

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA BARTOLIČ

***PROUČEVANJE VPLIVA POGOJEV OHLAJANJA RAZTOPIN MANITOLA NA
LASTNOSTI LIOFILIZATOV***

***STUDY OF THE INFLUENCE OF COOLING CONDITIONS OF MANNITOL
SOLUTIONS ON THE PROPERTIES OF LYOPHILISATES***

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na razvojnem centru farmacevtskega podjetja Lek d.d. pod somentorstvom dr. Klemna Kočevarja. Uradni mentor s Fakultete za farmacijo pa je prof. dr. Odon Planinšek. Vso eksperimentalno delo in analize so bile opravljene na razvojnem centru farmacevtskega podjetja Lek d.d.

ZAHVALA

Najlepše zahvale gredo v prvi vrsti mentorju prof. dr. Odonu Planinšku in somentorju dr. Klemnu Kočevarju za mentorstvo, strokovno usmerjanje, za vso posredovano znanje, izkušnje, potrpljenje in motivacijo.

Iskrene zahvale gredo tudi Mateju Avanzo, mag. farm in celotni skupini za sterilne, poltrdne in tekoče oblike s področja farmacevtske tehnogije Razvojnega centra Lek za ponujeno priložnost izdelave diplomskega dela in sobivanja znotraj skupine. Posebno zahvalo si zaslužita Jurij Praček, mag. farm in dr. Špela Irman za vso praktično pomoč, posredovano znanje, izkušnje ter nasvete in nove ideje.

Iskrene zahvale gredo tudi analitskim oddelkom Razvojnega centra Lek za pomoč pri analizi vzorcev, in sicer, dr. Javorju Kacu za določitev vsebnosti vode po sušenju s titracijo po Karl Fischerju, dr. Zoranu Hamu za pomoč pri merjenju z Ramanskim mikroskopom, za rentgenske praškovne difraktograme in pomoč pri interpretaciji rezultatov, Daši Šivec za termično analizo ter Aniti Zajc za analizo vzorcev z metodo SEM.

Nenazadnje se zahvaljujem svojim staršem, Mihaelu, prijateljem, sodelavcem z Leka in sošolcem s Fakultete za farmacijo za vso pomoč, podporo, razumevanje in nepozabne trenutke tekom študija. Brez slednjih nič od tega ne bi bilo mogoče. Hvala!

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Odon Planinška in somentorja dr. Klemna Kočevarja.

Ljubljana, junij 2014

Tina Bartolič

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Marko Anderluh

Član komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. PROCES LIOFILIZACIJE	1
1.1.1. PREDNOSTI IN SLABOSTI	1
1.1.2. PODROČJA UPORABE	2
1.2. FAZA ZMRZOVANJA	2
1.2.1. FIZIKALNO KEMIJSKE OSNOVE LIOFILIZACIJE	4
1.2.2. MODIFIKACIJE FAZE ZMRZOVANJA -NADZOROVANA NUKLEACIJA	8
1.3. FAZI SUŠENJA	10
1.3.1. PRIMARNO SUŠENJE	10
1.1.1. SEKUNDARNO SUŠENJE	12
1.4. LIOFILIZATI KOT ZDRAVILA	13
1.4.1. POLIMORFIZEM	13
2. NAMEN DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	16
3.1. MATERIALI IN NJIHOVE LASTNOSTI	16
3.1.1. IZBIRA POMOŽNIH SNOVI	16
3.1.2. IZDELAVA VZORCEV	17
3.1.3. OPREMA	20
3.2. ANALITSKE METODE	22
3.2.1. PROUČEVANJE ZMRZOVANJA ETANOLNO VODNIH RAZTOPIN MANITOLA	22
3.2.2. MERJENJE TERMIČNIH LASTNOSTI SNOVI Z METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE – DSC	22
3.2.3. ANALIZA OSTANKA VODE PO SUŠENJU S TITRACIJO PO KARL FISCHERJU	23
3.2.4. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA	25
3.2.5. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA (ANG. PXRD)	27
3.2.6. VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)	28
3.2.7. STATISTIČNE METODE VREDNOTENJA REZULTATOV	29
4. REZULTATI	30
4.1. VIZUALNO VREDNOTENJE LIOFILIZATOV	30
4.2. VREDNOTENJE MAS LIOFILIZATOV	33

4.3. VSEBNOST VODE V LIOFILIZATIH	33
4.4. PROUČEVANJE ZMRZOVANJA ETANOLNO VODNIH RAZTOPIN MANITOLA	34
4.5. METODA DIFERENČNE DINAMIČINE KALORIEMTRIJE (DSC)	35
4.6. RAMANSKA SPKTROSKOPIJA	35
4.7. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA - PXR	38
4.8. VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP - SEM	38
5. RAZPRAVA	40
5.1. VREDNOTENJE VPLIVA HITROSTI OHLAJANJA IN KOLIČINE ETANOLA V FORMULACIJI NA VIZUALNI IZGLED, VSEBNOST VODE IN KONČNO MASO LIOFILIZATOV	40
5.2. VREDNOTENJE PARAMETROV KRIVULJE OHLAJANJA	42
5.3. DOLOČANJE VPLIVA HITROSTI OHLAJANJA IN KOLIČINE ETANOLA NA POJAVNOST KRISTALNIH OBLIK MANITOLA Z RAMANSKIM MIKROSKOPOM, METODO DIFERENČNE DINAMIČINE KALORIMETRIJE IN RENTGENSKO PRAŠKOVNO DIFRAKCIJO	46
5.4. VREDNOTENJE STRUKTURNIH POSEBNOSTI Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM – SEM54	
6. SKLEP	57
7. LITERATURA	59
8. PRILOGE	62
8.1. PRILOGA 1: DOLOČANJE VODE S TITRACIJO PO KARL FISHERJU	62
8.2. PRILOGA 2: PROUČEVANJE KRIVULJE OHLAJANJA	62
8.3. PRILOGA 3. VREDNOTENJE DSC TERMOGRAMOV	62
8.4. PRILOGA 4: TERMOGRAMI VZORCEV	62
8.5. PRILOGA 5: REZULTATI RAMANSKE SPEKTROSKOPIJE	62
8.6. PRILOGA 6: REZULTATI RENTGENSKE PRAŠKOVNE DIFRAKCIJE	62
8.7. PRILOGA 7: DIFRAKTOGRAMI VZORCEV	62
8.8. PRILOGA 8: OPISNO VREDNOTENJE VZORCEV S SEM	62
8.9. PRILOGA 9: SEM SLIKE	62

POVZETEK

Liofilizacija je tehnološki proces sušenja z zmrzovanjem, pri katerem s sublimacijo odstranimo vodo iz ledu. Formulacijo pretvorimo v suho praškasto snov in tako povečamo stabilnost izdelka. V sklopu diplomskega dela smo preučevali vpliv sestave topila (različna razmerja etanola v vodi) in pogojev ohlajanja na lastnosti liofilizatov. Kot modelni sistem smo izbrali manitol. Manitol je pogosto uporabljena pomožna snov pri procesu liofilizacije zaradi svojih lastnosti, kot so velika tendenca kristalizacije in visoka temperatura kristalizacije oz. tališča. Take lastnosti omogočajo izbor optimalnih pogojev procesa, npr. nižjih temperatur sušenja in dajejo eleganten videz končnega izdelka. Manitol izkazuje polimorfizem. Znanih je več kristalnih oblik manitola; alfa, beta in delta. Obstaja lahko tudi v obliki hemihidrata ali amorfnega manitola.

S statističnimi metodami smo vrednotili vpliv koncentracije etanolne raztopine in hitrosti ohlajanja na maso in vsebnost vode v liofilizatih ter polimorfizem in morfologijo manitola. Kristalne oblike manitola smo določali z različnimi metodami (termična analiza, ramanska spektroskopija in rentgenska praškovna difrakcija) ter jih kvalitativno in kvantitativno primerjali. Z metodo elektronske mikroskopije smo vrednotili morfološke značilnosti liofilizatov. Ugotovili smo, da ima dodatek etanola kot sotopila bistveno večji vpliv na lastnosti liofilizatov kot hitrost ohlajanja. Etanol je imel pomemben vpliv na vizualni izgled liofilizatov, pojavnost različnih kristalnih oblik manitola in morfologijo. Liofilizati, ki so bili izdelani iz raztopine z večjim deležem etanola niso tvorili čvrste pogače, temveč sipko snov. Pri pogojih zmrzovanja se je izločilo največ delta kristalne oblike, razmerje beta in alfa kristalne oblike manitola pa je bilo odvisno predvsem od koncentracije etanola. Ugotovili smo, da lahko iz polimorfne sestave liofilizata sklepamo na sestavo topila. Hitrost ohlajanja pa ni izkazala statistično pomembnega vpliva na lastnosti liofilizatov zaradi omejenega prenosa toplote med policami in dnom vial.

Poleg lastnosti liofilizatov smo preučevali tudi zmrzovanje manitola iz vodnih in etanolno-vodnih raztopin z metodo krioramanske spektroskopije. Opisali smo dva možna načina kristalizacije manitola v povezavi s pojavnostjo različnih kristalnih oblik, ter potrdili prisotnost manitol hemihidrata pri pogojih zmrzovanja. Ker manitol hemihidrata v končnih liofilizatih nismo zaznali, sklepamo, da med sušenjem pretvori v drugo kristalno obliko.

ABSTRACT

Lyophilization also known as freeze-drying is a technological process based on the principle of ice sublimation, without entering the liquid stage. Lyophilization is an important and well-established process to improve long-term stability of labile products. The main purpose of this thesis was to study the influence of solvent composition and cooling conditions on lyophilisate properties. Mannitol was chosen as a model system. Mannitol is the most common bulking agent used for lyophilized formulations because of its crystallization properties and its high crystallization and melting temperature. Mannitol has 5 solid state forms: three crystalline anhydrous forms, alpha- α , beta- β and delta- δ form, hemihydrate form and an amorphous state.

Statistical methods were used to evaluate the impact of ethanol concentration as co-solvent and cooling rate on mass, water content, polymorphism and morphology. Crystalline forms of mannitol were determined by a variety of methods such as thermal analysis, Raman spectroscopy and X-ray powder diffraction and were then compared. With scanning electron microscope morphological characteristics of lyophilisates were determined.

Addition of ethanol as co-solvent was determined to have a much larger impact on the lyophilisate properties as cooling rate has. It was statistically proven that ethanol has a significant impact on the visual appearance of lyophilisates, on different crystalline forms and morphology. Lyophilisates containing a higher proportion of ethanol had not form a solid cake but rather a particulate material. In freezing conditions ethanol concentration affected the ratio of polymorphs appearance. At sub-ambient conditions δ form was mostly detected. The ratio of individual forms mainly depended on ethanol concentration in formulation. It was acknowledged that from polymorphic composition of lyophilisate the solvent composition can be determined. On the other hand cooling rate have not show any statistically significant impact on lyophilisate properties due to the limited heat transfer between the shelves and the vial bottom.

The crystallization of mannitol from aqueous and ethanol solution was studied using cryo-Raman spectroscopy. Two possible ways of crystallization of mannitol were determined in relation to the occurrence of different crystalline forms. At sub-ambient conditions mannitol hemihydrate was detected. Since mannitol hemihydrate was not detected in final lyophilisate products it was assumed that it was converted into another crystalline form during the drying process.

SEZNAM OKRAJŠAV

T_0	Temperatura trojne točke vode
T_a	Temperatura temperiranja
T_g	Temperatura steklastega prehoda raztopine
T_{eu}	Temperatura evtektične točke raztopine
T_p	Temperatura produkta
T_c	Temperatura kolapsa
DSC	Diferenčna dinamična kalorimetrija (<i>ang. Differential Scanning Calorimetry</i>)
XRD	Rentgenska praškovna difrakcija (<i>ang. X-Ray diffraction</i>)
SEM	Vrstični elektronski mikroskop (<i>ang. Scanning electron microscope</i>)

1. UVOD

1.1. PROCES LIOFILIZACIJE

Beseda liofilizacija izhaja iz grščine in v prevodu pomeni »spraviti snov v stanje, da se lažje razpusti«. Danes s tem izrazom opišemo postopek dehidracije raztopin organskih ali bioloških molekul, ki jih z odstranitvijo vode s sublimacijo pretvorimo v trdno praškasto snov, z namenom povečanja stabilnosti in/ali povečanja topnosti. Proces je sestavljen iz treh stopenj, globokega zmrzovanja, primarnega sušenja in sekundarnega sušenja. Produkt naprej globoko zamrzujemo, da se vsa voda iz raztopine izloči v obliki ledenih kristalov. Nato sledi faza primarnega sušenja, kjer pri znižanem tlakom led sublimira, s sekundarnim sušenjem pa s procesom difuzije in desoprcije odstranimo še preostalo vodo. Po zaključenem procesu dobimo trdno snov v obliki pogače, ki ima na svoji površini pore, kar poveča afiniteto do topila ob ponovnem stiku. (1, 2)

1.1.1. Prednosti in slabosti

Proces liofilizacije je dolgotrajen in drag proces, zato ga uporabljamo v primeru, ko cena izdelka upraviči njegovo uporabo oz. kadar ne moremo izdelati raztopin za parenteralno aplikacijo zaradi termolabilnosti zdravilne učinkovine, predvsem z vidika sterilizacije. (3)

Poglavitna prednost liofilizacije pa je ravno v povečanju stabilnosti pripravka, zaradi imobilizacije vzorca med zmrzovanjem, vakuumskega sušenja v odsotnosti kisikove atmosfere in nizkih temperatur procesa. Na ta način preprečimo interakcije med kemijsko reaktivnimi snovmi in zmanjšamo možnost oksidacij. Nastali liofilizat ima visoko poroznost in je liofilen, kar omogoča hitro in enostavno rekonstitucijo v raztopino. Dodatno prednost pa predstavlja natančno in ponovljivo odmerjanje tudi zelo majhnih odmerkov zdravilnih učinkovin. (3).

S tehniko liofilizacije tako povečamo dolgoročno stabilnost učinkovin in s tem izboljšamo pogoje shranjevanja in transporta. To je bistvenega pomena predvsem pri bioloških

snoveh, kot so cepiva, tkivni ekstrakti, transplantacijska tkiva, antibiotiki, bakterijske kulture in biološka zdravila. (1, 2)

1.1.2. Področja uporabe

Razvoj procesa liofilizacije sega v prvo polovico 20. stoletja. V laboratoriju so proces uporabljali že pred prvo svetovno vojno, po vojni pa se je njena uporaba razširila tudi na industrijo. Poleg proizvodnje medicinsko-farmaceutskih in veterinarskih pripravkov, se je tehnika izkazala za uporabno tudi na področju prehrane. Znani liofilizati so instant kava, mleko v prahu, čaj, začimbe, gobe, koncentrirani sadni sokovi itd. (1)

V kemiji se liofilizacija uporablja za sušenje občutljivih snovi, sušenje v odsotnosti kisika, ohranjanje radikalov. Na področju sodne medicine in patologije, za pripravo vzorcev bioloških tkiv za citološke in citokemične preiskave, na področju mikrobiologije, na bakterioloških in viroloških inštitutih, kjer ga koristijo predvsem za skladiščenje sevov bakterij, virusov, gliv, celic in pripravo gojišč. Na tej osnovi se pripravljata tudi izdelki, ki vsebujejo določeno število živih mikroorganizmov (kot npr., oslABLJENE VAKCINE IN probiotični izdelki). (1)

1.2. FAZA ZMRZOVANJA

Faza zmrzovanja pri procesu liofilizacije velja za najbolj kritično fazo celotnega procesa, ker način zmrzovanja bistveno vpliva na fazo sušenja in posledično na končno kakovost izdelka. Glavni cilj faze zmrzovanja je odstraniti čim večji delež vode iz formulacije in je zato to največji dehidracijski korak procesa. Voda se izloča v obliki ledenih kristalov in s tem pride do povečanja koncentracije topljenca, ki se izloča v trdnem stanju. Pri kritični koncentraciji in ustrezni temperaturi bo koncentrirana raztopina prešla evtektično zmrzovanje ali bo podvržena steklastemu prehodu. Raztopina lahko zmrzne po enem od obeh mehanizmov, največkrat pa po kombinaciji obeh. (2- 4)

Glavna dejavnika faze zmrzovanja sta hitrost ohlajanja in stopnja podhladitve raztopine, pomembno vlogo pa imata tudi končna temperatura zmrzovanja in koncentracija topljencev v raztopini. (4)

