

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA HUDOBIJVNIK

**DIPLOMSKA NALOGA**  
**UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA HODOBIVNIK

**IZDELAVA KOKRISTALOV Z MLETJEM  
KLARITROMICINA, HIDROKLOROTIAZIDA ALI  
GLIBENKLAMIDA S POMOŽNIMI SNOVMI**

**CREATING CO-CRYSTALS BY METHOD OF GRINDING  
EXCIPIENTS WITH CLARITHROMYCIN,  
HYDROCHLOROTHIAZIDE OR GLIBENCLAMIDE**

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Odona Planinška, mag. farm. Meritve rentgenske praškovne difrakcije so opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

## ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Odonu Planinšku, za meritve, strokovno svetovanje in pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem in babici za podporo ter vztrajnost med študijem. Prav tako velika zahvala mojemu Ivanu in prijateljem, še posebej Janji. Stali so mi ob strani, me vzpodbujali in mi pomagali med študijem ter pri izdelavi diplomske naloge. Diplomo posvečam svoji babici.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Odona Planinška, mag. farm..

Nina Hudobivnik

Ljubljana, april 2013

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Članica diplomske komisije: asist. dr. Irena Prodan-Žitnik, mag. farm.

## **VSEBINA**

<b>POVZETEK .....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>II</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT.....</b>	<b>III</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. KOKRISTALI.....	1
1.2. INTERAKCIJE V KOKRISTALIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN .....	3
1.3. RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE KOKRISTALOV .....	6
1.4. POMEN IN LASTNOSTI FARMACEVTSKIH KOKRISTALOV .....	6
1.4.1. TEMPERATURA TALIŠČA .....	7
1.4.2. TOPNOST.....	8
1.4.3. HITROST RAZTAPLJANJA .....	9
1.4.4. BIOLOŠKA UPORABNOST .....	10
1.4.5. HIGROSKOPNOST .....	11
1.4.6. KEMIJSKA STABILNOST.....	11
1.4.7. MEHANSKE LASTNOSTI.....	12
1.4.8. POLIMORFIZEM KOKRISTALOV .....	12
1.5. METODE OBLIKOVANJA IN PRIPRAVE KOKRISTALOV .....	13
1.5.1. KOKRISTALIZACIJA IZ RAZTOPIN .....	13
1.5.2. KOKRISTALIZACIJA Z MLETJEM.....	15
1.5.2.1. MLETJE BREZ TOPILA.....	16
1.5.2.2. MLETJE S TOPILOM .....	19
1.6. METODE KARAKTERIZACIJE KOKRISTALOV .....	20
1.7. FARMACEVTSKI KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA.....	21
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>24</b>
3.1. MATERIALI.....	24
3.2. PREISKOVANE UČINKOVINE .....	25
3.2.1. KLARITROMICIN .....	25
3.2.1.1. OSNOVNI PODATKI O KLARITROMICINU .....	26
3.2.2. HIDROKLOROTIAZID .....	26

3.2.2.1. OSNOVNI PODATKI O HIDROKLOROTIAZIDU .....	27
3.2.3. GLIBENKLAMID.....	27
3.2.3.1. OSNOVNI PODATKI O GLIBENKLAMIDU .....	28
3.3. METODE.....	30
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>32</b>
4.1. REZULTATI REŠETANJA Z METODAMA DSC IN XRPD .....	32
4.2. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z NALIDIKSNO KISLINO .....	33
4.3. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z ADIPINSNO KISLINO .....	34
4.4. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z NATRIJEVIM SAHARINATOM.....	35
4.5. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z NIKOTINAMIDOM.....	36
4.6. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA S 4,4-BIPIRIDINOM .....	38
4.7. MLETJE ZMESI HIDROKLOROTIAZIDA Z NALIDIKSNO KISLINO.....	39
4.8. MLETJE ZMESI HIDROKLOROTIAZIDA S CIMETNO KISLINO .....	40
4.9. MLETJE ZMESI HIDROKLOROTIAZIDA Z NIKOTINAMDOM.....	41
4.10. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA Z NALIDIKSNO KISLINO .....	42
4.11. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA S SALICILNO KISLINO .....	44
4.12. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA Z BENZOJSKO KISLINO .....	45
4.13. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA S CIMETNO KISLINO .....	46
<b>5. SKLEP .....</b>	<b>48</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>49</b>

## POVZETEK

Farmakokinetične lastnosti zdravilne učinkovine so odvisne od njenih fizikalno-kemijskih lastnosti. Pri razvoju formulacij lahko te lastnosti spremojamo s tvorbo soli, hidratov, solvatov, različnih polimorfnih oblik ali amorfnih oblik. V zadnjih letih se je kot dodatna možnost za spremenjanje pomembnih farmacevtskih lastnosti uveljavila tvorba kokristalov. S kokristalizacijo lahko spremenimo naslednje lastnosti zdravilne učinkovine: temperaturo tališča, topnost, hitrost raztopljanja in z njo povezano biološko uporabnost, higroskopnost, kemijsko stabilnost, mehanske lastnosti in posledično tudi farmakološke lastnosti. Farmacevtski kokristali so sestavljeni iz zdravilne učinkovine in tvorca kokristala, tako lahko izpolnjujejo tudi pogoje patentne zaščite nove kristalne strukture.

Kokristale lahko pripravimo na različne načine. Najbolj uveljavljena metoda je kokristalizacija iz raztopine, njena alternativa pa je priprava kokristalov z mletjem v krogličnem mlinu. Nedavna modifikacija pri postopku mletja je dodajanje majhne količine topila. To izboljša proces kokristalizacije v trdnem. Velja za metodo prvega izbora pri rešetanju kokristalov, saj lahko na ta način eksperimentalno v kratkem času pripravimo veliko število potencialno novih kokristalov.

Pri diplomski nalogi smo z mletjem rešetali zmesi klaritromicina, hidroklorotiazida oziroma glibenklamida s tvorci za pripravo nove kristalne strukture (kokristala ali soli). Kot tvorce kokristalov smo uporabili 17 karboksilnih kislin in njihovih derivatov (dva amida, sol sulfimida ter derivat piridina). Vse zmesi smo najprej pripravili brez topila, nato pa z zelo majhno količino etanola. Pri analizi z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo opazili različne spremembe tališča. Na podlagi teh rezultatov smo izbrali 12 zmesi z zanimivimi rezultati in jih analizirali še z rentgensko praškovno difrakcijo. Ta je pokazala, ali je prišlo do nastanka nove kristalne strukture (kokristala ali soli). Kadar na X-ray nismo zaznali sprememb kristalne strukture, smo sklepalni, da je nastala evtektična zmes. Rezultati analiz so pokazali nastanek nove kristalne strukture pri zmeseh klaritromicina in adipinske kisline ter hidroklorotiazida in nikotinamida. Manj izrazite interakcije smo zaznali pri zmeseh klaritromicina in nalidiksne kisline, klaritromicina in natrijevega saharinata, klaritromicina in nikotinamida ter klaritromicina in 4,4-bipiridina.

## ABSTRACT

The pharmacokinetic properties of active pharmaceutical ingredients (API) are dependent on their physicochemical properties. In the development of formulations properties can be changed by formation of salts, hydrates, solvates, diverse polymorphic forms and amorphous forms. In recent years the formation of co-crystals has gained importance as an additional option to change important pharmaceutical properties. By co-crystallisation we can change the following properties of therapeutic ingredients: melting point, solubility, dissolution rates and its connected bioavailability, hygroscopicity, chemical stability, mechanical properties and consequently also pharmacological properties. Pharmaceutical co-crystals are composed of API and co-crystal formers, so they might also satisfy the conditions of patent protection.

Co-crystals can be prepared in various ways. The most successful method is cocrystallisation from solutions. Its alternative is preparation from ground ingredients in a ball mill. Recent modification of solid-state grinding method is small quantity of solvent addition. That improves the process of co-crystallisation in solid state. It is established as a method of first choice because experimentally it offers many new potential co-crystals in a short time.

In this dissertation we used solid-state grinding of different mixtures. We used co-crystal formers with clarithromycin or hydrochlorothiazide or glibenclamide to create new crystal structure (co-crystal or salt). We used 17 carboxylic acids and their derivates (two amides, a salt of sulfimide and derivate of pyridine) as the co-crystal formers. All powders were prepared first without solvent and than with small amount of ethanol. We spotted various melting point changes using the differential scanning calorimetry analysis. Based on these results we selected 12 compounds with interesting results and analyzed them with X-ray diffraction. In some cases new cocrystal structures were created (co-crystal or salt) as X-ray showed. At others there weren't any changes and we concluded that eutectic mixture was created. Results of these analyses indicated creation of new crystal structures at mixtures of clarithromycin with adipic acid and hydrochlorothiazide with nicotinamide. Less distinct interactions were also detected in mixtures of clarithromycin with nalidixic acid, clarithromycin with sodium saccharinate, clarithromycin with nicotinamide and clarithromycin with 4,4-bipyridine.

## SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT

API	- active pharmaceutical ingredients (zdravilna učinkovina)
BU	- biološka uporabnost
CSD	- podatkovna baza CSD (Cambridge Structural Database)
DSC	- diferenčna dinamična kalorimetrija
FDA	- Ameriška agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Administration)
GRAS	- splošno varne substance (Generally regarded as safe)
HCTZ, HCT ali HZT	- hidroklorotiazid
IR	- infrardeča spektroskopija
$K_{sp}$	- topnostni produkt
Mr	- relativna molekulska masa
pK <sub>a</sub>	- negativni logaritem disociacijske konstante kisline (-log K <sub>a</sub> )
SU	- sulfonilurea
T <sub>tal</sub>	- temperatura tališča
TGA	- termogravimetrija
X-ray	- rentgenska difrakcija
XRPD	- rentgenska praškovna difrakcija
ZU	- zdravilna učinkovina

## 1. UVOD

Zdravilne učinkovine se pri sobni temperaturi zelo pogosto nahajajo v trdnem agregatnem stanju. So v obliki delcev, ki so vgrajeni v tablete ali kapsule. Lahko obstajajo v obliki soli, amorfni ali kristalni oblici, kamor spadajo polimorfi in pseudopolimorfi. Njihove fizikalno-kemijske lastnosti se lahko medsebojno zelo razlikujejo in vplivajo na farmakokinetične lastnosti. Amorfne oblike se v primerjavi s kristalnimi hitreje razapljujo in so zato bolje topne, jih pa redkeje zasledimo v farmacevtskih izdelkih, saj so manj kemijsko in fizikalno stabilne, kar pomeni predvsem, da lažje kristalizirajo. Različne kristalne oblike (polimorfi) zdravilne učinkovine se med seboj razlikujejo v temperaturi tališča, topnosti, stabilnosti, hitrosti razapljanja, intrinzični topnosti, oblici delcev, biološki uporabnosti, gostoti, barvi in stisljivosti. Te lastnosti lahko z izdelavo različnih kristalnih struktur prilagajamo našim željam in potrebam. Struktura, ki je bolj stabilna, ima slabšo topnost v primerjavi s termodinamično manj stabilno strukturo (1, 2, 3). Topnost ene in druge strukture se od primera do primera zelo razlikuje. V določenih primerih je razlika v topnosti med kristalnimi strukturami do 10-kratna. Lahko pa je neravnotežna topnost amorfne oblike tudi do 1000-krat večja od kristalne (4).

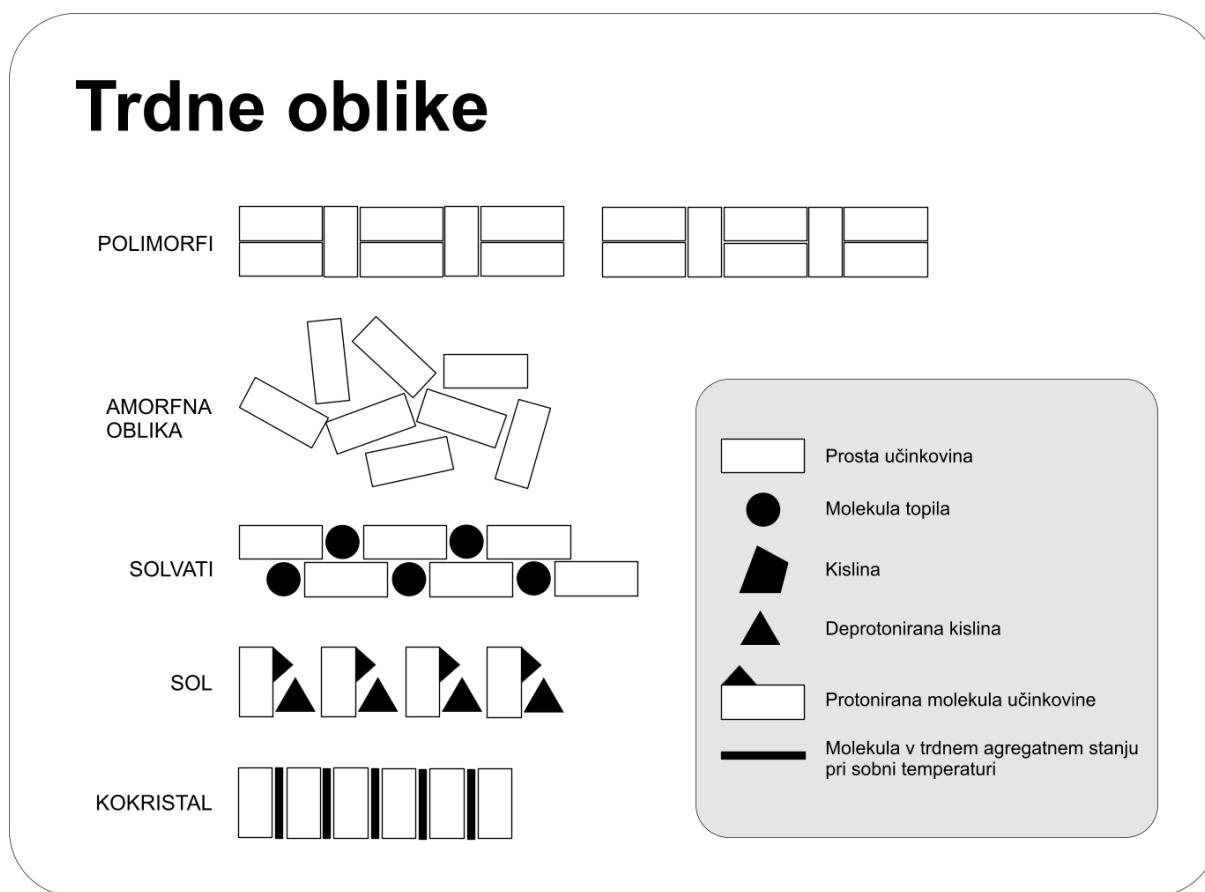
### 1.1. KOKRISTALI

Kokristali ponujajo nove možnosti za pripravo novih stabilnih struktur delcev, s katerimi lahko izboljšamo lastnosti zdravilnih učinkovin (3, 5). Sestavljeni so iz zdravilne učinkovine in tvorca kokristala, ki je splošno uporabljeni farmacevtska pomožna snov oziroma »varna substanca«. Zdravilne učinkovine v obliki kokristalov imajo lahko boljše fizikalno-kemijske lastnosti kot čiste učinkovine (patentirani kokristali z boljšimi lastnostmi so npr. ciprofloksacin s citronsko kislino ali s kofeinom, carbamazepin s saharinom ali nikotinamidom, imipraminijev klorid s fumarno kislino ...), zaradi različnih struktur pa predstavljajo novost in inventivnost, zato jih farmacevtsko podjetje lahko patentno zaščiti kot novo obliko zdravilne učinkovine, sklicuje pa se lahko na klinične študije čiste ZU; podjetje ima zaslužek in vpliva na trg z zdravili (6).

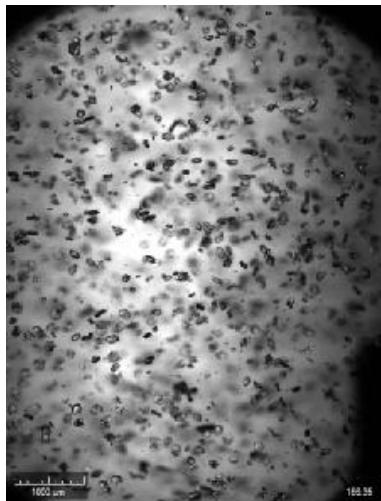
Kokristalih in solvati imajo heteromolekularne strukture, tako so si strukturno podobni, razlika pa je v agregatnem stanju komponent. Pri kokristalih sta zdravilna učinkovina in

tvorilec kokristala v trdnem agregatnem stanju, medtem ko je pri solvatih ena komponenta v tekočem agregatnem stanju (5).

Obstaja več definicij kaj je kokristal, ker izraz še ni poenoten. Ena od definicij je: »Kokristali so sestavljeni iz nevtralne ali ionske zdravilne učinkovine in nevtralnega tvorilca kokristala, ki sta povezana z nekovalentnimi, reverzibilnimi povezavami« (7). Učinkovina in tvorec sta v ustrezном stehiometrijskem razmerju (1:1, 1:2, 2:1, 1:3 itd.). Kokristali so najpogosteje sestavljeni iz dveh molekul (učinkovine in tvorca), najdejo pa se tudi primeri, ko so sestavljeni iz treh ali več molekul, pri teh je tarčna molekula pogosto v obliki solvata ali soli (8, 9, 10). Slika 1 prikazuje razporeditev molekul v polimorfu, amorfni snovi, solvatu, soli in v kokristalu (11), slika 2 pa delce kokristala (12).



**Slika 1:** Razporeditev molekul v polimorfu, amorfni snovi, solvatu, soli in v kokristalu (prirejeno po 11).



Slika 2: Delci kokristala karbamazepina in izonikotinamida (12).

## 1.2. INTERAKCIJE V KOKRISTALIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

V kokristalu molekule medsebojno povezujejo nekovalentne interakcije, gre za vodikove vezi, koordinacijske vezi, halogenske vezi, hidrofobne interakcije, van der Waalsove vezi,  $\pi$ - $\pi$  interakcije in elektrostatske interakcije (npr. dipol-dipol) (13). Vodikova vez je med vsemi najpomembnejša zaradi jakosti in usmerjenosti (9, 14). Najpomembnejši strukturni enoti v farmacevtskih učinkovinah in bioloških sistemih, ki najbolj sodelujejo pri tvorbi interakcij, sta karboksi dimer O-H...O pri karboksilnih kislinah in karboksamidni dimer N-H...O pri amidih (5). Jakost teh interakcij je od 20 do 40 kJ/mol. Več kot je v učinkovini in tvorilcu kokristala funkcionalnih skupin, večje so možnosti za nastanek farmacevtskega kokristala (15). Poznamo še druge vodikove vezi: CH...O, OH... $\pi$ , CH...N, NH... $\pi$ . Njihova jakost je od 2 do 20 kJ/mol. Vodikova vez NH...N sodi med srednje močne vezi (16). Za tvorbo kokristalov so zelo pomembne interakcije karboksilna skupina – aromatski dušik, karboksilna kislina – amid in hidroksilna skupina – piridin. (7).

Na tvorbo kokristalov zdravilne učinkovine vplivajo številne spremenljivke. Te so vrste pomožnih snovi (tvorilci kokristalov), stehiometrijsko razmerje ZU : pomožna snov, uporabljeno topilo za izdelavo, temperatura, tlak, kristalizacijske tehnike idr.

Koraki za načrtovanje kokristalov so:

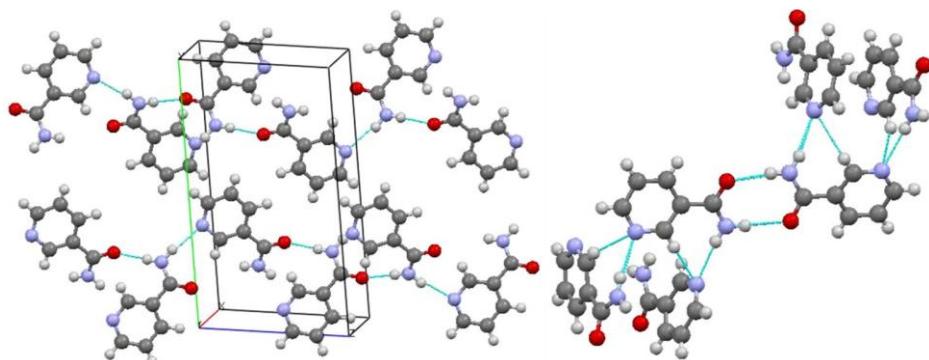
- izbira ustrezne ZU, kateri bomo s kokristalizacijo izboljšali fizikalno-kemijske lastnosti;
- načrtovanje, ali bo ZU z eno ali več pomožnimi snovi tvorila kokristale
- načrtovanje in identifikacija medmolekulskeih povezav znotraj kristalne strukture;
- predstava celotne kristalne rešetke ter ureditev komponent v končni kokristalni strukturi (17).

Tvorilec kokristalov navadno izberemo na podlagi naslednjih kriterijev:

- biti mora farmacevtsko sprejemljiv in že uporabljen v komercialnih farmacevtskih izdelkih; to so lahko substance, ki jim je FDA podelil oznako GRAS (angl. Generally Recognized As Safe – splošno varne substance) ali substance z oznako EAFUS (angl. Everything Added to Food in the US – vse kar se dodaja k hrani); to so npr. glutarna kislina, citronska kislina, ciklodekstrin, ocetna kislina, fosforna kislina, 1-hidroksi-2-naftolna kislina, idr.);
- je netoksičen;
- med kislino in bazo ne sme biti več kot 2 enoti razlike v  $pK_a$  vrednosti, sicer pride do nastanka soli;
- velikost molekule pomožne snovi je sorazmerna velikosti ZU (18).

