni podatki o analiziranem vzorcu. Primer omenjenih termogramov 0,05 M in 0,5 M Na-citratnega pufru s PEG, prikazujeta sliki: Slika 12 in Slika 13.



Slika 12: Termogram - prikaz T_g' kot funkcijo koncentracije vzorca; 0,05 M Na-citratni pufer in 1%, 5% in 10% PEG.



Slika 13: Termogram - prikaz Tg' kot funkcijo koncentracije vzorca; 0,5 M citratni pufer in 1%, 5% in 10% PEG.

4.2 TABELARIČNI PRIKAZ Tg' GLEDE NA KONCENTRACIJO IN MASO VZORCA

- Rezultati kažejo odziv Tg' glede na **koncentracijo** in **maso** vzorca (Tabela 2 in Tabela 3).

Tabela 2: Na-citratni pufer

| Koncentracija vzorca (mol/L) | Masa vzorca (mg) | T _{ONSET} (°C) | Tg' vzorca (°C) |
|------------------------------|------------------|-------------------------|-----------------|
| 0,05 M | 42,70 | -52,43 | -51,11 |
| | 26,41 | -48,59 | -47,82 |
| 0,05 M + 1% PEG | 27,62 | -55,08 | -52,06 |
| | 25,56 | -55,52 | -52,12 |
| 0,05 M + 5% PEG | 29,81 | -55,90 | -52,61 |
| | 25,10 | -55,03 | -52,59 |
| 0,05 M + 10% PEG | 28,37 | -55,35 | -52,57 |
| | 24,88 | -54,77 | -53,07 |
| 0,5 M | 29,98 | -52,27 | -53,35 |
| | | -39,31 | -37,76 |
| 0,5 M + 1% PEG | 29,63 | -39,19 | -38,43 |
| | 26,76 | -41,78 | -43,57 |
| 0,5 M + 5% PEG | 28,76 | -42,08 | -41,39 |
| | 24,73 | -50,53 | -47,89 |
| 0,5 M + 10% PEG | 28,85 | -51,01 | -47,82 |
| | 28,24 | -51,77 | -47,98 |
| | 27,82 | -52,07 | -49,00 |

Tabela 3: Na-acetatni pufer

| Koncentracija vzorca (mol/L) | Masa vzorca (mg) | T _{ONSET} (°C) | Tg' vzorca (°C) |
|---------------------------------|------------------|-------------------------|-----------------|
| 0,05 M | 22,49 | -54,71 | -51,91 |
| | 22,68 | -53,13 | -51,71 |
| 0,05 M + 1% PEG | 9,94 | -55,23 | -51,28 |
| | 33,46 | -55,41 | -53,36 |
| 0,05 M + 5% PEG | 3,77 | -57,26 | -52,66 |
| | 25,32 | -57,31 | -53,70 |
| 0,05 M + 10% PEG | 4,84 | -56,34 | -52,95 |
| | 25,60 | -56,08 | -53,33 |
| 0,5 M | 4,34 | -37,90 | -37,23 |
| | 20,03 | -60,51 | -52,55 |
| | | -36,41 | -34,32 |
| 0,5 M + 1% PEG | 7,33 | -56,06 | -51,13 |
| | 24,91 | -55,05 | -52,71 |
| 0,5 M + 5% PEG | 6,47 | -53,78 | -51,00 |
| | 26,77 | -53,38 | -50,65 |
| 0,5 M + 10% PEG | 4,922 | -50,22 | -46,21 |
| | 22,44 | -50,08 | -46,35 |

4.3 INTERPRETACIJA MERITEV

Z metodo MT DSC smo analizirali izhodne snovi, ki se uporabljajo za pripravo končnih farmacevtskih oblik.

Pripravili smo Na-acetatni in Na-citratni pufer s pH 4,5, različnih koncentracij, s 1%, 5% in 10% PEG 10000. Pri tem smo se odločili za primerjavo z razpoložljivimi podatki (26, 37). Glede na vire, smo Tg' obravnavali v temperaturnem intervalu od -60 do -30°C.

Tabela 3: Primerjava meritev Tg' glede na razpoložljive podatke.

| | Tg' (°C) |
|------------------------------------|----------|
| Podatki v literaturi za: | |
| • 0,25 M Na-citrat, pH 4,5 (17) in | -46 |
| • citronsko kislino (43) | -53 |
| Vzorec 0,05 M Na-citrata | -47,82 |
| Vzorec 0,5 M Na-citrata | -53,35 |
| | -37,76 |

Mnogo farmacevtskih oblik vsebuje pufer za vzdrževanje pH in za zagotovitev optimalne kemijske in fizikalne stabilnosti. Komponenta, ki pripada pufru v preiskovanem vzorcu, lahko kristalizira med postopkom zamrzovanja. Posledice se lahko odražajo v pomembnih spremembah pH (38), ki so običajno nezaželene in bi se jim morali izogniti. Na-citratni pufer ima namreč visoko Tg' v primerjavi z nekaterimi drugimi pufrmi pri enakem pH. Na podlagi številnih meritev je Na-citratni pufer primernejši za uporabo pri liofiliziranih farmacevtskih oblikah, zaradi višje Tg' in manjše možnosti za kristalizacijo (26). Na kristalizacijo močno vpliva med drugim tudi velikost vzorca (pri večjih masah se bolj odraža kristalizacija) (39).

➤ Dogodki (Tg') in njihova lega glede na absciso, ki ponazarja temperaturno lestvico (T):

a) *kot funkcija koncentracije:*

Glede na tabelarni prikaz meritev, je pri Na-acetatnem in Na-citratnem pufru razvidno, da je pri večjih koncentracijah analiziranih vzorcev zamrznjenih raztopin, višja Tg'.

Sklepamo, da se T_g' večja s koncentracijo soli kot funkcija molarnosti NaOH/citronska kislina (26).

Povečanje T_g' z večanjem vsebnosti natrija, si lahko razlagamo kot posledico povečanja ionskih interakcij, ki nastanejo med povečanjem koncentracije ionskih raztopin. Znano je dejstvo, da imajo soli pogosteje višjo T_g' kot proste kisline, ki jim ustrezajo. Pomembno je poudariti, da T_g' zamrznjenih raztopin ni odvisna zgolj od topljenca (npr. količine soli), temveč tudi od vsebnosti vode v zamrznjenem vzorcu (26).

b) kot funkcija mase:

Masa vzorcev zamrznjenih raztopin glede na naše meritve nima pomembnega vpliva na vrednost T_g' , poveča le nekoliko odziv na termogramu.

Sklepamo, da ni večjih sprememb pri odzivu in vrednostih T_g' , verjetno zaradi premajhne razlike v masah. Sprva smo izvedli meritve na vzorcih z majhnimi masami, nato pa smo glede na razpoložljive podatke (19, 37) izvedli meritve s priporočljivimi večjimi masami vzorcev, približno od 20 mg naprej. Zato smo se odločili, da bomo primerjali meritve prvotnih manjših mas vzorcev z večjimi masami.

Rezultati naših meritev kažejo, da povečanje koncentracije vzorcev vpliva na povišanje temperature steklastega prehoda zamrznjenih raztopin. Spreminjanje mase analiziranih vzorcev nima bistvenega vpliva na spremembo T_g' . Povečanje mase rahlo vpliva le na boljši odziv na termogramu. Dodatek pomožnih snovi (1% PEG, 5% PEG, 10% PEG) Na-acetatnemu in Na-citratnemu pufru ne spremeni bistveno T_g' glede na sam pufer.

5 SKLEP

Na osnovi meritev analiziranih vzorcev zamrznjenih raztopin in razpoložljivih literaturnih podatkov, smo zaključili:

- Glede na meritve ugotavljamo, da sprememba koncentracije vzorcev zamrznjenih raztopin (Na-acetatnega in Na-citratnega pufra) vpliva na spremembo temperature steklastega prehoda (T_g').
- T_g' pri vzorcih z višjo koncentracijo pufrov je višja, v primerjavi z vzorci z 10-kratno nižjo koncentracijo pufrov.
- Ugotavljamo, da spreminjanje mase analiziranih vzorcev nima bistvenega vpliva na spremembo položaja T_g' . Pri analizi smo uporabili razpon mas vzorcev od 3 do 42 mg.
- Povečanje mase rahlo vpliva na boljši odziv na termogramu.
- Ob dodatku pomožnih snovi (1% PEG, 5% PEG, 10% PEG) Na-acetatnemu in Na-citratnemu pufru, se T_g' glede na sam pufer bistveno ne spremeni. Sklepamo, da dodatek različnih koncentracij PEG pri vzorcih obeh pufrih raztopin, ne vpliva bistveno na premik T_g' .

6 LITERATURA

1. O. Planinšek, N. Zajc, S. Srčič: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm. Vestn.* 2001; 52: 173-185.
2. W.J. Sichina: Measurement of Tg by DSC. Thermal analysis, application note. Perkin Elmer, ZDA, 2000.
3. Paul C. Hiemenz: *Polimer Chemistry The Basic Concepts*, Marcel Dekker, New York, 1984: 199-270, 1-42.
4. J. Swarbrick, C. Boylan: *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*, Marcel Dekker, New York, 1995; 6: 1-28.
5. T.A. Jennings: *Lyophilization: Introduction and Basic Principles*, 1999: 500.
6. B. C. Hancock and G. Zografi: The Relationship Between the Glass Transition Temperature and the Water Content of Amorphous Pharmaceutical Solids, *Phar. Res.* Vol.11, No. 4, 1994: 471.
7. C.A. Angell: Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions, *Chem. Rev.* 2002: 2627-2650.
8. K.H. Bauer, K. Lahmann, H.P. Osterwald, G. Rothgang: *Coated Pharmaceutical Dosage Forms*, medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 1998: 13-18, 21-28, 65-70, 96, 107-115, 217-261.
9. Koenigbauer M.J.: Pharmaceutical Applications of Microcalorimetry, *Phar. Res.*, 6, 1994; 11: 777-783.
10. Heines P.J.: *Principles of Thermal Analysis and Calorimetry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002.

11. Gaisford S., Buckton G.: Potential applications of microcalorimetry for the study of physical processes in pharmaceuticals, *Thermochim. Acta*, 380, 2001; 185-198.
12. D.A. Scoog, F.J. Holler, T.A. Nieman: *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth edition, Saunders College Publishing, 1998: 798-809, 674-724.
13. N. Zajc, O. Planinšek, S. Srčič: Diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature. *Farm Vestn* 2001; 52: 187-195.
14. Selzer T., Radau M., Kreuter J.: Use of isothermal heat conduction microcalorimetry to evaluate stability and excipient compatibility of a solid drug, *Int. J. Pharm.*, 171, 1998; 227-241.
15. The Glass Transition from the Point of View of DSC Measurements: Part 1: Basic principles. Mettler Toledo. UserCom 1999; 10: 13-16.
16. The Glass Transition from the Point of View of DSC Measurements. Part 2: Information for the Characterization of Materials. MettlerToledo. UserCom 2000; 11: 8-13.
17. M. Dionisio, N.M. Alves, J.F. Mano: Molecular dynamics in polymeric systems. *E-polymers* 2004; No. 44.
18. Dostop do spleta:
http://us.mt.com/us/en/home/events/webinar/live/TOPEM-Thermal_Analysis_Webinar.html, 15.5.2011.
19. I. Fraga, S. Montserrat, J.M. Hutchinson: TOPEM, a new temperature modulated DSC Technique, Application to the glass transition polymers, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol.87, 2007: 119-124.
20. Jennings TA: *Lyophilization: Introduction and basic principles: Introduction*, CRC press LLC, Florida, 2002: 1-13.

21. Swarbrick J: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Pikal MJ: Freeze drying, Informa Healthcare USA, Inc., 2007: 1807-1833.
22. Mi Y, Wood G., Thoma L., Rashed S.: Effects of polyethylene glycol molecular weight and concentration on lactate dehydrogenase activity in solution and after freeze-thawing, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Vol. 56 (No. 3), 2002: 115-123.
23. Cameron P.: Good pharmaceutical freeze-drying practice, Murgatroyd K.: The freeze drying process, Interpharm Press, Inc., USA, 1997: 1-58.
24. Vučko Mole S.: Formularium Slovenicum: slovenski dodatek k Evropski farmakopeji – FS 2.0, 2. izdaja: Parenteralne farmacevtske oblike; Zavod za farmacijo in za preizkušanje zdravil, Ljubljana, 2005: 96-98.
25. Carpenter J.F., Pikal M.J., Chang B.S., Randolph T.W.: Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice, Pharmaceutical Research, Vol. 14 (No. 8), 1997: 969-975.
26. Evgenyi Y. Shalaev, Tiffany D. Johnson-Elton, Liuquan Chang, Michael J. Pikal: Thermophysical Properties of Pharmaceutically Compatible Buffers at Sub-Zero Temperatures: Implications for Freeze-Drying, Pharmaceutical Research, Vol. 19, No. 2, February 2002: 195-201.
27. Bakul S. Bhatnagar, Susan M. martin, Dirk L. Teagarden, Evgenyi Y. Shalev, Raj Suryanarayanan: Investigation of PEG Crystallization in Frozen PEG-Sucrose-Water Solutions. I. Characterization of the Nonequilibrium Behavior during Freeze-Thawing, Journal of Pharmaceutical Sciences 10.1002/jps.22040, 12 October 2009: 1-11.
28. T. Yamauchi, A. Hasegawa: Determination of PEG Concentration in Its Aqueous Solution Using Differential Scanning Calorimetry, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 49, 1993: 1653-1658.