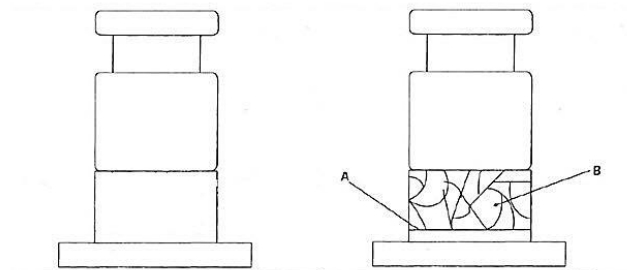
Vpliv hitrosti ohlajanja

V splošnem velja, da počasnejša stopnja ohlajanja (ki je definirana kot hitrost ohlajanja raztopine) vodi v višjo stopnjo zmrzovanja (ki je definirana kot hitrost rasti kristalov iz že nastalih kristalizacijskih jeder -klic). Pri takem procesu kristalizacije nastane malo klic in te nemoteno rastejo. Kristali, ki nastanejo so pravilnih dendritičnih oblik in v zmrznjeni pogači tvorijo ledene kanale. Pri hitrem ohlajanju pa pride do tvorbe večjega števila manjših kristalov nepravilnih dendritičnih oblik, ki pa ne rastejo. (4, 5)

Vpliv stopnje podhladitve

Pri večji stopnji podhladitve, ko ima vsa voda v raztopini temperaturo nižjo od temperature trojne točke vode $-T_0$, nastanejo manjši kristali enakih velikosti. Pogača, ki nastane ima puhast videz. (6)

Pri manjših podhladitvah pa pride do podhladitve samo določenega dela raztopine, nastajajo večji kristali enakih velikosti. Preostala voda zmrzne pri temperaturi okoli ničle in nastanejo kristali različnih velikosti. Dobimo heterogene kristale in grobo obliko končne pogače. Razliko v videzu končne pogače prikazuje slika 1. (6)



Slika 1: Struktura bolj homogenih kristalov enakomernih velikosti pri večji stopnji podhladitve (levo), struktura heterogenih kristalov pri nižji stopnji podhladitve (desno); A. Homogeni del, B. Heterogeni del

Pri farmacevtskih izdelkih so bolj zaželeni večji kristali, ki nastajajo pri manjših podhladitvah. Z zmanjšanjem podhladitve vplivamo tudi na hitrost primarnega sušenja. Večji kristali izkazujejo namreč manjšo upornost proti tokom vodnih par pri sublimaciji in

za seboj puščajo večje pore, kar poveča poroznost. Obratno pa velja za pripravke iz organskega materiala, predvsem terapevtske beljakovine. Tukaj je zaželena čim hitrejša zamrznitev, da kristali, ki nastajajo ne bi poškodovali oz. spremenili strukturo beljakovine. (4, 7)

1.2.1. Fizikalno kemijske osnove liofilizacije

1.2.1.1. Zmrzovanje vode in mešanice voda-etanol

Zmrzovanje vode

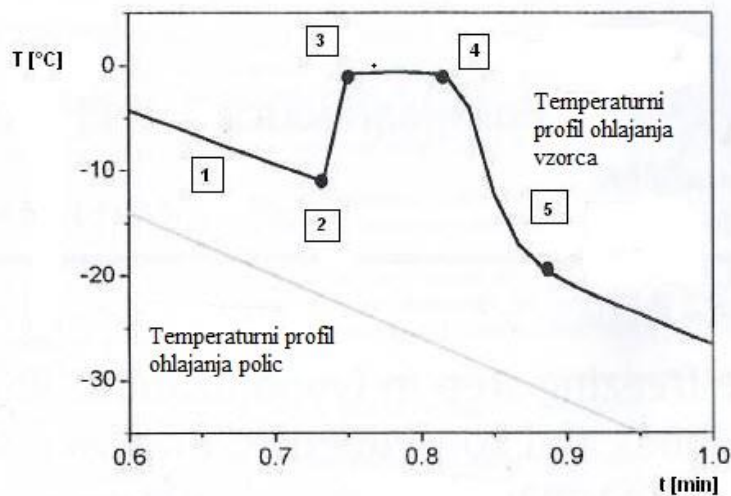
Čista voda ima temperaturo zmrzišča in temperaturo taljenja pri T_0 , tj. pri temperaturi 0°C . Kadar čista voda doseže temperaturo 0°C , pride do nastanka ledenih kristalov. Temperatura vode pade pod ničlo šele ko se vsa voda spremeni v led (podobno velja pri taljenju ledu s povečanjem temperature nad ničlo). (8)

Pri ohlajanju čiste vode pri atmosferskem tlaku in pod temperaturo T_0 pa lahko pride do nastanka ne-ravnotežnega, meta-stabilnega stanja, ki ga imenujemo podhlajena talina. To pomeni, da pri temperaturi T_0 , kjer je ravnotežje med tekočo in trdno fazo (ravnotežna temperatura zmrzišča) voda ne zamrzne. Če v takem sistemu nimamo prisotnih kristalizacijskih jeder, se kristali začnejo tvoriti šele pri točki homogene kristalizacijske temperature, tj. pri -40°C . Stopnja podhladitve je definirana kot razlika med ravnotežno temperaturo zmrzišča in dejansko temperaturo pri kateri se začno tvoriti kristali. Odvisna je od lastnosti raztopine in procesa. Višja kot je stopnja podhladitve (pri hitrejšem ohlajanju), več toplote se sprosti pri kristalizaciji, ki jo vzorec absorbira in več vode lahko naenkrat zamrzne. Molekule vode v podhlajeni talini tvorijo ledu podobne agregate ali t.i. klastre, ki so med seboj povezani z vodikovimi vezmi. Tvorba takih klastrov – kristalizacijskih jeder je gonilna sila kristalizacije. Rast takih formacij v številu in velikosti pa je bolj favorizirana pri nižjih temperaturah. (4, 7)

V farmacevtskih pripravkih, tudi takih, ki vsebujejo sterilno vodo, pride do adsorpcije »nečistoč«, ki delujejo kot sprožilci heterogene kristalizacije, na površini ledu-podobnim klastrom. Prisotnost mikronskih nečistoč zviša zmrzišče raztopine. Kot nečistoče tukaj razumemo površino vsebnika - vial ali tuje delce prisotne v vodi. Verjetnost prisotnosti

takih nečistot je večja na laboratorijskem nivoju kot proizvodnem. Temperature kristalizacije so torej v povprečju lahko nižje na proizvodnem nivoju. (7)

Po tvorbi kristalizacijskih jeder pride do rasti kristalov. Ker je kristalizacija eksotermen proces, začne temperatura vzorca med procesom naraščati proti T_0 . Toplota se med procesom liofilizacije odvaja s hlajenjem polic in temperatura spet pade, ko se proces kristalizacije zaključi. Temperaturne spremembe med procesom liofilizacije prikazuje slika 2. (4)



Slika 2: Temperaturni profil vzorca med procesom liofilizacije. 1. Podhladitev, 2. Začetek kristalizacije, 3. Dvig temperature proti T_0 zaradi sproščene toplote pri kristalizaciji, 4.-5. Padec temperature po končani kristalizaciji (4)

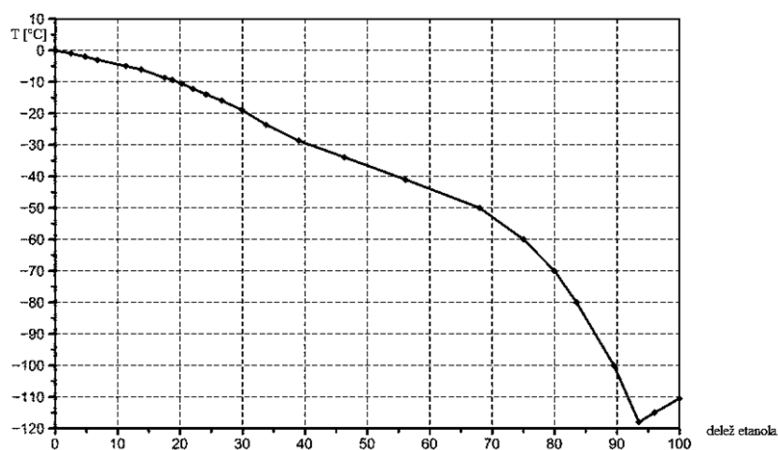
Zmrzovanje lahko poteka po dveh mehanizmih, po t.i. globalnem (angl. *global supercooling*) ali lokalnem mehanizmu podhladitve (angl. *local supercooling*). Pri počasnem ohlajanju s policami pride do globalne podhladitve. Nivo podhladitve in proces strjevanja potečeta po celotnem volumnu. Pri hitrem ohlajanju, npr. ohlajanju polic s tekočim dušikom, pa je podhladitev prisotna le lokalno in na teh področjih pride do kristalizacije. (4) Nastanek oz. pristonost kristalizacijskih jeder v raztopini pri homogeni kristalizaciji je stohastičen ali slučajen proces, kar pomeni, da se proces spreminja s krajem in časom. (9)

V praksi se zaradi stohastičnosti procesa kristalizacije soočamo s težavo variabilnosti med vialami iste serije (intervariabilnost) in/ali variabilnostjo znotraj ene same viale (intravariabilnost). Enotnost znotraj serije in znotraj viale lahko povečamo s temperiranjem

vzorca, različnimi tehnikami nadzorovane kristalizacije ali dodatkom organskih sotopil (npr. etanol ali terc-butanol). (4)

Zmrzovanje mešanice voda-etanol

Pri ohlajanju etanolno-vodne raztopine, pa velja, da taka raztopina zmrzne pri temperaturah pod nič. Voda zmrzne pri višjih temperaturah kot raztopina, kar pomeni, da se na začetku tvorijo čisti kristali ledu, v raztopini pa se povečuje koncentracija etanola (ta je večja kot koncentracija etanola na začetku). »Koncentrirana« raztopina zmrzne pri nižjih temperaturah.(8) Točka zmrzišča je odvisna od sestave topila. Slika 3 prikazuje fazni diagram trdno-tekoče za binarno mešanico vode in etanola.



Slika 3: Fazni diagram binarne mešanice vode in etanola (10)

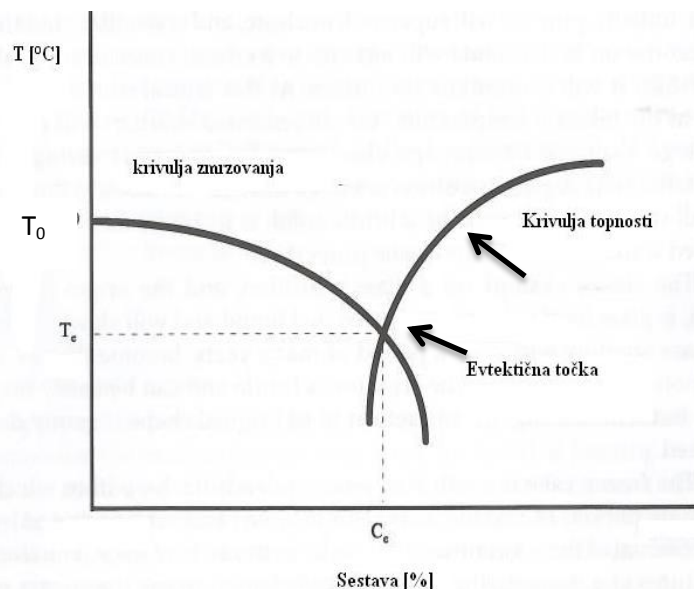
1.2.1.2. Zmrzovanje raztopin pri procesu liofilizacije

Pri zmrzovanju raztopin pride najprej do podhladitve in tvorbe kristalizacijskih jeder ledu. Led, ki nastane, ima gosto heksagonalno strukturo, v katero se molekule topljenca ne morejo vrniti in njihova koncentracija se v intersticijskih prostorih poveča. Takšna fazna ločitev je nujen pogoj za uspešnost liofilizacije. (3, 4)

Koncentracija topljenca se hitro povečuje dokler ne doseže kritične točke - t.i. *kriokoncentracije*. Po dosegu kritične točke, se koncentracija topljenca ne povečuje več. Končna koncentracija raztopine je faktor temperature in je neodvisna od začetne koncentracije. Pri pogojih kritične koncentracije in dane temperature lahko poteče evtektična kristalizacija ali pa pride do steklastega prehoda topljenca. Steklast prehod je

stanje povečane viskoznosti snovi z elastičnimi lastnostmi, ki pa na pogled zglada kot trdna snov - t.i. trdna raztopina. Diagrama evtektičnega zmrzovanja prikazuje slika 4. (3, 4)

Sistem lahko obstaja v popolnoma trdnem stanju samo pod točko evtektične temperature. V splošnem velja, da je temperatura evtektične točke višja pri nižji topnosti topljenca v vodi. Pomembna razlika med evtektično kristalizacijo in steklastim prehodom je v sestavi snovi, ki nastane in njenega vpliva na fazi sušenja. Kristalna snov, ki nastane z evtektično kristalizacijo je sestavljena iz majhnih kristalov ledu in topljenca. Vsa voda je tukaj prisotna v trdnem stanju in jo lahko uspešno odstranimo s primarnim sušenjem. Amorfnost ali steklasto snov pa tvori trdna raztopina topljenca. Ker tukaj ostane velik delež vode nezamrznjen, je poleg primarnega potrebno še sekundarno sušenje z difuzijo in desorpcijo. (4)



Slika 4: Diagram evtektičnega zmrzovanja prikazuje obnašanje dvokomponentnega sistema, topila in topljenca. Pri padcu temperature pri ohlajanju začne topilo - voda zmrzovati pri temperaturi T_0 . Sistem nato sledi krivulji zmrzovanja, kjer se povečuje koncentracija topljenca do točke (T_{eu} , C_{eu}), kjer poteče evtektična kristalizacija.(3)

1.2.1.3. *Temperiranje ali dvofazno zmrzovanje (ang. »Annealing«)*

Temperiranje vzorca je vrinjen procesni korak po doseženi končni točki zmrzovanja in pred začetkom primarnega sušenja. Temperaturo produkta dvignemo na določeno temperaturo temperiranja – T_a , ki je nižja od temperature trojne točke vode - T_0 in višja od

temperature steklastega prehoda snovi - T_g . Na ta način pride do kristalizacije pomožnih snovi, ki lahko na začetku izkazujejo amorfne lastnosti (nad temperaturo steklastega prehoda pride do taljenja takih snovi in kasneje do ponovne rekristalizacije) oz. pospešene ali uspešnejše kristalizacije pomožnih snovi (kot sta npr. manitol ali glicin). Manjši kristali se prej stalijo kot večji in s tem se poveča stična površina med vodo in ledom. Sistem nato spet ohladimo. Med ponovnim ohlajanjem pride do Ostwaldove rasti kristalov, tj. do rasti večjih kristalov na račun topljenja manjših, in stična površina se ponovno zmanjša. Dobimo večje kristale, ki predstavljajo potencialna nova mesta kristalizacije in rezultat je bolj homogena porazdelitev velikosti ledenih delcev. Temperaturo T_a zadržujemo nekaj časa (za volumen polnitve 1 cm ali več 2h), nato pa jo spet spustimo do končne točke zmrzovanja. V primeru, da snov, ki jo uporabimo ne kristalizira med fazo zmrzovanja temveč med fazo primarnega sušenja, lahko pride med procesom do lomljenja vial. (4, 7, 11, 12)

1.2.2. Modifikacije faze zmrzovanja -nadzorovana nukleacija

Razvitih je bilo več število metod z namenom optimizacije in bolj nadzorovane nukleacije. Nadzorovana nukleacija pa mora biti pri tem neodvisna od opreme - liofilizatorja, tipa in velikosti vial, volumna polnitve, formulacije in geometrije čepa za liofilizacijo. (4)

Največja izziva nadzorovane nukleacije sta 100% uspeh procesa in možnost spremljanja kristalizacije kot dogodka. Kristalizacijo kot dogodek lahko spremljamo z uporabo termočlenov, katerih slabost je invazivnost njihove uporabe. Za spremljanje procesa jih moramo potopiti v raztopino za liofilizacijo - v viale. S tem posežemo v sam proces kristalizacije, saj termočleni delujejo kot zunanji sprožilci kristalizacije. Z uporabo termočlenov pa lahko spremljamo samo določeno število vial na serijo. Ena izmed bolj sodobnih in dražjih metod spremljanja procesa nukleacije pa je vgrajena kamera v komori liofilizatorja. (7)

Zmrzovanje s policami (angl. shelf-ramped freezing)