Ko izbiramo tvorilec kokristala, moramo upoštevati strukturne značilnosti ZU. Te so: število, razporeditev in vrsta funkcionalnih skupin, ki lahko tvorijo vodikovo vez, poleg tega še simetrija in konformacijska fleksibilnost molekule ZU (7).

Slika 3 prikazuje strukturni primer kokristala z vodikovimi vezmi (19), slika 4 pa različno razporeditev molekul in tvorbo druge vrste vezi med istima komponentama v različnem razmerju (20).

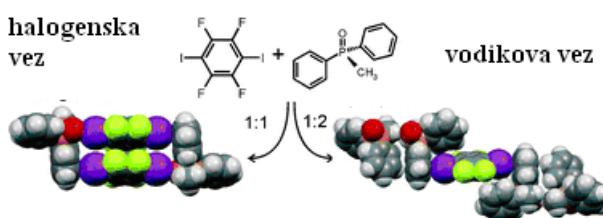


**Slika 3:** Primer vodikovih vezi med molekulami v kokristalu (19).

Kristalizacija večkomponentnih kristalov v stehiometrijskem razmerju je posledica različno močnih povezav, ki povzročajo agregacijo istovrstnih molekul – homomerov in agregacijo med različnimi molekulami – heteromeri (5). Kokristali lahko nastanejo naključno, če sta v zmesi komplementarni komponenti, ki sta se z vodikovimi in drugimi nespecifičnimi nekovalentnimi vezmi med seboj povezali v urejeno strukturo. V procesu načrtovanja priprave farmacevtskih kokristalov je navadno prvi korak analiziranje obstoječih kristalnih struktur. To se ponavadi izvaja s pomočjo Cambridgove strukturne podatkovne baze (angl. Cambridge Structural Database – CSD), ki poda statistično analizo kristalnih struktur in razporeditev molekul v kristalu, s tem pa tudi empirično informacijo o orientiranosti funkcionalne skupine in informacijo o možnih medmolekulskeh povezavah preko supramolekulskeh sintonov. Ko je izbrana učinkovina, je potrebno izbrati ustrezno pomožno snov, s katero bosta skupaj tvorili ustrezne interakcije za tvorbo kokristala. Interakcije so posledica njune molekulske strukture, lege molekul v kristalu, možnosti nastanka vodikovih vezi in gibljivosti molekul. Tako ni mogoče z gotovostjo trditi, ali bo med dvema komponentama kokristalizacija potekla ali ne. Potrebni so empirični poskusi (5). Razvoj kokristalov lahko racionaliziramo, če upoštevamo pravila tvorbe vodikovih vezi med trdimi komponentami (21):

- pri tvorbi vodikove vezi sodelujejo vsi dobri donorji in akceptorji vodikove vezi;
- šest-členski obroč, ki ga tvorijo ciklične intramolekularne vodikove vezi, nastanejo lažje kot intermolekulske vodikove vezi;
- najboljši donorji in akceptorji protona, ki ostanejo prosti po tvorbi medmolekulskeh vezi, med seboj tvorijo znotrajmolekulske vodikove vezi (21);

Ob upoštevanju teh pravil povečamo verjetnost nastanka medmolekulskeh vodikovih vezi, s tem pa možnost vgraditve dveh komponent v kokristal. V opisanih kokristalih najpogosteje nastopa ena molekula s karboksilno skupino in druga z dušikovim heterocikлом v strukturi (21).



**Slika 4:** Primer različne ureditve molekul ter tvorbe halogenske ali vodikove vezi glede na različno razmerje komponent (20).

### 1.3. RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE KOKRISTALOV

S sodobnimi računalniškimi programi lahko iz eksperimentalnih podatkov modeliramo ureditve molekul v kristalno rešetko, s tem pa teoretično predvidimo tvorbo kokristalov. Večja verjetnost za nastanek kokristalov je bolj verjeten, če je nastala kristalna struktura termodinamsko ugodnejša in bolj stabilna kot kristalna struktura posameznih komponent kokristala. Raziskave so pokazale, da lahko teoretično napovemo tvorbo najstabilnejše oblike kokristala in ureditev molekul v kristalni rešetki z izračunom minimalne energije kristalne rešetke. Napovedovanje tvorbe najstabilnejše oblike kokristala je primerljiva z napovedovanjem tvorbe polimorfizma (23).

Čeprav se računalniška tehnologija hitro razvija, je v farmacevtski industriji njena uporaba omejena, saj na ureditev molekul v kristalno rešetko vplivajo številni dejavniki, hkrati pa morajo biti rezultati zanesljivi in uporabni. Podatke je z modelom težko opisati, to pa zmanjšuje zanesljivost rezultatov, zato je eksperimentalni del še vedno zelo pomemben pri raziskavi in ima prednost pred računalniškim modeliranjem (24-27).

### 1.4. POMEN IN LASTNOSTI FARMACEVTSKIH KOKRISTALOV

Zanimanje za kokristale se je povečalo konec 80-ih let 20. stoletja, ko so odkrili, da je kokristale mogoče uporabiti v supramolekularni kemiji za organsko sintezo brez uporabe topila oziroma sintezo v trdem stanju v tehnologiji nelinearne optike (NLO) in za razvijanje fotografskih filmov. Gre za samozdruževanje molekul z nekovalentnimi interakcijami (28-31). Farmacevtski kokristali so še precej slabo raziskani, vendar pa farmacevtska znanost in industrija kažeta vedno večje zanimanje zanje, predvsem zaradi novih možnosti pri razvoju zdravil. Prednost kokristalov je v tem, da ponujajo možnosti za izboljšanje lastnosti zdravilnih učinkovin brez kemijskih sprememb molekule in brez uporabe potencialno neželenih topil. Tako brez slednjih ni treba opravljati testov za ostalih topil, s tem pa se znižajo stroški, večja pa je tudi verjetnost za kakovost in varnost izdelka, ker niso uporabljeni nevarni topili (5, 22, 32, 33).

Zdravilne učinkovine uporabljamo v obliki soli, polimorfov, solvatov in hidratov, s katerimi vplivamo na njihove fizikalno-kemijske lastnosti. Pri tem lahko pride do različnih težav in omejeno količino protionov in topil (34, 35). Pri farmacevtskih kokristalih teoretično obstaja več potencialnih tvorilcev kokristalov za določeno ZU in s tem večja

možnost za prirejanje fizikalno-kemijskih lastnosti. Te lahko večinoma razložimo kot posledico spremenjene lege molekule v kristalni rešetki in medmolekulskih povezav, ki so zelo odvisne od lastnosti tvorilca kokristala (7).

Lastnosti, ki jih lahko spremojamo s tvorbo kokristalov in so pomembne za farmacevtsko uporabo so:

- temperatura tališča,
- topnost,
- hitrost raztplavljanja,
- biološka uporabnost,
- higroskopnost,
- kemijska stabilnost,
- mehanske lastnosti,
- polimorfizem kokristalov (7).

#### **1.4.1. Temperatura tališča**

Temperatura tališča je fizikalna lastnost, zelo značilna za čisto snov, v analizi se uporablja kot metoda prve identifikacije. Pri tej temperaturi sta trdna in tekoča faza v ravnotežju (7).

Temperature tališča kokristala in posameznih sestavnih se med seboj razlikujejo (5, 36, 37). Pod to temperaturo ni drugih termičnih sprememb. Če znižamo temperaturo tališča s kokristalizacijo, dosežemo bolj stabilno strukturo in preprečimo težave, povezane s termolabilnostjo učinkovine v procesih, ki potekajo pri višji temperaturi, npr. v talini (5). Na temperaturo tališča kristalnih snovi vplivajo določeni dejavniki, kot so molekulska ureditev znotraj kristalne rešetke, molekularna simetrija, intermolekularne interakcije in konformacijska gibljivost molekule (7).

Schultheiss in Newmann sta izvedla obsežno raziskavo. Preučevala sta temperature tališča kokristalov in čistih zdravilnih učinkovin ter temperature tališča tvorilcev kokristalov. Vključila sta 50 različnih kokristalov in sestavnih snovi. Rezultati so pokazali, da ima 26 od 50 kokristalov (51 %) temperaturo tališča med tališčem čiste zdravilne učinkovine in tališčem tvorilca kokristala; pri 19 od 50 kokristalov (39 %) je temperatura tališča kokristalov nižja od obeh temperatur tališča; samo pri 3 od 50 kokristalov (6 %) je temperatura tališča kokristalov višja od temperatur obeh tališč; pri 2 od 50 pa je temperatura tališča kokristala skladna bodisi s tališčem čiste zdravilne učinkovine, bodisi s

temperaturo tališča tvorilca kokristala. Raziskava dokazuje, da s kokristalizacijo lahko spremojemo temperaturo tališča glede na čisto učinkovino. Rezultat je najpogosteje temperatura tališča med tališčem učinkovine in tališčem tvorilca ali pa je nižje od obeh tališč (7).

### 1.4.2. Topnost

Izboljšana topnost je eden glavnih vzrokov za pripravo in karakterizacijo kokristalov. Učinkovine so zelo pogosto lipofilne, tako da so zelo slabo topne v vodi. Na topnost kokristala vpliva koncentracija komponent in pH, kadar je katera od komponent ionizirana (38). Razvili so matematične modele, ki opisujejo topnost binarnih kokristalov, ki vsebujejo neionizirne komponente. Ti modeli temeljijo na ravnotežju med kokristali in kokristalnimi komponentami v raztopini. Tu je pomembna lastnost topnostni produkt kokristala  $K_{sp}$ . Veliko kokristalov je sestavljenih iz nevtralnih komponent, ki lahko ionizirajo tekom raztopljanja. Tu bo na topnost vplivala tudi  $pK_a$  vrednost ter pH raztopine (5). Na topnost vpliva vrsta medija in pH medija, ki ga ustvarimo v vodni raztopini z dodatkom kislin ali baz. Pri prostih kislinah in bazah lahko tako sol kot kokristal izboljša topnost, zato boljša topnost ni zagotovilo, kakšen sistem je nastal (38).

Spremembu pH še posebej vpliva na topnost učinkovin, ki v vodi ionizirajo ali imajo od pH odvisno topnost in ko je izbrani medij nepufrana raztopina ali kar voda sama. Večja topnost kokristalov v pufranih medijih pa je posledica solubilizacijskega učinka raztopljenega kokristalizacijskega partnerja oziroma tvorbe bolj topnega kompleksa. Če pa kokristal preseže topnostni produkt, ima slabšo topnost (5, 38, 39).

Raziskave so pokazale, da učinkovina itrakonazol z 1,4-dikarboksilno kislino v obliki kokristala izkazuje boljše lastnosti. Obnaša se kot čista amorfna oblika in lahko doseže tudi do 20-krat višjo topnost (37), kljub temu da ima čista učinkovina manjše delce (36). Pri tem lahko nastane prenasičenje ZU v mediju. Kokristali vplivajo tako kot amorfi na kinetiko raztopljanja, poleg tega pa še na ravnotežno topnost. Podatki kažejo, da je to povečanje manj izrazito kot pri soleh zdravilnih učinkovin (28). Tvorilec kokristala v veliki meri vpliva tako na topnost kot na hitrost raztopljanja (10).

Rodriguez – Homedo in sodelavci so določali topnost kokristalov karbamazepina v vodi, etanolu, izopropanolu in etilacetatu, in sicer za sedem različnih kokristalov karbamazepina. Rezultati so dali od 2-krat do 152-krat večjo topnost kokristalov od čiste oblike

učinkovine. Dokazali so tudi, da je topnost kokristalov proporcionalna topnosti posameznih komponent kokristala (38, 39).

Pri kokristalu fluoksetinijevega klorida je kokristal z benzojsko kislina slabo topen, kokristal s fumarno kislino rahlo bolje topen, kokristal z jantarjevo kislino pa je dvakrat bolj topen, nato se pretvori v stabilno obliko in doseže ravnotežno topnost čiste oblike (10). Težava s topnostjo kokristalov se je pojavila pri pasji hrani: leta 2007 je FDA prejela veliko pritožb lastnikov domačih živali, ker so številne poginile, in sicer zaradi hrane. Odpovedala so jim ledvica. Zadevo so raziskali in ugotovili, da zastrupitev povzročata dve relativno netoksični substanci – melamin in cianurična kislina, obe v hrani prisotni v manjši količini kot je toksični odmerek. Raziskave so pokazale, da je kokristal melamin : cianurična kislina = 1:1 praktično netopen v vodi in zato pride do obarjanja kokristala v ledvicah, s tem pa do zamašitve ledvičnih tubulov (33).

#### **1.4.3. Hitrost raztplavljanja**

Zdravilna učinkovina se mora iz trdne farmacevtske oblike najprej raztopiti v telesnih tekočinah, preden se lahko absorbira iz gastrointestinalnega trakta. Pogosto je vzrok nizke biološke uporabnosti slaba topnost kot posledica pa tudi slaba absorpcija skozi epitelne celice gastrointestinalnega trakta. Tako so topnost, hkrati pa tudi hitrost raztplavljanja in permeabilnost zelo pomembne lastnosti zdravilne učinkovine za njeno učinkovitost (41).

Na večjo hitrost raztplavljanja lahko vplivamo z zmanjšanjem velikosti delcev - s tem zvečamo površino delcev, s tvorbo vodotopnih kompleksov, z dodatkom površinsko aktivnih snovi dosežemo solubilizacijo, z derivatizacijo ZU kot je tvorba soli, s spremembo trdnega stanja ZU za izboljšanje raztplavljanja (sem spada tudi tvorba kokristalov) ter s tvorbo trdnih disperzij. Velikost delcev je zelo pomembna lastnost tako za raztplavljanje kot za absorpcijo (42).

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

$$\frac{dW}{dt} = \frac{DA(C_s - C)}{L}$$

kjer je  $\frac{dW}{dt}$  hitrost raztplavljanja, A je površina trde snovi, ki je na razpolago za raztplavljanje, C je koncentracija trdnega v nasičenem mediju,  $C_s$  je nasičena topnost učinkovine, D je difuzijski koeficient učinkovine, L je debelina difuzijskega sloja, ki je blizu površine delca,

C je koncentracija učinkovine, raztopljene v času t. Površina učinkovine, ki je na voljo za raztplavljanje, je odvisna od velikosti delcev učinkovine in sposobnosti za močljivost. Velikost delcev je kritičen parameter za hitrost raztplavljanja in je odvisna od pogojev kristalizacije (kokristalizacije) ter metode priprave (ko-)kristalov (15).

Študije so pokazale, da je profil raztplavljanja kokristala celekoksib-nikotinamid (43) odvisen od medija raztplavljanja ter dodanih farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi. Raztplavljanje kokristala z ionizirajočo učinkovino indometacin-saharin je bilo odvisno od jakosti pufra v vodnem mediju (5).

Na hitrost raztplavljanja vpliva tudi pH medija. Testira se topnost učinkovine, ki ionizira v vodi, in sicer če ima od pH odvisno topnost ter če je medij nepufrana vodna raztopina ali kar sama voda (5, 7, 10). V pufrani raztopini pa je povečana topnost zdravilne učinkovine kokristala lahko posledica tvorbe bolj topnega kompleksa, slabša topnost pa je lahko posledica doseganja topnognega produkta kokristalov zaradi raztplavljanja kokristalnih komponent (44). Če ima kokristal višjo ali nižjo temperaturo tališča od tališča čiste ZU, lahko sklepamo na šibkejše ali močnejše medmolekulske povezave, to pa vpliva na hitrost disociacije kokristala in s tem na hitrost raztplavljanja (7). Na psih so delali farmakokinetične študije, s katerimi so potrdili, da lahko z ustrezno kokristalizacijo slabo topne in dobro permeabilne zdravilne učinkovine povečamo njeno topnost in se ta hitreje raztplavlja. S tem pa zboljšamo njeno absorpcijo in biološko uporabnost. Šlo je za (2-[4-(4-kloro-2-fluorofenoksi)fenil]pirimidin-4-karboksamid, potencialno učinkovino), blokator natrijev kanalčkov, ki je kot kokristal z glutarno kislino izkazovala tako dobre lastnosti (36).

#### 1.4.4. Biološka uporabnost

Biološka uporabnost (BU) je delež odmerjene zdravilne učinkovine, ki je na razpolago v neposredni obliki v sistemskem krvnem obtoku. Pri razvoju zdravil potekajo mnoge raziskave na živalih. Pri njih je biološka uporabnost pomemben parameter, ki ga je treba upoštevati pri načrtovanju nove učinkovine ali pri pripravi nove farmacevtske oblike. Rezultati teh študij so zelo pomembni in v veliko pomoč pred prehodom na testiranje na ljudeh. Za testiranje BU uporabljam naslednje živalske vrste: podgane, zajce, pse, prašiče in opice. Pri relativnih in primerjalnih študijah biološke uporabnosti merimo koncentracijo ZU v krvi po peroralni aplikaciji čiste učinkovine, nato pa še po aplikaciji kokristala (7).

Farmakokinetične študije na psih so pri raziskavi učinkovine iz drugega razreda biofarmacevtske klasifikacije pokazale, da lahko pri slabo topni in dobro permeabilni učinkovini s tvorbo kokristala izboljšamo raztpljanje, absorpcijo ter biološko uporabnost v primerjavi s čisto učinkovino (36).

Tudi pri raziskavi flavonoida kvercetina so z raziskavo potrdili višjo biološko uporabnost s tvorbo kokristala. Kot čista učinkovina je slabo topen, vsi širje pripravljeni kokristali, kvercetin : kofein, kvercetin : kofein:metanol, kvercetin : izonikotinamid in kvarcetin : teobromin dihidrat, pa izkazujejo veliko večjo topnost, dokazana pa je bila tudi visoka absorpcija. Tako je bila dosežena 10x višja biološka uporabnost učinkovine (45).

#### **1.4.5. Higroskopnost**

V kokristalu so molekule povezane v enotno kristalno rešetko, in sicer s komplementarnimi funkcionalnimi skupinami in vodikovimi vezmi. V nekaterih primerih to inhibira vgradnjo molekule topila v kristalno rešetko, ki prav tako temelji na komplementarnosti sistema (5). Stabilnost trdne učinkovine ali farmacevtske oblike v pristnosti atmosferske vlage je zelo pomembna za farmacevtsko industrijo, tudi zaradi neželene tvorbe hidratov med procesi izdelave, shranjevanjem in transportom. Kokristale lahko oblikujemo tako, da ne tvorijo hidratov in solvatov. Narejene so bile raziskave kokristala indometacin : saharin v stehiometrijskem razmerju 1:1 in njegovo higroskopnostjo. Pri merjenju dinamične sorpcije vlage se je izkazalo, da kokristal veže zanemarljivo količino vode ( $< 0,05\%$ ) pri 95 % relativne vlažnosti, medtem ko čista oblika veže 0,07 %, fizikalna zmes indometacina in saharina pa 0,10 % (40). Tako ima v tem primeru kokristal najboljše lastnosti, saj je najmanj higroskopen. Vendar ta pojav ni pravilo. Tako je bilo pri drugi raziskavi ugotovljeno, da kokristal kofeina in oksalne kisline ni higroskopen, medtem ko kokristal kofeina z malonsko in maleinsko kislino veže vodo, pri tem pa kokristal razпадa in nastane hidrat kofeina (46).

#### **1.4.6. Kemijska stabilnost**

V določenih primerih tvorba kokristala zveča kemijsko stabilnost ZU, če je stabilnost oz. nastanek razpadnega produkta pogojena z določeno konformacijo molekule v trdnem stanju. Primer je molekula karbamazepina, kjer je fotokemijska stabilnost molekule odvisna od strukture kristala in razporeditve molekul v njem. Tako je zaradi spremenjene

konformacije molekule v kokristalu izboljšana kemijska stabilnost te ZU in preprečena fotodegradacija karbamazepina s spremembo konformacije (5).

#### 1.4.7. Mehanske lastnosti

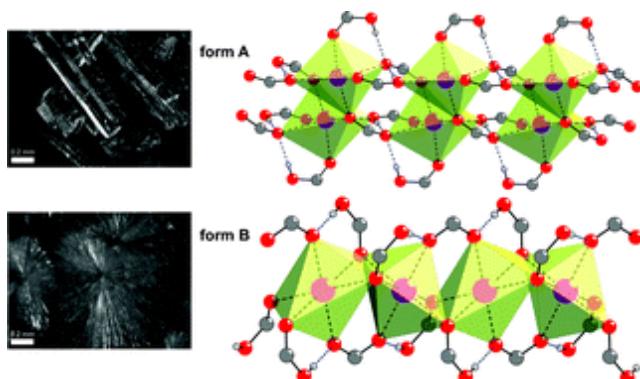
Pomembni lastnosti trdnih kristalnih snovi sta tudi oblika kristalov in velikost delcev ZU, ki lahko vplivajo tudi na razvoj in proces izdelave zdravil (pretočne lastnosti, stisljivost, sedimentacija, hitrost raztplavljanja) (47). Ker je spremenjena notranja struktura kristala, se lahko spremeni tudi zunanjega oblika in morfologija in s tem mehanske lastnosti delcev, s tem pa se moramo pri tem zavedati, da ima velikost delcev velik vpliv na postopek kristalizacije (47, 48). Različne mehanske lastnosti delcev lahko pričakujemo pri kristalizaciji in kokristalizaciji norfloksacina, ki tvori v prisotnosti saharina sol norfloksacinjevega saharinata dihidrata. Hkrati pri enakih pogojih nastanejo kokristali norfloksacinijev saharinat : saharin (kokristal soli in nevtralne molekule) (9).