29. Ketan Amin, Rose-Marie Dannenfelser, Joseph Zielinski, Barbara Wang: Lyophilization of Polyethylene Glycol Mixtures, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 93, No. 9, September 2004: 2244-2249.
30. The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals, Thirteenth edition, Merck&Co., Inc., Whitehouse Station NJ, ZDA, 2001.
31. European Pharmacopoeia, 6th Edition, Council of Europe, Strasbourg, 2008.
32. Howard P.H., Neal M.: Dictionary of Chemical Names and Synonyms, Electronic Edition, Synapse Information Resources, Inc., 1998.
33. Kibbe A.H.: Handbook of Pharmaceutical Excipients, Third Edition, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, 2000: 324-327, 329-398, 478-480, 496-497, 539-543.
34. European Pharmacopoeia 5th Ed., Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), Strasbourg, 2005: 1680, 1971-1973, 2428-2429, 2431-2432, 2437-2438, 2499-2501.
35. Dostop preko spleta:
<http://www.jazmp.si/files/humana/navodila/Navajanje%20pomo%C5%BEnih%20snovi.pdf> (31.3.2009), 12.3.2011.
36. Dostop preko spleta:
http://physchem.ox.ac.uk/MSDS/SO/sodium_hydroxide.html (december 2007), 10.4.2011.
37. Q. Lu, G. Zografi: Properties of Citric Acid at the Glass Transition, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 86, No. 12, 1997: 1374-1378.
38. L. van den Berg: pH changes in buffers and foods during freezing and subsequent storage, *Cryobiology* 3, 1966: 236-242.

39. G. Gomez, M.J. Pikal, and N. Rodriguez-Hornedo: Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions, *Pharm. Res.* 18, 2001: 90-97.

PRILOGA 1

Termogrami meritev posameznih raztopin so prikazani z reverzibilno komponento in označenimi T_g' in T_{ONSET} za posamezen vzorec.

Termogram 1: a) 1% raztopina PEG; b) 5 % raztopina PEG; c) 10% raztopina PEG

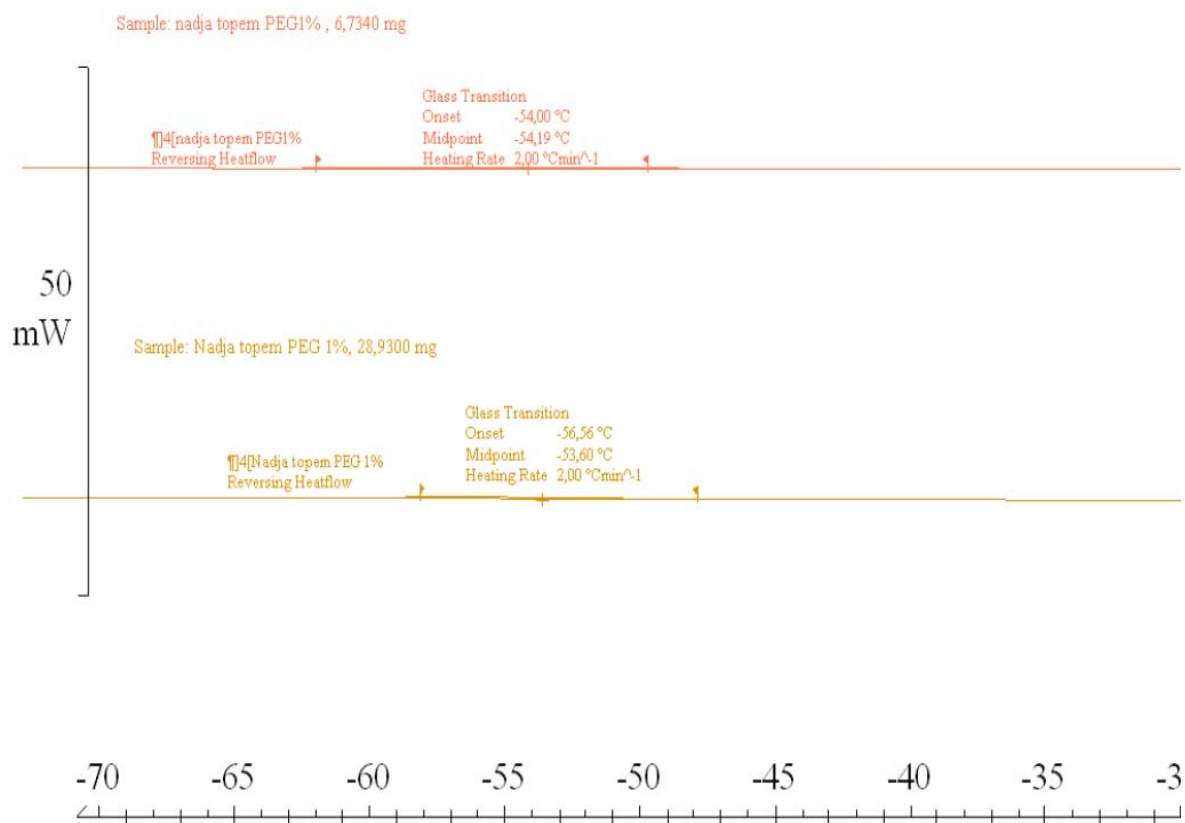
Pogoji: aluminijasta posodica hermetično zaprta,

ohlajanje do -75 °C, segrevanje od -75 do 0°C,

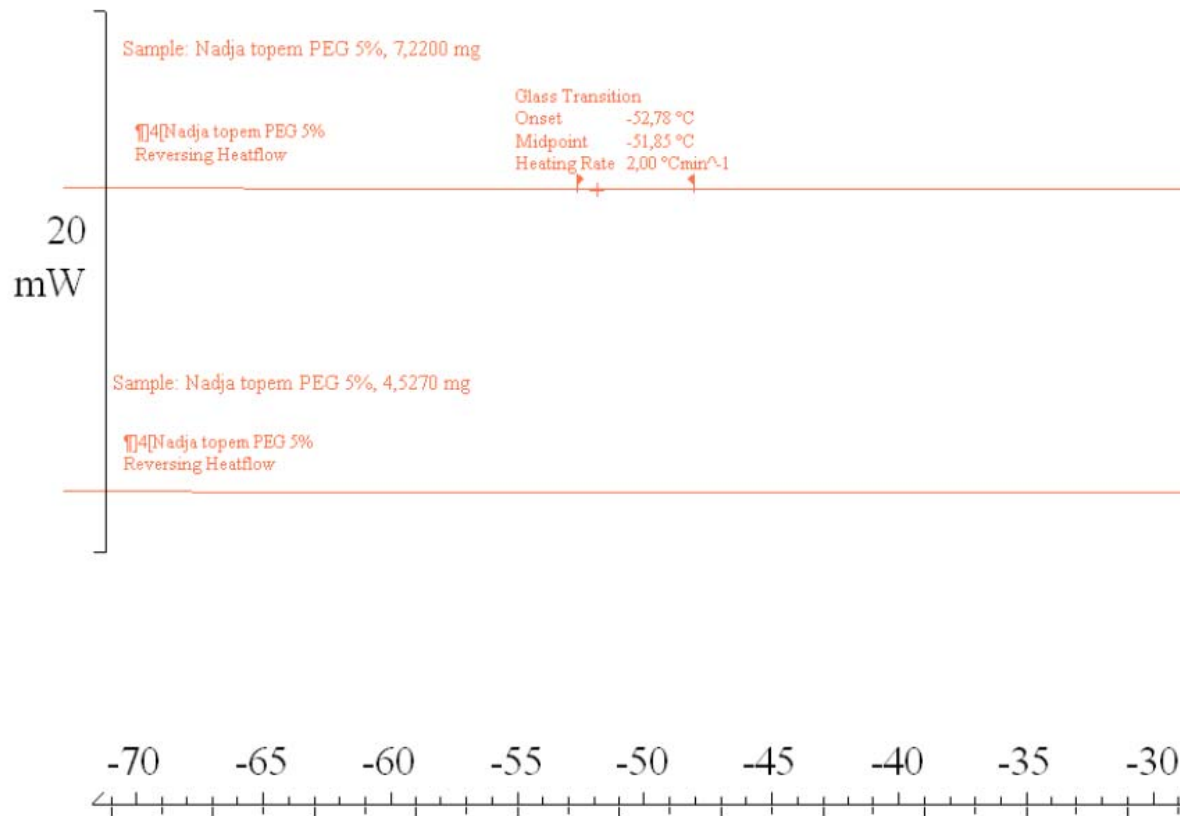
hitrost ohlajanja: -5 K/min (+/-0,5 K/min), hitrost segrevanja pa je bila +2 K/min,

dušikova atmosfera, s pretokom dušika 40 mL/min.