Gre za osnovno ohlajanje vial s policami liofilizatorja, ki jih temperiramo s pomočjo računalniškega programa. S to metodo ne moremo nadzorovati nukleacije. Temperatura tukaj pada linearno. Hitrosti zmrzovanja so razmeroma nizke, v povprečju med 0.1 in 5°C/min, odvisno od zmogljivosti liofilizatorja. Police ne dosegajo visokih hitrosti zmrzovanja zaradi nizke konduktivnosti vode oz. ledu, njune visoke toplotne kapacitete in

omejene prevodnosti med polico in vialami. Za zagotavljanje popolnega strjevanja, moramo vzorce ohladiti pod temperaturo steklastega prehoda - T_g za amorfne in pod T_{eu} za kristalne snovi. Večinoma se kot najnižjo temperaturo programa uporabljajo temperature od -40 do -50°C , ker so to najnižje temperature, ki jih liofilizator lahko doseže (brez dodatnega hlajenja z uporabo tekočega dušika). Popolno strjevanje zahteva tudi izbor ustrezne dolžine faze. Čas strjevanja je odvisen od volumna polnjenja. Velja, da večji kot je volumen polnjenja, več časa je potrebnega za popolno zamrznitev raztopine v viali. V literaturi je mogoče zaslediti priporočilo, da vzorce z volumnom polnjenja do 1 cm, pustimo temperirati eno uro na najnižji temperaturi, vzorce z volumnom polnjenja večjim od 1 cm pa do 2h. Za doseg bolj homogenega zmrzovanja pa vzorce pustimo od 15 do 30 minut na nižani temperaturi polic, med 5 in 10°C ali pa med -5 in -10°C za 30 do 60 min preden začnemo z nalaganjem – to imenujemo faza nalaganja. (4)

Predhodno ohlajene police (*angl. pre-cooled shelf method*)

Police predhodno ohladimo na želeno končno temperaturo (od -40 do -45°C) in nato nanje položimo napolnjene viala. Pri tej metodi se značilno poveča temperatura zmrzišča raztopine (na pribl. -9.5°C) v primerjavi z navadnim ohlajevanjem s policami liofilizatorja. Hitrost zmrzovanja je pri tej metodi počasnejša zaradi zmanjšane nivoja podhladitve. Med vialami je velika variabilnost - heterogenost. Pri uporabi metode in pri prenosu na industrijski nivo pa velja posebna pozornost, da hladne police ne ustvarjajo meglice ob stiku z vlažnim zrakom. (4, 7)

Uporaba organskih sotopil (*angl. non-aqueous co-solvents*)

Uporaba sotopil v formulacijah ima tako prednosti kot slabosti. Prednosti dodatka so, povečanje hitrosti sublimacije, kar vodi v krajši čas sušenja; povečanje močljivosti; izboljšanje lastnosti rekonsitucije; povečanje topnosti zdravilnih učinkovin ali pomožnih snovi v raztopini; povečanje mikrobiološke stabilnosti. Na drugi strani pa kot slabost velja omeniti potencialno nevarnost ostanka rezidualnih topil, ki je lahko neustrezna s toksikološko-regulatornega vidika. (4)

Najbolj uporabljeno organsko sotopilo v formulacijah je terc-butanol. Dobro se meša z vodo, ima visoko točko zmrzišča (24°C) in visok parni tlak pri sobni temperaturi (26.8 mm Hg). Velik, a za enkrat še zelo neraziskan potencial, izkazuje tudi etanol. Glavna ovira pri

izbiri etanola je njegova nizka temperatura zmrzišča, kar posledično zahteva večje zmoglosti kondenzatorja. (4, 13)

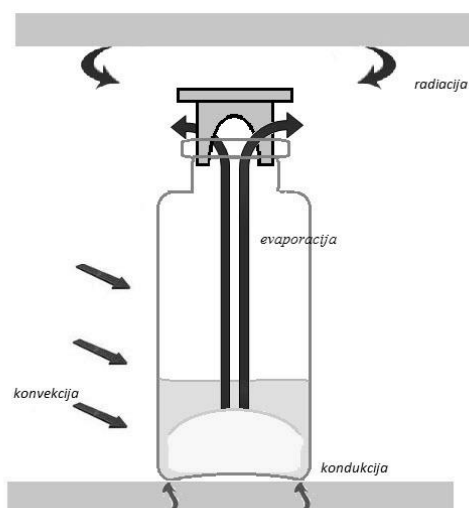
Pri izboru organskega so topila pa je pomembno to, da izbrano topilo popolnoma zmrzne v samem procesu, ker lahko nepopolna zmrznitev vodi do optično neustrezne pogače. (4)

1.3. FAZI SUŠENJA

1.3.1. Primarno sušenje

Faza primarnega sušenja je najdaljša in energijsko najbolj potratna faza procesa. Kritični parametri procesa so izbor temperature in tlaka sušenja, ki so značilni za vsako formulacijo, volumen polnjenja in tip vial posebej. (3)

Pri primarnem sušenju poteka proces sublimacije ledu, prehod iz trdnega v plinasto stanje brez pojava vmesnega tekočega stanja. Je endotermen proces, kar pomeni, da se toplota tekom procesa porablja, zato temperaturo polic, ko spustimo tlak v komori pod vrednost parnega tlaka ledu, dvignemo. Želimo si doseči ravnotežje med porabo toplote za evaporacijo in dovedeno toploto, ki jo dovajamo s kondukcijo, radiacijo in konvekcijo, da ohranimo konstantno temperaturo površine produkta. Procese, ki potekajo med primarnim sušenjem prikazuje slika 5. (3, 4)



Slika 5: Prenos toplote pri primarnem sušenju

Hitrost prenosa vodne pare znotraj komore na kondenzator je funkcija stopnje podtlaka. Na kondenzatorju vodne pare kondenzirajo in se kasneje izločajo iz sistema v obliki odpadne vode. Prehod vode iz parne v tekočo fazo je eksotermen proces, zato je kondenzator neprestano hlajen, da ne pride do nasičenja vodnih par v komori nad produktom. (3) Po končanem primarnem sušenju produkt lahko vsebuje od 15 do 20% vlage v obliki nezmrznjene amorfne vode, ki jo odstranimo s fazo sekundarnega sušenja. (4)

Sublimacijo ali hitrost primarnega sušenja opišemo z naslednjo enačbo:

$$\frac{dm}{dt} = \frac{P_o - P_c}{R_p + R_s}$$

Enačba 1

Kjer je P_o ravnotežni parni tlak ledu pri dani temperaturi produkta, P_c tlak v komori, R_p upor nastale trdne plasti na površini na prenos vlage, R_s pa upor čepa vial. Iz enačbe je razvidno, da je proces sušenja neposredno povezan s procesom zmrzovanja - preko R_p parametra. Pri produktih, kjer pri zmrzovanju nastane večja specifična površina in manjše pore je upornost proti prenosu vlage večja, kar zmanjša hitrost sušenja. Za doseganje večjih hitrosti primarnega sušenja so torej ugodnejše nižje hitrosti zmrzovanja oz. nastanek večjih kristalov. (4, 7) Proces primarnega sušenja se zaključí, ko se izenači temperatura produkta - T_p , s temperaturo polic. (14)

1.3.1.1. Izbir temperature in tlaka sušenja

T_p mora biti v ravnotežju s hitrostjo prenosa toplote in njenim odvajanjem s sublimacijo, ki je neposredno povezana s hitrostjo prenosa mase z vodno paro. Želimo, da je temperatura produkta čim višja, vendar hkrati dovolj nizka, da ne preseže temperature kolapsa - T_c oz. temperature evtektičnega taljenja. (4)

Optimalni temperaturni profil pri konstantnem dovajanju toplote bi bil uporaba višje temperature na začetku faze zaradi manjše upornosti toku par in večje evaporacije, ter nižje temperature proti koncu faze zaradi povečane upornosti in zmanjšanje evaporacije. Pri tem pa moramo biti pozorni na dve omejitvi. Pri previsoki začetni temperaturi lahko pride do taljenja ledu ali pa do prevelike obremenitve kondenzatorja zaradi prevelikega toka par. Zato raje uporabljamo nižje temperature na začetku ter postopno višanje proti koncu.

Za izbor tlaka velja, da se z znižanjem parnega tlaka komore, poveča tlačna razlika med parnim tlakom vodne pare v viali in komoro. Vodne pare iz vial tako hitreje prehajajo v komoro in s tem pospešijo sublimacijo. (14)

Temperatura kolapsa – T_c

Temperatura kolapsa je definirana kot najvišja dovoljena temperatura med fazo sušenja, ki jo lahko dosežemo, ne da bi se pri tem porušil videz pogače. Sušenje nad temperaturo kolapsa ima lahko za posledico izgubo strukture pogače, večjo vsebnost vode v končnem produktu, daljši čas rekonstitucije zaradi zmanjšanje poroznosti ali izgubo aktivnosti pri terapevtskih beljakovinah. Pri popolnoma amorfnem produktu velja, da je T_c enaka temperaturi steklastega prehoda plus dve stopinji, enačba 2. Za popolnoma evtektičen produkt ali evtektične zmes pa je T_c enaka temperaturi evtektične točke, enačba 3. (2)

$$T_c = T_g + 2^{\circ}C$$

$$T_c = T_{eu}$$

Enačbi 2 in 3

1.1.1. Sekundarno sušenje

S sekundarnim sušenjem odstranimo še preostalo vodo v produktu. Voda se lahko nahaja v obliki vezane vode ali kot ostanek topila – rezidualna voda. Večji problem pa predstavlja v produktu vezana voda, ker vpliva na stabilnost. Funkcija sekundarnega sušenja je zmanjšanje vsebnosti vode do te meje, da se onemogoči mikrobiološka rast. Pri sekundarnem sušenju lahko spreminjamo parameter temperature. Produktu dovajamo toploto preko segrevanja polic, predvsem z radiacijo in kondukcijo. Voda se iz produkta odstranjuje s procesom difuzije in desorpcije. Faza sekundarnega sušenja je relativno kratka v primerjavi s fazo primarnega sušenja. (3, 15)

Po končanem sušenju vialo zapremo v inertni dušikovi atmosferi. Doseganje nizkih vsebnosti vode v končnem produktu je izrednega pomena za dolgoročno stabilnost izdelka. (3, 15)

1.4.LIOFILIZATI KOT ZDRAVILA

Učinkovine, ki so prisotne na trgu v obliki liofilizatov za rekonstitucijo raztopin, so učinkovine za zdravljenje tumorjev, bakterijskih ali virusnih okužb, hipertenzije, avtoimunskih bolezni, erektilne disfunkcije in druge. (16)

Kot farmacevtske učinkovine v takih izdelkih lahko nastopajo manjše molekule sinteznega izvora ali večje –kot so beljakovine (biološka zdravila). Za ustrezen končni izgled in aktivnost zdravila po rekonstituciji pa je potreben pravilen izbor pomožnih snovi v formulaciji. Pomožne snovi v liofilizatih imajo predvsem vlogo polnil (sladkorji, aminokislina, polimeri), sopolnil (kompleksirajoči ioni, površinske aktivne snovi, organska sopolnila), pufov (za pripravo raztopin za liofilizacijo in za ohranjanje primerne pH rekonstitucijske raztopine), snovi za izotoniziranje, konzervansov (predvsem v večodmerih rekonstitucijskih raztopinah) in modifikatorjev temperature kolapsa. Uporaba primernih pomožnih snovi se večinoma odraža v ustreznem izgledu končnega izdelka – eleganten videz pogače, stabilnosti končnega izdelka, čas rekonstitucije in za razvoj bolj robusnega in hkrati ekonomsko ugodnejšega procesa liofilizacije. (16)

Najpogosteje uporabljene pomožne snovi so polnila. Ta se pri liofilizaciji uporabljajo predvsem v formulacijah učinkovin z močnim učinkom. Polnila imajo pomembno vlogo tudi pri končnem izgledu liofilizata. Lahko kristalizirajo in s tem omogočajo nastanek por za odvajanje vlage tekom procesa (ustrezna struktura za proces sublimacije) ali pa ostanejo v amorfnem stanju, kar je predvsem priporočljivo za formulacije z beljakovinami (ohranitev aktivnosti). (4) Najpogosteje uporabljena polnila so manitol, glicin, glukoza, saharoza, laktoza, trehaloza in dekstran. Nekatere snovi, kot npr. manitol, pa lahko med procesom kristalizacije kristalizirajo v različnih kristalnih oblikah, kar ima lahko za posledico zmanjšano stabilnost končnega izdelka pri pogojih shranjevanja in transporta. (16)

1.4.1. Polimorfizem

Kristali

Snovi v trdnem agregatnem stanju se lahko pojavljajo v dveh oblikah, amorfni in kristalni. Za amorfnost je značilno, da so atomi v snovi naključno urejeni brez reda v dolgem dosegu in so podobno neurejeni kot atomi v raztopini. Pri kristalih pa so atomi urejeni po pravilnem ponavljajočem vzorcu, ki se translacijsko širi v prostor. Najmanjši element

kristala imenujemo osnovna celica. Dimenzije osnovne celice so opisane s tremi osmi a, b, c ter koti med njimi - alfa, beta in gama. Razmerja med osmi in koti med njimi pa določajo sedem različnih kristalnih oblik, kubično, tetragonalno, trigonalno, heksagonalno, triklinsko in najbolj pojavni obliki, ortorombsko in monoklinsko. (6, 17)

Polimorfi

Polimorfizem je zmožnost trdne snovi, da se lahko pojavlja v različnih kristalnih oblikah, kar je lahko posledica večih različnih dejavnikov, spremembe konformacije molekule, povezovanje molekul v različnih smereh, tautomerije, različnih vzorcev povezovanja preko vodikovih vezi. Polimorfi se medseboj razlikujejo v fizikalnih lastnostih kot so, topnost, hitrost raztapljanja in temperatura tališča ter odzivih v spektroskopskih (IR, Raman, NMR), difrakcijskih (rentgenska praškovna difrakcija) in mikroskopskih lastnostih (atomski mikroskop, vrstični elektronski mikroskop). V naravi velja tendenca, ki jo je opisal Wilhelm Ostwald in sicer, da najprej kristalizira najbolj nestabilen polimorf in ne najbolj stabilen. (18, 19)

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučiti vpliv dveh dejavnikov, sestave topila in hitrosti ohlajanja na fizikalno kemijske lastnosti liofilizatov manitola.

Izbrali smo formulacijo z manitolom, ki daje z izbranim liofilizacijskim ciklom bel in homogen izdelek v obliki pogače. Z manitolom bomo pripravili etanolno-vodne raztopine z različnimi koncentracijami etanola. Pripravljene raztopine bomo nato liofilizirali po različnih liofilizacijskih ciklih, pri katerih bomo varirali le fazo ohlajanja (različne hitrosti ohlajanja, predhodno ohlajene police). Parametrov primarnega in sekundarnega sušenja ne bomo spreminjali. Raztopine bomo ohlajali po programu s policami, za doseganje višjih hitrosti pa bomo uporabili tekoči dušik. Posebej bomo proučevali fazo zmrzovanja in vrednotili posamezne parametre, kot so maksimalna hitrost ohlajanja posameznih raztopin, temperatura zmrzišča in razne opisne spremembe. Vrednotili bomo tudi vpliv predhodno ohlajenih polic, kot eno izmed metod nadzorovane nukleacije.

Pripravili bomo raztopine manitola v vodi in mešanici vode in etanola ter preučevali kristalizacijo z metodo krioramanske spektroskopije.

V naslednji stopnji bo sledilo vrednotenje končnega izdelka. Liofilizate bomo takoj po zaključku cikla liofilizacije vizualno pregledali in jih stehali. S titracijo po Karl-Fischerju bomo vrednotili ostanek vode po sušenju v končnem produktu. Liofilizatom bomo nato določali kristalno sturkutro z ramanskim mikroskopom, rentgensko praškovo difrakcijo in diferenčno dinamično kalorimetrijo ter morfološke lastnosti z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI IN NJIHOVE LASTNOSTI

3.1.1. Izbira pomožnih snovi

Manitol za injekcije

Manitol (D-manitol) je organska spojina z molekulsko formulo $C_6H_8(OH)_6$, po IUPAC-u *heksan1,2,3,4,5,6-heksol*. Kemijsko spada med alkohole. Je bel, kristaliničen prah brez vonja in s sladkim okusom. V farmaciji se uporablja pri osmoterapiji za zniževanje povišanega intrakranialnega pritiska po poškodah glave, pri zdravljenju oligurije kot posledice zmanjšane zmogljivosti ledvic, zaužit peros pa deluje kot odvajalo.

Kot polnilo se lahko uporablja v tabletah in liofilizatih. Zaradi svojih nehigroskopskih lastnosti se lahko pojavlja tudi v kombinaciji z na vlago občutljivimi učinkovinami. V liofilizatih se pogosto uporablja zaradi svojih lastnosti, kot so visoka evtektična temperatura $-1,5^{\circ}\text{C}$ (temperatura steklastega prehoda raztopine -31°C), (20) kar omogoča izbor višjih temperatur sušenja. Ima visoko tendenco kritalizacije iz vodnih raztopin in visoko temperaturo tališča (od 164 do 169°C) (21). Zaradi zgoraj naštetih lastnosti liofilizati z manitolom tvorijo trdno, homogeno pogačo elegantnega videza. Manitol se lahko pojavlja v petih trdnih oblikah - v amorfni obliki, v obliki hidrata ali v obliki treh polimorfni oblik, alfa - α , beta - β , delta - δ . Amorfn in hidratna oblika manitola sta metastabilni obliki in lahko obstajata le pri nizkih temperaturah zmrzovanja ter hitro rekristalizirata pri pogojih okolja. V naših poskusih smo uporabljali komercialni manitol za injekcije v beta kristalni obliki. (22-26). Določili smo topnost manitola v različnih medijih, kot prikazuje preglednica I.