Boljše mehanske lastnosti (predvsem plastičnost in elastičnost) so bile potrjene tudi v diplomski nalogi pri kokristalizaciji flukonazola z glutarno, maleinsko, fumarno ali salicilno kislino (51).

#### 1.4.8. Polimorfizem kokristalov

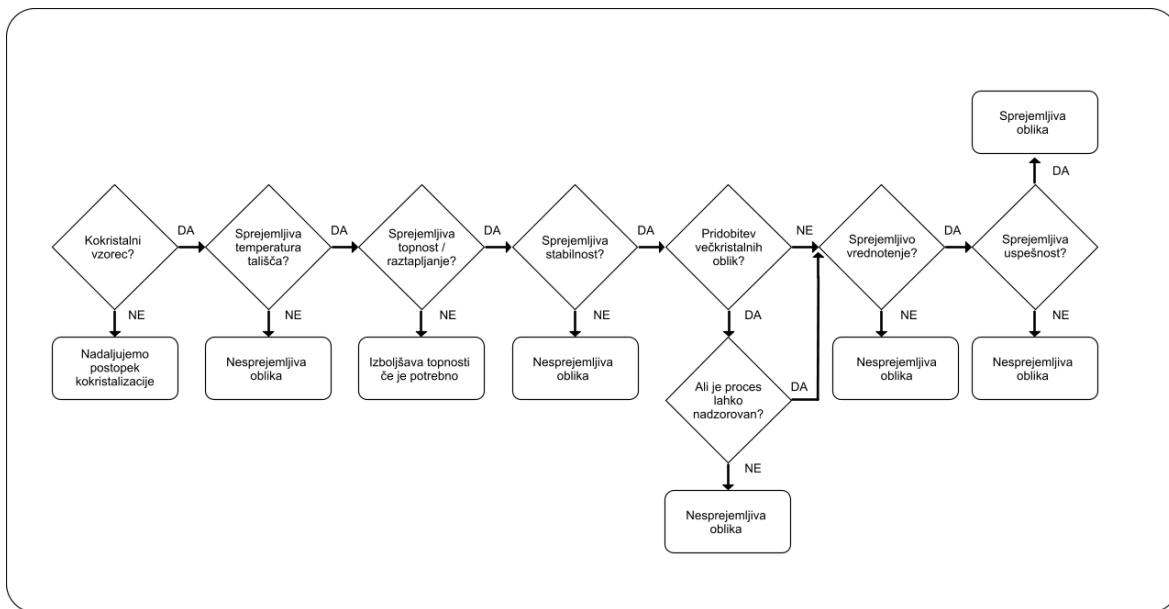
Polimorfi imajo lahko različne fizikalne in kemijske lastnosti. Obstajajo tudi polimorfi kokristalov z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (49).

Raziskovalcem je uspelo pripraviti kokristal benzojske kisline in natrijevega benzoata (slika 5). Hitro izhlapevanje privede do nastanka novega kokristala (B) v stehiometrijskem razmerju 2 benzojska kislina : 1 natrijev benzoat. Termodinamske razlike med novim in starim polimorfov so v strukturi molekul. Pri sobni temperaturi je nova oblika B metastabilna (49).



**Slika 5:** Kokristal A benzojska kislina : natrijev benzoat = 1:1; oblika B kokristal 2 benzojska kislina : 1 natrijev benzoat (49).

Slika 6 kaže stopnje načrtovanja kokristalov (7).



Slika 6: Stopnje preizkušanja ustreznosti kokristalov (7).

## 1.5. METODE OBLikOVANJA (DIZAJNIRANJA) IN PRIPRAVE KOKRISTALOV

Kokristale najpogosteje pripravimo iz raztopine, z mletjem zmesi v krogličnem mlinu in s kokristalizacijo iz zelo goste suspenzije. Poznana je tudi kokristalizacija s sublimacijo sestavin, kokristalizacijo iz taline in delikvescenco sestavin pri visoki vlažnosti (28, 50).

### 1.5.1. Kokristalizacija iz raztopin

Kokristalizacijo iz raztopin najpogosteje izvajamo s počasnim odparevanjem topila iz raztopine z ekvimolarnim oziroma stehiometrijskim razmerjem koncentracij kokristalnih komponent. Lahko uporabimo tudi drugo metodo, kjer pri višji temperaturi najprej raztopimo komponente, nato pa raztopino ohladimo ali dodamo netopilo, da poteče kristalizacija (5, 52). Pri kokristalizaciji iz raztopine je pomembno, da imata obe komponenti podobno in dovolj veliko topnost, sicer se najprej obori samo manj topna komponenta. Tehnike se razlikujejo po nujnosti uporabe stehiometrijskega razmerja med komponentami, ki so prisotne v kokristalu (52). Pri metodi odparevanja topila je

stehiometrijsko razmerje ključnega pomena, še posebej kadar pustimo odpareti topilo do suhega (18).

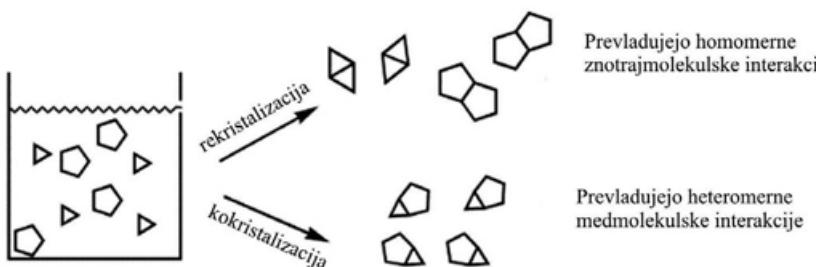
Rodrigez – Homedo in sodelavci so opisali tehniko, ko pada topnost kokristala pod nivo topnosti obeh komponent zaradi dodajanja ene od sestavin raztopini. Zato se kokristal obori iz raztopine. Tu moramo izbrati topilo, v katerem je ena komponenta presežno topna glede na drugo. Če tako topilo ni na voljo, lahko dodajamo raztopino bolj topne komponente h gosti suspenziji manj topne komponente. Ta postopek privede do želenega koncentracijskega razmerja, ki bo vodilo do pretvorbe neraztopljene snovi v kokristal (53). Vendar podobna topnost ne zagotavlja uspešne kokristalizacije (15).

Priporočeno je, da za kokristalizacijo uporabimo tiste učinkovine in pomožne snovi, ki lahko tvorijo več polimorfnih oblik. Kadar ima molekula več polimorfnih oblik, ima s tem večjo strukturno fleksibilnost in ni ujeta v le določen tip kristalne rešetke. Tako je večja verjetnost, da se molekula postavi v primerno konformacijo za obstoj v kristalni rešetki z drugo molekulo (50). Vendar polimorfizem ni zagotovilo, da je izbrana spojina ustrezna komponenta za kokristalizacijo. Glavno vlogo pri tem igra jakost heteromernih medmolekulskih interakcij (9, 54).

Pri kokristalizaciji iz raztopin pogosto nastajajo veliki in dobro oblikovani monokristali kokristalov. Glavna prednost tu je, da lahko pripravimo kokristale takšne kakovosti, da so primerni za analizo z rentgensko difrakcijo na monokristalu. Ta predstavlja najpomembnejšo metodo za karakterizacijo strukture kokristalov. Druga prednost priprave kokristalov iz raztopne je, da postopek predstavlja uveljavljen in učinkovit način čiščenja kokristalov (52).

Poleg nastanka kokristalov je konkurenčen proces nastanek solvatov, ki so neželeni. Na to zelo vpliva vrsta topila. Zmesi topil, lahko preprečijo nastanek solvatov in povečajo verjetnost za nastanek kokristalov. Pri študiji karbamazepama in saharina v prisotnosti do devet različnih topil, ki tvorijo solvate, je bila ta teorija potrjena. Tvorba solvatov je funkcija aktivnosti topila, ta pa je odvisna od deleža topila v raztopini. Z zmanjšano koncentracijo topila, zmanjšamo tveganje za nastanek solvatov. Podobno se zgodi tudi, če izberemo topilo z visoko topnostjo obeh komponent kokristala. Zmes topil naj bi zmanjšala verjetnost nastanka solvatov s katerimkoli topilom v zmesi, saj je tako aktivnost vsakega naslednjega topila zmanjšana. V eksperimentu je kar nekaj topil kazalo manjšo molarno topnost saharina v primerjavi s topnostjo karbamazepina. Premajhna količina saharina je bila lahko vzrok za prevlado solvacije nad kokristalizacijo (55).

Zmesi topil naj bi tudi izboljšale kinetiko pretvorbe posameznih komponent v skupno kokristalno obliko. Stopnja nastanka kristalizacijskih jeder je v kar nekaj zmeseh topil višja kot pri čistih topilih. Vendar pa ima kokristalizacija iz kompleksne zmesi topil z industrijskega vidika kar nekaj pomanjkljivosti. Težko je skozi celotne procese zagotoviti in kontrolirati popolnoma enako sestavo topil. Lahko so topila tudi toksična. Kriteriji za izbor ustreznih univerzalnih topil so aktivnost, hlapnost in viskoznost zmesi topil (55). Slika 7 kaže različne interakcije in različne procese med molekulami v raztopini (6, 11).



**Slika 7:** Kokristalizacija iz raztopine: dominacija homomernih znotrajmolekulskih interakcij vodi do rekristalizacije, dominacija heteromernih medmolekulskih interakcij vodi do kokristalizacije (6, 11).

### 1.5.2. Kokristalizacija z mletjem

Tvorba kokristalov v trdnem stanju temelji na mletju, in sicer pride s tem do mehanske aktivacije komponent. Ta metoda sodi med metode »zelene kemije«, je alternativna, ker ni prisotnih toksičnih topil (9). Znano je, da se z mletjem pogosto poruši kristalna rešetka, s tem nastane amorfna snov, lahko pa nastanejo tudi različne polimorfne oblike učinkovine kot posledica mehanske obremenitve pri mletju. Tako so prednosti metode mletja, da je hitra, odsotne so težave s topnostjo komponent, ni težav z nastankom solvatov, tako je ta metoda bolj ustrezena pri rešetanju (screeningu) (56).

Pri dokazovanju kokristalizacije je cilj ponazoritev kristalne strukture. Z mletjem pripravljenih kokristalov ne moremo identificirati z rentgensko difrakcijo na monokristalu. Ta metoda namreč zahteva določeno velikost kristalov, z mletjem pa preveč zmanjšamo velikost delcev. Slaba lastnost je, da so ti delci manj čisti kot kokristali iz raztopin, tudi kristalna neurejenost je zelo velika. Sprememba v stopnji kristalnosti se lahko pokaže tudi v spremenjenih fizikalno-kemijskih lastnostih (52).

Za uspešno kokristalizacijo naj bi bila vsaj ena komponenta hlapna pri temperaturi mletja. Pri mletju nastali dimeri pa naj bi imeli močnejše intermolekularne vodikove vezi kot

vsaka čista komponenta. Kokristalizacijo v trdnem lahko izboljšamo tudi s segrevanjem zmesi pred mletjem. Segrejemo jo na temperaturo, ki je vsaj 50 °C nižja od temperature tališča vsake posamezne komponente. Mletje lahko izvajamo v možnarju (terilnici s pestilom) ali v krogličnem mlinu, kjer lažje zagotovimo ponavljanje izvajanja in kontrolirane pogoje. Z dodatkom nekaj kapljic topila med mletjem lahko znatno izboljšamo nastanek kokristalov. Če je topilo ustrezne polarnosti, lahko tudi kontroliramo nastanek polimorfov (52).

Na hitrost kokristalizacije pri amorfnih snoveh vplivajo pogoji mletja (temperatura) in temperatura steklastega prehoda reaktantov. Pri tvorbi kokristala karbamazepin-saharinata z mletjem obeh komponent kokristalizacija poteče hitreje pri sobni temperaturi kot v hladnejših pogojih, kjer je amorfna faza bolj stabilna (56). Če dodamo pomožno snov z nižjo temperaturo steklastega prehoda, deluje ta kot mehčalo, zniža namreč temperaturo steklastega prehoda zmesi, s tem pa povišamo stabilnost molekul in hitrost kokristalizacije. Učinkovito mehčalo je voda, tu je tvorba kokristalov pospešena, če uporabimo hidratirano kristalno obliko reaktanta ali kadar pri mletju uporabimo zelo majhno količino vode (5, 56). Vpliv topil na tvorbo kokristalov in njihovo primerjavo so analizirali Trash in sodelavci, ko so dodajali nekaj kapljic različnih topil zmesi kofeina in glutarne kisline pripravljene z mletjem. Ugotovili so, da nastanejo različne kokristalne strukture, in sicer so molekule obeh komponent v kristalni rešetki različno razporejene pri dodatku topila ali brez njega. Predvsem so nastajale razlike pri polarnih topilih (kloroform, diklorometan, acetonitril, voda) ali nepolarnih topilih (n-heksan, cikloheksan, heptan). Tako mletje brez topila kot mletje s topilom predstavlja zelo učinkoviti metodi za rešetanje pri izdelavi kokristalov, soli in polimorfov zdravilnih učinkovin (57).

Kokristalizacija lahko nehote poteka tudi med različnimi procesi v proizvodnji, transportu ali pri skladiščenju zdravil. Ti procesi potekajo hitreje pri višji relativni vlažnosti. Zato bi morali dodati spisku možnih pretvorb, tudi možnost nastanka kokristala k že poznani tvorbi polimorfov in solvatov, ki so posledica kemičnih, termičnih in mehanskih vplivov med izdelavo, transportom in shranjevanjem zdravil (5, 56).

### 1.5.2.1. Mletje brez topila

Kokristalizacija v trdnem stanju s suhim mletjem poteka po različnih mehanizmih, vsak pa vsebuje različen tip vmesnega stanja. Ti so lahko molekularna difuzija, tvorba evtektika in

kokristalizacija z amorfnim intermediatom. Vsem tem mehanizmom je skupno, da izkazujejo povečano mobilnost in/ali višjo energijo glede na njihove začetne kristalne oblike. Kokristali lahko nastajajo hkrati z več od teh mehanizmov (58).

### **Kokristalizacija s suhim mletjem z molekularno difuzijo**

Ta metoda je značilna za nastanek kokristalov, če ima ena ali obe sestavini visok parni tlak. Kokristalizacija je hitra, poteče tudi brez mletja ali mešanja. Velikokrat gre za mehanizem površinskega premika in difuzije skozi plinasto fazo (59). Mletje zagotovi večjo površino in je tako difuzija olajšana. To površino reaktantov še povečamo, če odstranjujemo nastali produkt (60). Difuzija ni omejena le na površinski sloj, temveč lahko prodira tud v notranjost (58).

### **Kokristalizacija s suhim mletjem z vmesno tekočo fazo**

Kadar se uporablja ta metoda, tekoča faza postane del produkta, ko pa se reakcija konča, postopoma izgine kot čista spojina. Osnoven primer tega mehanizma je, kadar je eden od reaktantov pri sobnih pogojih v tekočem stanju. To pa ni skladno z osnovno definicijo kokristalov. Kar nekaj kokristalov z vodikovimi vezmi obstaja, ki vključujejo vsaj eno tekočo komponento pri sobnih pogojih, primer je kokristal kofeina z mravljično, ocetno ali trifluorocetno kislino (61).

Lahko se tekočina tudi dodaja za lažji nastanek kokristala, nevarnost pa je, da pri tem nastane solvatna struktura. Preko tekoče faze lahko kokristalizacija poteka tudi, kadar kokristalne komponente tvorijo podhlajen, nestabilen evtektik, ki navadno preide v kokristal (58).

- **Tvorba kokristalov hidratov:**

Če med mletjem zmesi pri izdelavi kokristalov dodamo tekočino, lahko to pomembno pripomore k boljši tvorbi kokristalov. Produkt lahko vsebuje topilo kot sestavni del kokristala. Tako je ta tehnika ugodna za iskanje trikomponentnih kokristalov. V nekaterih primerih lahko dosežemo nastanek trikomponentnega kokristala hidrata predvsem z dodatkom vode kot tekočega reaktanta ali dodatkom kristalnega hidrata (62).

- **Tvorba kokristala preko evtektične zmesi:**

Ena od možnih zmesi pri pripravi kokristalov je tudi evtektična zmes. Evtektična zmes (eutekos gr.-snov z nizko temperaturo tališča) je razmerje komponent, ki imajo v sistemu najnižjo temperaturo kristalizacije. Kadar gre v sistemu za dvokomponentno zmes, tvori snov, ki jo je manj, s snovjo v prebitku evtektično zmes. V DSC diagramu opazimo pri evtektični temperaturi endotermni vrh, pri višji temperaturi pa še taljenje komponente v prebitku. Če določamo entalpijo taljenja glede na sestavo zmesi, lahko ugotovimo razmerje komponent v evtektični zmesi ali razmerje komponent v neznani zmesi (63).

Možen je tudi nastanek kokristala iz predhodne evtektične zmesi. To so potrdili pri zmesi difenilamina in benzofenona (56).

Vloga mletja pri tvorbi evtektika je dvojna: poskrbi za mešanje in za nastanek novih površin reaktantov za tvorbo evtektika, hkrati pa izboljša tvorbo kokristalov z indukcijo kokristalnih jeder v fazi evtektika (58).

### **Priprava kokristalov s suhim mletjem preko amorfne faze**

Ta princip poteka pri trdih snoveh, ki niso hlapne in so povezane z močnimi vezmi, kot so vodikove vezi. Amorfni intermediati lahko nastanejo kot posledica različnih farmacevtskih procesov, iz teh pa lahko nastanejo kokristali pri pogojih, ko je povečana mobilnost molekul in njihova komplementarnost. Amorfno fazo lahko stabiliziramo, če meljemo reaktante pri znižani temperaturi. S tem je znižana mobilnost molekul in nastajanje kokristalov poteka v manjšem obsegu (dokazano za indometacin) (56).

Temperatura steklastega prehoda amorfne snovi je zelo pomembna. Določa mobilnost molekul in njihovo reaktivnost. Če dodamo snov z visoko temperaturo steklastega prehoda, deluje ta kot protimehčalo, ker se dvigne temperatura steklastega prehoda celotne zmesi, saj je celotna mobilnost in reaktivnost molekul zvečana, s tem pa tudi možnost kokristalizacije (56).

Na nastanek kokristalov z mletjem poleg temperature izvedbe vpliva še solvatna kristalna struktura reaktantov. Pri karbamazepinu s saharinom je voda mehčalo v kristalni rešetki in zniža temperaturo kokristalizacije. Rezultati raziskav so pokazali, da nastane amorfna oblika karbamazepina med dehidracijo dihidratne oblike pri mletju pri sobni temperaturi. Ker tudi mletje povzroča amorfizacijo, so proučevali obnašanje amorfnegra intermediata pri shranjevanju na 0 % in 75 % vlažnosti po 5 minutnem mletju pri sobni temperaturi.

Rezultati so pokazali, da se pri višji vlažnosti pospeši tvorba kokristalov. Tako absorpcija vlage poveča mobilnost molekul in kristalizacijo amorfnega intermediata. Vzrok je tako kot pri mletju karbamazepin dihidrata v vodi, ki ima temperaturo steklastega prehoda -138 °C in dokazano zniža temperaturo steklastega prehoda zmesi (56).

### 1.5.2.2. Mletje s topilom

Kokristalizacija z mletjem ob majhni količini ustreznega topila je tudi perspektivna metoda. Njene prednosti so, da je učinkovita, lahka, poceni in zanesljiva metoda tako za odkrivanje novih kot za pripravo že poznanih kokristalov. Poleg tega je ekološko sprejemljiva, ker ni potrebno uporabljati velike količine topil kot pri metodi iz raztopine. Z dodatkom majhne količine topila se poveča kinetika nastanka kokristalov in možnost kontrole nastanka polimorfov (52).

Raziskovalci so odkrili, da je pri dodatku ustreznega topila olajšana tvorba kokristalov in bistveno skrajšan čas njihovega nastanka. Pri dodatku neustreznega topla, predvsem kjer komponente niso topne, pa kokristalizacija ne poteče (15, 36).

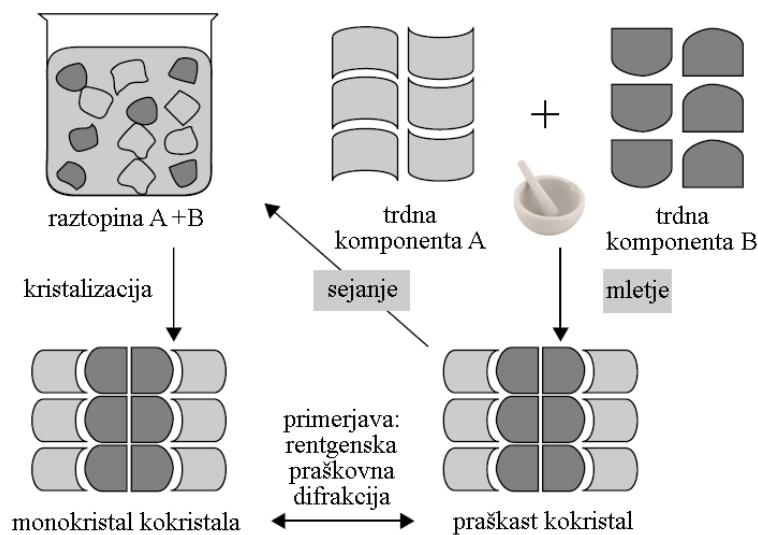
Pri suhem mletju, kjer je prisotna vmesna tekoča faza, se ta tekoča faza tekom kokristalizacije pretvori v trdno. Pri mletju s topilom pa to igra kinetično vlogo. Topilo se tekom kokristalizacije naj ne bi izločalo, razen če izhlapi. Niso pa še dokončno ugotovili, kako tekoča faza pri mletju s topilom prispeva k večji učinkovitosti mletja v primerjavi s suhim mletjem (58). Ena predpostavka je, da ima majhna količina topila v nekaterih primerih čisto fizikalno vlogo, in sicer kot drsilo v reakciji, ter je tako medij za molekularno difuzijo. Lahko pa ima narava mletja velik vpliv na potek kokristalizacije v odvisnosti od vrste tekočine, ki je prisotna, med drugim tudi z vplivom na tvorbo multikomponentne rešetke (ogrodja) (57).