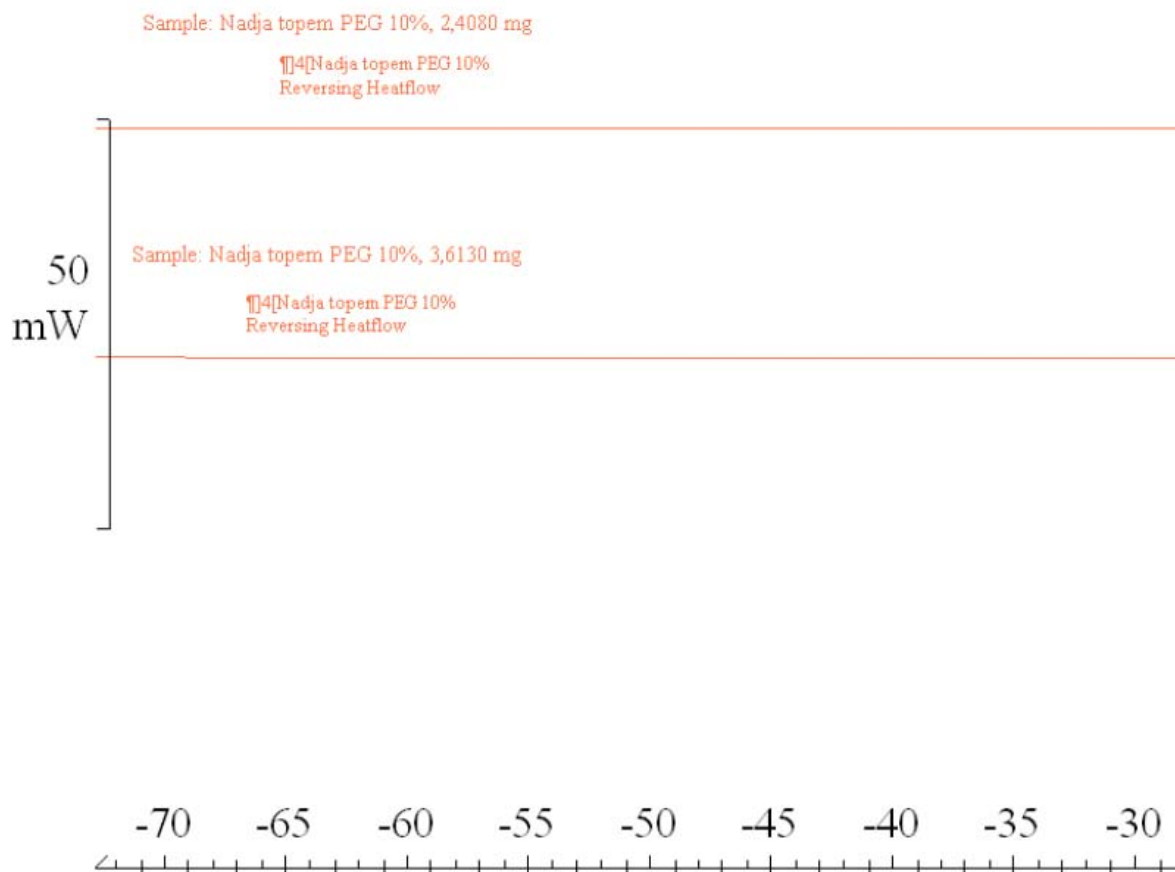
a) 1% raztopina PEG



b) 5 % raztopina PEG



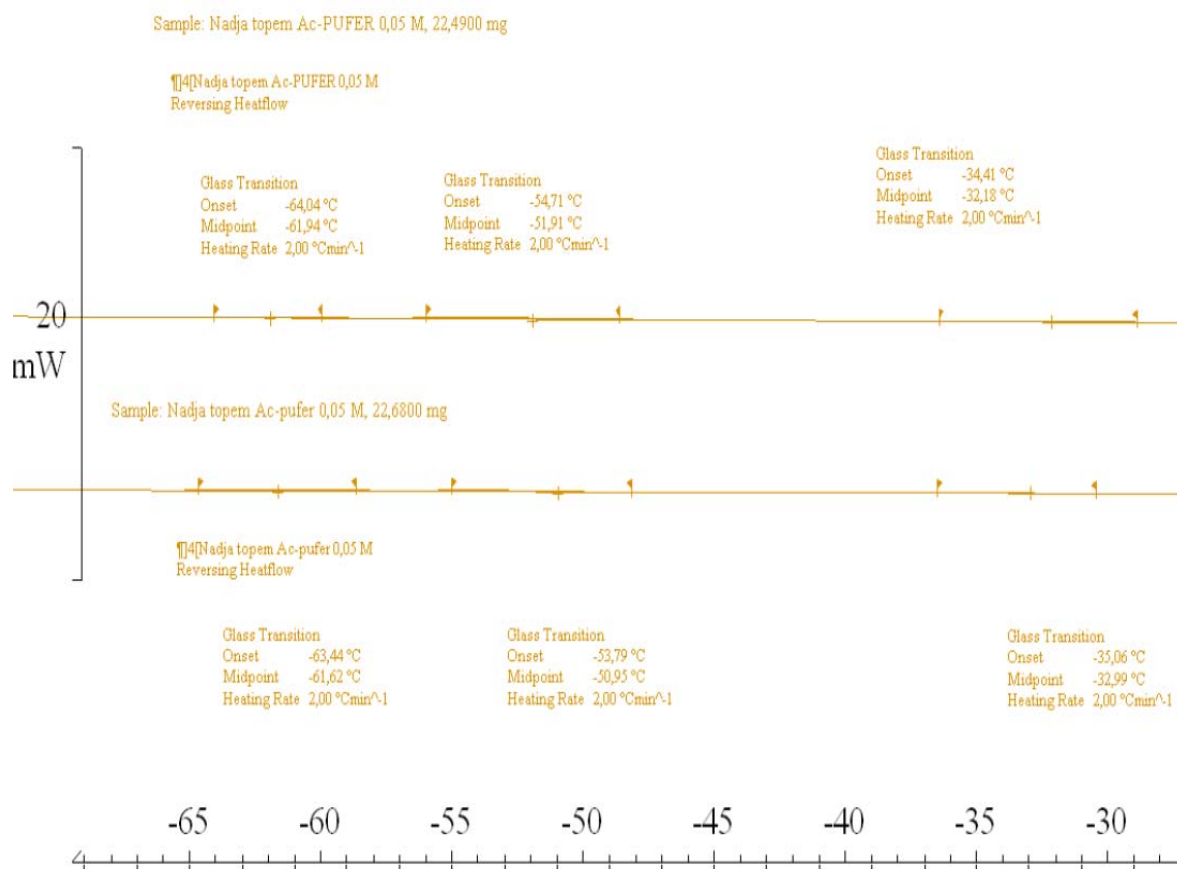
c) 10% raztopina PEG



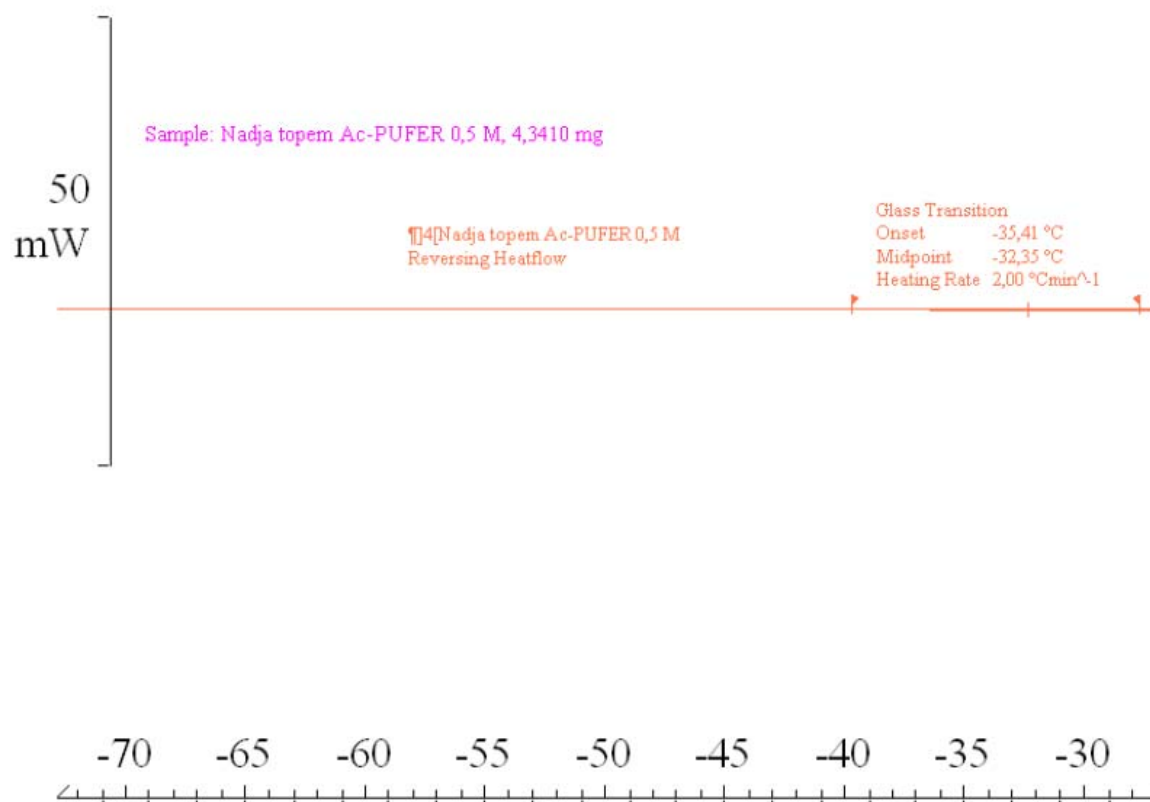
Termogram 2: Primarjava a) acetatnega pufra (0,05M in 0,5M) in b) citratnega pufra (0,05M in 0,5M)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

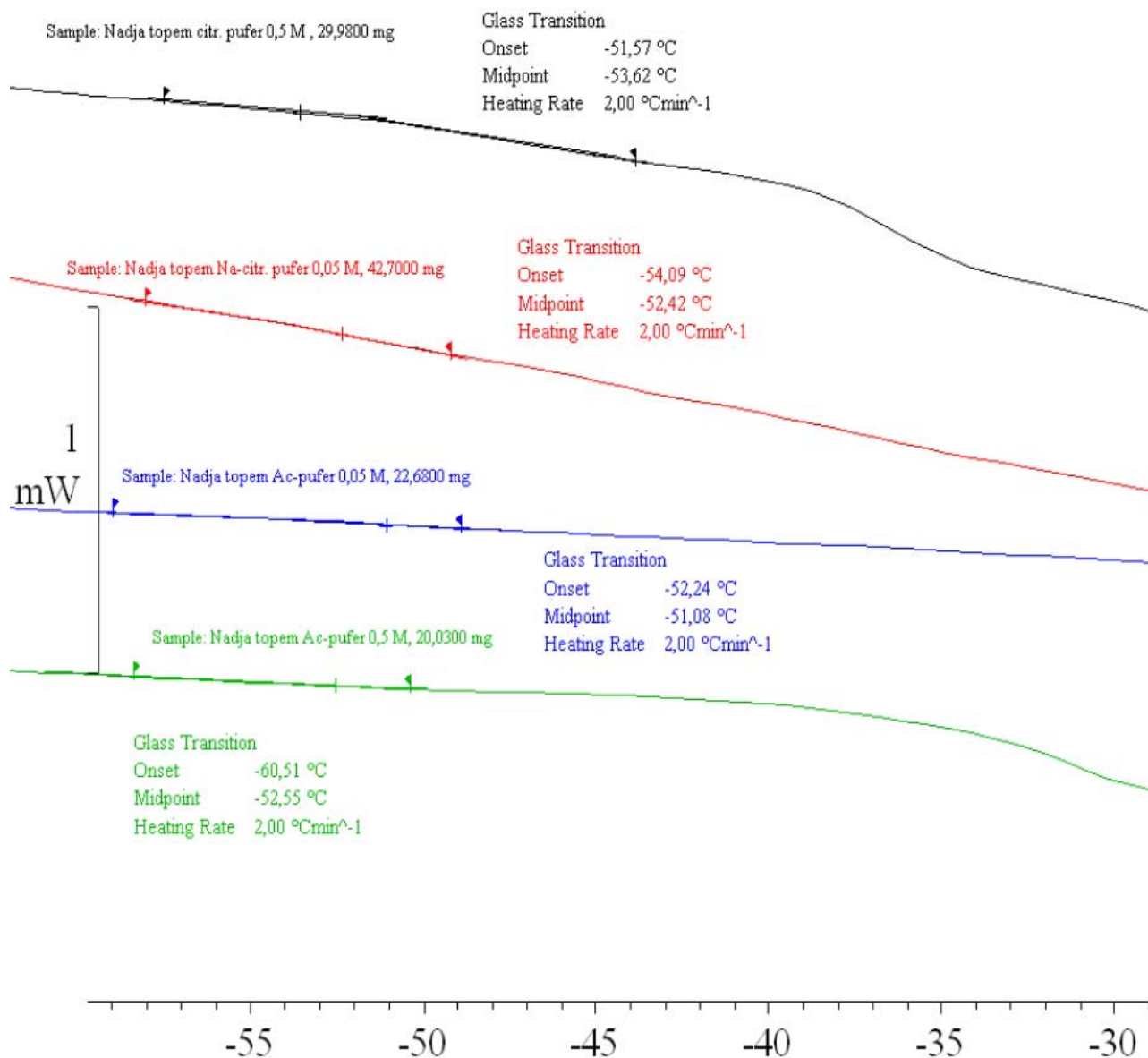
a) 0,05 M Na-acetat



b) 0,5 M Na-acetat



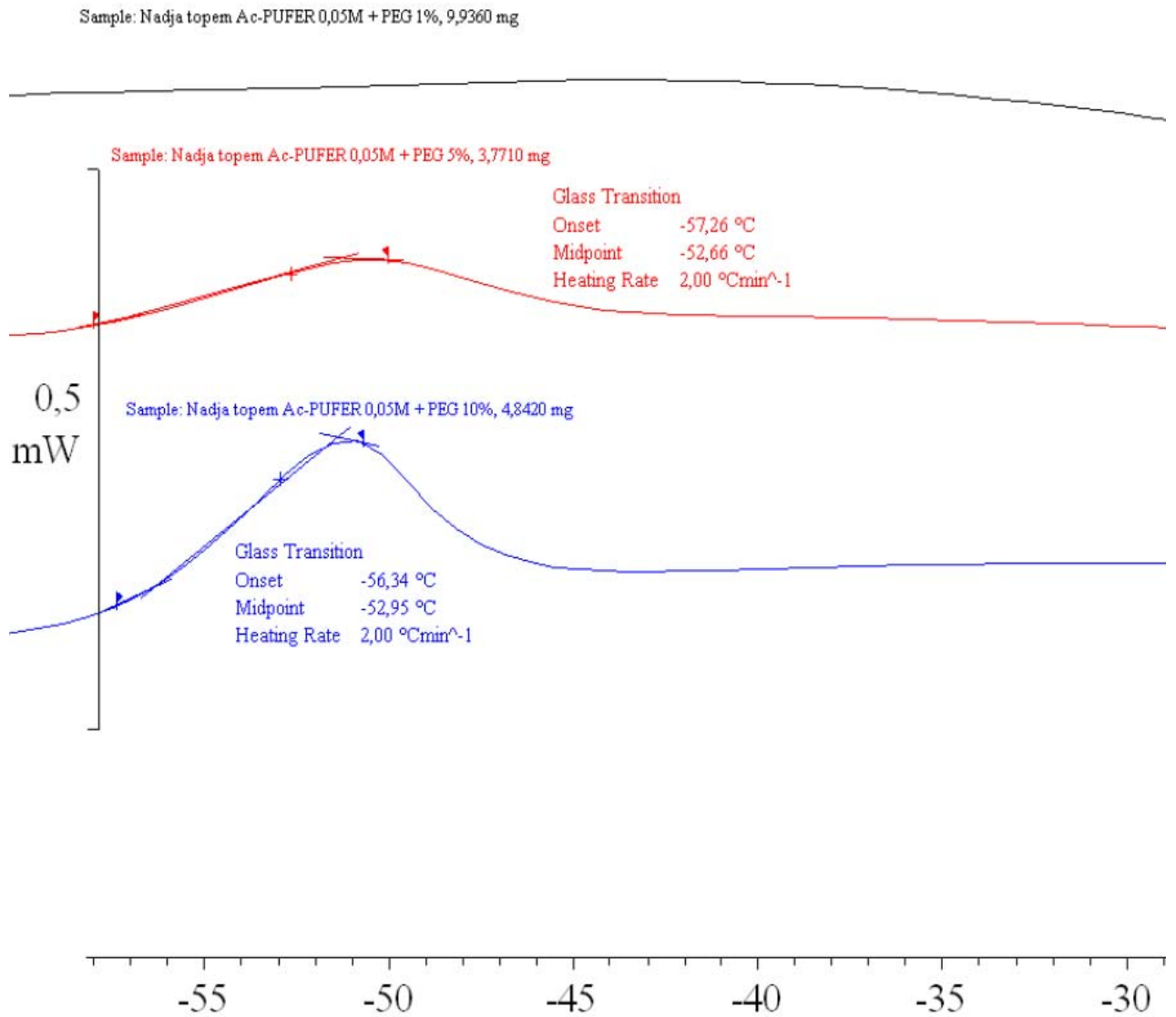
c) 0,05 M in 0,5 M Na-acetat in Na-citrat