Topnost manitola v različnih medijih pri T 20°C	
V vodi	V razmerju 1 : 5,5 (27)
V etanolu	V razmerju 1 : 83 (27)
V mešanici vode in etanola	V razmerju 15 % raztopina: 1 : 10* V razmerju 30 % raztopina: 1 : 15* V razmerju 40 % raztopina: 1 : 22*

Preglednica I: Topnost manitola v različnih medijih

*vrednosti so bile določene eksperimentalno

3.1.2. Izdelava vzorcev

Priprava raztopin za liofilizacijo

Za vsak liofilizacijski cikel smo pripravili štiri različne raztopine ki smo jih označili s črkami od a do d, kot prikazuje preglednica II.

formulacija	mantiol [g]	etanol [ml]	voda za injekcije (WFI) [ml]
a	3	2,5	Ad 100
b	3	5	Ad 100
c	3	7,5	Ad 100
d	3	10	Ad 100

Preglednica II: Sestava raztopin za liofilizacijo

Na tehtalni čolniček smo zatehtali 3 g *manitola za injekcije* za vsak vzorec posebej in natehtano količino kvantitativno prenesli v 300 ml erlenmajerice.

Pripravili smo vodne raztopine etanola štirih različnih koncentracij. V vsako bučko posebej smo odmerili po 2,5; 5,0; 7,5 in 10,0 ml 96% *etanola za uporabo v farmaciji*. Z *vodo za injekcije* smo dopolnili do oznake. Bučke smo zaprli in premešali.

V naslednjem koraku smo natehtan *manitol* prelili z vodno raztopino etanola in na magnetnem mešalu mešali pet minut oz. do popolne raztopitve. Bistvo, brezbarvno raztopino smo nato razdelili na deset enakomernih volumskih delov (deset vial).

Oznaka vzorcev

Vzorci so označeni po formulaciji in po pogojih procesa. Črke so označevale koncentracijo etanola v sestavi topila, številke pa hitrost ohlajanja. Preglednica III prikazuje primer označevanja vzorcev

Proces		Formulacija	
Oznaka vzorca	hitrost zmrzovanja [K/min]	Oznaka podvzorca	koncentracija etanola [%]
001T	0,5	a	2,5
002T	2,5	b	5,0
003T	5,0	c	7,5
004T	7,5	d	10,0
005T	police ohlajene na -45°C		
006T	police ohlajene na -45°C*		
007T	10,0		

Preglednica III: Oznaka vzorcev

**Vzorec 006T je ponovitev vzorca 005T*

Liofilizacijski proces

Pripravljene raztopine po zgoraj opisanem postopku smo polnili v 20 ml vialo z oznako A20-C25. V vsako vialo smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 10 ml raztopine. Že napolnjene vialo smo pokrili s čepi za liofilizacijo oznake FM460.

Pogoji liofilizacije so predstavljeni v preglednici IV in V. Obarvani koraki predstavljajo razlike v hitrostih ohlajanja med cikli.

Program liofilizacije po korakih				
Korak:	Faza:	čas	T	Tlak (mbar)
1.	Zmrzovanje A	00:30	+5	
2.		06:00	+5	
3.	Vzorec 001T	01:40	-45	
	Vzorec 002T	00:20	-45	
	Vzorec 003T	00:10	-45	
	Vzorec 004T	00:07	-45	
	Vzorec 007T	00:05	-45	
4.		03:00	-45	
5.	Annealing	02:00	-15	
6.		03:00	-15	
7.	Zmrzovanje B	02:00	-45	
8.		02:00	-45	
9.	Primarno sušenje	00:05	-45	0,420
10.		10:00	-45	0,420
11.		03:00	-10	0,420
12.		20:00	-10	0,420
13.	Sekundarno sušenje	03:20	+30	0,420
14.		03:00	+35	0,420
15.		00:05	+35	0,420
16.		07:00	+35	0,420

Preglednica IV: Program liofilizacije za vzorec 001T, 002T, 003T, 004T in 007T.

Vzorec 005T in vzorec 006T

Viale položimo na **predhodno ohlajene police**.

Vzorec 006T je ponovitev vzorca 005T.

Program liofilizacije po korakih				
Korak:	Faza:	čas	T	Tlak (mbar)
1.	Zmrzovanje A	0:00	-45	
2.		00:07	-45	
3.		15:00	-45	
4.	Annealing	02:00	-15	
5.		03:00	-15	
6.	Zmrzovanje B	02:00	-45	
7.		02:00	-45	
8.	Primarno sušenje	00:05	-45	0,420
9.		10:00	-45	0,420
10.		03:00	-10	0,420
11.		20:00	-10	0,420
12.	Sekundarno sušenje	03:20	+30	0,420
		03:00	+35	0,420
		00:05	+35	0,420
		07:00	+35	0,420

Preglednica V: Program liofilizacije za vzorca 005T in 006T

Priprava raztopin za vrednotenje mehanizma kristalizacije manitola

Pripravili smo različne raztopine manitola (manitol za injekcije, beta kristalna oblika) kot prikazuje preglednica VI.

	Sestava raztopine	
	delež manitola [%]	delež etanola [%]
raztopina 1 - vodna raztopina	3	/
raztopina 2 - vodna raztopina	Nasičena raztopina	/
raztopina 3 - etanolna raztopina	3	5
raztopina 4 - etanolna raztopina	Nasičena raztopina	5
raztopina 5 - etanolna raztopina	Nasičena raztopina	96

Preglednica VI: Sestava raztopin

Raztopino 2 in 4 smo pripravili tako, da smo s pomočjo podatka topnosti manitola v etanolno-vodni raztopini in v vodi pripravili nasičeno raztopino, ki smo jo nato večkrat filtrirali, da smo se znebili že prisotnih kristalizacijskih jeder. Filtrirani raztopini 2 in 4 smo nato razdelili na dve paralelki, ki ju imenujemo a in b. Paralelki a, 1a in 2a, smo pustili nekaj časa stati na zraku pred dodatkom netopila, paralelkam b, 1b in 2b, pa smo naenkrat dodali takšno količino netopila (v obeh primerih etanola), da smo tvorili 40% etanolno raztopino. Vrednotili smo nastale kristale, ki so po filtraciji ostali na filter papirju – v nadaljevanju jih imenujemo filtrati.

Raztopine 1,2,3,4 in 5 smo vrednotili s pomočjo sklopitve mizice “Freeze-drying” mikroskopa z Ramanskim mikroskopom – kar v nadaljevanju imenujemo krioramanska spektroskopija in spremljali proces zrmzovanja. Vzorec smo ohlajali na -30°C s pomočjo tekočega dušika. Doseženo temperaturo smo ohranjali tekom procesa vrednotenja.

3.1.3. Oprema

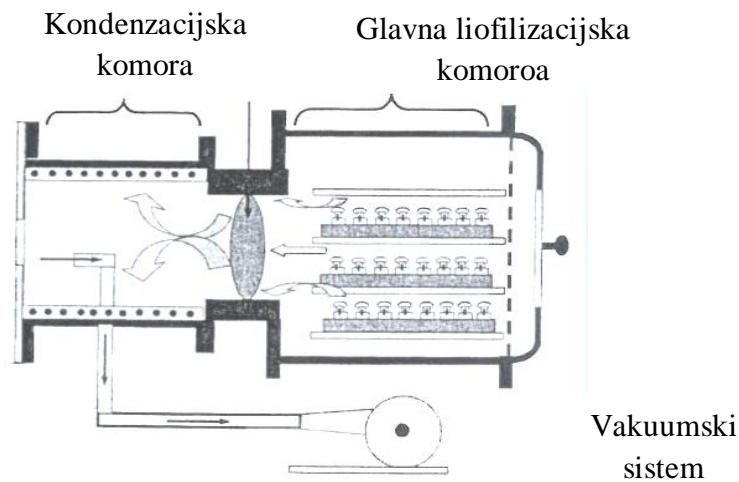
Za pripravo raztopin smo uporabili naštetu opremo v preglednici VII.

Tehtnica Sartorius BP 1200
Magnetno mešalo IKA
Avtomatska pipeta eLine z 50 ml nastavkom
Liofilizator CHRIST Epsilon 2-6D, Velika Britanija

Preglednica VII: Tehnološka oprema

Liofilizator

Liofilizator je naprava, v kateri poteka proces liofilizacije. Sestavljena je iz glavne liofilizacijske komore, kondenzacijske komore in vakuumskega sistema, kot prikazuje slika 6.



Slika 6: Shematski prikaz sestave liofilizatorja (28)

Glavno liofilizacijsko komoro sestavljajo funkcionalne police, na katere položimo vialice, ter zgornja polica, ki služi prenosu toplote z radiacijo in zapiranju vial s spuščanjem polic ob koncu cikla. Police so napolnjene s tekočino »heat transfer fluid«, z generičnim imenom SLYOTHERM XLT, kemijsko *dimetil polisiloksan*. Police lahko premikamo v vertikalni smeri navzdol s pomočjo hidravličnega sistema in tako potiskamo čepce v vialice po zaključku cikla (v dušikovi atmosferi) in pred odprtjem komore. Funkcije glavne liofilizacijske komore so zagotavljanje ustrezne temperature, tlaka in primerne izolacijskega okolja za izdelek med procesom. Funkcija kondenzacijske komore pa je odstranjevanje vodnih par iz glavne liofilizacijske komore s pomočjo vakuumskega sistema. Vakuumski sistem pa s pomočjo kondenzatorja ustvarja tlak primeren za izvedbo faz sušenja. (29)

3.2. ANALITSKE METODE

3.2.1. Proučevanje zmrzovanja etanolno vodnih raztopin manitola

Z namenom natančnejšega vrednotenja faze ohlajanja, smo ponovno pripravili raztopine a, b, c, in d formulacije kot prikazuje preglednica II. Z uporabo brezžičnih termočlenov TEMPRIS® proizvajalca iQ mobil, smo vrednotili obnašanje raztopine ob izpostavitvi pogojem ohlajanja. Odločili smo se za spremljanje vzorcev 002T, 003T, 004T, 006T in 007T. Vzorca 005T nismo mogli ponoviti, vzorec 001T pa smo izpustili zaradi nizke hitrosti ohlajanja (vrednotili smo ga iz originalnega seta podatkov za primerajvo).

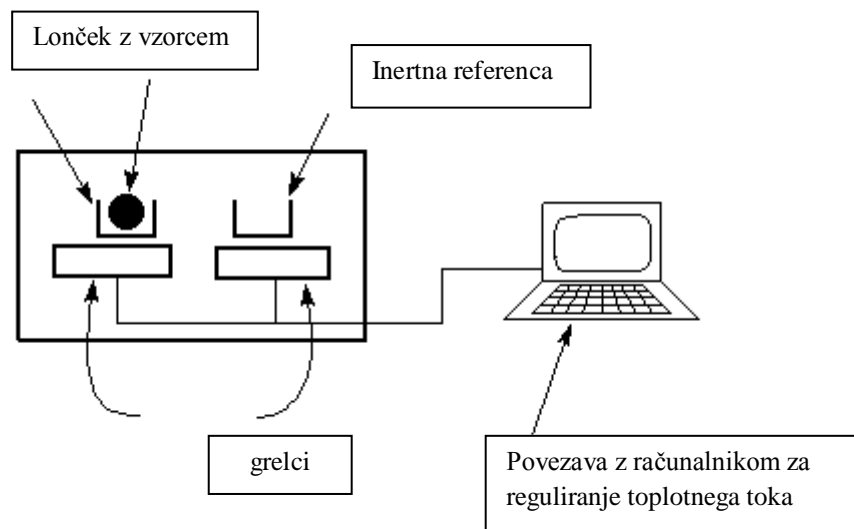
3.2.2. Merjenje termičnih lastnosti snovi z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije – DSC

Termična analiza je ime za skupino metod, pri katerih merimo določeno fizikalno lastnost snovi kot funkcijo temperature v določenem času. (30)

Metode termične analize se na področju liofilizacije uporabljajo za optimizacijo in karakterizacijo liofilizacijskih ciklov in končnih produktov, kot npr. predhodno določanje evtektične temperature. (31)

Metoda diferenčne dinamične kalorimetrije (v nadaljevanju *DSC*) je ena izmed metod termične analize pri kateri primerjalno merimo razliko v toplotnem toku - energija v obliki toplote na enoto časa, med vzorcem in inertno referenco, pri kateri v danem temperaturnem območju ne prihaja do sprememb. Z drugimi besedami, merimo toplotno energijo, ki je potrebna, da med vzorcem in referenco ne pride do temperaturnih razlik, in je enaka toploti, ki se porablja ali sprošča pri kemijskih reakcijah ali faznih prehodih v vzorcu. (32, 33) Shematski prikaz načina delovanja prikazuje slika 7.

Z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije na instrumentu Mettler Toledo DSC1 Star^e System smo vrednotili liofilizate. Vzorec in referenco, vsako v svojem aluminijastem lončku, postavimo na enoten dovod toplote. Instrument s pomočjo *Fourier*-jevih transformacij odziv matematično pretvarja v dve vrsti toplotnih sprememb- reverzibilne in ireverzibilne. (33)

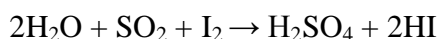


Slika 7: shematski prikaz delovanja DSC (34)

3.2.3. Analiza ostanka vode po sušenju s titracijo po Karl Fischerju

Karl Fischer titracija (v nadaljevanju KF) je pogosto uporabljen analitski pristop določanja vode v izdelku, ki temelji na Bunsenovi reakciji.

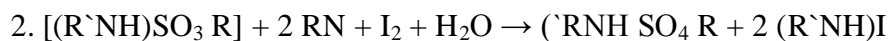
Del Bunsenove reakcije, ki se uporablja za določanje vode, je prvi korak v žveplo-jodni reakciji produkcije vodika. Gre za kemijsko reakcijo nastanka žveplove kisline in vodikovega jodida iz vode, žveplovega dioksida in joda, kot prikazuje spodnja kemijska enačba. (35, 36)



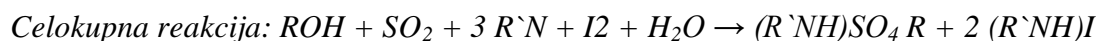
Enačba 4

Pri KF titraciji v reakcijo vstopajo žveplov dioksid, jod in baza (pridin ali imidazol), ki ima vlogo pufra, oz. nevtralizira nastajajoče kisline in reakcijo potiska v desno.

Vzorec, kateremu želimo izmeriti vsebnost vode najprej raztopimo v metanolu (lahko pa tudi v drugih organskih topilih, kot npr etanol, 2-propanol, dietilen glikol monoetilni eter, ali mešanici), nato dodamo še žveplov dioksid in pridin. Potek reakcije prikazujejo spodnje kemijske enačbe:



Enačbi 5 in 6



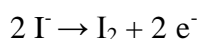
Enačba 7

V prvi stopnji gre za reakcijo med alkoholom, žveplovim dioksidom in bazo do nastanka alkilsulfatnega intermediata, ki ga v naslednjem koraku jod oksidira do alkilsulfatne soli. Pri reakciji se porablja voda. Poraba vode je sorazmerna s porabo joda, torej v razmerju 1:1. Ko se porabi vsa voda, določimo presežek joda na indikatroski elektrodi in to označuje konec titracije.