### Topilo kot medij za molekularno difuzijo

Raziskovalci so analizirali, kako kemijska narava uporabljeni tekočine vpliva na rezultate mletja trdnih komponent. Raziskovalci so trikomponentne fazne diagrame, cimetna kislina in nikotinamid sta bila komponenti za tvorbo kokristalov, voda ali metanol pa topilo. Fazni diagram razloži težavo, ki se pojavi pri raztopinah. Če sta komponenti za kokristalizacijo različno topni, navadno nastane oborina posamezne komponente. Če pa imata obe komponenti kokristala podobno topnost, lahko pride do nastanka kokristala. Pri mletju z

dodatkom topila je količina prisotnega topila zelo nizka, zato je nastanek kokristala s termodinamskega vidika najstabilnejša faza, ki lahko nastane (64). Predpostavljamo, da topilo močno vpliva na povečanje molekularne difuzije (65).

Primer kokristalizacije teobromina z malonsko kislino nakazuje, kako lahko mletje s topilom prepreči težave s topnostjo kokristalnih komponent. Iz raztopine s temo dvema komponentama praktično ni bila mogoča tvorba kokristala. Pri mletju ekvimolarnega razmerja teobromina in maloske kisline s topilom pa nastane kokristal v 20 minutah (6). Slika 8 kaže principa priprave kokristalov (66).



Slika 8: Pridobivanje kokristalov iz raztopine ali z mletjem (35).

## 1.6. METODE KARAKTERIZACIJE KOKRISTALOV

V kokristalu so posamezne komponente med seboj drugače povezane in orientirane kot sicer vsaka posamezna. Tako so za karakterizacijo kokristalov primerne vse metode, ki dajejo informacijo o kristalni strukturi. Ko kokristal izdelujemo, nas najprej zanima ali ta sploh nastane. Zato uporabljamo diferenčno dinamično kalorimetrijo (angl. Differential Scanning Calorimetry - DSC), termogravimetrijo (TGA), rentgensko praškovno analizo (XRPD), Ramansko in infrardečo spektroskopijo (IR). Rezultati teh metod so spektri. Če kokristal ne nastane, so spektri vsota spektrov čistih izhodnih substanc. Če pa komponente

po procesu priprave tvorijo novo skupno kokristalno strukturo, so ti spektri drugačni. Vrhovi se premaknejo ali celo nastanejo novi. V DSC vidimo eno samo tališče novega kokristala, razen če ostane še nekaj čiste komponente. V XRPD spektru nastanejo ukloni pri kotih, ki jih v XRPD spektrih izhodnih komponent ni. V Ramanskem in IR spektru vidimo signale, ki so posledica novih interakcij in drugačno »fingerprint« območje (7, 57, 67-70).

S temi metodami pa ne moremo zagotovo potrditi prisotnosti kokristalov, saj tudi pri tvorbi soli in solvatov nastanejo novi, edinstveni spektri. Potrebne so še metode, ki lahko zaznajo stopnjo prenosa protona med dvema komponentama, s tem pa podajajo informacijo o tvorbi ionske interakcije ali vodikove vezi. Zato je za strukturno karakterizacijo kokristalov najzanesljivejša metoda rentgenska difrakcija na monokristalu (angl. Single Crystal X-Ray Diffraction). Ta metoda nam daje absolutno kristalno strukturo, s tem pa možnost da razberemo razmerje molekul v kokristalu, prostorsko urejenost molekul in vrsto ter položaj interakcij v kokristalu. Težava pa je, da za to analizno metodo potrebujemo ustrezno velikost in kvaliteto kristala. To je pogosto problem, saj kokristali pripravljeni z mletjem ne zadostujejo tem zahtevam in tako niso primerni za to analizo. Dobra analiza je tudi jedrska magnetna resonanca v trdem stanju (angl. Solid-state nuclear magnetic resonance - CP/MAS NMR), s katero lahko določamo polimorfe in razberemo interakcije v kokristalu. Metode se dobro dopolnjujejo z rentgenesko praškovno difrakcijo (7, 57, 67-70).

## 1.7. FARMACEVTSKI KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA

Farmacevtska in biotehnološka podjetja se še posebej zanašajo na zaščito intelektualne lastnine, s tem pa hkrati zaščitijo prihodke od lastnih proizvodov, saj so s to panogo povezane številne regulatorne ovire, visoki razvojni stroški in vedno prisotna tveganja, da se stroški razvoja produkta ne bodo povrnili med njegovim trženjem. Kokristali, ki jih tvori zdravilna učinkovina s tvorcem kokristala, lahko izpolnjujejo pogoje patentne zaščite (71). Kokristalizaciji je alternativna modifikacija ZU v trdnem agregatnem stanju, tako da gre za podobno spremembo, kot jo dosežemo s tvorbo soli, s tem pa pravno zadostijo kriteriju novosti za patentno zaščito (6).

Farmacevtski kokristali imajo večinoma enako terapevtsko uporabnost, kot jo ima čista zdravilna učinkovina in je patentno zaščitena z originatorjevo prijavo. V industriji so kokristali lahko bolj uporabni zaradi prednosti, ki jih imajo, saj kažejo v primerjavi s čisto zdravilno učinkovino izboljšane fizikalno-kemijske lastnosti. Industrijska uporabnost se nanaša tudi na izvedljivost postopka v industrijskem merilu (6).

Za farmacevtska podjetja imajo nove oblike s patentno zaščito velik pomen. To lahko pomeni dodatno tržno prednost za podjetja, ki lahko vloži dodatne prijave za zaščito novih izdelkov na trgu in s tem časovno podaljšano ekskluzivnost svojega izdelka na trgu oz. omogoča generičnemu proizvajalcu, da predčasno vstopi na trg (6).

## 2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je raziskati, ali lahko učinkovine klaritromicin, hidroklorotiazid in glibenklamid potencialno tvorijo kokristale. V raziskavi bomo z mletjem proučevali interakcije naštetih treh učinkovin z sedemnajstimi tvorilci kokristalov. Vse tri ZU so v vodi zelo slabo topne. Kot tvorilce kokristalov bomo uporabili različne karboksilne kisline in njihove derivate - dva amida, sol sulfimida in derivat piridina (od tega je šest kislin dikarboksilnih in ena trikarboksilna kislina). Uporabili bomo: nalidiksno kislino, cimetno kislino, benzojsko kislino, salicilno kislino, adipinsko kislino, sukaminsko kislino, fumarno kislino, glutarno kislino, oksalno kislino, maleinsko kislino, citronsko kislino, 4-aminobenzojsko kislino (PABA), biotin, ureo, nikotinamid, natrijev saharinat in 4,4-bipiridin. Vzorec bomo mleli brez topila in z dodatkom zelo majhne količine etanola. Za primerjavo z dvokomponentnimi mletimi zmesmi bomo pripravili tudi fizikalne zmesi vseh učinkovin z vsakim tvorilcem kokristala. Pripravljene zmesi bomo analizirali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC), s katero bomo primerjali temperaturo tališča zmesi s tališči čistih izhodnih snovi. Zmesem, katerim se bo spremenila temperatura tališča glede na čiste izhodne snovi, bomo analizirali še z rentgensko praškovno difracijo (XRPD). Tako bomo potrdili ali ovrgli smisel nadaljnega raziskovanja nastanka kokristalov klaritromicina, hidroklorotiazida in glibenklamida.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje spojine:

- klaritromicin (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- hidroklorotiazid (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- glibenklamid (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- 4-aminobenzojska kislina (PABA) (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- 4,4-bipiridin (Riedel de Haën, 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)
- maleinska kislina (Merck, Nemčija)
- nalidiksna kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- natrijev saharinat (Merck, Nemčija)
- nikotinamid (Merck, Nemčija)
- oksalna kislina (Merck, Nemčija)
- salicilna kislina (Sigma Aldrich, Nemčija)
- sukcinska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- urea (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)

topilo:

- etanol (Merck, Nemčija)

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje aparature:

- analizna tehnica, A-150-sx, Cobos, Španija
- tehnica Exacta 300 EB, Ţelezniki, Slovenija
- analizna tehnica Mettler Toledo AG 245, Švica

- vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija
- diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STAR<sup>e</sup> Software v9.30, Švica
- difraktometer Philips X`Pert Pro MPD

Laboratorijski pribor:

- tehtalni čolnički, spatule, patena
- mikropipeta (100µL)
- škarje, ura, etikete

## 3.2. PREISKOVANE UČINKOVINE

### 3.2.1. KLARITROMICIN

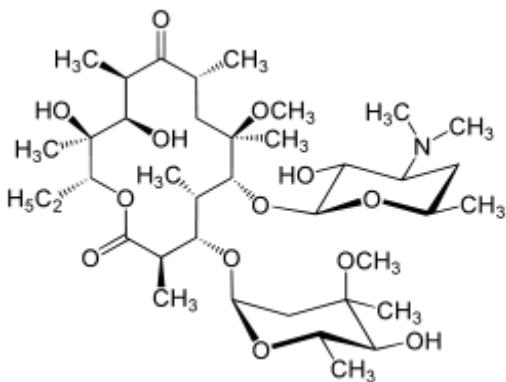
Klaritromicin je makrolidni antibiotik. Je semisintezični analog eritromicina - ima večjo obstojnost kot eritromicin. Reverzibilno se veže na 23S rRNA blizu 50S podenote, tu je lociran peptidiltransferazni center na del, ki povzroči translokacijo tRNA. S tem ustavi sintezo proteina na neki stopnji (ribosom se ne premika več po mRNA). Klaritromicin deluje na G+ bakterije, na G- praktično nima učinka. Delovanje je baktericidno ali bakteriostatično (72).

Makrolidni antibiotiki so med najvarnejšimi antibiotiki in se pogosto uporablajo za zdravljenje v zgornjem in spodnjem respiratornem traktu, pri infekcijah mehkih tkiv povzročenih z G+ bakterijami. Z njimi zdravimo legionelozo, profilakso, bakterijski endokarditis, vnetje srednjega ušesa, mikoplazemske pljučnice, gonorejo, blage respiratorne okužbe, sistemske okužbe (jetra, ledvica, prostata, mlečne žlez...). Klaritromicin se uporablja tudi proti gastričnemu ulkusu, ki je povzročen s Helicobacter pylori v kombinaciji drugih antibiotikov (72).

### 3.2.1.1. OSNOVNI PODATKI O KLARITROMICINU

IUPAC poimenovanje: (3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14S)-6-{[(2S,3R,4S,6R) -4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi} -14-etil-12,13-dihidroksi-4-{[(2R,4S,5S,6S)-5-hidroksi-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi}-7 -metoksi-3,5,7,9,11,13-heksametil-1-oksaciklotradekan-2,10-dion

Strukturna formula:



Molekulska formula: C<sub>38</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>13</sub> ; pK<sub>a</sub> = 12,94

Molekulska masa: 747,953 g/mol

Temperatura tališča: 220 °C

### 3.2.2. HIDROKLOROTIAZID

Hidroklorotiazid, skrajšano HCTZ, HCT ali HZT, spada v skupino tiazidnih diuretikov, in sicer deluje kot inhibitor Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-simporterja, ki se nahaja v distalnem tubulu. Imenujemo jih saluretiki, ker zavirajo reabsorpcijo natrijevih, kloridnih in kalijevih ionov. S tem odvaja tudi vodo iz telesa. Posledično zmanjšanje volumna krvi stimulira izločanje renina, kar vodi do nastanka angiotenzina in izločanja aldosterona. Ta homeostazni mehanizem omejuje učinek diuretikov na krvni pritisk. Zaradi možnega pojava hipokaliemije se običajno uporablja v kombinaciji z učinkovinami, ki varčujejo s kalijem (72).

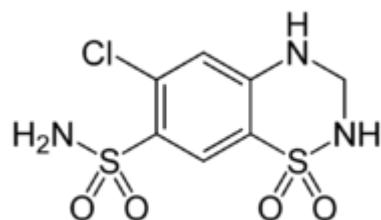
Tiazidi so po delovanju šibkejši od diuretikov Henlejeve zanke (npr. furosemid), vendar se pogosteje uporablja za terapijo nekomplikiranih hipertenzij. Pacienti tiazidne diuretike bolje prenašajo kot diuretike Henlejeve zanke. Klinične študije so pokazale, da uporaba

tiazidov zmanjša tveganje za kap in srčni napad, ki sta povezana s hipertenzijo. V terapiji hipertenzije je začetni padec krvnega pritiska posledica zmanjšanega krvnega volumna zaradi diureze, kasneje pa je hipotenzivni učinek tudi posledica delovanja na vaskularne gladke mišice. Posledično se zmanjša tudi izločanje sečne kisline, pojavi se lahko hipokloremična alkaloza. Prav tako tiazidi zmanjšajo izločanje kalcija. To je lahko pozitiven učinek na kostni metabolizem pri dolgotrajni uporabi pri starejših pacientih (v primerjavi z diuretiki Henlejeve zanke) (73).

### **3.2.2.1. OSNOVNI PODATKI O HIDROKLOROTIAZIDU**

IUPAC poimenovanje: 6-kloro-1,1-diokso-3,4-dihidro-2H-1,2,4-benzotiadiazin-7-sulfonamid

Struktorna formula:



Molekulska formula: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> ;      pK<sub>a1</sub> = 7,9; pK<sub>a2</sub> = 9,2

Molekulska masa: 297.74 g/mol

Temperatura tališča: 273 – 275 °C

### **3.2.3. GLIBENKLAMID**

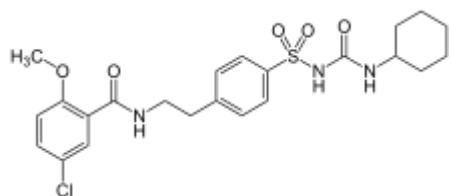
Glibenklamid, znan tudi kot gliburid (v ZDA) spada v skupino peroralnih antidiabetikov, derivatov sulfoniluree (SU). Derivati iz te skupine zapirajo kalijeve kanalčke in povečajo občutljivost tarčnih celic za inzulin tudi preko povečane ekspresije transportnih proteinov za glukozo. Uporabljajo se le v primeru ohranjene funkcije beta celic Langerhansovih otočkov trebušne slinavke (slatkorna bolezen tipa 2). Vežejo se na plazemske proteine. Derivati SU delujejo enako kot povečana koncentracija ATP znotraj beta celic: povzročijo

depolarizacijo membrane in odprtje kalcijevih kanalčkov ter sekrecijo inzulina. Tarča derivatov SU so kalijevi kanalčki (vezava na beta podenote, pri I. in II. generacija na notranjo stran membrane, pri III. generacija pa na zunanj stran membrane). Na notranji strani membrane je afiniteta vezave večja, saj spojine, ki se vežejo sem, delujejo dlje časa. Glibenklamid spada v II. generacijo derivatov SU (72). Z delovanjem na beta celice stimulira izločanje inzulina. S farmakokinetičnega vidika se močno veže na plazemske albumine, tako lahko pride do interakcij z drugimi ZU, ki se prav tako vežejo nanje. Večina derivatov SU se izločan z urinom – ojačano delovanje pri starejših in bolnikih z renalno boleznijo (73).

### **3.2.3.1. OSNOVNI PODATKI O GLIBENKLAMIDU**

IUPAC poimenovanje: 5-kloro-N-(4-[N-(cikloheksilkarbamoil)sulfamoil]fenetil)-2-metoksibenzamid

Struktura formula:



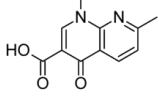
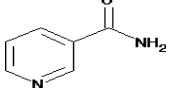
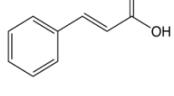
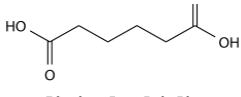
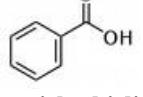
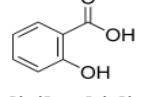
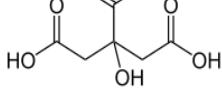
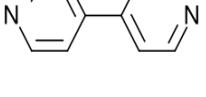
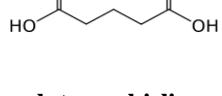
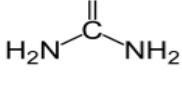
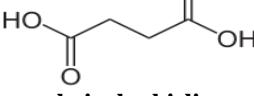
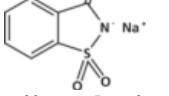
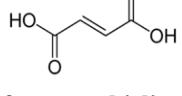
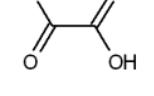
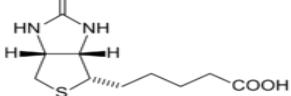
Molekulska formula: C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S ; pK<sub>a</sub> = 5,3

Molekulska masa: 494.004 g/mol

Temperatura tališča: 173-175 °C

V preglednici I so navedeni uporabljeni tvorilci kokristalov s strukturnimi formulami, relativno molekulsko maso, temperaturo tališča in pK<sub>a</sub> vrednostmi (74).

**Preglednica I:** Strukturne formule uporabljenih tvorilcev kokristalov, njihova relativna molekulska masa, temperatura tališča in pK<sub>a</sub> vrednost (74).

 <p><b>nalidiksna kislina</b> Mr = 232,235; T<sub>tal</sub> = 229,5 °C; pK<sub>a</sub> = 5,94</p>	 <p><b>nikotinamid</b> Mr = 122,12; T<sub>tal</sub> = 128-131 °C; pK<sub>a</sub> = 3,3</p>	 <p><b>cimetna kislina</b> Mr = 148,16; T<sub>tal</sub> = 133 °C; pK<sub>a</sub> = 4,44</p>
 <p><b>adipinska kislina</b> Mr = 146,14; T<sub>tal</sub> = 152,1 °C; pK<sub>a1</sub> = 4,43; pK<sub>a2</sub> = 5,41;</p>	 <p><b>benzojska kislina</b> Mr = 122,12; T<sub>tal</sub> = 122,35 °C; pK<sub>a</sub> = 4,20</p>	 <p><b>salicilna kislina</b> Mr = 138,12; T<sub>tal</sub> = 159,0 °C; pK<sub>a</sub> = 2,97</p>
 <p><b>citronska kislina</b> Mr = 192,12; T<sub>tal</sub> = 153 °C; pK<sub>a1</sub> = 3,09; pK<sub>a2</sub> = 4,75; pK<sub>a3</sub> = 5,41;</p>	 <p><b>4,4'-bipiridin</b> Mr = 156,19; T<sub>tal</sub> = 110 - 114 °C; pK<sub>a</sub> = 3,27</p>	 <p><b>PABA</b> Mr = 137,14; T<sub>tal</sub> = 187-189 °C; pK<sub>a</sub> = 6,5</p>
 <p><b>glutarna kislina</b> Mr = 132,12; T<sub>tal</sub> = 95-98 °C; pK<sub>a</sub> = 4,31</p>	 <p><b>urea</b> Mr = 60,06; T<sub>tal</sub> = 133-135 °C; pK<sub>a</sub> = 13,82</p>	 <p><b>sukcinska kislina</b> Mr = 118,09; T<sub>tal</sub> = 184 °C; pK<sub>a1</sub> = 4,2; pK<sub>a2</sub> = 5,6;</p>
 <p><b>natrijev saharinat</b> Mr = 183,18; T<sub>tal</sub> = 228,8-229,7 °C; pK<sub>a</sub> = 2,2</p>	 <p><b>fumarna kislina</b> Mr = 116,07; T<sub>tal</sub> = 287 °C; pK<sub>a1</sub> = 3,03; pK<sub>a2</sub> = 4,54;</p>	 <p><b>maleinska kislina</b> Mr = 166,07; T<sub>tal</sub> = 135 °C; pK<sub>a1</sub> = 1,93; pK<sub>a2</sub> = 6,58;</p>
 <p><b>oksalna kislina</b> Mr = 90,03; T<sub>tal</sub> = 189-191 °C; pK<sub>a1</sub> = 1,25; pK<sub>a2</sub> = 4,14;</p>	 <p><b>biotin</b> Mr = 244,31; T<sub>tal</sub> = 232-233 °C; pK<sub>a</sub> = 4,51</p>	

### 3.3. METODE

#### Priprava vzorcev za rešetanje kokristalov z metodo mletja

Zmesi za pripravo kokristalov smo izdelovali z mletjem v vibracijskem mlinu Pulverisette 0, proizvajalca Fritsch (Idar-Oberstein, Nemčija) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani (slika 9). Najprej smo zatehtali ustrezni količini obeh komponent - ZU in tvorilec kokristala sta bila v molarnem razmerju 1:1, skupna masa zmesi pa je znašala 1g. Obe natehtani komponenti smo stresli v možnar mlina, dobro premešali in mleli 30 minut pri 3000-3600 nihajev/min, pri amplitudi 1-3 mm. Vse te kombinacije smo nato mleli še z dodatkom kapljic topila, in sicer smo ponovno natehtanima komponentama dodali 100µL 70 % etanola.



Slika 9: Vibracijski mlin Pulverisette 0 Fritsch (75).