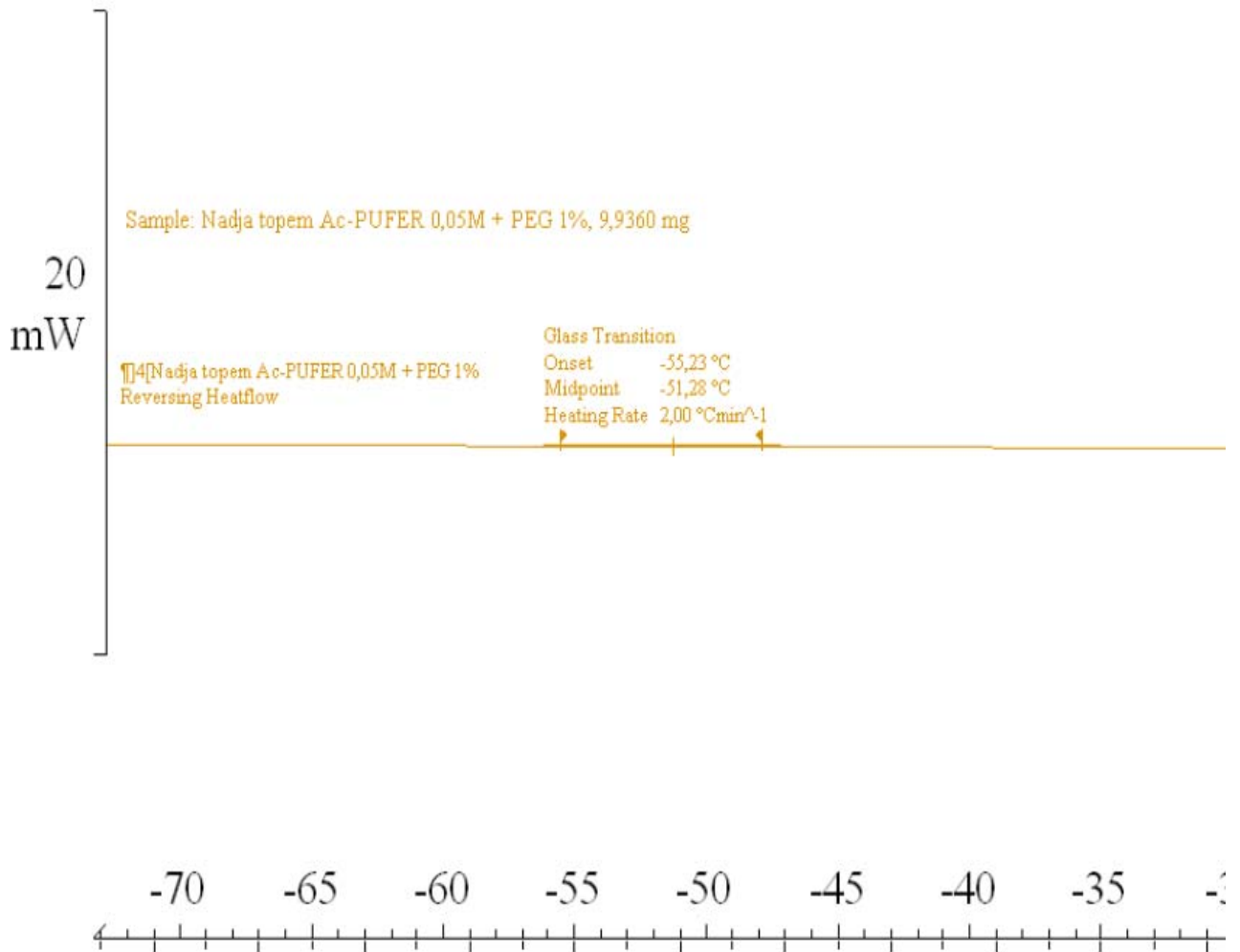
Termogram 3: Acetatni pufer 0,05 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG mm – natehtali smo majhne mase (približno do 9 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

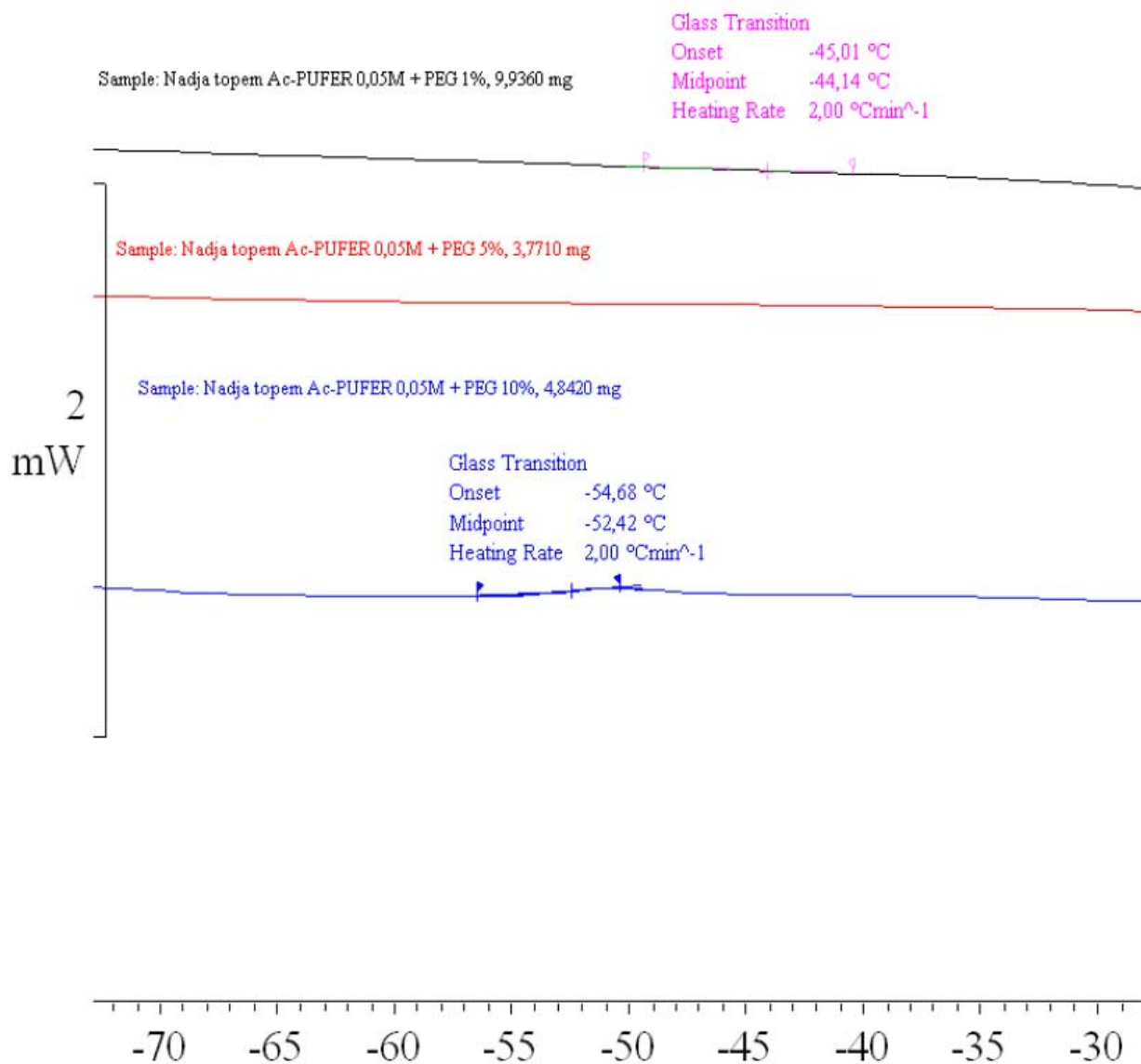
a) Prva meritev



- b) **0,05 M Na-acetat z 1% PEG** - Tg' smo določili na ločenem termogramu. Na ta način je bilo določevanje enostavnejše, ker niso motili drugi termogrami.