Količino vode prisotne v preučevanem vzorcu izračunamo na podlagi razlike med količino joda na začetku v KF reagentu in količino porabljenega joda med reakcijo. (36, 37)

Poznamo dva tipa KF titracije, volumetrično in kulometrično, ki se razlikujeta po načinu odmerjanja joda v sistem reakcije. Pri volumetričnem določanju joda vzorec raztopimo v izbranem alkoholu in raztopino titriramo z mešanico reagentov z znano koncentracijo joda do rdeče-rjavega obarvanja. Iz presežka in znanega razmerja med jodom in vodo izračunamo vsebnost vode v vzorcu. Volumetrična metoda določitve se uporablja za vzorce, kjer je voda prisotna v večinskem deležu. (36, 37)

Kulometrična določitev joda temelji na elektrokemijskem nastanku joda *in-situ* z oksidacijo jodida v jod na anodi, kot prikazuje spodnja kemijska enačba. (36, 37)



Enačba 8

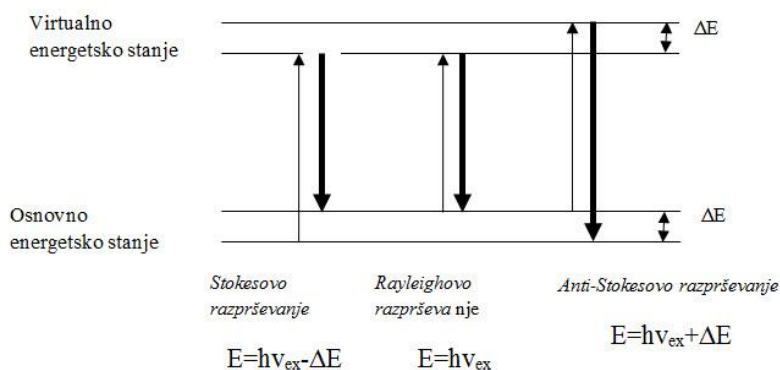
Količina titrirane vode je proporcionalna količini prenesenega naboja, potrebnega za nastanek joda. Končno točko titracije pa določa padec napetosti na merilni elektrodi, zaradi povečanja količine prostega I_2 v raztopini. Kulometrična metoda se uporablja za vzorce, kjer je voda prisotna v sledovih (od 1 ppm do 5%).(36, 37)

Vodo določamo po volumetrični metodi, z uporabo enokomponentnega reagenta (titrant vsebuje raztopino žveplovega dioksida, joda, imidazola in alkohola). Kot topilo uporabimo brezvodni metanol. Meritev izvedemo na Mettler Toledo V 30 Volumetric KF titrator. V celico najprej avtomatično prečrpamo brezvodni metanol. Aparat s pomočjo avtomatske birete dozira količino reagenta (Riedel-de Haen (Fluka) Hydranal Composite 2 ali Composite 5), da odstranimo morebitno prisotno vodo v metanolu. Vzorec približno natehtamo (natehtno pa natančno zapišemo) ter kvantitativno prenesemo v celico. Tehtanje in prenašanje opravimo čim hitreje, da se na vzorec ne veže atmosferska vlaga. Avtomatski

titrator odmerja količino reagenta dokler se ne porabi vsa voda v vzorcu. Običajno končno točko določimo z merjenjem potenciala med dvema platinastima elektrodama, potopljenima v raztopino vzorca – voltametrična titracija. Pri voltametrični titraciji dodajanje KF titranta povzroči padec napetosti v celici. Aparat nam poda rezultat v obliki deleža vode v vzorcu.

3.2.4. Ramanska spektroskopija

Ramanska spektroskopija je spektroskopska analizna metoda, s katero lahko izmerimo moč in valovno dolžino svetlobe, ki se sipa na molekulah. Vzorec obsevamo z močnim laserskim virom vidne ali bližne infrardeče monokromatske svetlobe. Molekula absorbira foton, kar povzroči prehod elektronov iz osnovnega energetskega stanja v višji virtualni energetske nivo kot prikazuje slika 8. Vzbujeno stanje je nestabilno, zato se molekula vrne v osnovno stanje in ob tem izseva foton. Med procesom pride do izmenjave energije med fotoni in molekulami vzorca, pri čemer je lahko energija razpršenih fotonov nižja ali višja od energije fotonov na začetku. Večina izsevanih fotonov je pri isti energiji, kar imenujemo elastično sipanje ali t.i. *Rayleighovo sipanje*. Sprememba energije sipanja fotona pa je posledica rotacije in vibracije molekul v vzbujenem stanju. Ramanski spekter je sestavljen iz dela z nizko frekvenčno emisijo, t.i. *Stokesovo sipanje*, in dela z visoko frekvenčno emisijo – *anti-Stokesovo sipanje*. V obeh primerih gre za ne-elastičen tip sipanja. Sipanje Ramanskega spektra je v primerjavi z Rayleighovim šibkejše, zato optični frekvenčni filter spusti na detektor le odzive ramanskega spektra. (38, 39)



Slika 8. shema prehodov iz osnovnega v virtualno energetske stanje

Liofilizate smo vrednotili z Reinshaw in Via Raman mikroskopom (IR laser, 1200 nm / 785 nm, streamline; rdeč laser, 1800, 633, streamline). Z analizo z ramanskim mikroskopom

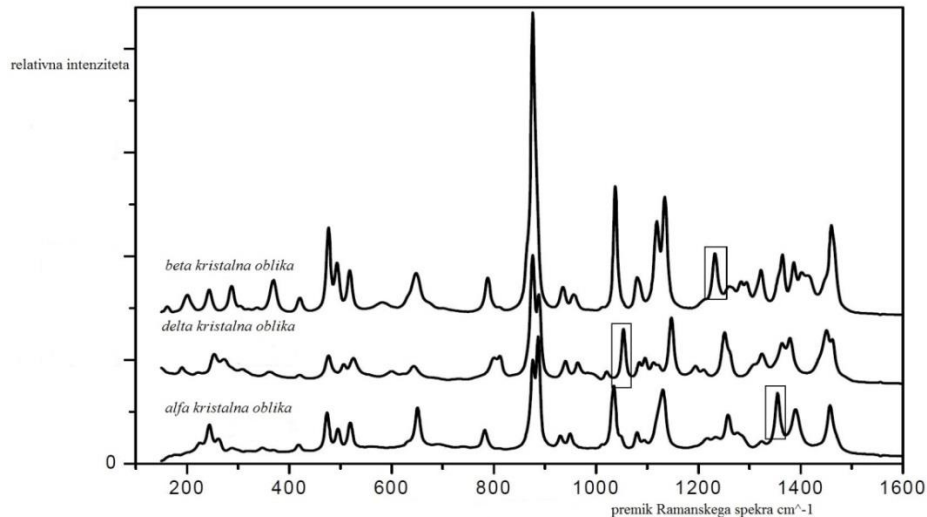
smo želeli določiti pojavnost kristalnih oblik manitola v vzorcih liofilizatov in njihov delež kvantitativno ovrednotiti.

Liofilizate smo odprli tik pred meritvijo, jih homogeno premešali in jih s spatulo nanegli na objektno steklo, ki smo ga predhodno očistili z robčki, ki ne odpuščajo vlaken. Vzorce smo nanegli tako, da smo dobili ravno in rahlo zbito površino. Pri nanosu pa moramo biti pozorni, da vzorca pretirano ne teptamo, da ne porušimo strukture kristalov.

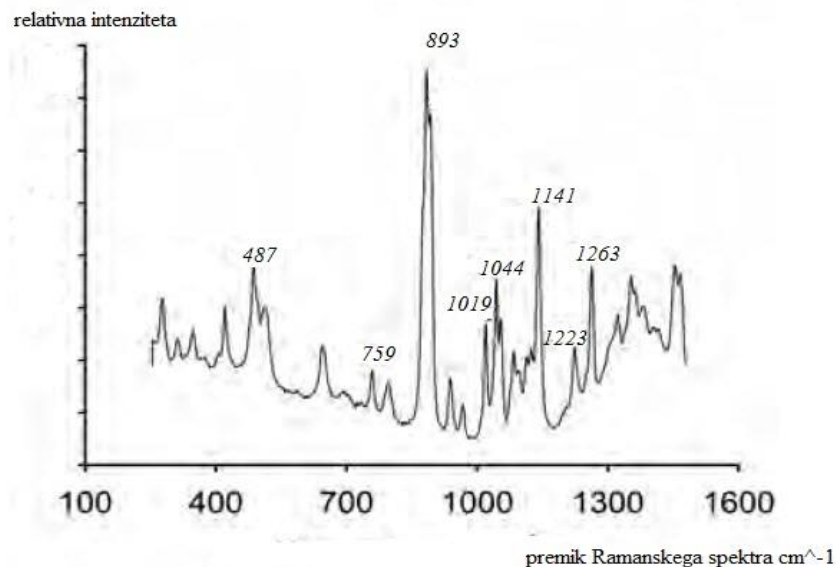
Meritev smo izvedli pri 20-kratni povečavi objektiv in 100 % moči laserja. Izdelali smo mapo, sestavljeno iz skupno 16 slik (4x4), ki jih je inštrument posnel od točke, kjer smo izostrili sliko. Znotraj slik smo izbrali mapo pravih kvadratkov v izmeri 7.1x7.1 mikrometrov pri IR laserju in 6.5 x 6.5 mikrometrov pri rdečem laserju, kar v povprečju ustreza od 20-25 tisoč spektrov na vzorec. Čas izpostavljenosti posameznega kvadrata je 4 sekunde pri IR laserju in 10 sekund pri rdečem laserju.

Zaradi okvare IR laserja, smo meritev preostalih vzorcev (od vzorca 005Tc naprej) nadaljevali na rdečem laserju. S snemanjem na referenčnih vzorcih (določanje moči laserja, intenzitete odziva in časa snemanja) smo na rdečem laserju dobili primerljivo metodo z metodo, ki smo jo razvili za IR laser.

Kočne spektre smo primerjali s prileganjem spektrov čistih alfa, beta in delta oblik. Primer ramanskega spektra čistih oblik prikazuje slika 9 (označeni so značilni vrhovi za posamezno obliko), slika 10 pa prikazuje tipičen ramanski spekter manitol hidrata. Podatke prileganja dobimo v številčni obliki s pomočjo korelacije prvega odovoda. S histogrami določimo porazdelitev podatkov, sredino porazdelitve in standardni odklon. Iz sredine porazdelitve podatkov vseh treh kristalnih oblik sklepamo na kvantitativno pojavnost v vzorcu. Ramanski spekter tipično odraža kemijske vezi v trdnih vzorcih kristalne okolice, zato običajno razlikuje med različnimi kristalnimi oblikami.



Slika 9: Ramanski spekter čistih kristalnih oblik alfa, beta in delta manitola



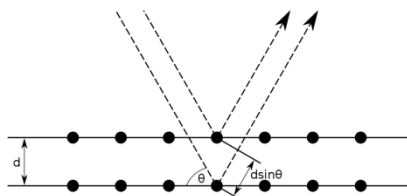
Slika 10: Ramanski spekter manitol hidrata (40)

3.2.5. Rentgenska praškovna difrakcija (ang. *PXRD*)

Rentgenska praškovna difrakcija je metoda identifikacije kristalnih snovi. Oblika difrakcijskega spektra je značilna za posamezno kristalno strukturo tudi v vzorcih, kjer je prisotnih več različnih oblik (npr. različne kristalne oblike), zato je metoda primerna tudi za karakterizacijo in identifikacijo polikristalnih faz. (41, 42)

Metoda rentgenske praškovne difrakcije temelji na koherentem sipanju elektromagnetnega polja na elektronih v atomih. Ko rentgenski žarek zadene atom, vzbudi elektronske prehode v nižjih elektronskih lupinah atomov. Ob prehodu elektronov v ravnovesno stanje, izseva foton rentgenskega sevanja v poljubni smeri. Vsak od elektronov postane vir

rentgenskega sipanja. Pri kristalnih strukturah, kjer so atomi tridimenzionalno pravilno urejeni, pride do konstruktivne interference v določenih smereh odboja žarka, kar vodi do uklona. V tem primeru je razlika poti žarka od izvora preko centra sipanja do detektroja enaka mnogokratniku valovne dolžine uporabljenega elektromagnetnega sevanja, kot prikazuje slika 11. Pri ostalih kotih pa prihaja do destruktivnih interferenc. (41, 42)



Slika 11: Prikaz poti žarka pri rentgenski praškovni difrakciji

Za analizo uporabimo majhne delce praška. Metoda temelji na dejstvu, da so delci v vzorcu naključno porazdeljeni kar omogoča, da se vhodni žarek načeloma uklanja na vseh prisotnih ploskvah v kristalu. Merili smo na inštrumentu X`Pert PRO MPD, z refleksijsko tehniko, CuK α radiacija, v območju od 2 do 40° 2 θ (korak 0,033° 2 θ , 50s na korak), reže V10.

3.2.6. Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Vrstična elektronska mikroskopija je vrsta elektronske mikroskopije, ki za opazovanje površine uporablja elektronski curek. V vsaki točki, na katero je usmerjen elektronski snop, nastajajo različne vrste elektronov in elektromagnetna valovanja. Meritev poteka tako, da je vzorec izpostavljen curku elektronov, ki trči s površino vzorca. Pri tem se generirajo različni signali, ki so posledica elastičnih ali neelastičnih deformacij. Elastična deformacija so v tem primeru odbiti elektroni s površine vzorca, ki ohranijo začetno energijo. Neelastične deformacije nastanejo kot posledica prenosa energije elektrona na površino vzorca, kar ima za posledico odboj sekundarnih, Augerjevih elektronov oz. UV ali rentgenskih žarkov. Elektroni elastičnih in neelastičnih deformacij se nato zbirajo na detektorju, ki izriše sliko pri povečavah površine od 10 do 1000000-krat. (43, 44)

Vrstični elektronski mikroskop je sestavljen iz 5 osnovnih delov, t.i. elektronske puške, v kateri se generira snop pospešenih elektronov; elektronskih leč za fokusiranje in odklanjanje elektronskega curka, detektorja, ki sprejema elektrone in elektromagnetna valovanja, ki nastanejo pri interakciji elektronov s površino vzorca; vakuumске enote, ki zagotavlja nizek tlak v komori; in računalniškega vmesnika za prikaz in obdelavo slike. (43, 44)

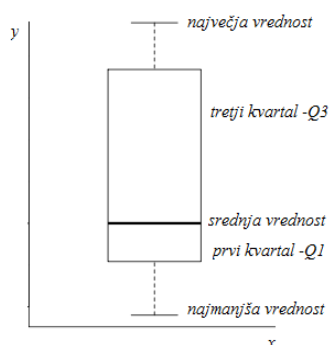
S SEM metodo vrednotimo morfološke lastnosti liofilizatov. Za analizo smo liofilizate odprli tik pred meritivijo, jih s spatulo homogeno premešali in nanegli na kovinske nosilce, ki smo jih predhodno prevlekli z obojestranskim lepilnim trakom. Nanesli smo majhno količino vzorca v tankem sloju, pri čemer smo morali biti previdni, da presežek vzorca nismo teptali ampak smo ga odpihnili s komprimiranim zrakom. Tako pripravljene vzorce smo vstavili na držalo in v komoro. Komora z vzorci omogoča hitro premikanje držala v različnih smereh in med različnimi vzorci. Meritve smo izvedli z JEOL JSM-700 IF vrstičnim elektronskim mikroskopom z metodo sekundarne elektronske emisije.

3.2.7. Statistične metode vrednotenja rezultatov

Dobljene rezultate smo vrednotili s programoma Microsoft Excel in MiniTab 16 Statistical Software. Podatkom smo določili povprečno vrednost in standardni odklon. Grafično smo podatke predstavili z metodami škatle z brki, histogrami, analizo varianc in sipanjem podatkov dveh spremenljivk.

Škatla z brki

Škatla z brki je neparametrična vrsta grafične ponazoritve skupine podatkov v opisni statistiki. Sestavljena je iz petih delov: najmanjše vrednosti, prvega kvartila - Q1 (kjer je do 25% vseh podatkov), srednje vrednosti - Q2 (kjer je do 50% vseh podatkov), tretjega kvartila - Q3 (kjer je do 75% vseh podatkov) in največje vrednosti. Razmiki med posameznimi deli škatle dajejo podatek o sipanju in asimetriji podatkov. Škatla z brki prikazuje tudi odstopajoče točke ali t.i. osamelce. Primer škatle z brki prikazuje slika 12. (45)



Slika 12: Škatla z brki

4. REZULTATI

4.1. VIZUALNO VREDNOTENJE LIOFILIZATOV

Po končani liofilizaciji smo posneli fotografije nastalih liofilizatov. WFI označuje vodo za injekcije, E pa koncentracijo etanola.



Slika 13: Vzorec 001T

Vzorci 001T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 001T/b (manitol + WFI + 5 E), 001T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 001T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 1 (ohlajanje s policami s hitrostjo 0,5°/min).



Slika 14: Vzorec 002T

Vzorci 002T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 002T/b (manitol + WFI + 5 E), 002T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 002T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 2 (ohlajanje s tekočim dušikom s hitrostjo 2,5°/min).



Slika 15: Vzorec 003T

Vzorci 003T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 003T/b (manitol + WFI + 5 E), 003T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 003T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 3 (ohlajanje s tekočim dušikom s hitrostjo 5°/min).



Slika 16: Vzorec 004T

Vzorci 004T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 004T/b (manitol + WFI + 5 E), 004T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 004T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 4 (ohlajanje s tekočim dušikom s hitrostjo 7,5°/min).



Slika 17: Vzorec 005T

Vzorci 005T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 005T/b (manitol + WFI + 5 E), 005T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 005T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 5. Vzorce postavimo na predhodno ohlajene police.



Slika 18: Vzorec 006T

Vzorci 006T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 006T/b (manitol + WFI + 5 E), 006T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 006T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 5 (ponovitev vzorca 5). Vzorce postavimo na predhodno ohlajene police.



Slika 19: Vzorec 007T

Vzorci 007T/a (manitol + WFI + 2,5 E), 007T/b (manitol + WFI + 5 E), 007T/c (manitol + WFI + 7,5E) in 007T/d (manitol + WFI + E) so bili liofilizirani po liofilizacijskem ciklu 7 (ohlajanje s tekočim dušikom s hitrostjo $10^{\circ}/\text{min}$).