#### Priprava fizikalnih zmesi

Fizikalne zmesi smo pripravili brez mletja in večinoma brez topila v molarnem razmerju 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 in 3:1. Obe komponenti v ustrezno preračunanem razmerju smo natehtali in stresli v pateno, nato pa mešali s spatulo 5 minut.

### **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, Univerze v Ljubljani. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi, pretok dušika je znašal 40 ml/min. Hitrost segrevanja ja znašala 3K/min.

### **Rentgenska praškovna difrakcija**

Praškovni difraktogrami so bili posneti z difraktometrom Philips X`Pert Pro MPD. Območje snemanja je znašalo  $3 - 31^\circ$  2 theta. Integracijski čas je znašal 100 sekund, korak pa  $0,033^\circ$ . Meritve so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. REZULTATI REŠETANJA Z METODAMA DSC IN XRPD

V preglednici II so navedene vse mlete zmesi učinkovine in potencialnih tvorilcev kokristala, ki smo jih analizirali z metodo DSC in opažene interakcije. Temno osenčena polja označujejo zmesi, ki smo jih natančneje proučili z XRPD.

**Preglednica II:** Uporabljene učinkovine in tvorilci kokristalov za pripravo zmesi ter opažene interakcije.

	klaritromicin	hidroklorotiazid	glibenklamid
nalidiksna kislina	+	+	+
nikotinamid	+	+	+
adipinska kislina	+	/	/
4,4-bipiridin	+	/	/
natrijev saharinat	+	+	+
cimetna kislina	+	+	+
benzojska kislina	/	/	+
salicilna kislina	+	+	+
urea	/	+	/
biotin	/	+	+
4-aminobenzojska kislina	/	/	+
glutarna kislina	/	+	/
sukcinska kislina	/	+	/
oksalna kislina	/	/	/
citronska kislina	/	/	/
fumarna kislina	/	/	/
maleinska kislina	/	/	/

Legenda:



- zanimive zmesi; poleg DSC smo posneli tudi XRPD

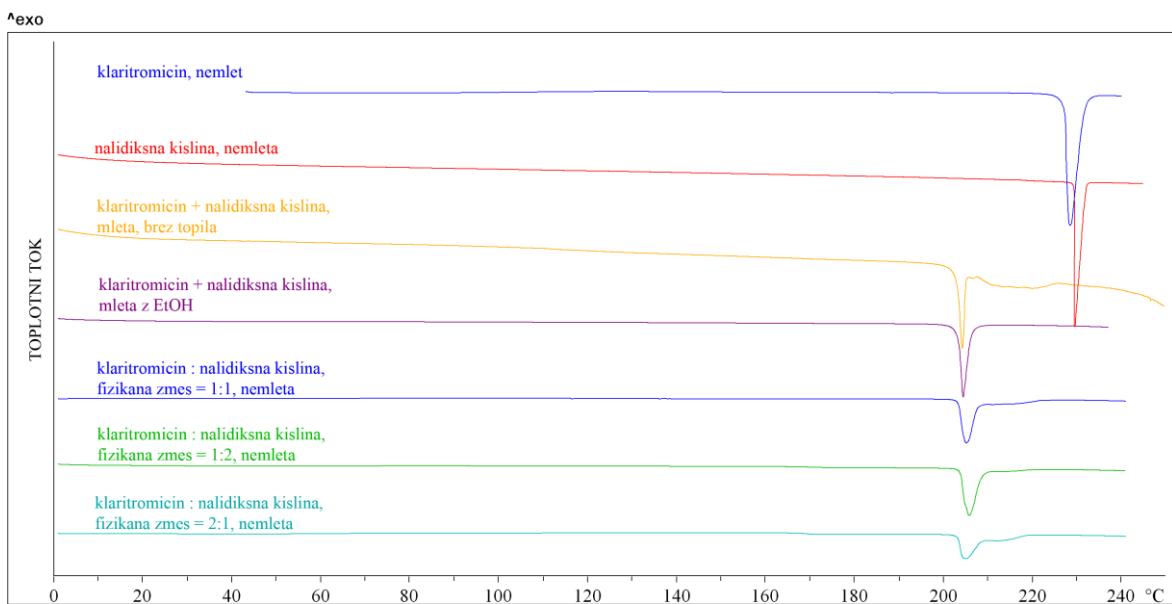


- zmesi, ki so tudi kazale zanimive interakcije; analizirali smo jih samo z DSC, z XRPD pa ne, ponavadi so bile prekompleksne

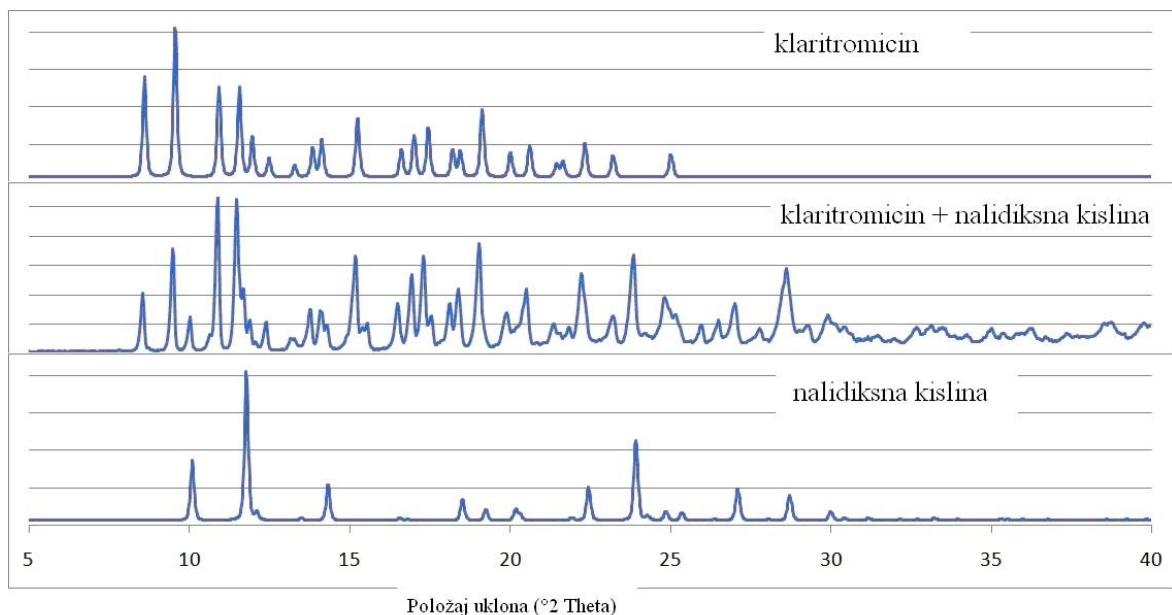


- brez zanimivih interakcij

## 4.2. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z NALIDIKSNO KISLINO



**Slika 10:** DSC krivulje klaritromicina, nalidiksne kisline, mlete zmesi klaritromicin : nalidiksna kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obih komponent v razmerju 1:1, 1:2 in 2:1.



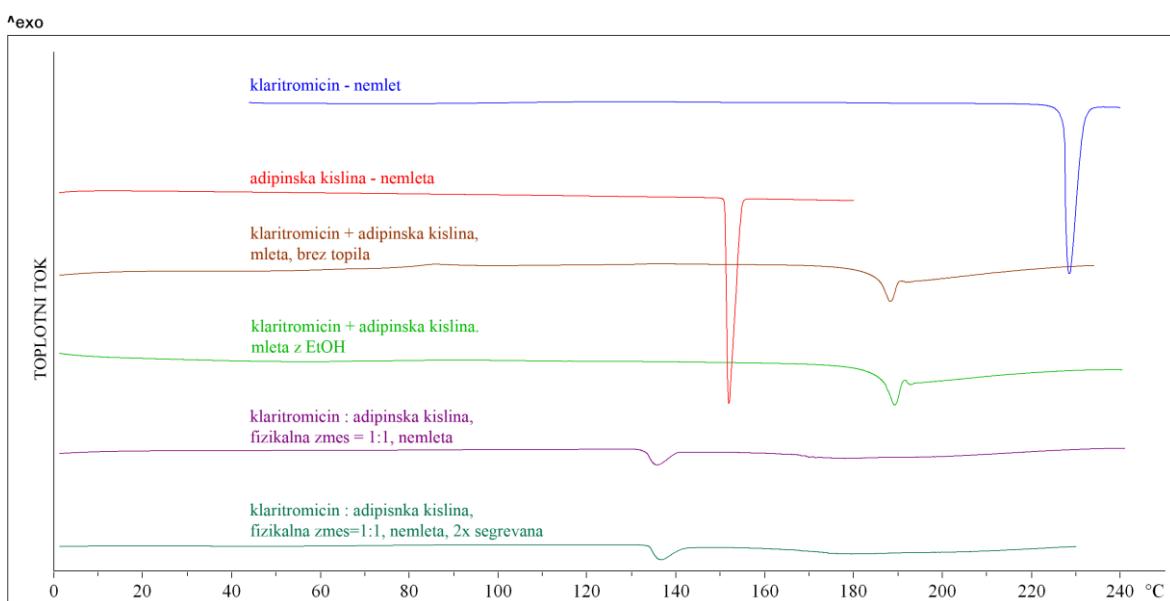
**Slika 11:** Praškovni difraktogrami klaritromicina, mlete zmesi klaritromicin : nalidiksna kislina = 1:1 in nalidiksne kisline.

DSC krivulja (slika 10) prikazuje zmes klaritromicina in nalidiksne kisline. Temperatura tališča pri vseh vzorcih zmesi se zniža pod tališči obeh čistih komponent. Za interakcije je dovolj le mešanje, saj je temperatura tališča mletih in nemletih zmesi enaka. Vrhovi pri

mleti zmesi so bolj ostri v primerjavi z nemletimi vrhovi. Tudi etanol ne prispeva k spremembi tališča.

XRPD graf (slika 11) prikazuje pri zmesi podoben graf, kot je vsota obeh čistih komponent. Nekaj novih odklonov pa vseeno nastane: uklonski kot pri  $15,58^{\circ}2\theta$ ;  $17,56^{\circ}2\theta$ ;  $25,97^{\circ}2\theta$ ;  $27,86^{\circ}2\theta$ ;  $29,31^{\circ}2\theta$  in  $29,93^{\circ}2\theta$ . Lahko nastane nova kristalna struktura (kokristal ali sol).

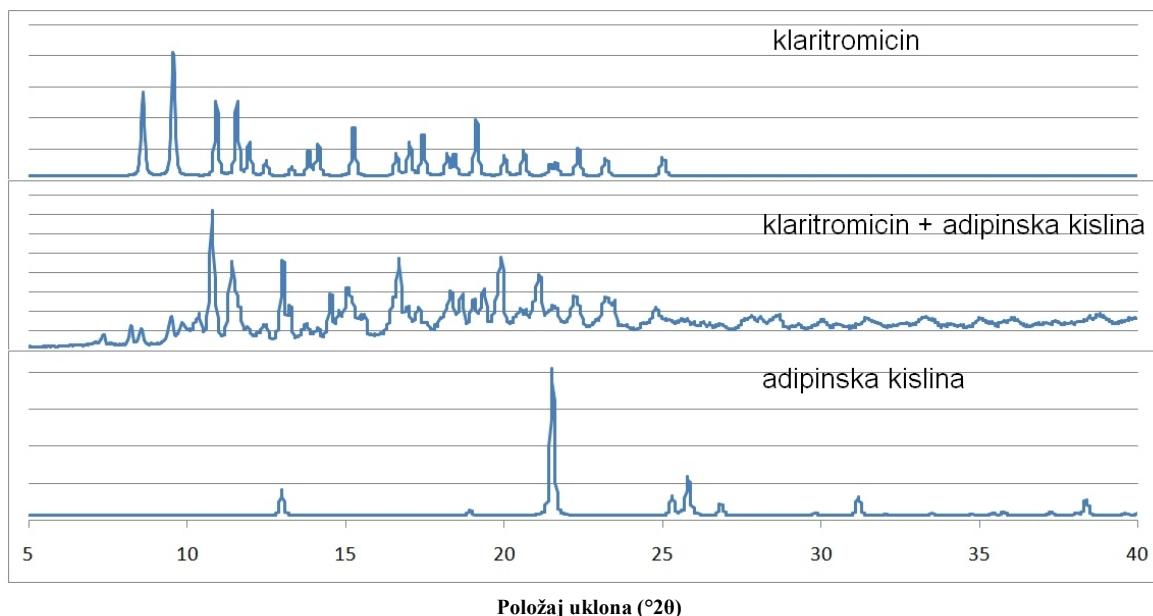
#### 4.3. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z ADIPINSNO KISLINO



**Slika 12:** DSC krivulje klaritromicina, adipinske kisline, mlete zmesi klaritromicin : adipinska kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemleta fizikalna zmes obeh komponent v razmerju 1:1 in 2-krat segrevana enaka fizikalna zmes.

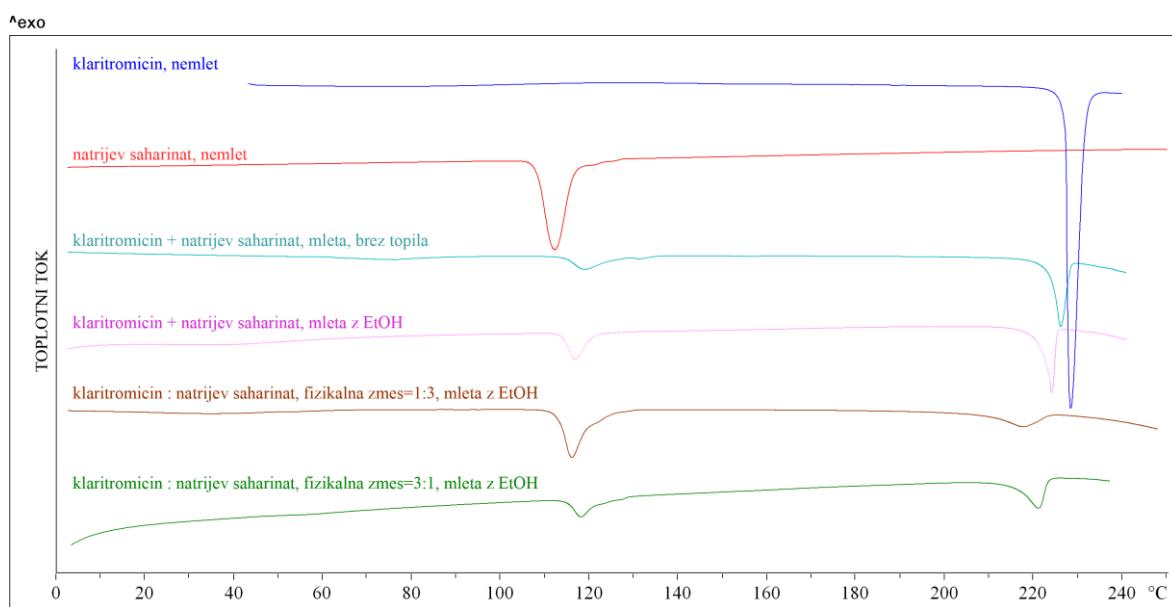
Slika 12 z DSC krivuljami čistega klaritromicina in adipinske kisline prikazuje, da je pri mletih zmeseh tališče med tališčema klaritromicina in adipinske kisline, medtem ko se fizikalnima zmesema tališči znižata. Glede na to bi lahko sklepali, da je zaradi interakcij med mletjem možen nastanek nove kristalne strukture, ki je lahko kokristal ali sol. Pri fizikalni zmesi pa je lahko prišlo do nastanka evtektične zmesi, kar bi lahko bil mehanizem nastanka nove kristalne strukture, ki sta jo nakazali mleti zmesi. Zato smo fizikalno zmes analizirali še z dvakratnim segrevanjem. Rezultat se ni spremenil, torej nismo potrdili nastanka nove kristalne strukture preko evtektične zmesi. Še vedno obstaja možnost tega mehanizma za nastanek nove kristalne strukture. Etanol ne prispeva k znižanju tališča.

Iz difraktogramov (slika 13) je razvidno, da pri mleti zmesi nastanejo novi odkloni, kar potrjuje nastanek kokristala ali soli. Novi uklonski koti so pri:  $7,40^{\circ}2\theta$ ;  $8,26^{\circ}2\theta$ ;  $9,91^{\circ}2\theta$ ;  $14,60^{\circ}2\theta$ ;  $15,70^{\circ}2\theta$  in  $21,20^{\circ}2\theta$ .



**Slika 13:** Praškovni difraktogrami klaritromicina, mlete zmesi klaritromicin : adipinska kislina = 1:1 in adipinske kisline.

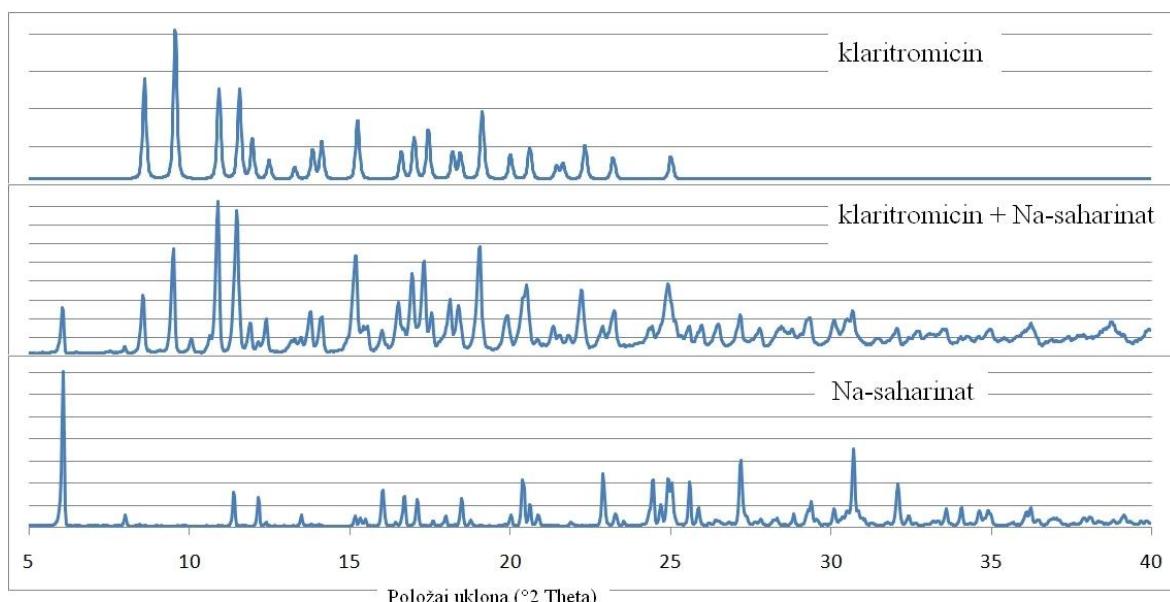
#### 4.4. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z NATRIJEVIM SAHARINATOM



**Slika 14:** DSC krivulje klaritromicina, natrijevega saharinata, mlete zmesi klaritromicin : Na-saharinat = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, z etanolom mleta fizikalne zmesi obih komponent v razmerju 1:3 in 3:1.

Na DSC diagramu (slika 14) klaritromicina in natrijevega saharinata opazimo pri zmeseh dva endotermna vrhova med tališčema obeh čistih komponent. Tališče, ki se pojavi pri temperaturi  $117\text{ }^{\circ}\text{C}$  verjetno pripada kokristalu oziroma soli, tališče pri višji temperaturi pa predstavlja raztplavljanje prebitne komponente v talini zvrsti, ki je nastala med komponentama. Fizikalni zmesi smo mleli z etanolom, da bi zmanjšali delce in olajšali prehod protona, s tem pa omogočili nastanek nove kristalne strukture. Segrevanje fizikalne zmesi v razmerju klaritromicin:Na-saharinat = 1:3, kjer je prebitka najmanj, nakazuje, da je v kristalni strukturi nove zvrsti več natrijevega saharinata. Tako mletje kot etanol ne vplivata na nastanek interakcij – tališče je enako.

Tudi XRPD analiza (slika 15) kaže nekaj novih odklonov, kar nakazuje nastanek nove kristalne strukture ( $10,25\text{ }^{\circ}\text{2}\theta$ ;  $17,25\text{ }^{\circ}\text{2}\theta$ ;  $26,72\text{ }^{\circ}\text{2}\theta$  in  $33,11\text{ }^{\circ}\text{2}\theta$ ).



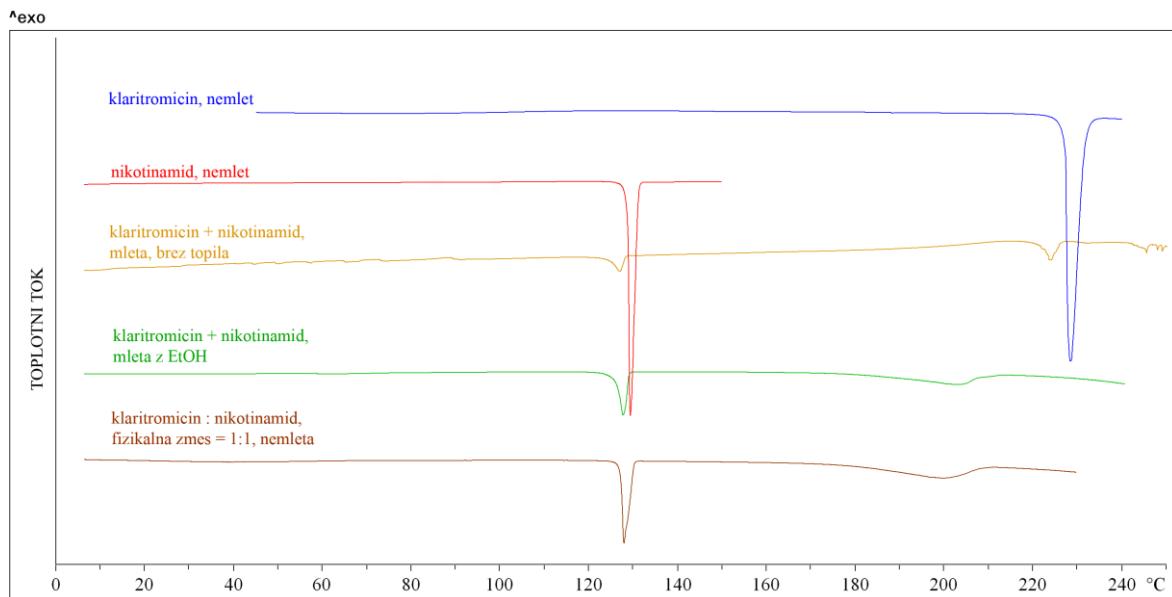
**Slika 15:** Praškovni difraktogrami klaritromicina, mlete zmesi klaritromicin : natrijev saharinat = 1:1 in natrijevega saharinata.