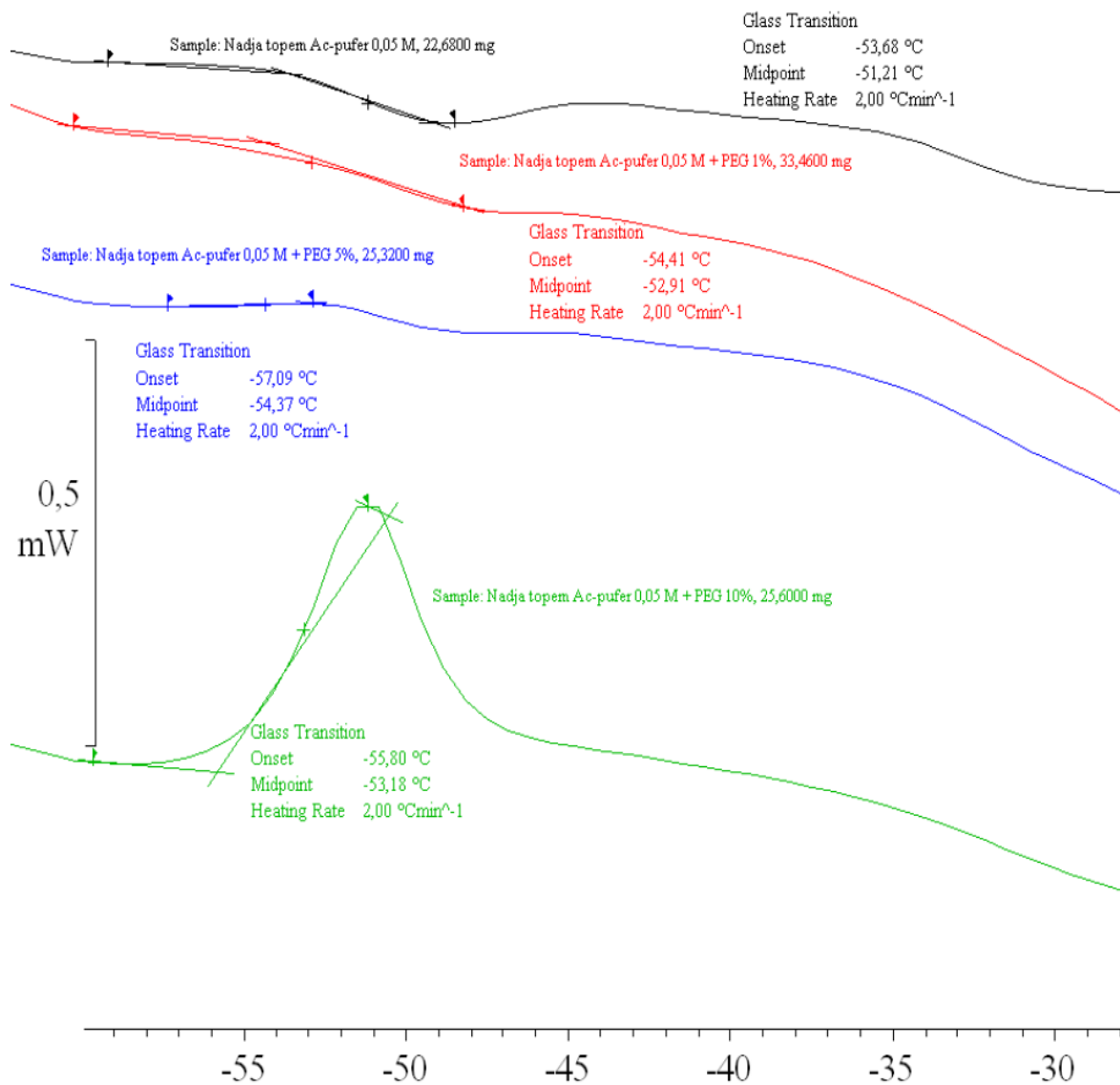
c) Druga meritev



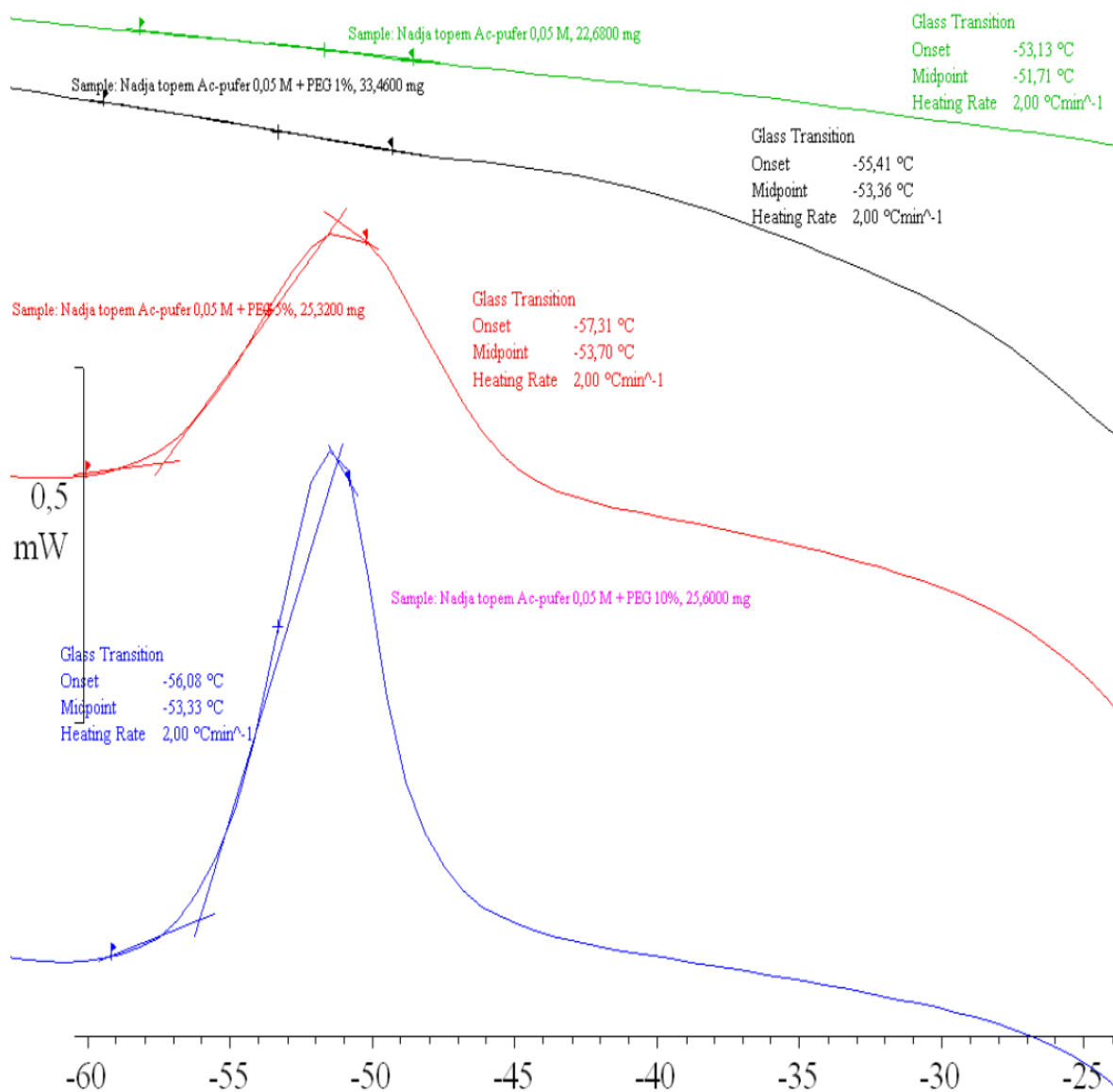
Termogram 4: Acetatni pufer 0,05 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG vm – natehtali smo večje mase (približno okrog 20 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

a) Prva meritev



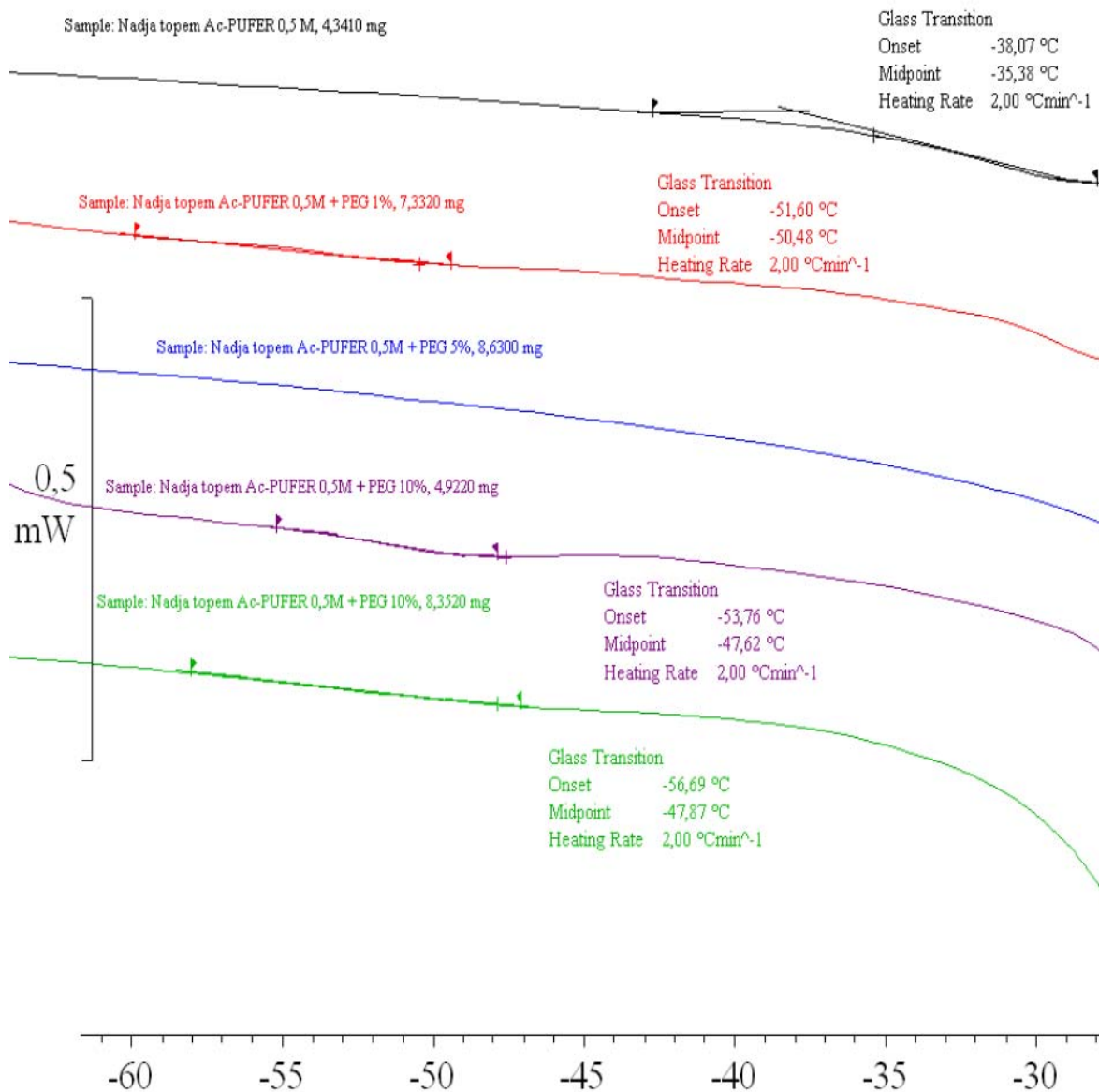
b) Druga meritev



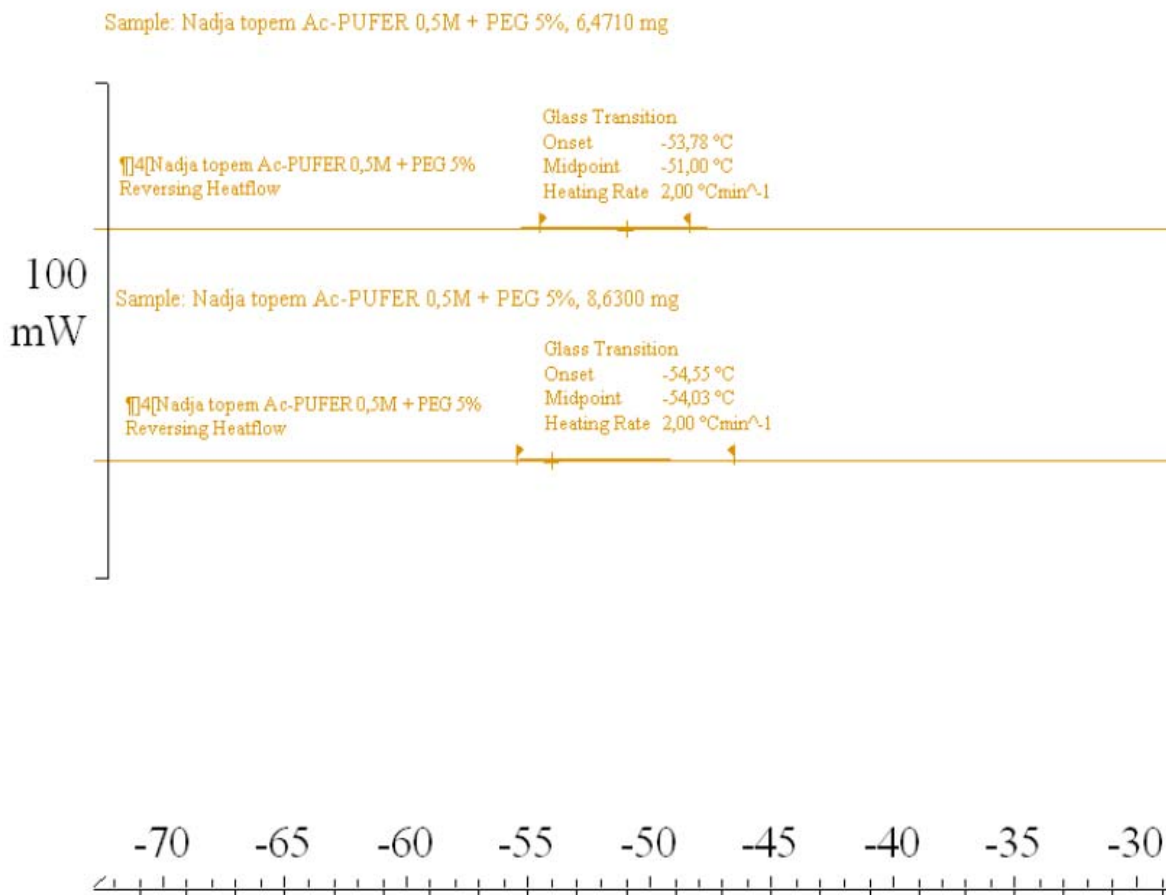
Termogram 5: Acetatni pufer 0,5 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG mm – natehtali smo majhne mase (približno do 9 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