4.2. VREDNOTENJE MASE LIOFILIZATOV

Za vrednotenje mase končnih liofiliziranih produktov smo na začetku zatehtali 10 praznih vial, po zaključku vsakega cikla pa vse vzorce, ki smo jih liofilizirali. Podatek o masah praznih vial smo uporabili za izračun neto mase produkta za vse vzorce.

Rezultati, povprečja desetih meritev, so predstavljeni v preglednici VIII.

vzorec	masa	SD	vzorec	masa	SD
001Ta	23,45	0,2	004Tc	23,39	0,16
001Tb	23,52	0,14	004Td	23,44	0,12
001Tc	23,39	0,13	005Ta	23,4	0,17
001Td	23,49	0,1	005Tb	23,26	0,18
002Ta	23,33	0,17	005Tc	23,37	0,19
002Tb	23,34	0,12	005Td	23,4	0,15
002Tc	23,27	0,15	006Ta	23,64	0,1
002Td	23,3	0,16	006Tb	23,57	0,1
003Ta	23,39	0,15	006Tc	23,54	0,1
003Tb	23,37	0,17	006Td	23,61	0,11
003Tc	23,48	0,11	007Ta	23,56	0,08
003Td	23,27	0,2	007Tb	23,61	0,16
004Ta	23,28	0,11	007Tc	23,44	0,14
004Tb	23,43	0,15	007Td	23,59	0,11
masa praznih vial:				23,054	
SD praznih vial				0,16	

Preglednica VIII: Mase vial po vzorcih in mase praznih vial

4.3. VSEBNOST VODE V LIOFILIZATIH

Z metodo določanja vode po Karl-Fischerju smo določili ostanek vode po sušenju v končnem liofiliziranem produktu. Rezultati so predstavljeni v *prilogi 1*.

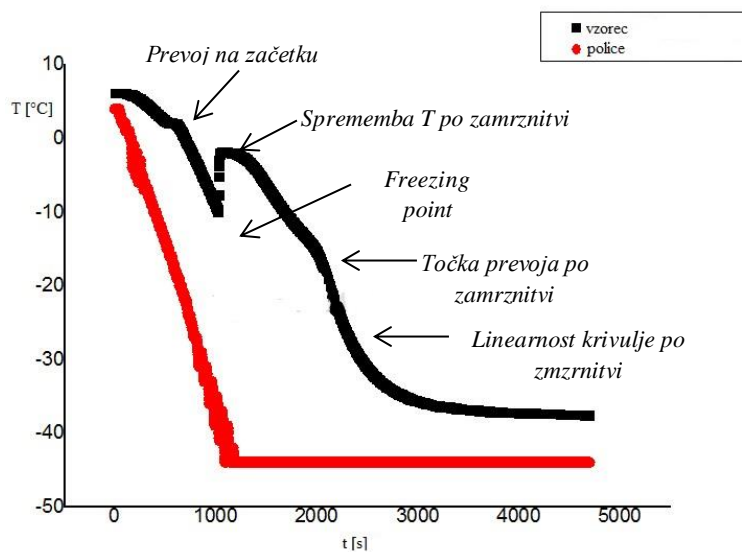
Vrstni red naraščanja vsebnosti vode po vzorcih je naslednji:

001Ta> 006Tb> 001Tb> 001Td > 006Ta> 001Tc> 007Ta> 007Td > 003Ta> 004Tb>
002Ta> 006Tc> 002Td> 002Tb> 007Tc> 004Ta> 007Tb> 005Td> 005Ta> 006Td
>003Tc> 003Tb> 004Td> 004Tc> 005Tc> 002Tc> 003Td> 005Tb

kjer je vzorec 001Ta vzorec z največjim deležem vode, vzorec 005Tb pa z najmanjšim.

4.4. PROUČEVANJE ZMRZOVANJA ETANOLNO VODNIH RAZTOPIN MANITOLA

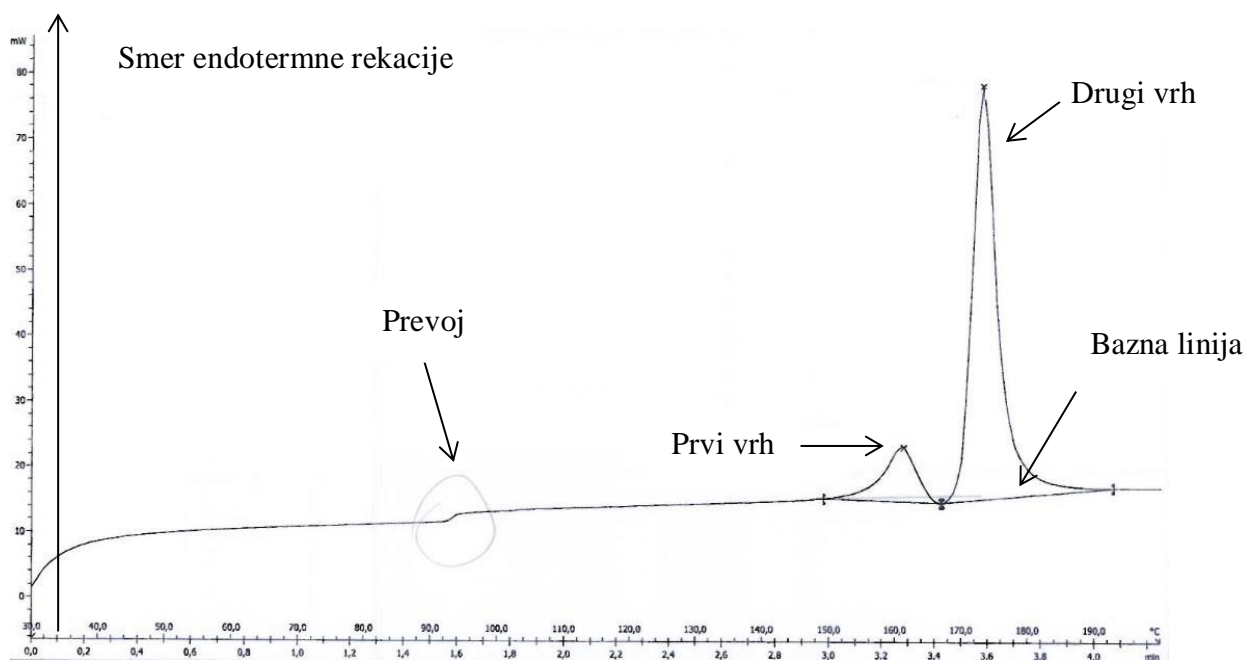
Z brezžičnimi termočleni TEMPRIS® proizvajalca iQ mobil smo spremljali obnašanje raztopin ob ohlajanju na sekundo natančno (zmogljivost analognih termočlenov pa omogoča spremljanje zgolj na minuto natančno). Vzorce smo spremljali v dveh paralelkah hkrati. Paralelka 1 je bila pozicionirana bližje vratom, paralelka 2 pa globlje v liofilizator. Dobili smo podatke iz termočlenov o temperaturi vzorcev in podatke liofilizatorja o obnašanju polic ter jih s pomočjo programskega orodja *Origin 8.0* interpolirali na enako skalo. Iz dobljenih podatkov smo grafično odčitali temperature zmrzovanja (kasneje označeno kot *freezing point*), spremembo temperature po zamrznitvi ter maksimalno hitrost ohlajanja na termočlenu, ki nam je dala podatek o hitrosti ohlajanja raztopine. Maksimalno hitrost smo vrednotili z naklonom premice pri linearnem prilaganju in z minimumom prvega odvoda. Način vrednotenja prikazuje slika 20, rezultati in nekatere opisne spremembe krivulj pa so predstavljeni v *prilogi 2*.



Slika 20: Vrednotenje krivulje ohlajanja raztopine manitola

4.5. METODA DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIEMTRIJE (DSC)

Liofilizate smo analizirali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije in vrednotili termične spremembe med segrevanjem vzorcev od 0 do 200°C. Zgornjo temperaturno mejo smo določili iz literarnih podatkov tališča manitola, od 164-169°C (20). Primer vrednotenja termograma prikazuje slika 21, termične spremembe liofilizatov manitola iz termogramov so opisane v *prilogi 3.*, termogrami vseh vzorcev pa v *prilogi 4.*

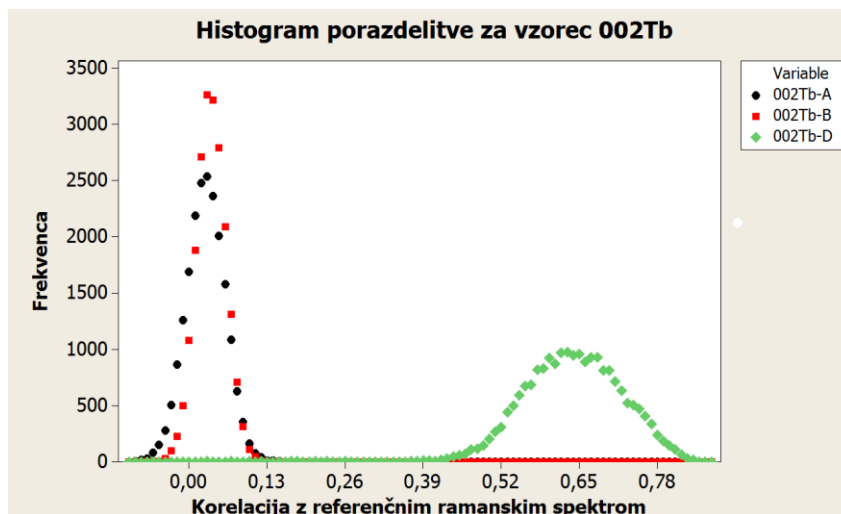


Slika 21: Vrednotenje termograma

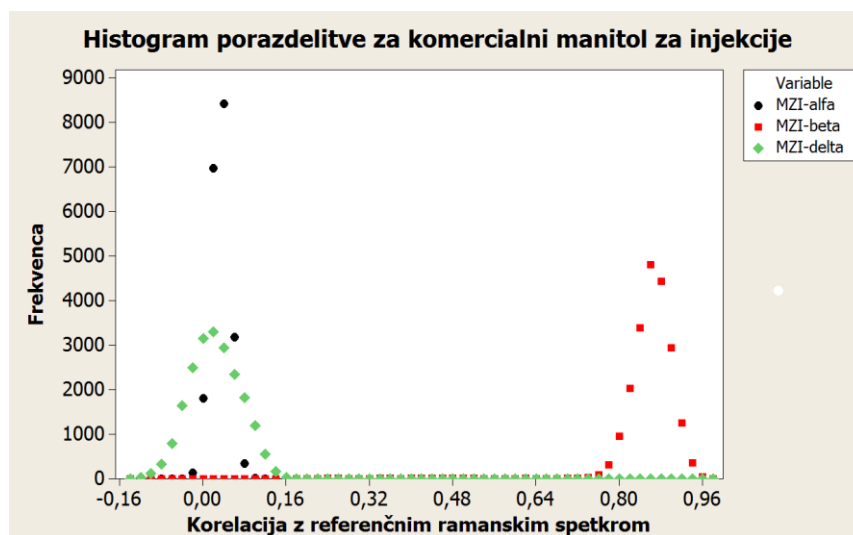
4.6. RAMANSKA SPKTROSKOPIJA

Podatke posnetih spektrov smo vrednotili s statističnim programskim orodjem *MiniTab 16 Statistical Software*. Izdelali smo histograme porazdelitve podatkov. Iz histogramov smo s pomočjo deskriptivne statistike določili povprečno vrednost za vsako kristalno obliko. Povprečne vrednosti smo normalizirali na vrednost 1. V histogramih smo določili tudi šum meritev. Alfa in beti kristalni obliki smo določili šum meritve na podlagi vzorcev kjer je bila porazdelitev vseh podatkov okoli nič. Pri delta obliki pa smo šum meritve določili tako, da

smo posneli ramanski spekter komercialnega *manitola za injekcije*, ki vsebuje večinoma beta kristalno obliko manitola. Primeri histogramov določanja šuma prikazujeta slika 22 in slika 23. V *prilogi 5* pa so predstavljeni deleži posameznih kristalnih oblik manitola, alfa, beta in delta, brez in z odštevanjem šuma meritve. Slika 24 prikazuje primer mape vzorca pri vrednotenju prisotnosti kristalnih oblik manitola.

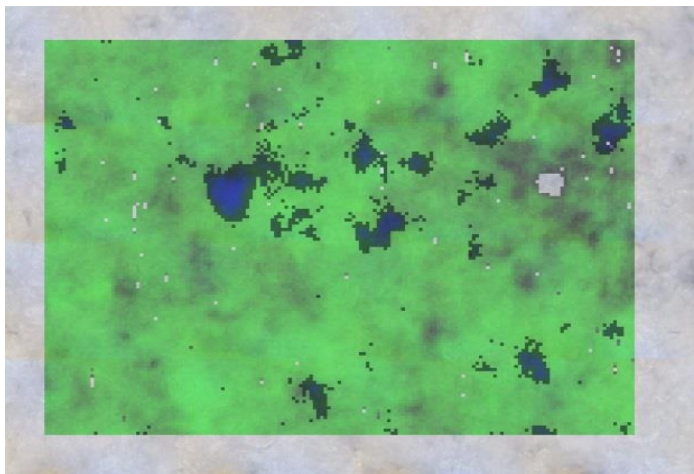


Slika 22: Histogram porazdelitve ujemanja vzorca 002T z referenčnimi spektri kristalnih oblik manitola



Slika 23: Histogram porazdelitve odzivov za komercialni manitol za injekcije

Črni krogi na obeh slikah predstavljajo alfa obliko, rdeči kvadrati beta obliko in zeleni rombi delta kristalno obliko manitola.



Slika 24: Primer ramanske analize površine liofilizata (»mapiranje«) vzorca 005Tb (zelena: delta kristalna oblika, modra: beta kristalna oblika)

Vrednotenje kristalizacije manitola

Vrednotili smo mehanizem kristalizacije manitola. Primerjali smo pojavnost kristalnih oblik manitola z metodo izločanja topila proti metodi zmanjševanja topnosti z dodatkom etanola kot netopila.

V preglednici IX so predstavljeni rezultati pojavnosti kristalnih oblik manitola v odvisnosti od dodatka netopila in ohlajanja raztopin. Predstavljena je tudi kristalna oblika manitola, če manitol segrejemo do temperature tališča (164 – 169°C (20) in ponovno ohladimo.

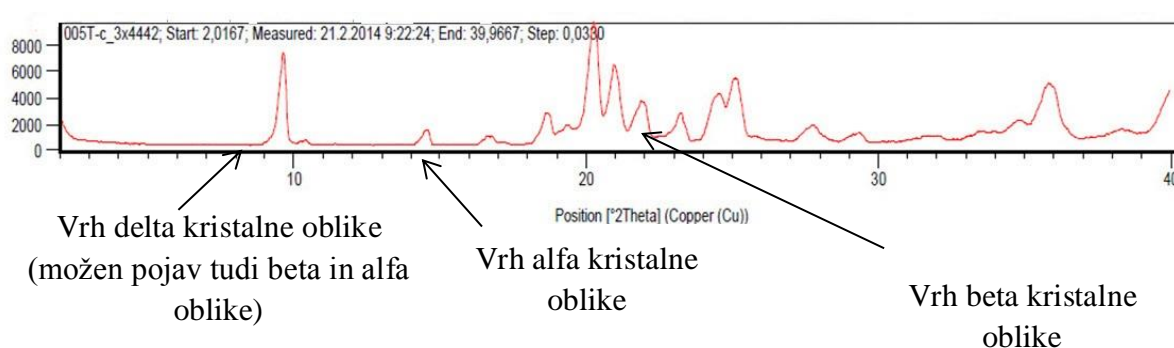
Vzorec	kristalna oblika manitola
filtrat raztopine 2 -paralelka a	beta
filtrat raztopine 2 -paralelka b	beta
filtrat raztopine 4 -paralelka a	beta (alfa na meji detekcije)
filtrat raztopine 4 -paralelka b	beta
raztopina 1 in 2	beta
raztopina 1 in 2 + ohlajanje na -30°C	delta, beta, hemihidrat, raztopljen manitol
raztopina 3 in 4 + ohlajanje na -30°C	delta, hemihidrat, raztopljen manitol
raztopina 5	delta
<i>staljen manitol</i>	<i>alfa</i>

Preglednica IX: Pojavnost kristalnih oblik manitola

4.7. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA - PXRD

Kristalnost liofilizatov smo vrednotili tudi z metodo rentgenske praškovne difrakcije. Difraktograme posameznih vzorcev smo primerjali z difraktogrami posameznih čistih kristalnih oblik. Vsi vzorci vsebujejo delta obliko z značilnim vrhom pri $9,7^\circ 2\theta$, večina od njih pa tudi alfa in/ali beta kristalno obliko. Za alfa kristalno obliko sta značilna vrhova, ki se pojavljata pri premikih $13,6^\circ$ in $17,2^\circ 2\theta$, za beta kristalno obliko pa pri $14,6^\circ$ in $23,4^\circ 2\theta$. Rezultati so podani kvalitativno, kot pojavnost določenih kristalnih oblik v vzorcu in kvantitativno, kot intenzitete značilnega vrha za posamezno kristalno obliko. Intenzitete vrhov alfa kristalne oblike niso sorazmerne z vrhovi beta kristalne oblike. Kvantitativna primerjava velja samo znotraj ene kristalne oblike. Delta kristalne oblike nismo kvantitativno vrednotili, ker se pri značilnih vrhovih za delto, pojavljata tudi alfa in beta kristalni obliki, zato z metodo ne moremo določiti kvantitativnih vsebnosti kristalnih oblik v vzorcu.