#### 4.5. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA Z NIKOTINAMIDOM

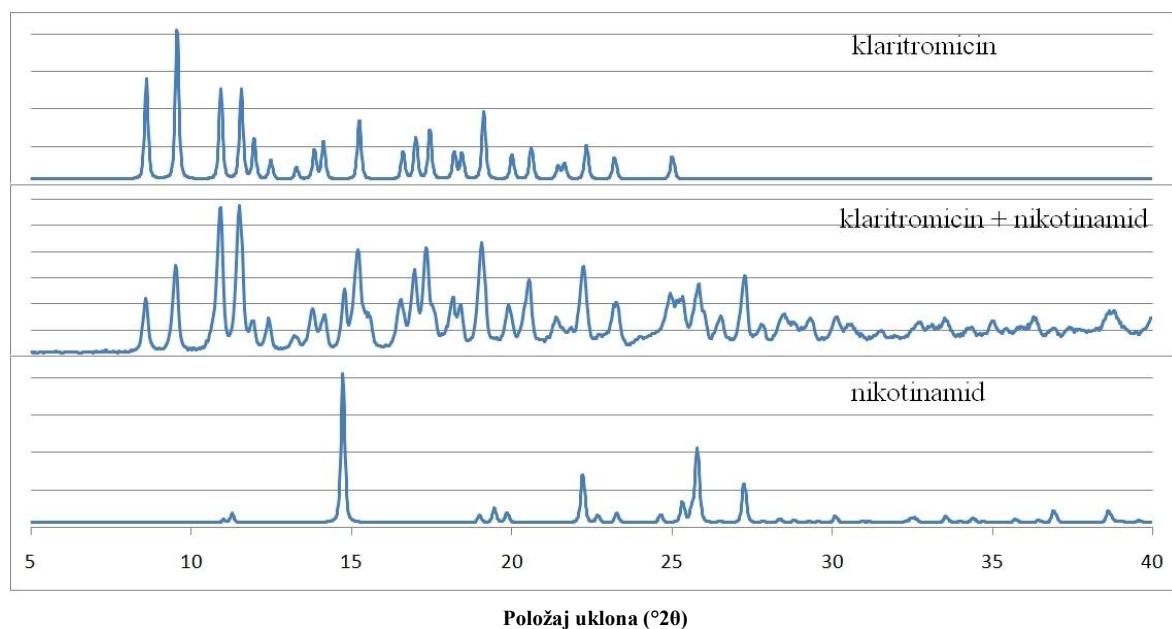
Slika 16 prikazuje zmes klaritromicina in nikotinamida, in sicer da se tako pri mletih zmeseh kot pri nemleti fizikalni zmesi tališče zniža pod tališči obeh čistih komponent. Enako tališče zmesi dokazuje, da je za nastanek interakcij v tej zmesi dovolj že mešanje s spatulo v ahatni terilnici, mletje ni potrebno. Tudi mletje z etanolom ne vpliva na strukturo DSC krivulje, kar pomeni, da je v vseh primerih nastala zmes z enakimi lastnostmi. Zelo

verjetno nastane evtektična zmes. Drugi vrh v DSC krivulji zmesi predstavlja komponento v prebitku ( $203\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $225\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Na XRPD (slika 17) nismo zaznali novih odklonov v zmesi obih komponent glede na čisti komponenti, zato ne moremo trditi, da je med temo dvema komponentama nastala nova kristalna struktura.

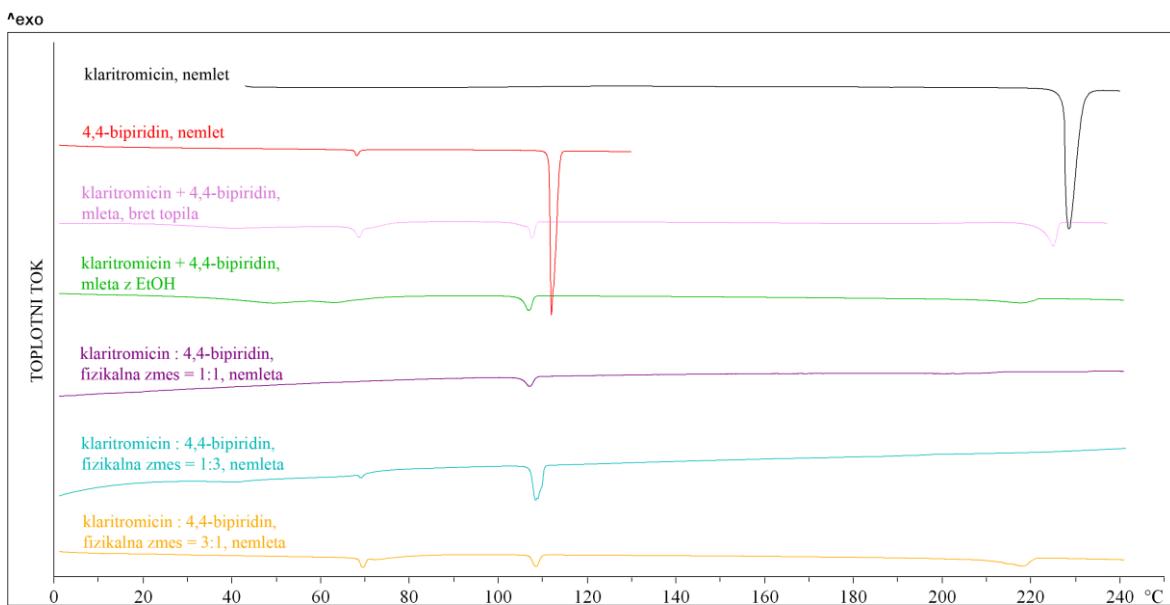


**Slika 16:** DSC krivulje klaritromicina, nikotinamida, mlete zmesi klaritromicin : nikotinamid = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemleta fizikalna zmes obih komponent v razmerju 1:1.

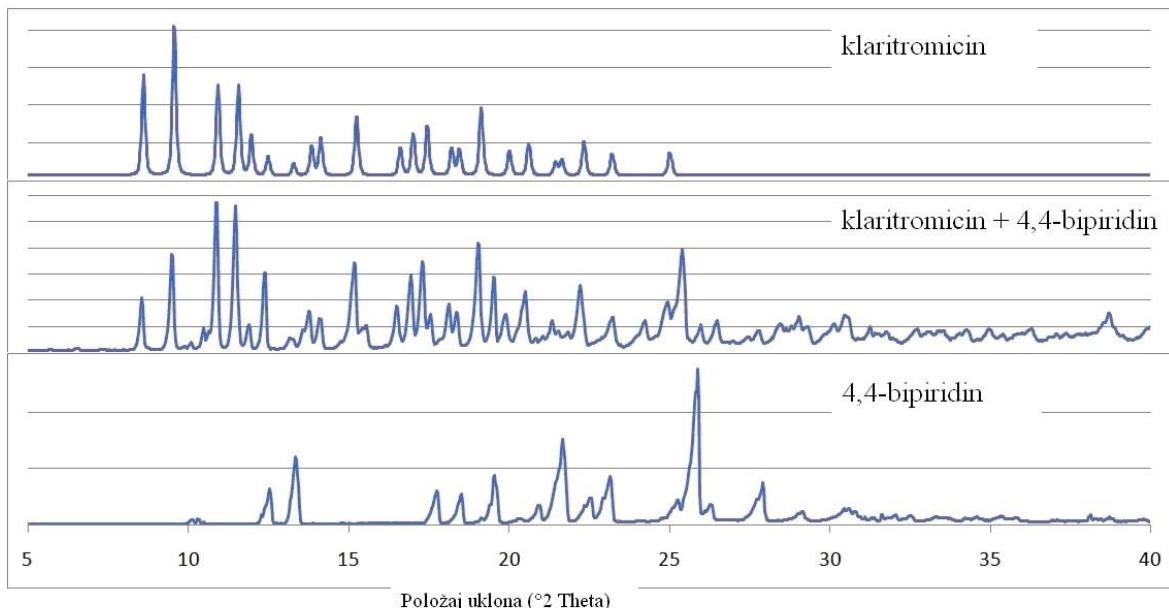


**Slika 17:** Praškovni difraktogrami klaritromicina, mlete zmesi klaritromicin : nikotinamid = 1:1 in nikotinamida.

## 4.6. MLETJE ZMESI KLARITROMICINA S 4,4-BIPIRIDINOM



**Slika 18:** DSC krivulje klaritromicin, 4,4-bipiridin, mlete zmesi klaritromicin : 4,4-bipiridin = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obeh komponent v razmerju 1:1, 1:3 in 3:1.



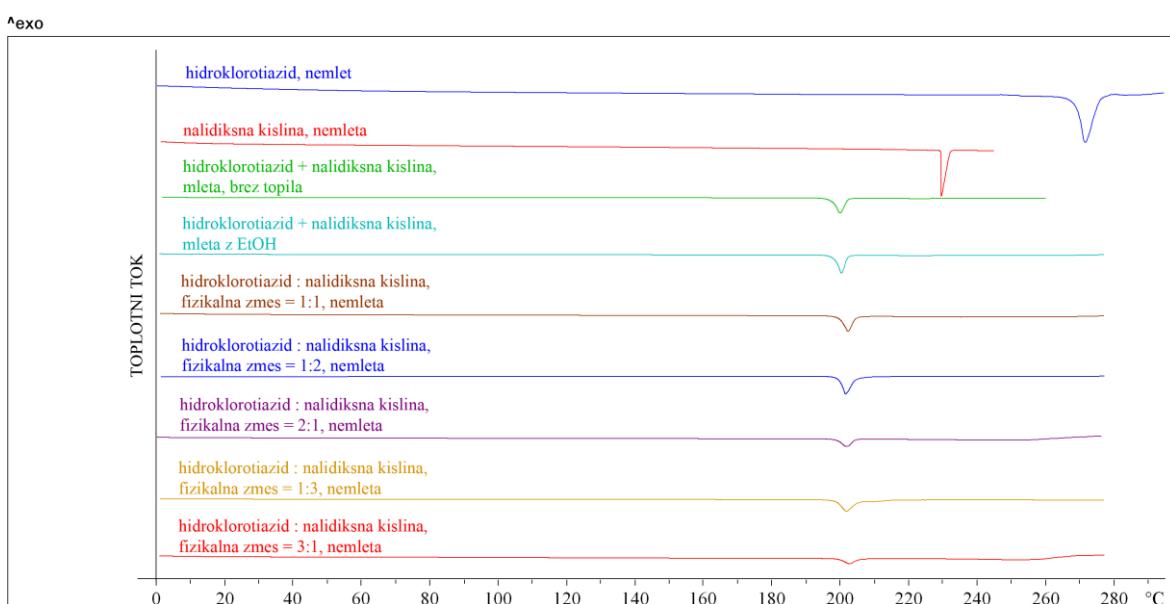
**Slika 19:** Praškovni difraktogrami klaritromicina, mlete zmesi klaritromicin : 4,4- bipiridin = 1:1 in 4,4-bipiridina.

Na DSC grafu (slika 18) klaritromicina in 4,4-bipiridina se nižja temperatura tališča zmesi zniža pod tališči obeh čistih komponent. Ta nakazuje na nastanek evtektika, lahko pa da gre tudi za nastanek nove kristalne strukture. Temperature tališča zmesi so enake (108 °C). Nastane tudi zmes, ki ima temperaturo tališča med tališčema čistih komponent (218 °C in

225 °C). Lahko gre za taljenje prebitne komponente v talini zvrsti, ki je nastala med komponentama. Mletje in etanol ne vplivata na spremembo tališča.

Na XRPD grafu (slika 19) se pojavijo tudi novi odkloni (15,55 °2θ; 23,24 °2θ in 28,52 °2θ), kar nakazuje na nastanek nove kristalne strukture.

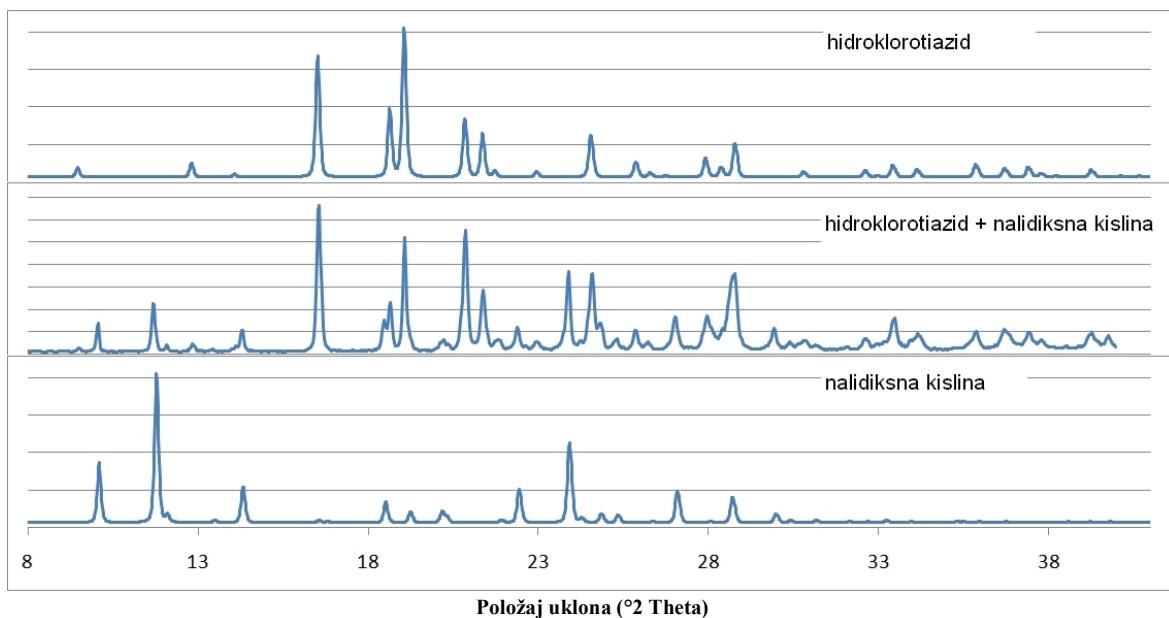
#### 4.7. MLETJE ZMESI HIDROKLOROTIAZIDA Z NALIDIKSNO KISLINO



**Slika 20:** DSC krivulje hidroklorotiazida, nalidiksne kisline, mlete zmesi hidroklorotiazid : nalidiksna kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obeh komponent v razmerju 1:1, 1:2, 2:1, 1:3 in 3:1.

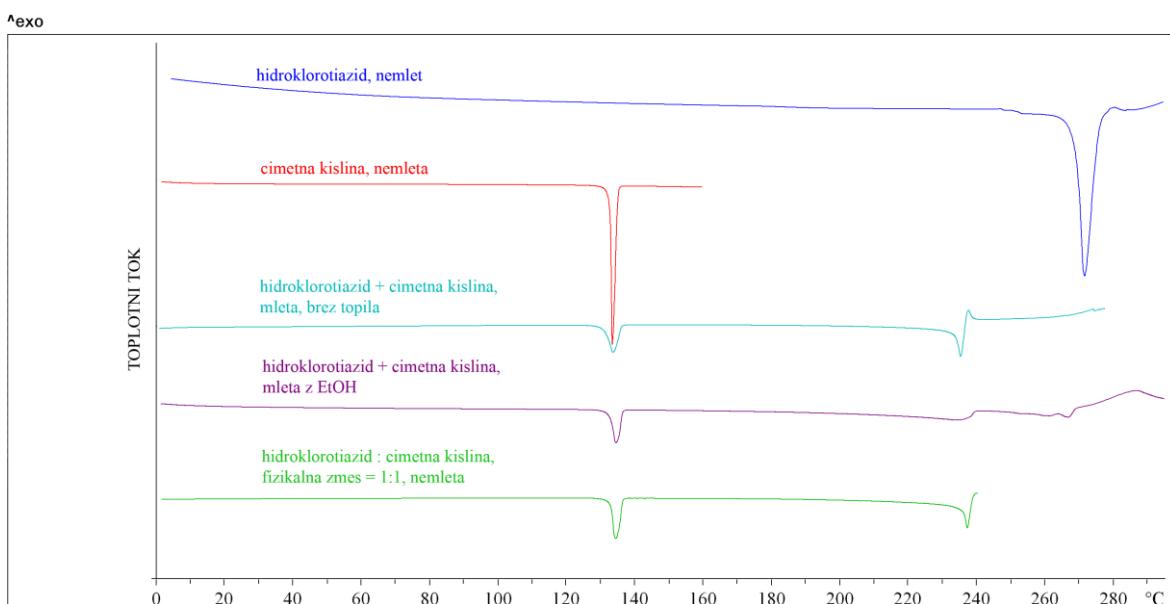
Na DSC diagramu (slika 20) zmesi iz hidroklorotiazida in nalidiksne kisline se temperature tališča vseh zmesi znižajo pod tališči obeh čistih snovi in so enake, zato je za nastanek interakcij dovolj mešanje brez dodatka etanola. Verjetno nastane evtektična zmes. Zanimivo je, da sprememba razmerja komponent v zmesi ne povzroči pojave novega vrha, ki bi predstavljal prebitno komponento v evtektični zmesi. Lahko je energija taljenja in raztopljanja prebitne komponente v evtektični zmesi prenizka. Dodaten vrh opazimo le pri zmesi z razmerjem učinkovina:pomožne nov=3:1.

V XRPD (slika 21) nismo zaznali novih odklonov, kar potrjuje ugotovitev, da med komponentama nastane evtektična zmes.



**Slika 21:** Praškovni difraktogrami hidroklorotiazida, mlete zmesi hidroklorotiazid : nalidiksna kislina = 1:1 in nalidiksne kisline.

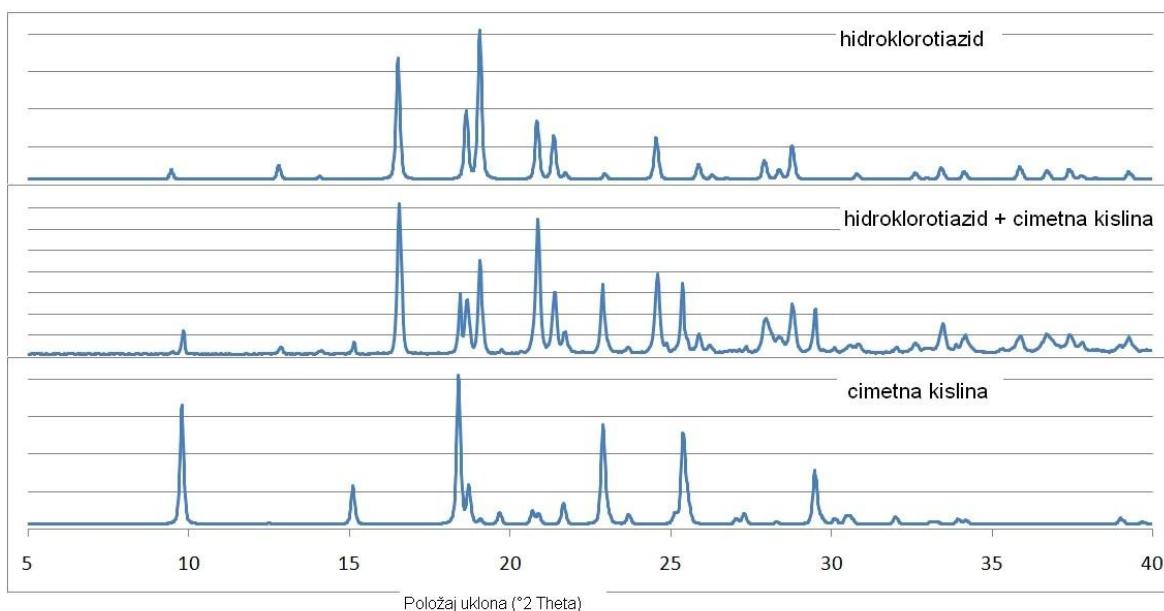
#### 4.8. MLETJE ZMESI HIDROKLOROTIAZIDA S CIMETNO KISLINO



**Slika 22:** DSC krivulje hidroklorotiazida, cimetne kisline, mlete zmesi hidroklorotiazid : cimetna kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemleta fizikalna zmes obeh komponent v razmerju 1:1.