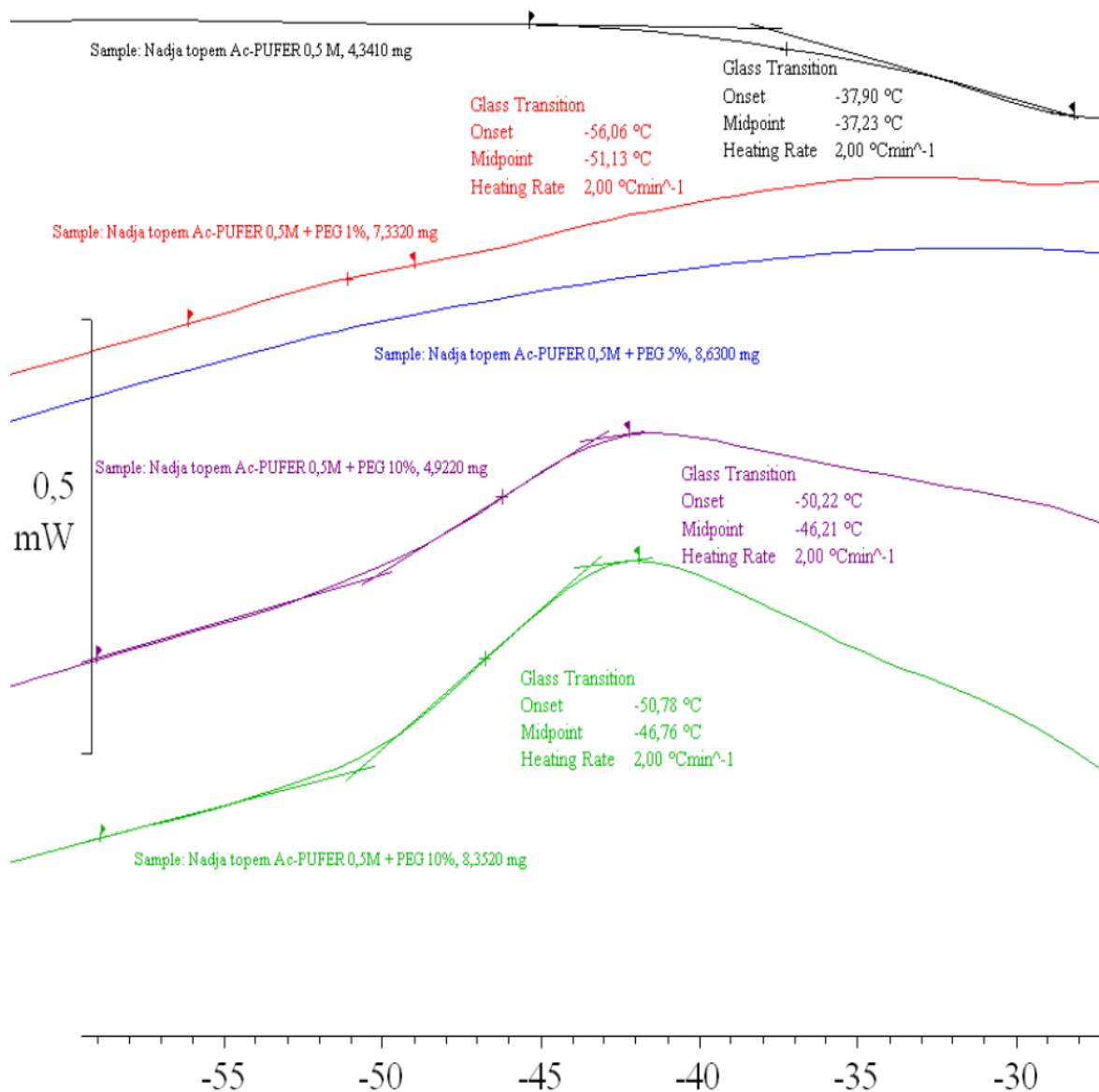
a) Prva meritev



- b) **0,5 M Na-acetat s 5% PEG** – Tg' smo določili na ločenem termogramu. Na ta način je bilo določevanje enostavnejše, ker niso motili drugi termogrami.



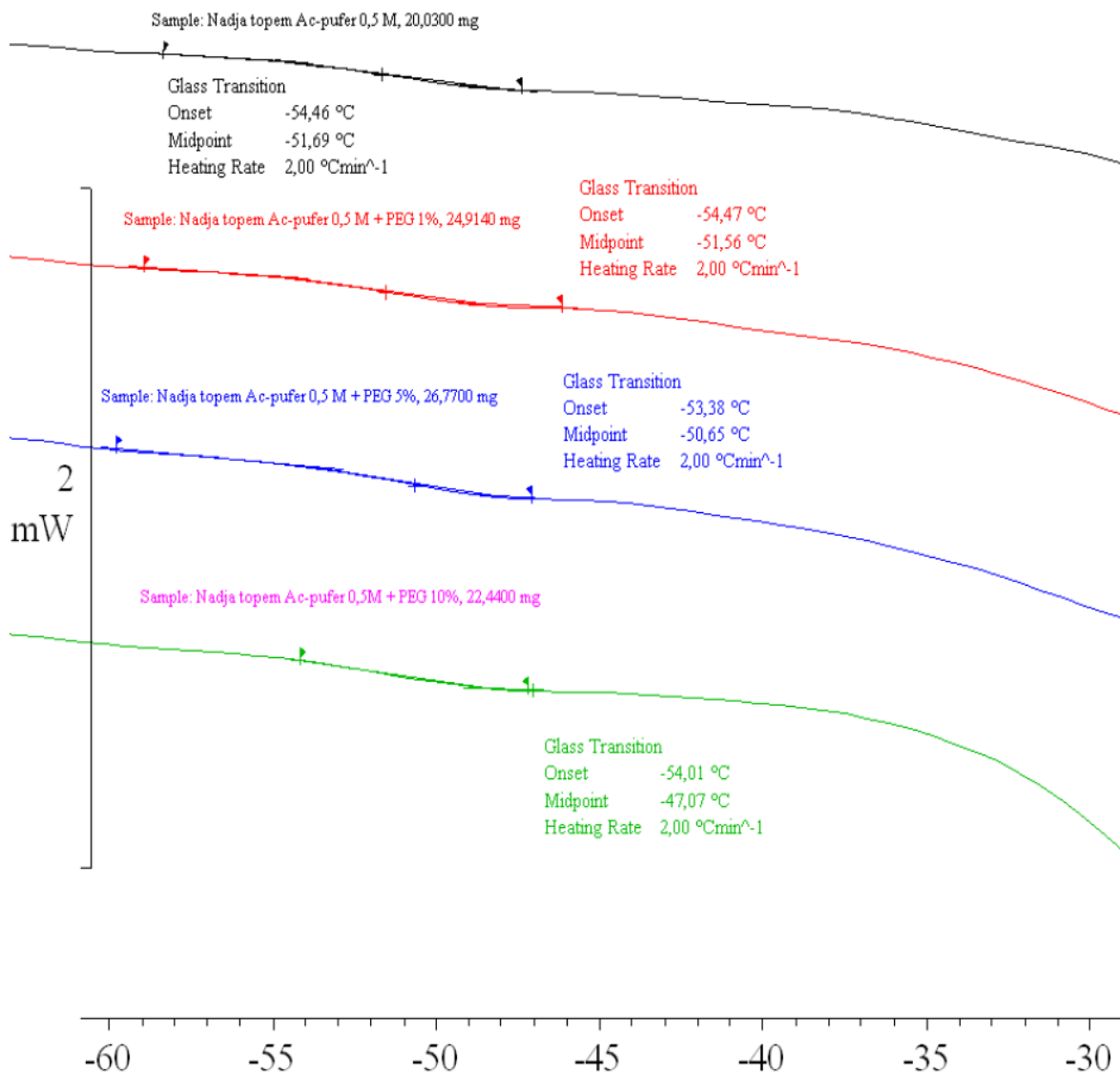
c) Druga meritev



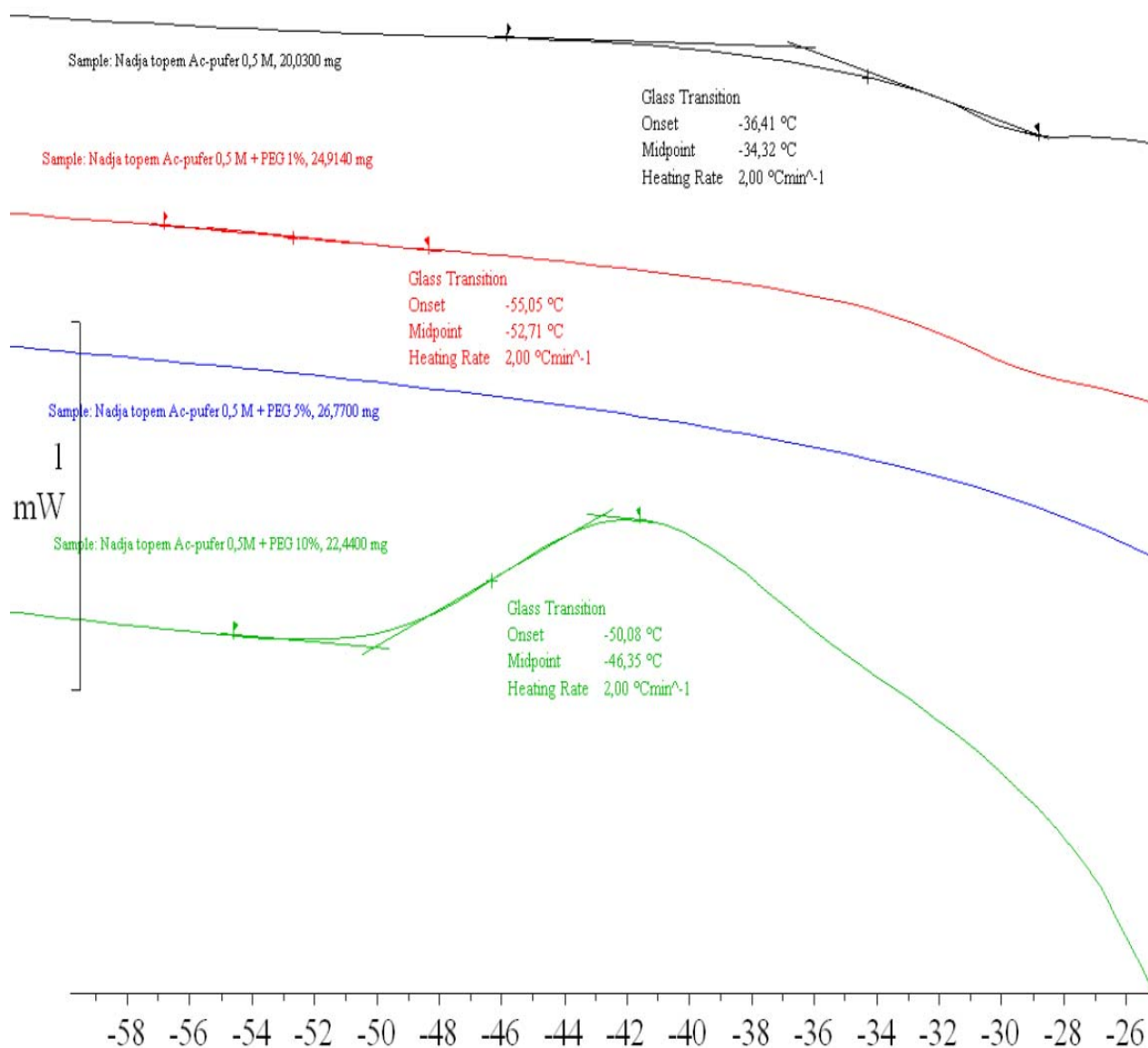
Termogram 6: Acetatni pufer 0,5 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG vm – natehtali smo večje mase (približno okrog 20 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