Primer vrednotenega difraktograma manitola prikazuje slika 25. Rezultati meritev so v *prilogi 6*, difraktogrami vseh vzorcev pa v *prilogi 7*.



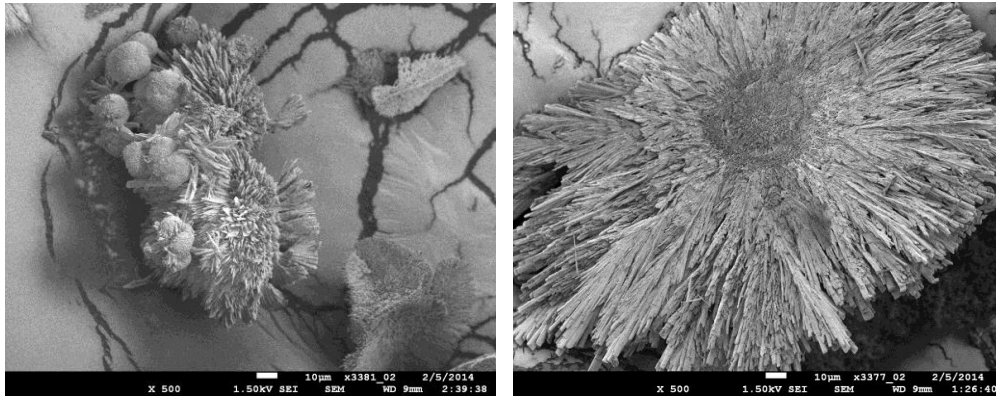
Slika 25: Primer vrednotenja difraktograma manitola

4.8. VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP - SEM

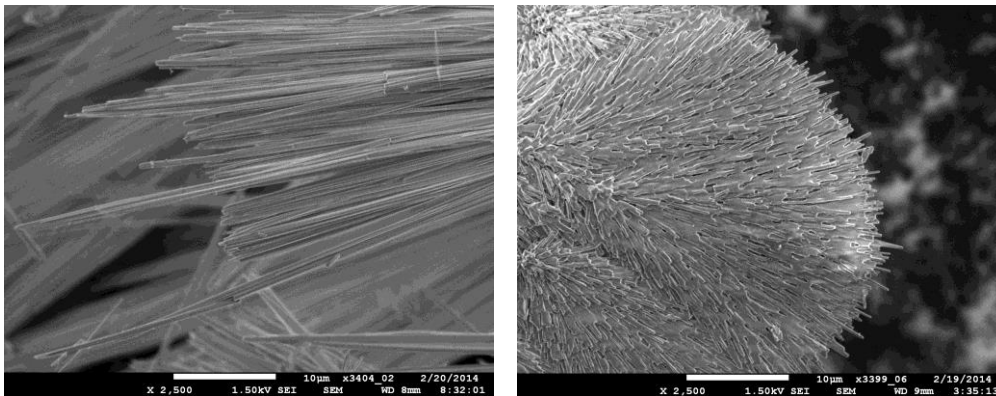
Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo vrednotili velikost, število delcev in strukturne posebnosti pri 100-kratni povečavi. Primeri vrednotenih značilnih oblik prikazujejo slika 26 in slika 27. Opisni rezultati mikroskopirane podlage so predstavljeni v *prilogi 8*. Vrednotili smo prisotnost »ježkom« podobnih struktur, velikost delcev, povprečno velikost delcev, število delcev na podlago ter opisne strukturne posebnosti pri 500-kratni in 2500-kratni povečavi.

Velikost delcev smo določili z merjenjem z ravnilom, število delcev na podlago pa smo zgolj ocenili.

Mikroskopske slike vzorcev pri 100-kratni in 500-kratni povečavi se nahajajo v *prilogi 9*.



Slika 26: Prikaz strukture ježka (levo) in cveta (desno) pri 500-kratni



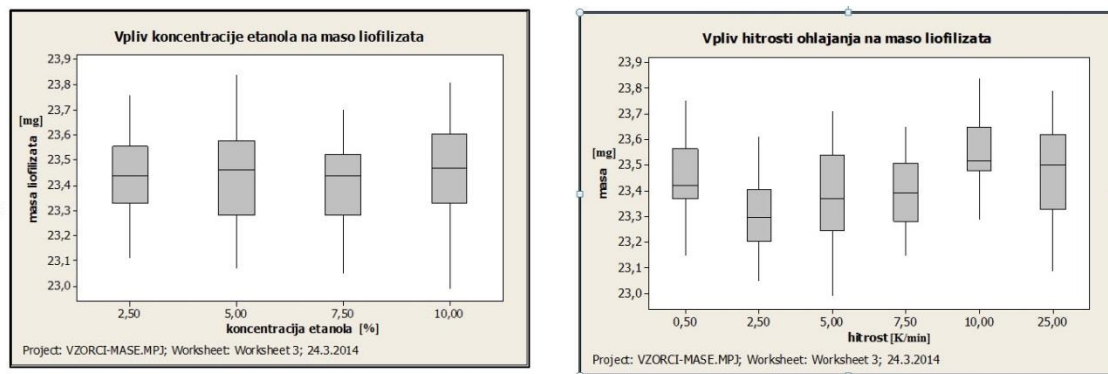
Slika 27: Prikaz primera ostrih iglic (levo) in mehkih iglic (desno) pri 2500-kratni povečavi

5. RAZPRAVA

5.1. VREDNOTENJE VPLIVA HITROSTI OHLAJANJA IN KOLIČINE ETANOLA V FORMULACIJI NA VIZUALNI IZGLED, VSEBNOST VODE IN KONČNO MASO LIOFILIZATOV

Vrednotenje vpliva hitrosti in količine etanola na vizualni izgled

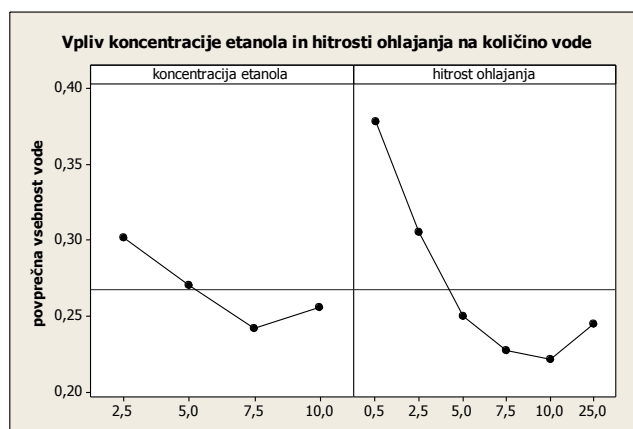
Na koncu liofilizacije smo opazili manitol tudi zunaj vial na policah liofilizatorja, zato smo po vsakem zaključenem ciklu liofilizacijevrednotili vizualni izgled liofilizatov in maso posameznega vzorca. Viale s formulacijo a in b so bile vedno pozicionirane bližje vratom, c in d pa globlje v liofilizator. Čvrsto pogačo smo vedno dobili pri b (5% etanola) formulacijah, večinoma pa tudi pri formulaciji a (2,5% etanola) ne glede na hitrost ohlajanja. C (7,5% etanola) in d (10% etanola) formulaciji nista pri nobenem vzorcu tvorili pogače čvrstega videza, temveč sipko, puhasto snov. Sipkost je oteževala tudi kvantitavni prenos vzorcev za nadaljne analize. Pri c in d formulacijah smo večino vzorca opazili tudi izven same vial, na čepih in na pladnjih v liofilizatorju. Pri povečevanju koncentracije etanola v kombinaciji s hitrejšim ohlajanjem, smo opazili še bolj sipek končni izdelek. Viale smo po končanem vizualnem vrednotenju stehali. Podatke o masah praznih vial in liofilizatov smo vrednotili s statističnim programskim orodjem *MiniTab 16 Statistical Software*. Iz povprečnih mas smo nato določili maso manitola v vzorcu. Slika 28 prikazuje da je končna masa liofilizata neodvisna od koncentracije etanola in hitrosti ohlajanja.



Slika 28: Vpliv koncentracije etanola (levo) in hitrosti ohlajanja (desno) na maso liofilizatov

Vrednotenje vpliva hitrosti ohlajanja in količine etanola na vsebnost vode

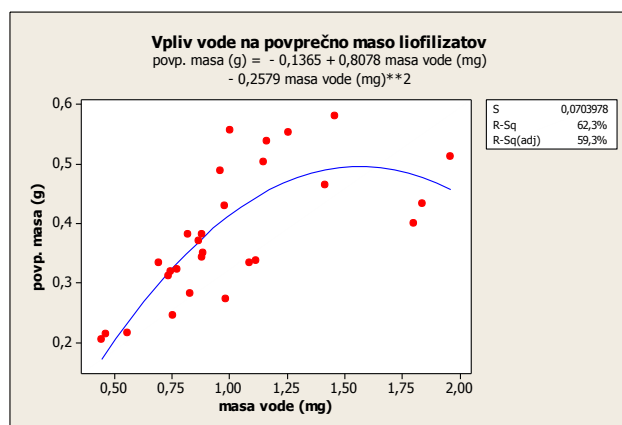
Vodo smo določali s titracijo pa Karl-Fischerju trem vialam vsake formulacije znotraj iste serije. Pri vseh vzorcih smo določili vsebnost vode manjšo od 2%, kar je v splošnem znana meja za vsebnost vode v liofiliziranem izdelku. Vsebnost vode se giblje od 0,2 % do 0,4 % za vse vzorce, razen za vzorec *001Ta_3*, za katerega sklepamo, da je zgolj naključno odstopajoča točka. Njena prisotnost je lahko posledica analitske napake ali rokovanja z vzorcem. Vrednotili smo vpliv koncentracije etanola in hitrosti ohlajanja na vsebnost vode po sušenju. Dobljene korelacije prikazuje slika 29. Opazimo trend, ki se odraža pri obeh preiskovanih parametrih, in sicer, da povprečna vsebnost vode pada z večanjem koncentracije etanola in večanjem hitrosti ohlajanja, a le v območju od 2,5 do 7,5% etanola in 0,5 do 10°C/min ohlajanja, nato pa prične naraščati.



Slika 29: Vpliv koncentracije etanola in hitrosti ohlajanja na količino vode v liofilizatu

Vrednotenje korelacije vsebnosti vode in mase liofilizatov

Izmerjenim vsebnostim vode smo določili povprečno vrednost meritve in standardni odklon in tako iz dobljenih rezultatov sklepali na vsebnost vode v vzorcih znotraj serije. Povprečne vsebnosti vode smo primerjali s povprečnimi masami liofilizatov. Opazimo, da večji delež vode načeloma pomeni večjo maso končnega liofilizata, a trend ni čisto linearen. Podatkom smo določili najbolj prilegajočo premico in njeno enačbo. Ugotovimo, da ne linearna (prileganje podatkov premici 44,8%, Pearsonov koeficient korelacije 0,668) ne kvadratna funkcija (prileganje podatkov premici 62,3%) ne opišeta najboljše korelacije med povprečno maso liofilizatov in povprečno vsebnostjo vode. Primer prileganja podakov kvadratni funkciji prikazuje slika 30. Masa liofilizata je torej funkcija več različnih dejavnikov, iz mase liofilizata pa ne moremo sklepati na količino vode v liofilizatu.



Slika 30: Odvinost mase liofilizata od zaostale vode

5.2. VREDNOTENJE PARAMETROV KRIVULJE OHLAJANJA

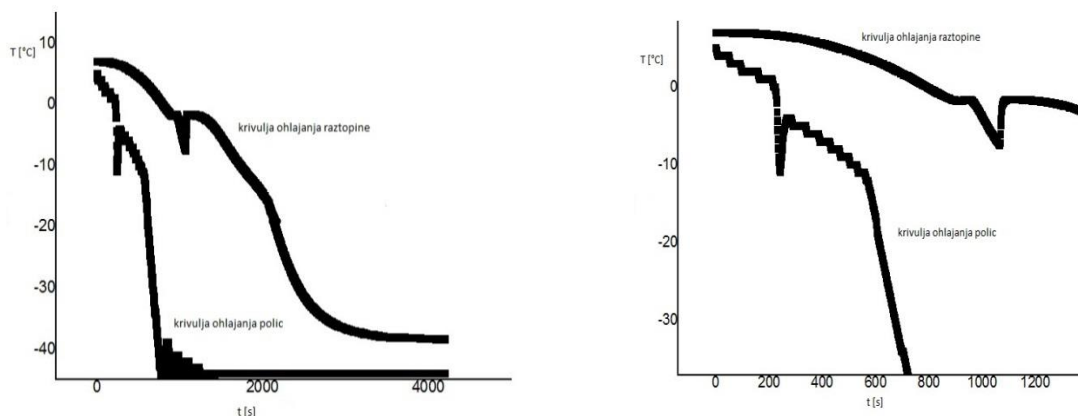
Z dodatnim vrednotenjem obnašanja raztopin med ohlajanjem smo z uporabo brezžičnih termočlenov dobili podatke predstavljene v *prilogi 2*. Iz dobljenih podatkov smo vrednotili temperaturo zmrzišča in maksimalno hitrost zmrzovanja raztopine in preučevali korelacije med temperaturo zmrzovanja in pozicijo vial (spredaj, zadaj), koncentracijo etanola in hitrostjo ohlajanja.

Po literarnih podatkih (4) naj bi se s tehniko nadzorovane nukleacije – *predhodno ohlajenih polic*, zvišala temperatura zmrzišča raztopine in zmanjšala hitrost zmrzovanja zaradi manjše stopnje podhladitve raztopine. Ugotovili smo, da se temperatura zmrzišča pri

vzorcu 006T, kjer so bile vialo postavljene na police, ki so bile predhodno ohlajene na -45°C bistveno ne razlikuje od ostalih vzorcev, ampak je v povprečju celo najnižja. Tudi hitrost ohlajanja raztopine je bila pri vzorcu 006T značilno višja kot pri ostalih vzorcih. Iz ugotovitev torej lahko sklepamo, da v raziskanem območju parametrov s hitrostjo ohlajanja polic ne moremo bistveno vplivati na hitrost ohlajanja raztopine. Maksimalna hitrost ohlajanja vzorcev omejuje toplotna prevodnost dna vialo ob stiku s polico, zato lahko kontroliramo le nižje hitrosti ohlajanja. Le v primeru ohlajanja polic s hitrostjo $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ je hitrost ohlajanja raztopine na termočlenu primerljiva s hitrostjo ohlajanja polic.

Proučevali smo tudi opisne spremembe oblike profila krivulje zmrzovanja, primer take krivulje prikazuje slika 31. Pri večini vzorcev opazimo značilen »zob« na začetku pred linearnim delom ohlajanja raztopine, kjer dosežemo tudi največjo hitrost ohlajanja. To korelira z grafom ohlajanja polic (slika 31, desno), kjer ohlajanje ne poteka linearno po času, ampak je na začetku počasnejše.