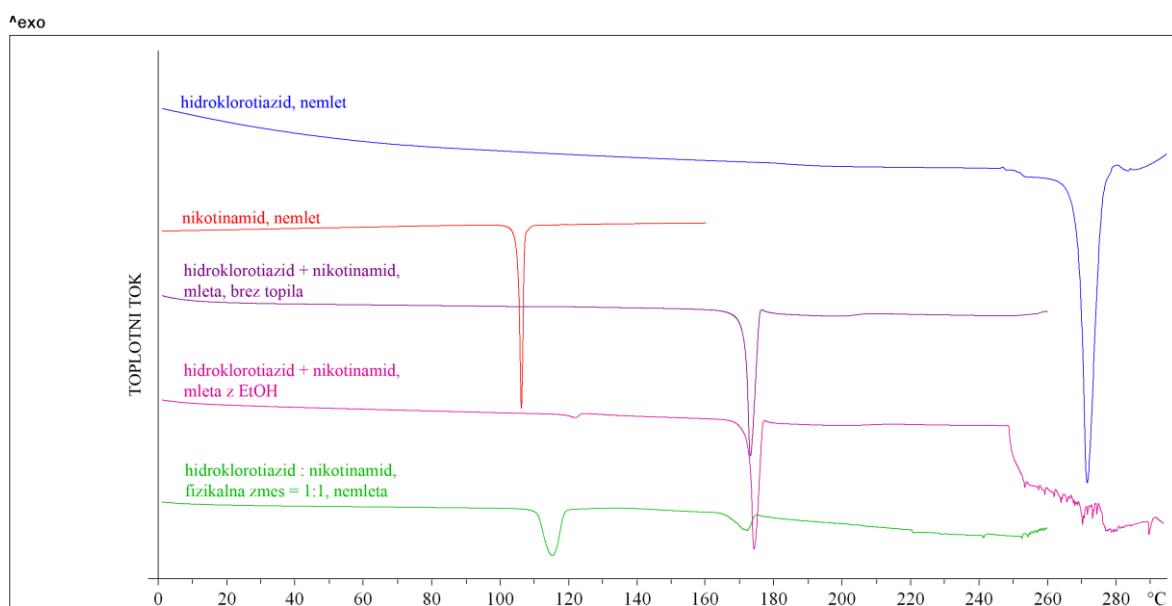
Na DSC diagramu hidroklorotiazida in cimetne kisline (slika 22) imajo zmesi eno temperaturo taliča pri isti vrednosti kot cimetna kislina (135 °C). Mletje in dodatek etanola ne vplivata na strukturo DSC krivulje. Še en vrh pa se pojavi pri višji temperaturi,

kar najverjetneje predstavlja raztopljanje prebitne komponente (učinkovine) v talini pomožne snovi. Z XRPD (slika 23) nismo zaznali novih odklonov.



**Slika 23:** Praškovni difraktogrami hidroklorotiazida, mlete zmesi hidroklorotiazid : cimetna kislina = 1:1 in cimetna kislina.

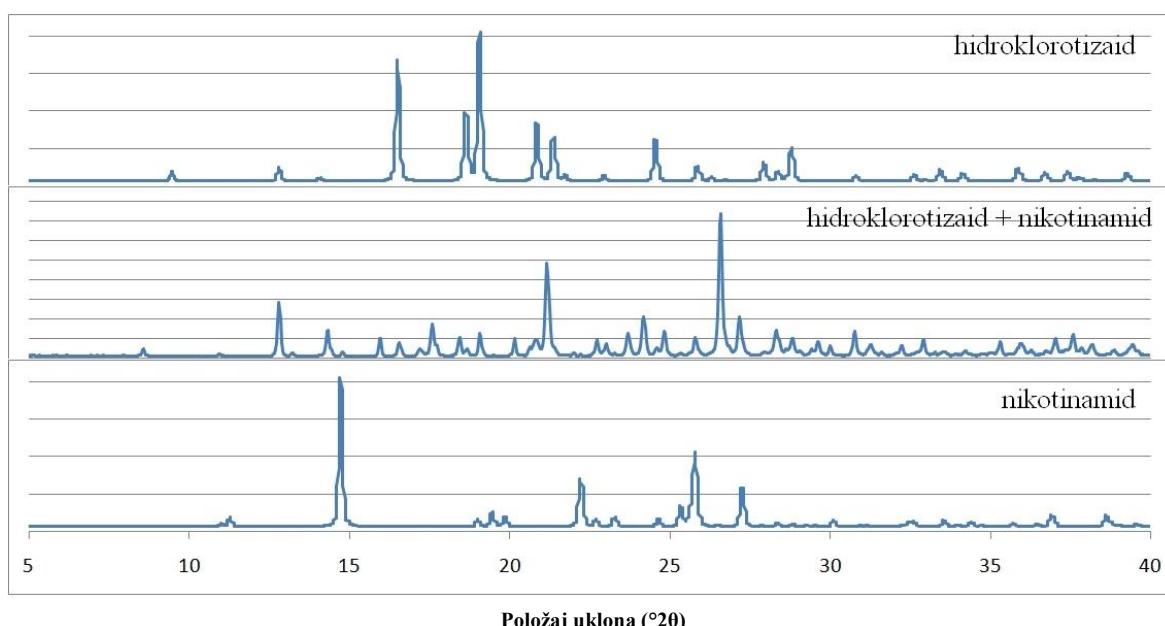
#### 4.9. MLETJE ZMESI HIDROKLOROTIAZIDA Z NIKOTINAMDOM



**Slika 24:** DSC krivulje hidroklorotiazida, nikotinamida, mlete zmesi hidroklorotiazid : nikotinamid = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemleta fizikalna zmes obeh komponent v razmerju 1:1.

Na DSC grafu (slika 24) zmesi hidroklororotiazida in nikotinamida zavzame temperatura tališča pri mletih zmeseh vrednost med tališčema obeh čistih komponent, in sicer med 152 °C in 154 °C. Zelo verjetno gre za nastanek nove kristalne strukture (kokristala ali soli). Fizikalna zmes ima dva vrhova. Eden je manj izrazit, ima enako tališče kot nova kristalna struktura, torej že med mešanjem fizikalne zmesi v ahatni terilnici nastane nova kristalna struktura. Drugi vrh se pojavi nižje, pri nekoliko višji temperaturi kot je tališče nikotinamida (115 °C).

Na XRPD grafu (slika 25) je difraktogram zmesi popolnoma nova slika in s tem kristalna struktura v primerjavi z vsoto odklonov posameznih komponent, kar potrjuje nastanek nove kristalne strukture (kokristala ali soli). Novi vrhovi so pri 14,12 ° $2\theta$ ; 16,23 ° $2\theta$ ; 17,26 ° $2\theta$ ; 17,63 ° $2\theta$ ; 20,15 ° $2\theta$ ; 23,73 ° $2\theta$ ; 26,60 ° $2\theta$ ; 31,32 ° $2\theta$ ; 32,94 ° $2\theta$  in 37,89 ° $2\theta$ .

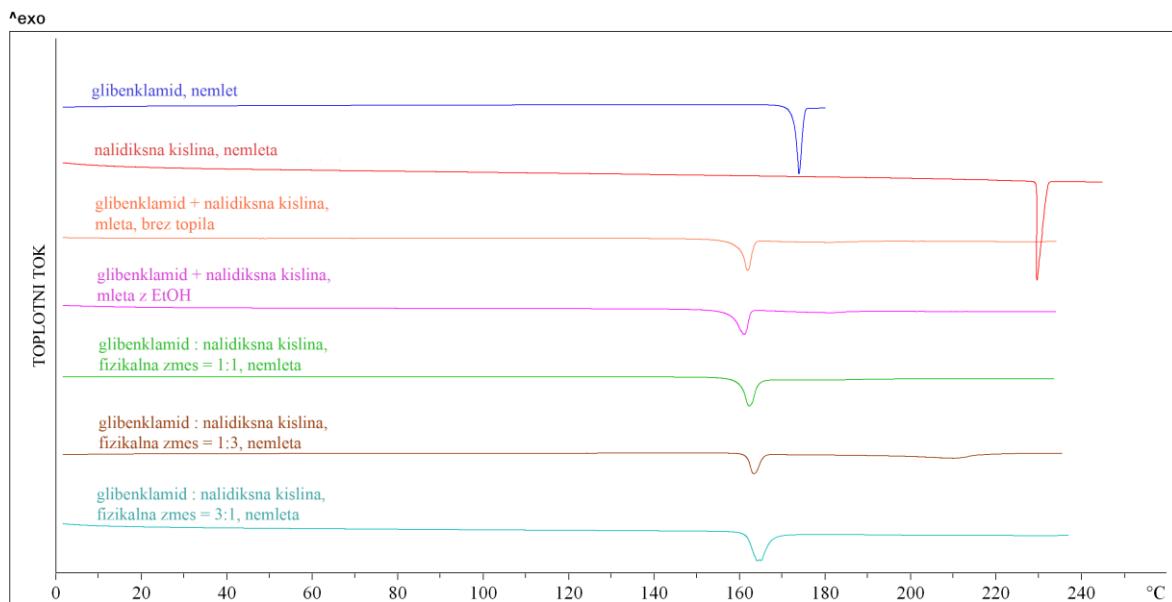


**Slika 25:** Praškovni difraktogrami hidroklorotiazida, mlete zmesi hidroklorotiazid : nikotinamid = 1:1 in nikotinamida.

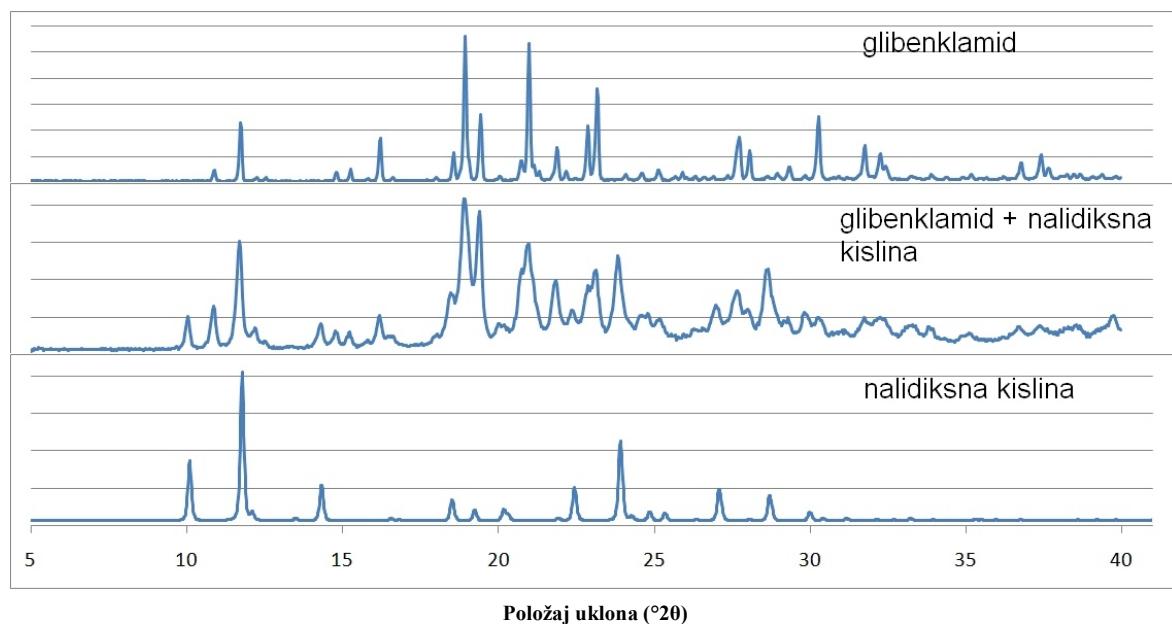
#### 4.10. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA Z NALIDIKSNO KISLINO

DSC diagram glibenklamida in nalidiksne kisline (slika 26) prikazuje znižano temperaturo tališča zmesi glede na tališče posameznih komponent. Tališče se ne razlikuje ne glede na to, ali je zmes mleta ali ne, torej je za interakcije dovolj mešanje. Nekoliko nižje tališče mlete zmesi z etanolom je verjetno posledica zmanjšanja velikosti delcev. Rezultat kaže, da je med komponentama najverjetneje nastala evtektična zmes.

Tudi na XRPD diagramu (slika 27) se odkloni ne spremenijo, graf zmesi je enak vsoti spektrov obih čistih komponent, kar potrjuje nastanek evtektične zmesi med komponentama.

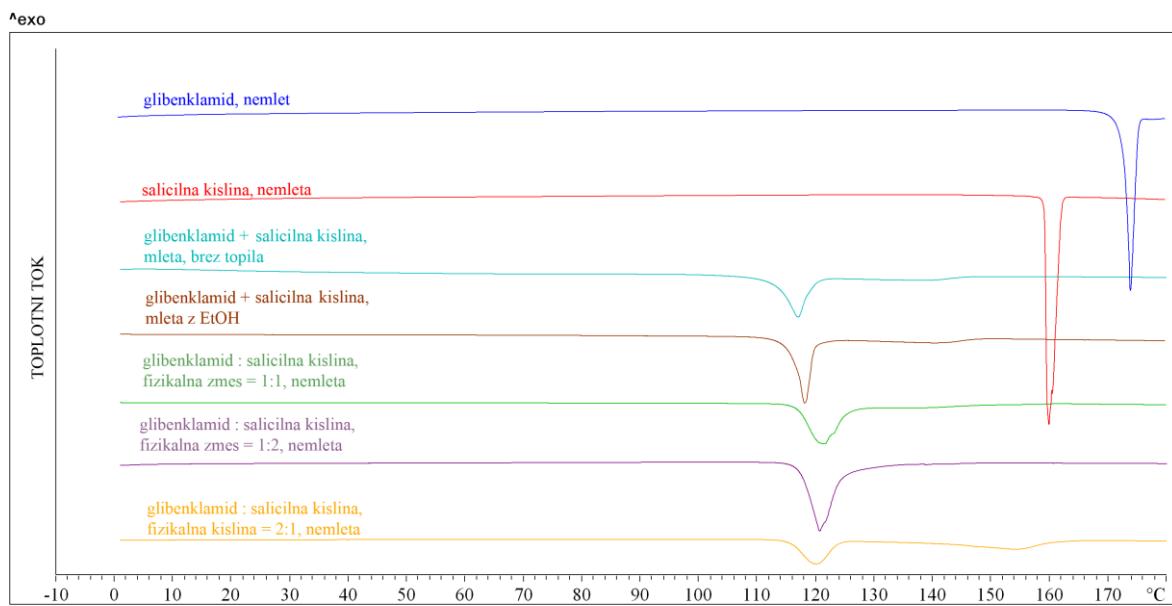


**Slika 26:** DSC krivulje glibenklamida, nalidiksne kisline, mlete zmesi glibenklamid nalidiksna kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obih komponent v razmerju 1:1, 1:3 in 3:1.

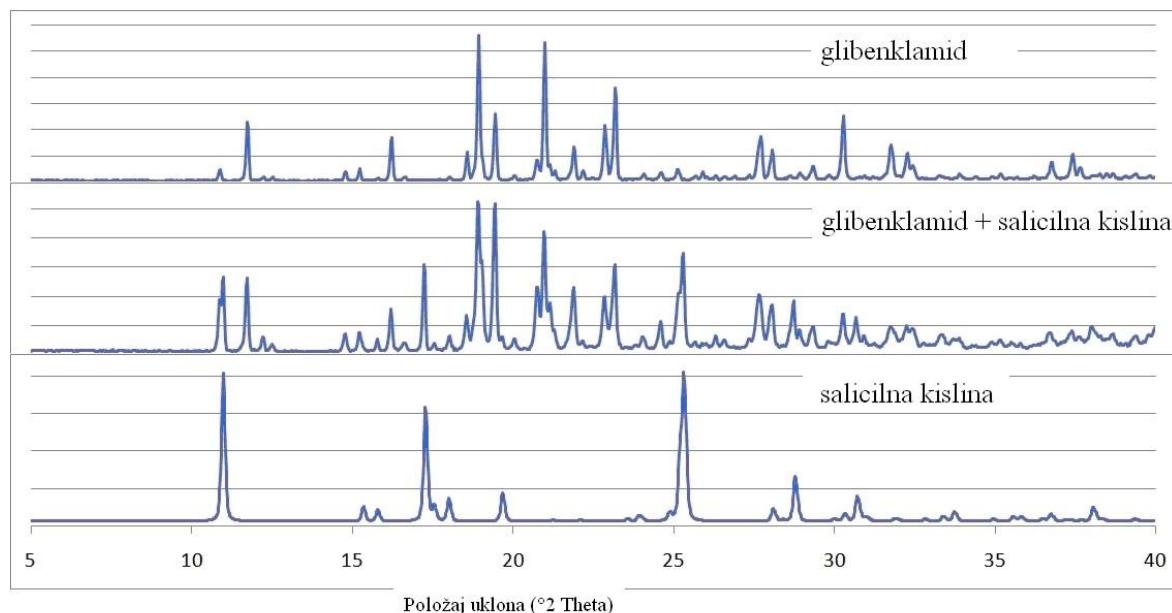


**Slika 27:** Praškovni difraktogrami glibenklamida, mlete zmesi glibenklamid : nalidiksna kislina = 1:1 in nalidiksne kisline.

#### 4.11. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA S SALICILNO KISLINO



**Slika 28:** DSC krivulje glibenklamida, salicilne kisline, mlete zmesi glibenklamid : salicilna kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obih komponent v razmerju 1:1, 1:2 in 2:1.

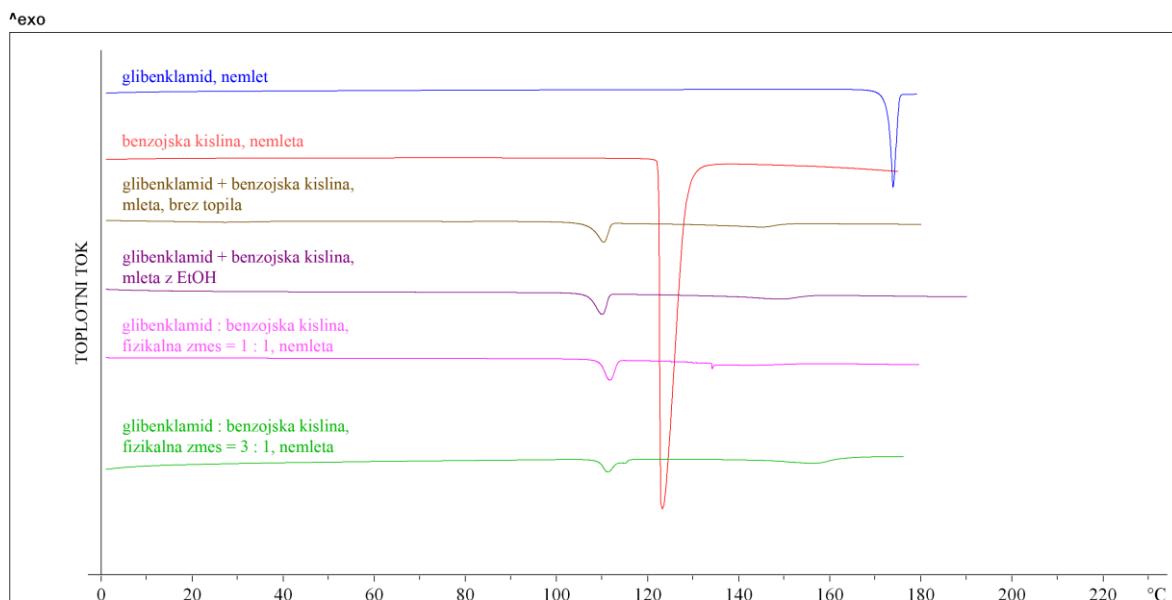


**Slika 29:** Praškovni difraktogrami glibenklamida, mlete zmesi glibenklamida : salicilna kislina = 1:1 in salicilne kisline.

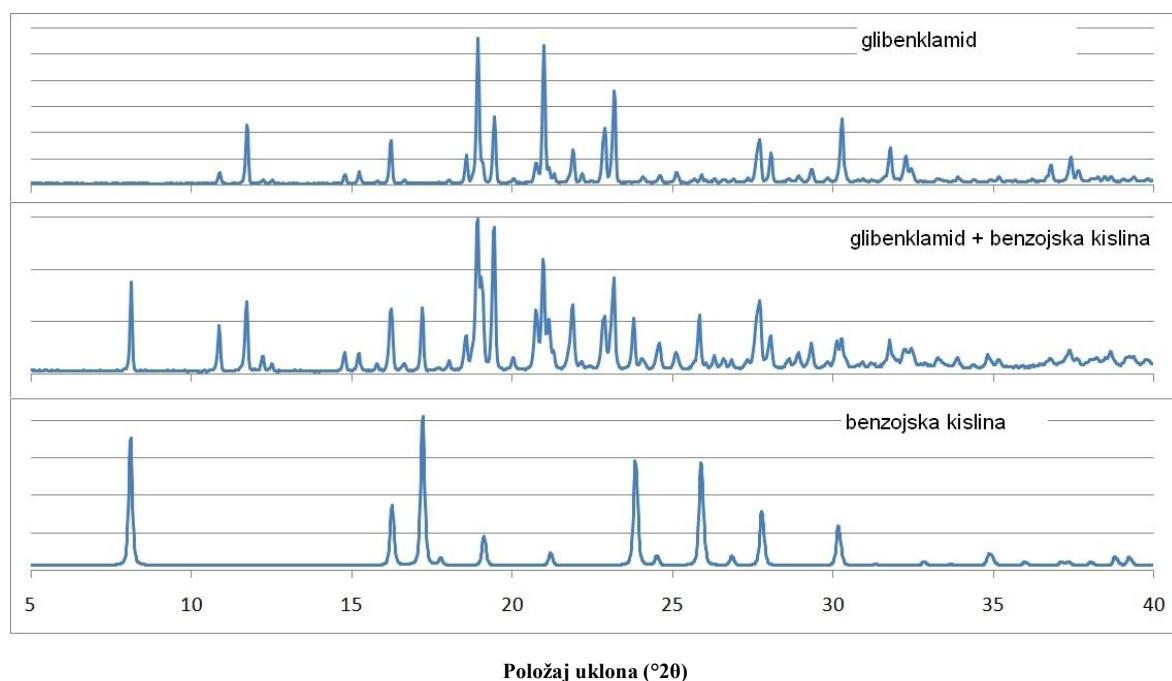
Slika 28 prikazuje DSC krivulje zmesi glibenklamida in salicilne kisline, kjer se temperature tališč zmesi znižale pod obe tališči čistih komponent. Tališča mletih zmesi so nekaj stopinj nižja od nemletih. Etanol ne prispeva k znižanju tališča. Najverjetneje nastane evtektične zmesi. To najbolje potrjuje DSC krivulja z razmerjem glibenklamid:salicilna

kislina = 2:1, kjer opazimo dva endotermna vrhova - taljenje evtektika pri 120 °C, ki mu sledi taljenje prebitne komponente pri 155 °C. Prav tako je XRPD graf zmesi (slika 29) dejansko vsota spektrov čistih komponent, kar dodatno potrjuje nastanek evtektične zmesi.