a) Prva meritev



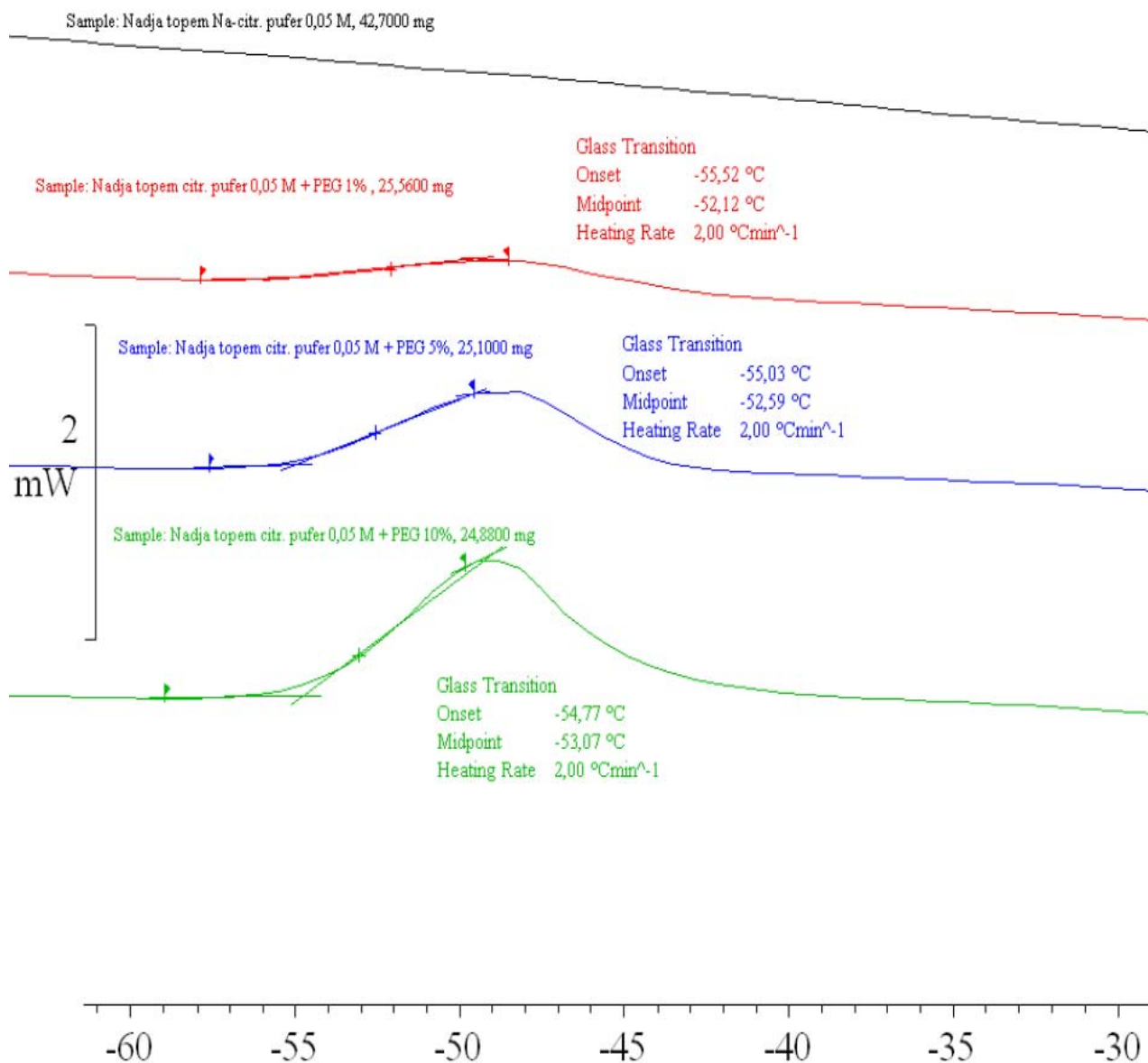
b) Druga meritev



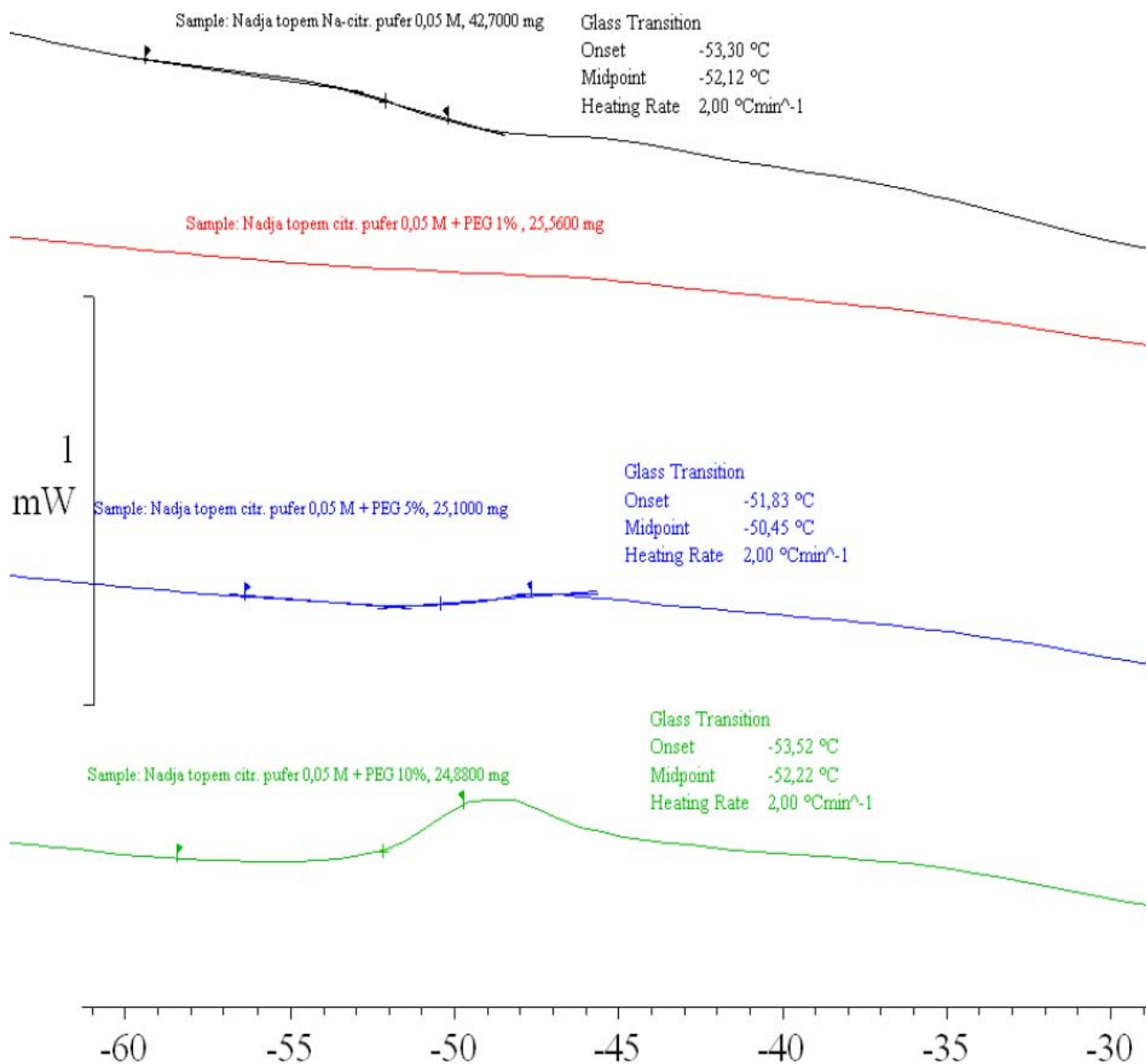
Termogram 7: Citratni pufer 0,05 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG vm1 – natehtali smo prvo paralelo večjih mas (približno okrog 20 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

a) Prva meritev



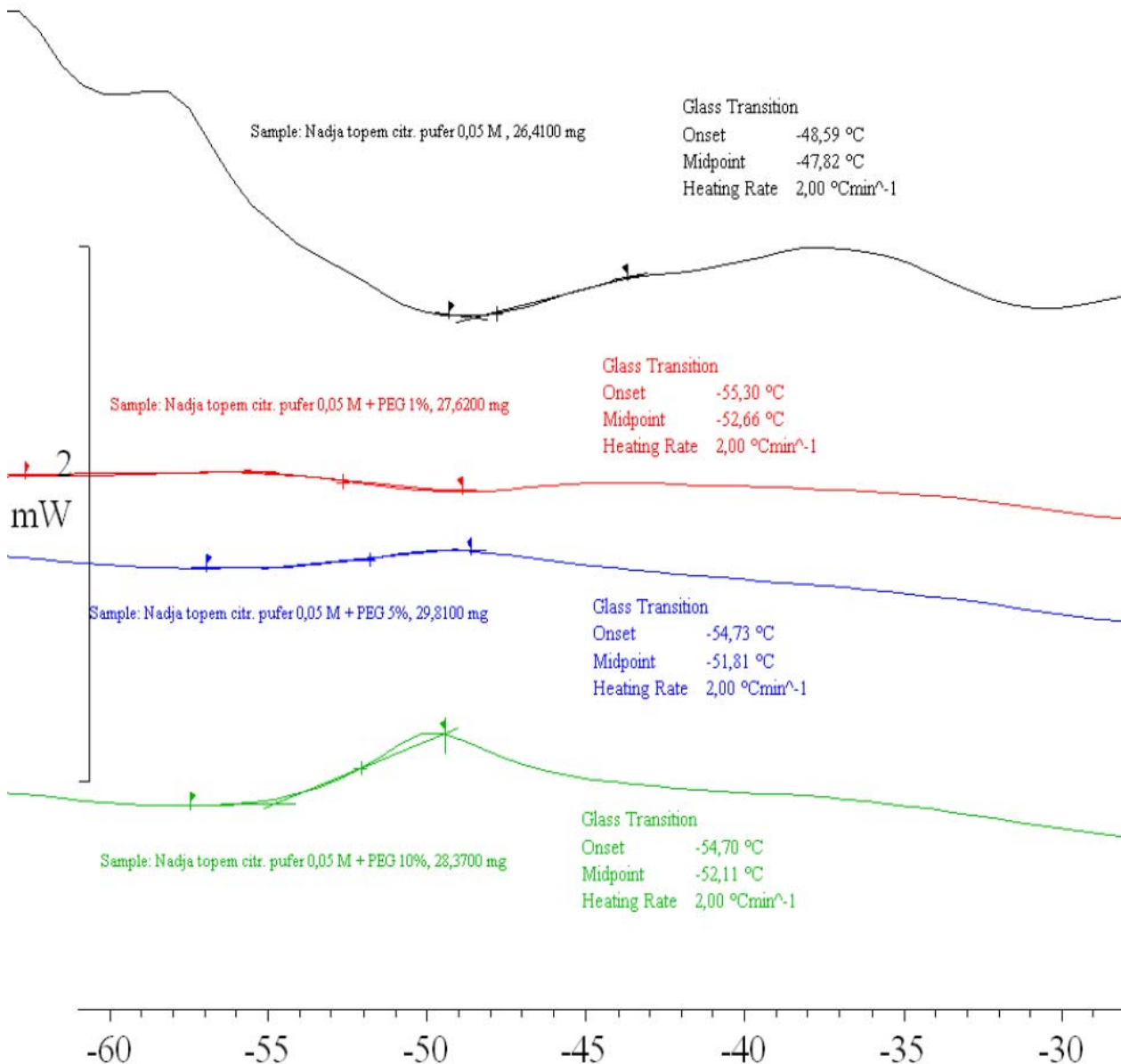
b) Druga meritev



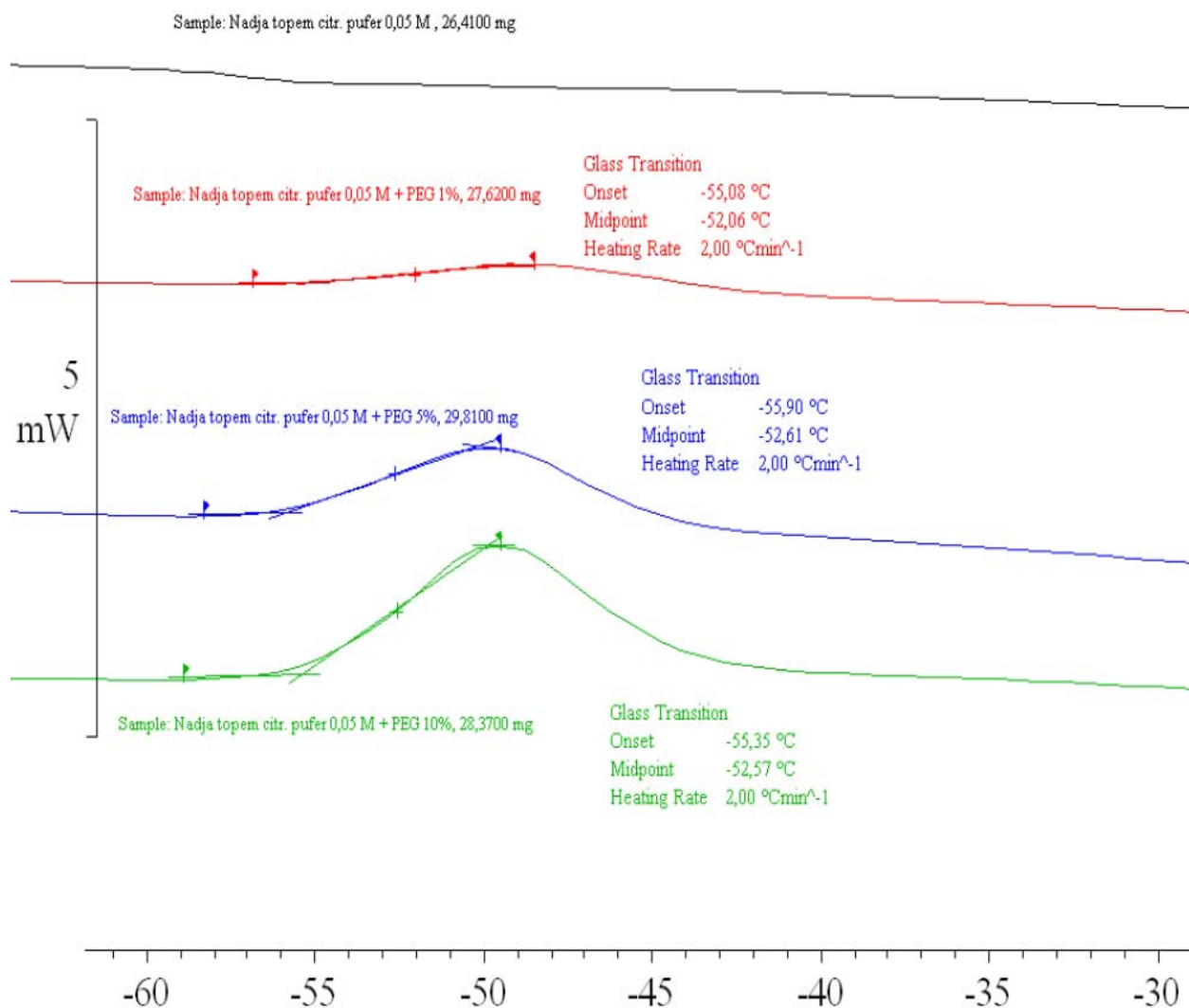
Termogram 8: Citratni pufer 0,05 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG vm2 – natehtali smo drugi paralelo večjih mas (približno okrog 20 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

a) Prva meritev



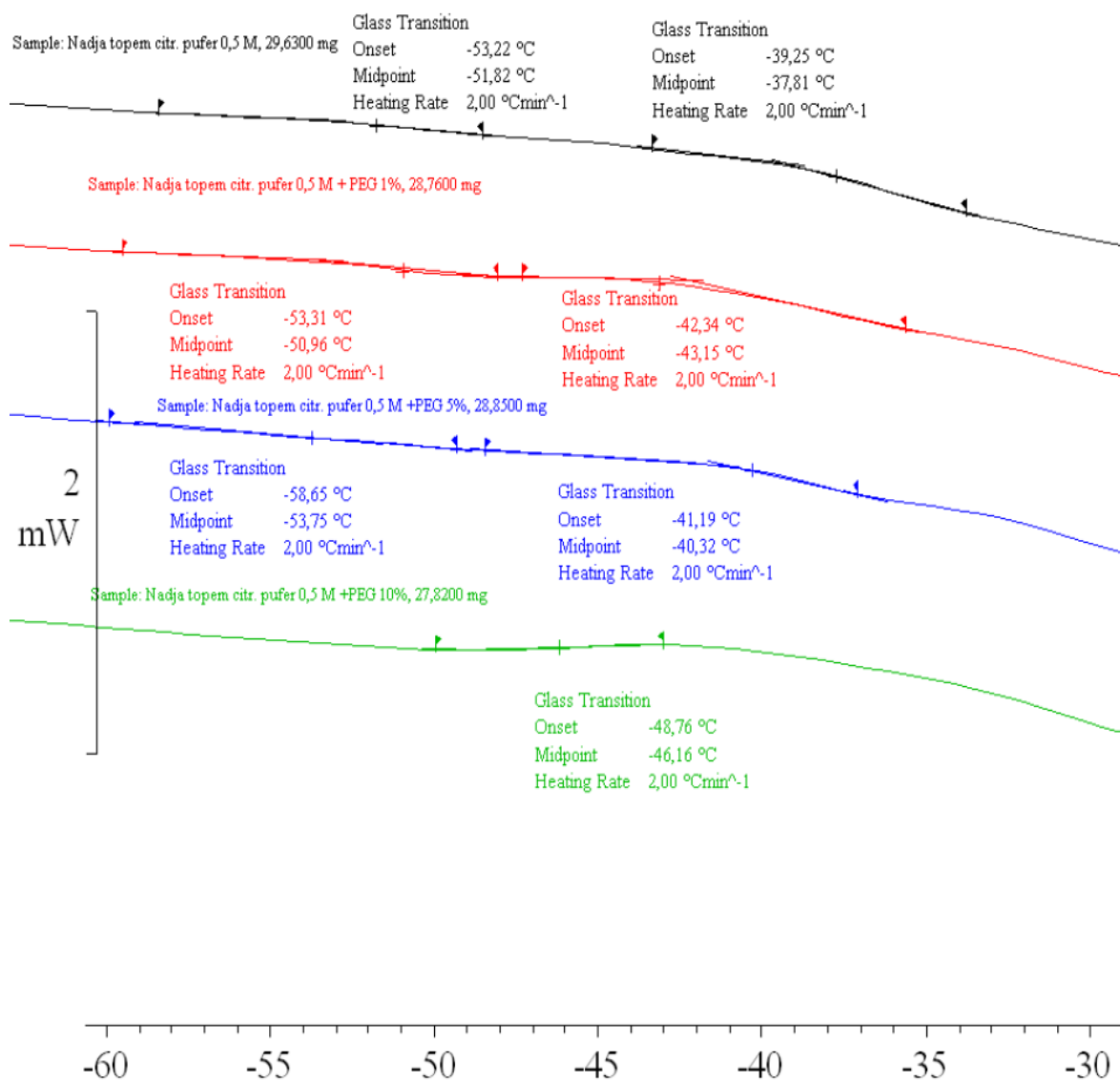
b) Druga meritev



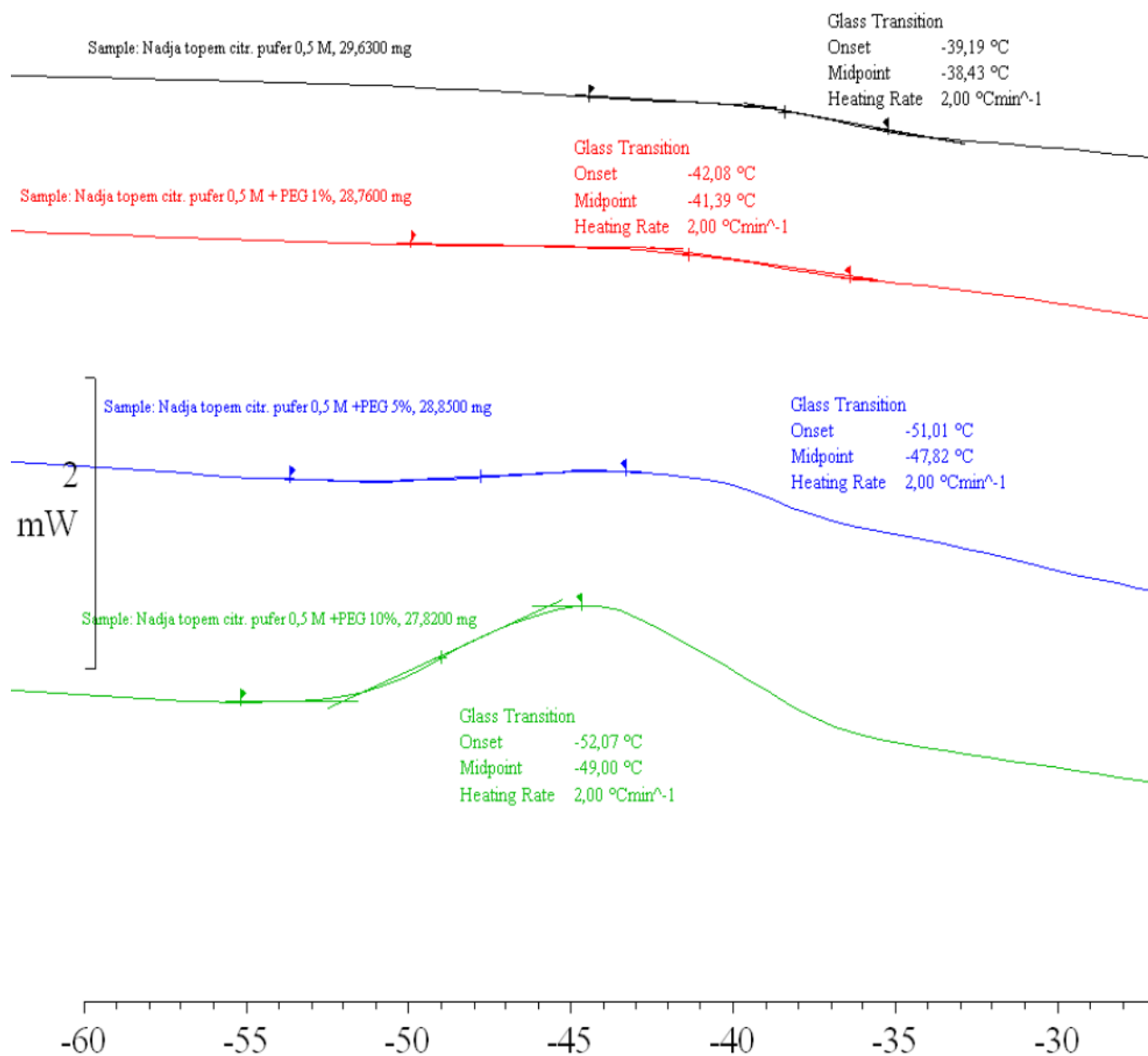
Termogram 9: Citratni pufer 0,5 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG vm1 – natehtali smo prvo paralelo večjih mas (približno okrog 20 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

a) Prva meritev



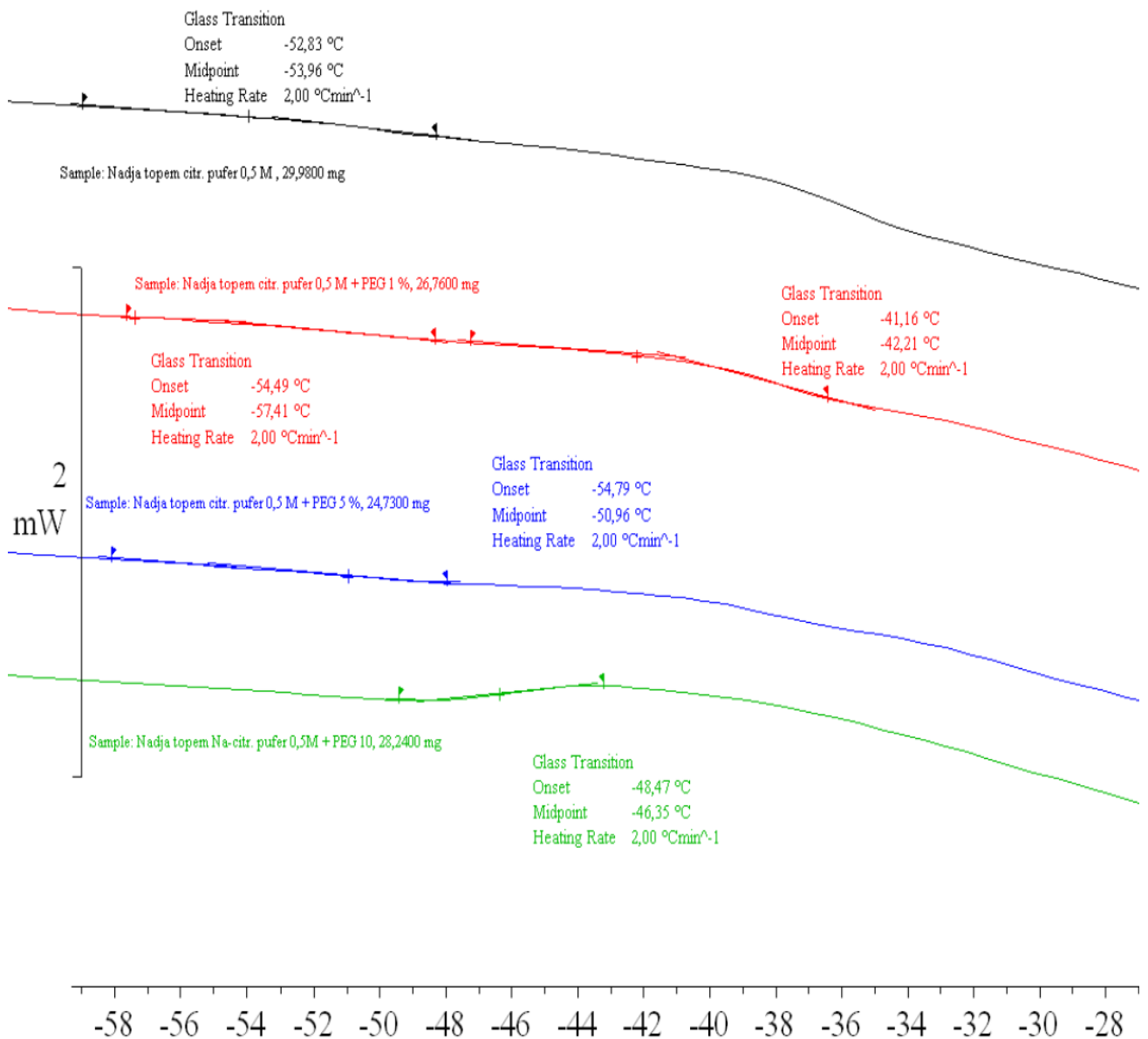
b) Druga meritev



Termogram 10: Citratni pufer 0,5 M s PEG 1%, 5% in 10%; PEG vm2 – natehtali smo drugo paralelo večjih mas (približno okrog 20 mg)

Pogoji: enaki kot pri meritvi 1.

a) Prva meritev



b) Druga meritev