#### 4.12. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA Z BENZOJSKO KISLINO



**Slika 30:** DSC krivulje glibenklamida, benzojske kisline, mlete zmesi glibenklamid : benzojska kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obih komponent v razmerju 1:1 in 3:1.

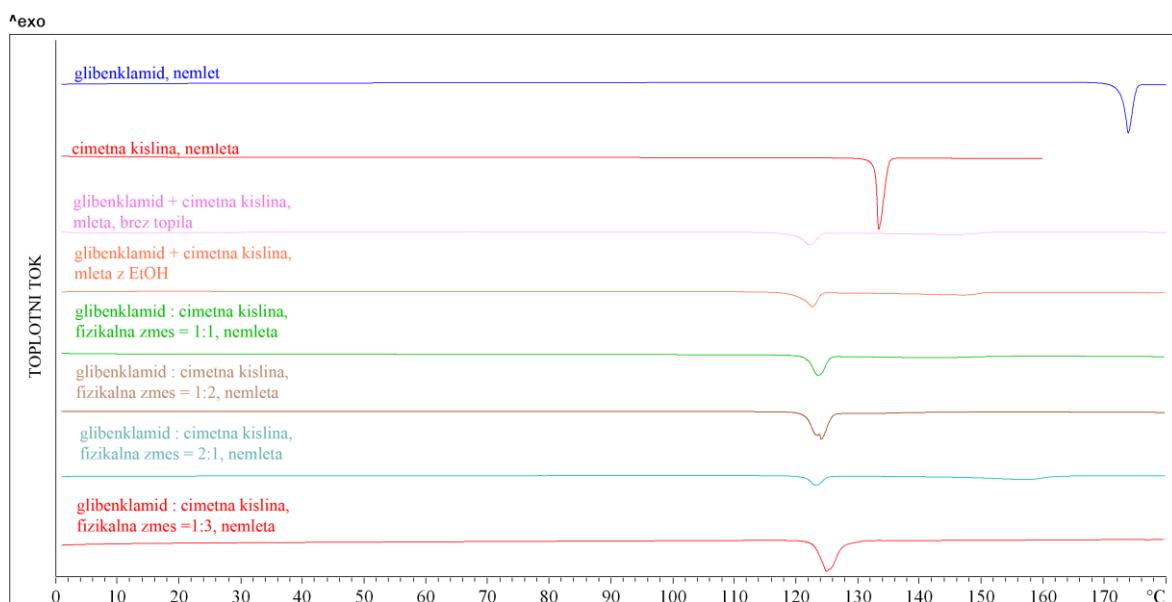


**Slika 31:** Praškovni difraktogrami glibenklamida, mlete zmesi glibenklamida : benzojske kisline = 1:1 in benzojske kisline.

DSC krivulje čistega glibenklamida, benzojske kislina in njunih zmesi (slika 30) kažejo znižanje temperature tališč zmesi glede na obe komponenti tako pri mletih zmeseh kot pri nemletih, z etanolom ali brez. Verjetno med komponentama nastane evtektična zmes. Rezultat potrjuje pojav drugega talilnega vrha pri temperaturi tališča med obema čistima komponentama, ki je najbolj viden pri fizikalni zmesi 3:1 pri 158 °C.

XRPD graf (slika 31) je pri zmesi enaka vsoti obeh čistih komponent, kar potrjuje nastanek evtektika.

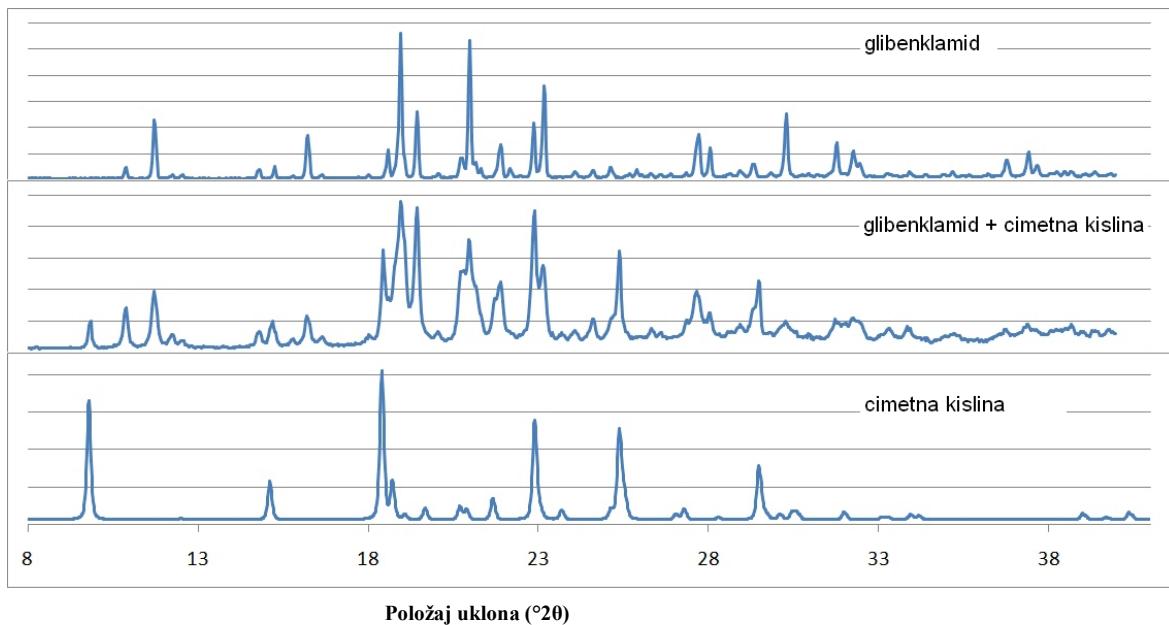
#### 4.13. MLETJE ZMESI GLIBENKLAMIDA S CIMETNO KISLINO



**Slika 32:** DSC krivulje glibenklamida, cimetne kisline, mlete zmesi glibenklamid : cimetna kislina = 1:1 brez topila in z dodanim etanolom, nemlete fizikalne zmesi obeh komponent v razmerju 1:1, 1:2, 2:1 in 1:3.

Na DSC grafu (slika 32) glibenklamida in cimetne kisline je lep primer evtektične zmesi; temperature tališč mletih in nemletih zmesi ter z etanolom in brez so enake. Tališče je pri vseh vzorcih zmesi nižje od tališč obeh čistih komponent.

XRPD graf (slika 33) je pri zmesi enaka vsoti obeh čistih komponent, kar potrjuje nastanek evtektika.



**Slika 33:** Praškovni difraktogrami glibenklamida, mlete zmesi glibenklamida : cimetne kisline = 1:1 in cimetne kisline.

## 5. SKLEP

V diplomski nalogi smo z mletjem dvokomponentnih zmesi proučevali možnost tvorbe kokristalov klaritromicina, hidroklorotiazida ali glibenklamida z 17-imi karboksilnimi kislinami ter njihovimi derivati kot tvorilci kokristalov (dvema amidoma, soljo sulfimida in derivatom piridina). Vse tri učinkovine, kot tudi karboksilne kisline in uporabljeni derivati, imajo funkcionalne skupine, ki bi lahko tvorile vodikove vezi kot najpomembnejše interakcije za tvorbo kokristalov. V literaturi nismo našli opisov kokristalov s proučevanimi zdravilnimi učinkovinami. Z mletjem zmesi učinkovine in pomožne snovi ter s termično analizo produktov smo izbrali 12 zmesi z obetavnimi rezultati in jih analizirali še z XRPD.

Pri klaritromicinu smo dokazali interakcije pri zmesi klaritromicina in adipinske kisline. Na XRPD grafu so nastali novi vrhovi, kar pomeni, da komponenti tvorita novo kristalno strukturo (kokristal ali sol). Tudi pri zmeseh: klaritromicin z nalidiksno kislino, natrijevim saharinatom, nikotinamidom ali 4,4-bipiridinom smo ugotovili interakcije, ki so bile manj izrazite. Obstaja možnost, da je nova kristalna struktura nastala v majhnem deležu, vendar je njen nastanek težji. Ker se je tališče zmesi znižalo pod tališče komponent obstaja verjetnost, da so z naštetimi pomožnimi snovmi nastale tudi evtektične zmesi.

Pri zmeseh iz hidroklorotiazida je najboljši rezultat dala zmes hidroklorotiazida in nikotinamida. Nastala je popolnoma nova struktura in prostorska ureditev molekul, saj smo pri meritvi z XRPD dobili bistveno spremenjen spekter, kar potrjuje nastanek kokristala oziroma soli. Pri mletju hidroklorotiazida in nalidiksne kisline ter cimetne kisline je nastala evtektična zmes.

Pri glibenklamidu nastane pri vseh proučevanih pomožnih snoveh evtektična zmes. Temperature tališč zmesi se znižajo pod tališči obeh čistih komponent, XRPD diagrami pa so vsota grafov obeh čistih komponent. Te zmesi so: glibenklamid in nalidiksna kislina, glibenklamid in salicilna kislina, glibenklamid in benzojska kislina ter glibenklamid in cimetna kislina.

Mletje v krogličnem mlinu z dodatkom topila ali brez njega se je izkazalo za ustrezno in hitro metodo priprave vzorcev s spremenjeno kristalno strukturo. Za potrditev novih kristalnih struktur bo potrebno pripraviti nove vzorce v obliki monokristalov in jih analizirati z rentgensko analizo.

## 6. LITERATURA

1. Huang LF, Tong WQ. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv Drug Deliver Rev* 2004; 56: 321-334.
2. Vippaguntaa SR, Brittainb HG, Grant DJW. Crystalline solids. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 48: 3-26.
3. Datta S, Grant DJW. Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3, 42-57.
4. Singhal D, Curatolo W. Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliver Rev* 2003; 56: 335-347.
5. Rodriguez-Hornedo N, Nehm SJ, Jayasankar A. Cocrystals: Design, Properties and Formation Mechanisms. v: Swarbrick J. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 3rd Edition, Informa Healthcare, New York, 2007: 615-636.
6. Kovačič B., Planinšek O., Vrečar F.: Kokristali zdravilnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2010: 30-36.
7. Schultheiss N, Newman A. Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2950-2967.
8. 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.
9. Velaga SP, Basavoju S, Bostrom D. Norfloxacin saccharinate-saccharin dihydrate cocrystal – A new pharmaceutical cocrystal with an organic counter ion, *J Mol Struct* 2008; 29: 150-153.
10. Childs SL, Chyall LJ, Dunlap JT et al. Crystal Engineering Approach to Forming Cocrystals of Amine Hydrochlorides with Organic Acids. Molecular Complexes of Fluoxetine Hydrochloride with Benzoic, Succinic, and Fumaric Acids. *J Am Chem Soc* 2004; 126: 13335-13342.
11. Solvias AG: An Attractive Alternative for Solid Forms. *Pharmaceutical International*, 2007; <http://www.pharmaceutical-int.com/article/co-crystals-an-attractive-alternative-for-solid-forms.html>
12. D.D.P.W. Stam, E. Aret, A. Coetzee, J.H. ter Horst: Controlling Co-crystal Polymorphs. Delft University of Technology, The Netherlands; 2010

13. Lehn JM. Supramolecular Chemistry — Scope and Perspectives: Molecules, Supermolecules, and Molecular Devices (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Edit* 1988; 27, 89-112.
14. [50](http://images.google.si/imgres?imgurl=http://www.rgu.ac.uk/graphics/PC%2520Co-crystal.jpg&imgrefurl=http://www.rgu.ac.uk/pharmacy/research/page.cfm%3Fpage%3D3326&usg=__TcTFXXaP2dUn_tee9Rur28D4oCA=&h=355&w=503&sz=20&hl=sl&start=1&tbnid=CbO8EjXgz3JOMM:&tbnh=92&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dcocystal%26gbv%3D2%26hl%3Dsl. (dostopano: 10-2009)</a></li><li>15. Blagden N, De Matas M, Gavan PT et al. Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. <i>Adv Drug Deliver Rev</i> 2007; 59: 617-630.</li><li>16. Desiraju GR: Supramolecular Synthons in Crystal Engineering - A New Organic Synthesis. <i>Angew Chem Int Ed</i> 1995; 34: 2311-2327.</li><li>17. Sekhon BS: Pharmaceutical co-crystals – a review. <i>Ars Pharm</i> 2009; 50: 99-117.</li><li>18. Stahly GP: Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. <i>Cryst Growth Des</i> 2007; 7: 1007-1026.</li><li>19. Jason Perman: Version Comparison: Structures of the Week. <i>ACS Chemistry for Life</i>, on Dec 11, 2010 1:40 PM, last modified by Jason Perman on Dec 13, 2010 9:45 AM</li><li>20. Matthew Cude: Competing cocrystals: Hydrogen-bonding vs. Halogen-bonding. <i>CrystEngComm Blog</i>, 2012.</li><li>21. Etter MC: Hydrogen bonds as design elements in organic chemistry. <i>J Phys Chem</i> 1991; 95: 4601-4610.</li><li>22. Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ. Pharmaceutical Co-Crystals. <i>J Pharm Sci</i> 2006; 93: 499-516.</li><li>23. Issa N, Karamertzanis PG, Welch GWA, Price SL: Can the Formation of Pharmaceutical Cocrystals Be Computationally Predicted? I. Comparison of Lattice Energies. <i>Cryst Growth Des</i> 2009; 9: 442-453.</li><li>24. Gavezzotti A: Are crystal structures predictable? <i>Accounts Chem Res</i> 1994; 27: 309-314.</li><li>25. Gavezzotti A: Ten years of experience in polymorph prediction: what next? <i>Cryst Eng Comm</i> 2002; 4: 343-347.</li><li>26. Dunitz JD: Are crystal structures predictable? <i>Chem Comm</i> 2003; 545-549.</li></ol></div><div data-bbox=)

27. Taskinen J, Yliruusi J: Prediction of physicochemical properties based on neural network modelling. *Adv Drug Deliver Rev* 2003; 55: 1163-1183.
28. Huang K, Britton D, Etter MC et al. A novel class of phenol-pyridine cocrystals for second harmonic generation. *J Mater Chem* 1997; 7: 713-720.
29. Gao X, Frioee T, MacGillivray LR. Supramolecular construction of molecular ladders in the solid state, *Angew Chem Int Edit* 2004; 43: 232-236.
30. Ma BQ, Zhang Y, Coppens P. Structural Variation and Supramolecular Isomerism in the C-Methylcalix[4]resorcinarene/Bipyridine System. *Cryst Growth Des* 2002; 2: 7-13.
31. Taylor LD, Warner JC, Process and composition for use in photographic materials containing hydroquinones, US patent 5,177,262 1994.
32. Almarsson Ö, Zawarotko MJ. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases: Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chem Commun* 2004; 1889-1896.
33. Shan N, Zawarotko MJ. The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discov Today* 2008; 13: 440-446.
34. Vishweshwar P, McMahon JA, Zawarotko MJ, Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-Crystals. v: Tieking ERT, Vittal JJ. *Frontiers in Crystal Engineering*, John Wiley & Sons 2006: 25-50.
35. Morissette SL, Almarsson Ö, Peterson ML. High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. *Adv Drug Deliver Rev* 2004; 56, 275–300.
36. McNamara DP, Childs SL, Giordano J et al. Use of a Glutaric Acid Cocrystal to Improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. *Pharm Res* 2006; 23: 1888-1897.
37. Basavouj S, Boström D, Velaga SP. Indomethacin-Saccharin Cocrystal: Design, Synthesis and Preliminary Pharmaceutical Characterization. *Pharm Res* 2007; 25: 530-541.
38. 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.
39. Good DJ, Rodriguez-Hornedo N: Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2252-2264.

40. Remenar JF, Morissette SL, Peterson ML et al. Crystal Engineering of Novel Cocrystals of a Triazole Drug with 1,4-Dicarboxylic Acids. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 8456-8457.
41. Jones W, Motherwell WDS, Trask AV: Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. *MRS Bull* 2006; 31: 875-879.
42. Barzegar-Jalali M, Valizadeh H, Shadbad MRS, Adibkia K et al: Cogrinding as an approach to enhance dissolution rate of poorly water-soluble drug (gliclazide). *Powder Technol* 2010; 197: 150-158.
43. 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.
44. Nehm SJ, Rodriguez-Spong B, Rodriguez-Hornedo N. Phase Solubility Diagrams of Cocrystals are explained by Solubility Product and Solution Complexation. *Cryst Growth Des* 2006; 6: 592-600.
45. Smith AJ, Kavuru P, Wojtas L, Zaworotko MJ, Shytle RD.: Cocrystals of quercetin with improved solubility and oral bioavailability. *Mol Pharm*. 2011 Oct 3;8(5):1867-76.
46. Trask AV, Motherwell WDS, Jones W: Pharmaceutical Cocrystallization: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration. *Cryst Growth Des* 2005; 5: 1013-1021.
47. Tiwary AK. Modification of crystal habit and its role in dosage form performance. *Drug Dev Ind Pharm* 2001; 27: 699–709.
48. Yang G, Kubota N, Sha Z et al. Crystal Shape Control by Manipulating Supersaturation in Batch Cooling Crystallization. *Cryst Growth Des* 2006; 6: 2799-2803.
49. Christian Butterhof, Kilian Bärwinkel, Jürgen Senker and Josef Breu: Polymorphism in co-crystals: a metastable form of the ionic co-crystal 2 HBz·1 NaBz crystallised by flash evaporation. *CrystEngComm* Issue 20, 2012.
50. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Company Incorporated, 2001.
51. Andreja Dejak (roj. Adamič): Izdelava kokristalov flukonazola ter vrednotenje njihovih fizikalnih in mehanskih lastnosti. diplomska naloga, marec 2013.
52. Trask AV, Jones W: Crystal Engineering of Organic Cocrystals by the Solid-State Grinding Approach. *Top Curr Chem* 2005; 254: 41-70.

53. Rodriguez-Hornedo N, Nehm SJ, Seefeldt KF, Pagan-Torres Y, Falkiewicz CJ: Reaction Crystallization of Pharmaceutical Molecular Complexes. *Mol Pharm* 2006; 3: 362-367.
54. Aakeröy CB, Beatty AM, Helfrich BA et al. Do polymorphic compounds make good cocrystallising agents? A structural case study that demonstrates the importance of synthon flexibility. *Cryst Growth Des* 2003; 3: 159-165.
55. Rager T, Hilfiker R: Cocrystal Formation from Solvent Mixtures. *Cryst Growth Des* 2010; 10: 3237-3241.
56. 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.
57. Trask AV, Motherwell S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem Commun* 2004; 890-891.
58. Friščić T, Jones W: Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 1621-1637.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm vestn* 2001; 52: 173-185.
64. Chiarella RA, Davey RJ, Peterson ML: Making Co-Crystals – The Utility of Ternary Phase Diagrams. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1223-1226.

65. 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.
66. 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.
67. Vogt FG, Clawson JS, Strohmeier M et al. Solid-State NMR Analysis of Organic Cocrystals and Complexes. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 921-937.
68. Almarsson Ö, Hickey MB, Peterson M, et al. Pharmaceutical co-crystal compositions of drugs such as carbamazepine, celecoxib, olanzapine, itraconazole, topiramate, modafinil, 5-fluorouracil, hydrochlorothiazide, acetaminophen, aspirin, flurbiprofen, phenytoin and ibuprofen. PCT WO 2004/078163 2004.
69. Alleso M, Velaga S, Alhalweh A et al. Near-Infrared Spectroscopy for Cocrystal Screening. A Comparative Study with Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2008; 80: 7755-7764.
70. Harris RK. NMR studies of organic polymorphs & solvates. *Analyst* 2006; 131: 351-373.
71. Trask AV. An Overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. *Mol Pharm* 2007; 4: 301-309.
72. Foye, Lemke T., Roche V. : Principles of medicinal chemistry. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, cop. 2013; 2012.
73. H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter: Pharmacology. Edinburgh [etc.] : Churchill Livingstone, 2001.
74. [http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa\\_compilation.pdf](http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf) (dodano do februar 2013)
75. Timofeeva VT, Kuhn HG e tal: Cocrystal of 1,1-Dicyano-2-(4-hydroxyphenyl)-ethene with L-Proline and Induced Conformational Polymorphism of 1,1-Dicyano-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-ethene. *Cryst Growth Des* 2003; 3: 383-391.