Kasneje pa (po začetni kristalizaciji) sprva opazimo konstantno vendar ne linearno hitrost ohlajanja do rahlega prevoja, ki se za vse vzorce pojavlja po približno 30 minutah od začetka ohlajanja in temperaturi do -20°C . Od točke prevoja naprej, se hitrost poveča in je približno linearna. Povečana hitrost je povezana z ohlajanjem ledu do končne temperature, prej pa je proces počasnejši, saj poteka istočasno zmrzovanje vode in se mora ob omejeni toplotni prevodnosti odvesti tudi entalpija zmrzovanja (voda ima višjo specifično toploto kot led). Tako obliko krivulje smo pojasnili s preprostim numeričnim modelom. Prvi del smo poimenovali *raztopini podoben* drugi del pa *ledu podoben* profil ohlajanja

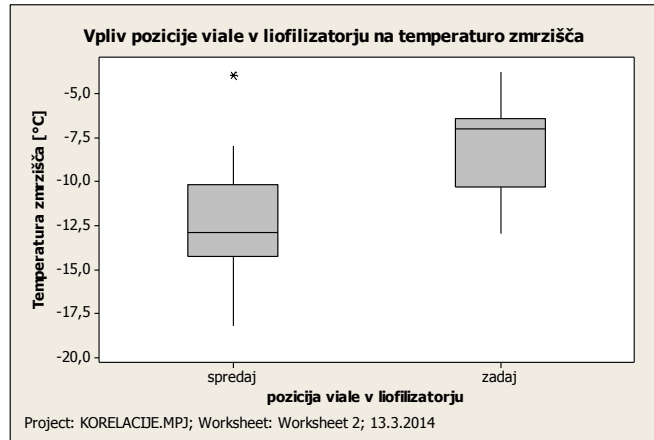


Slika 31: Primer profila krivulje ohlajanja za raztopino in polico vzorca 003T_a1 (levo), povečava prvega dela krivulje (desno)

Ugotovili smo, da obstaja pomembna korelacija med pozicijo vial v liofilizatorju in temperaturo zmrzišča raztopine. To korelacijo predstavlja slika 32. Viale, ki so bile pozicionirane bližje vratom liofilizatorja so zmrznile pri bistveno nižjih temperaturah v primerjavi z vialami, ki so bile postavljene globlje v liofilizator. To razlagamo z dejstvom, da na viale, ki so pozicionirane bližje vratom vpliva pritok energije v obliki sevanja in konvekcije, zato viale dalj časa ohlajamo. Viale, ki so globlje v liofilizatorju so »zaščitene« s sprednjimi vialami pred vplivi sevanja in konvekcije toplejšega zraka od zunaj. Predvidevamo, da ima tudi položaj termočlena v viali vpliv na temperaturo zmrzišča raztopine. Termočleni so ponavadi postavljeni tik nad dnom vial. Predvidevamo, da se termočlen sklopi z dnom vial oz. z ledom, ki nastane med dnom vial in senzorjem, zato izmerimo nižjo temperaturo kot je v resnici temperatura raztopine. Ta sklep se odraža tudi v delu krivulje, kjer imamo linearno ohlajanje.

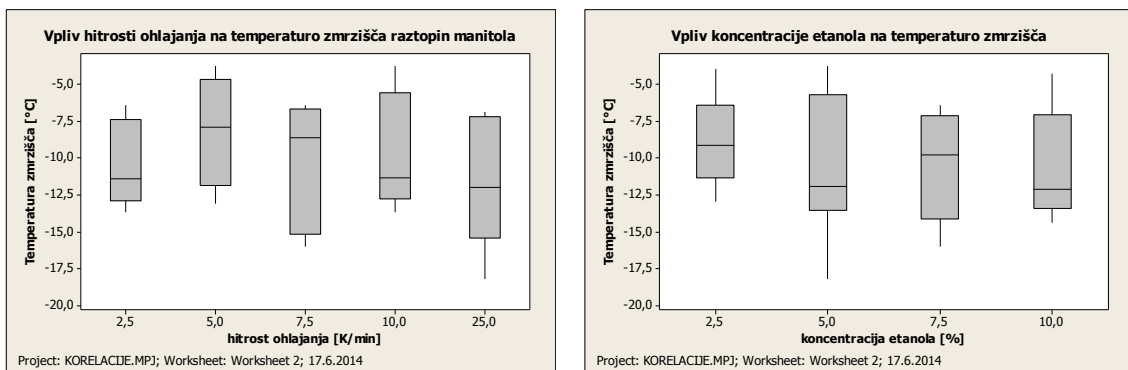
Pomembno korelacijo smo opazili tudi med temperaturo zmrzišča in temperaturnim skokom po zamrznitvi raztopin, kot posledico eksotermnosti procesa kristalizacije – kar v nadaljevanju imenujemo sprememba temperature. Temperatura zmrzišča in sprememba temperature dajeta informacijo o entalpiji procesa kristalizacije. Entalpija je termodinamska spremenljivka, ki je definirana kot vsota notranje energije ter zmnožka tlaka in volumna. Za procese, ki potekajo pri konstantnem tlaku pa je značilno, da je entalpija enaka količini dovedene ali odvzete toplote. Stopnja podhladitve raztopine, ki se odraža preko temperature zmrzišča, ima vpliv na to količino sproščene toplote pri procesu kristalizacije. Večja kot bo podhladitev, več bo kristalizacijske entalpije, več bo odvedene

oz. sproščene toplote in večji bo temperaturni preskok. Več kot bo sproščene toplote, večji bo obseg začetne kristalizacije.



Slika 32: Vpliv položaja vial v liofilizatorju na temperaturo zmrzišča

Do obratnih ugotovitev smo prišli pri vrednotenju vpliva koncentracije etanola in hitrosti zmrzovanja na temperaturo zmrzišča. Pri različnih koncentracijah etanola, hitrostih zmrzovanja in pri kombinaciji obeh preučevanih parametrov ni opaziti nobene korelacije s temperaturo zmrzišča, kar prikazuje slika 33. Iz tega sledi zaključek, da temperatura zmrzišča in stopnja podhladitve nista funkciji tehnološkega procesa, temveč funkcija čistosti vial, prisotnosti kristalizacijskih jeder v raztopini, mehanskih ali drugih dejavnikov okolja.



Slika 33: Vpliv hitrosti ohlajanja na temperaturo zmrzišča (levo); vpliv koncentracije etanola na temperaturo zmrzišča (desno)

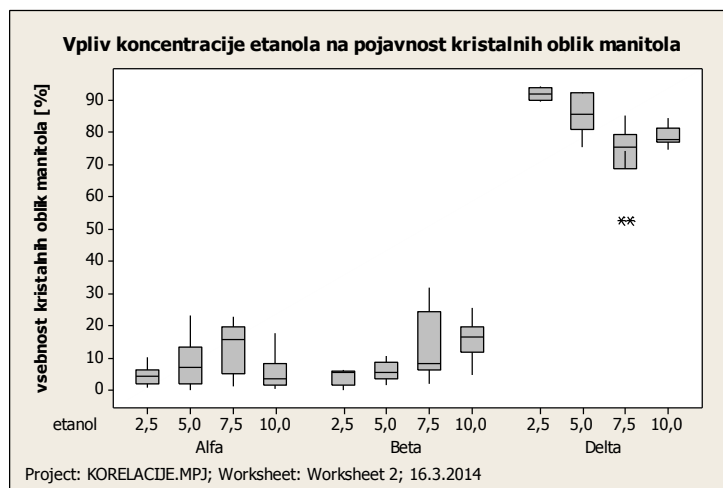
5.3. DOLOČANJE VPLIVA HITROSTI OHLAJANJA IN KOLIČINE ETANOLA NA POJAVNOST KRISTALNIH OBLIK MANITOLA Z RAMANSKIM MIKROSKOPOM, METODO DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE IN RENTGENSKO PRAŠKOVNO DIFRAKCIJO

Določanje pojavnosti kristalnih oblik manitola v liofiliziranih vzorcih

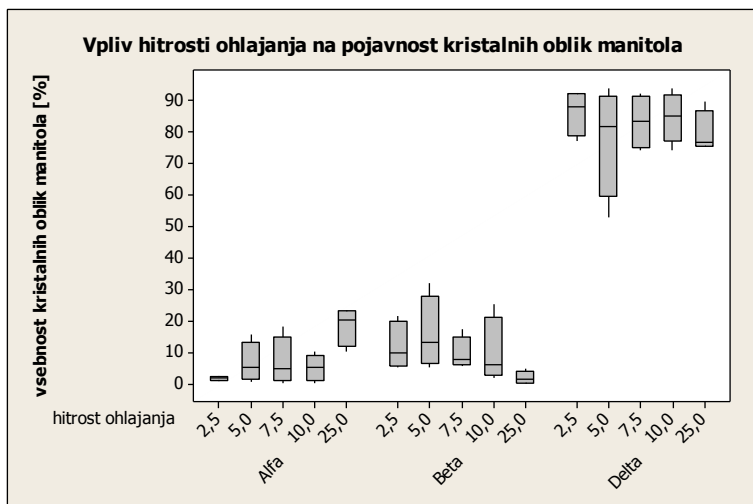
Z več metodami smo želeli kvantitativno ovrednotiti pojavnost različnih kristalnih oblik manitola v vzorcih. Metoda izbora je bila ramanska mikroskopija, rezultate pa smo primerjali z rezultati diferenčne dinamične kalorimetrije in rentgenske praškovne difrakcije.

V več različnih literaturnih virih zasledimo podatek, da manitol, zaradi svoje velike težnje po kristalizaciji, težko obstaja v amornem in hemihidratnem stanju pri sobnih pogojih, zato smo sestavo določali tako, da smo predvidevali, da celoten vzorec vsebuje le različne kristalne oblike manitola. Prisotnost samo kristalnih struktur manitola smo potrdili z rentgensko praškovno difrakcijo. Vsi vzorci vsebujejo največ delta kristalne oblike in sicer od 60 do 95%, ostali delež pa predstavljajo alfa in beta kristalno obliko v različnih razmerjih.

Vrednotili smo vpliv koncentracije etanola in hitrosti ohlajanja na spreminjanje deležev kristalnih oblik manitola. S povečevanjem koncentracije etanola se delež delta oblike zmanjšuje na račun beta in/ali alfa oblike. Opazimo, da alfa kristalna oblika pomembneje nastaja pri koncentraciji etanola 7,5%, vsebnost beta kristalne oblike pa narašča z naraščanjem koncentracije etanola kot prikazuje slika 34. Ravno obratno pa hitrost ohlajanja bistveno ne vpliva na pojavnost polimorfni oblik, kar prikazuje slika 35. Večji delež alfa oblike je prisoten le pri 006T vzorcu, kjer so bile vialo položene na predhodno ohlajene police.

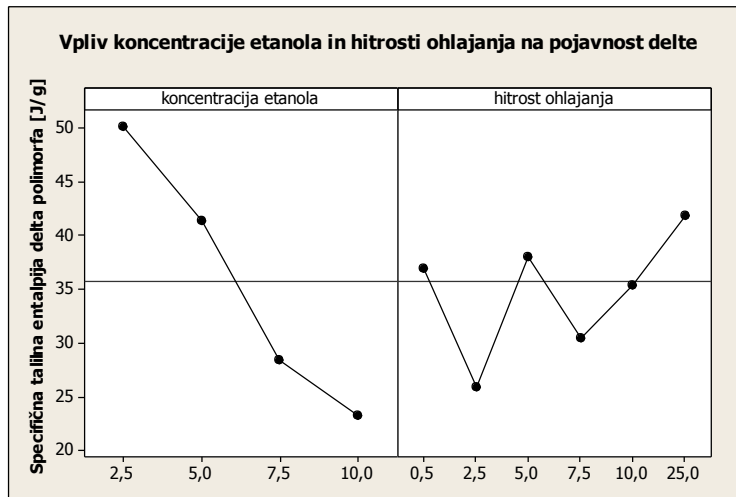


Slika 34: Vpliv koncentracije etanola [%] na pojavnost kristalnih oblik manitola z metodo ramanske spektroskopije



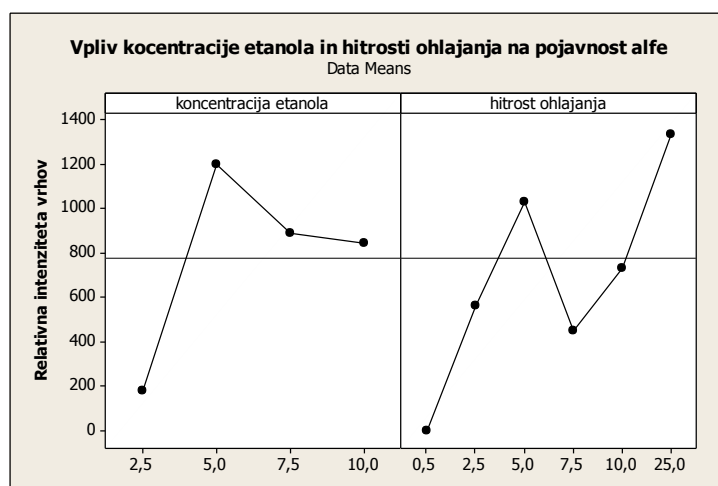
Slika 35: Vpliv hitrosti ohlajanja [K/min] na pojavnost kristalnih oblik manitola z metodo ramanske spektroskopije

Do podobnih zaključkov pridemo z vrednotenjem prvega vrha pri analizi z *DSC* metodo. Prvi vrh v termogramu prikazuje značilno taljenje delta kristalne oblike manitola, zato z analizo prvega vrha lahko vrednotimo vpliv koncentracije etanola in hitrosti ohlajanja na spreminjanje deleža le delta kristalne oblike. Vplive prikazuje slika 36. Opazimo, da z večanjem koncentracije etanola delež delta oblike pada, sprememba hitrosti ohlajanja pa ne izkazuje nobenega trenda. Ugotovitve korelirajo z rezultati ramanske mikroskopije.

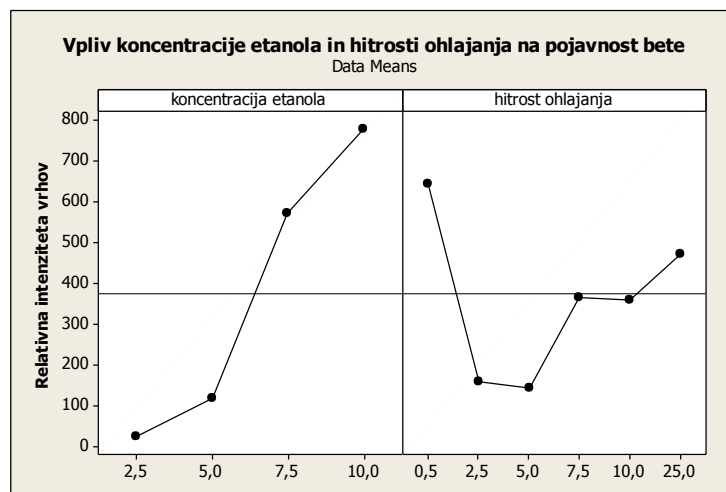


Slika 36: Vpliv koncentracije etanola [%] in hitrosti ohlajanja [K/min] na pojavnost delta kristalne oblike z diferenčno dinamično kalorimetrijo

Pojavnost kristalnih oblik smo vrednotili tudi z metodo rentgenske praškovne difrakcije. Difraktograme vzorcev smo primerjali z difraktogrami čistih oblik za alfa in beta kristalno obliko. Vplive prikazujeta sliki 37 in 38. Pojavnost beta kristalne oblike v odvisnosti od koncentracije etanola in hitrosti ohlajanja korelira z ugotovitvami ramanske mikroskopije, z večanjem koncentracije etanola v raztopini se večja tudi delež beta kristalne oblike manitola. Pojavnost alfa oblike pa le delno korelira z ugotovitvami ramanske mikroskopije. Tudi hitrost ohlajanja nakazuje določen trend, in sicer povečevanje alfa kristalne oblike do hitrostih ohlajanja 5°C/min, nato rahel padec in spet postopno naraščanje pri večjih hitrosti.

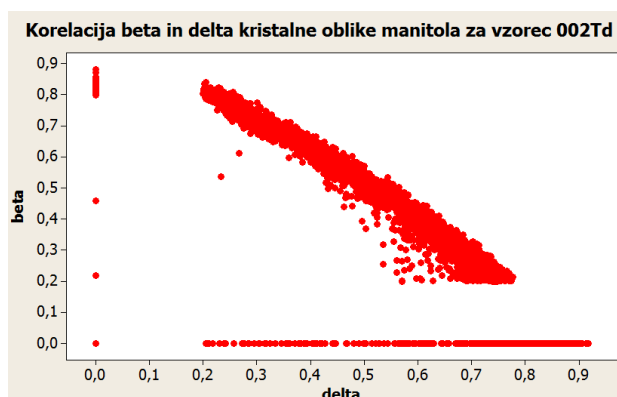


Slika 37: Vpliv koncentracije etanola [%] in hitrosti ohlajanja [K/min] na pojavnost alfa kristalne oblike z rentgensko praškovno difrakcijo



Slika 38: Vpliv koncentracije etanola [%] in hitrosti ohlajanja [K/min] na pojavnost beta kristalne oblike z rentgensko praškovo difrakcijo

Z raztresenim ali XY grafom smo vrednotili odvisnost hkratne pojavnosti beta in delta kristalne oblike. Pri vseh vzorcih smo dobili antikorelacijo beta in delta kristalne oblike, kar pomeni, da se večji delež delta kristalne oblike vedno pojavlja z manjšim deležem beta oblike v preiskovani točki. Prostorsko odvisnost delta in beta kristalne oblike prikazuje slika 24, iz katere je razvidno, da se beta polimorf pojavlja v t.i. »otočkih«. Slika 39 prikazuje pojav antikorelacije beta in delta kristalne oblike.



Slika 39: Antikorelacija beta in delta kristalne oblike manitola [%] za vzorec 002Td

Z vsemi tremi metodami smo pokazali, da ima koncentracija etanola bistveno večji vpliv na pojavnost različnih kristalnih oblik manitola v liofilizatu kot hitrost ohlajanja. Najbolj čisti vzorci, ki so pretežno vsebovali le delta obliko so bili 002Ta, 002Tb in 005Ta (vzorci z nizkim deležem etanola).

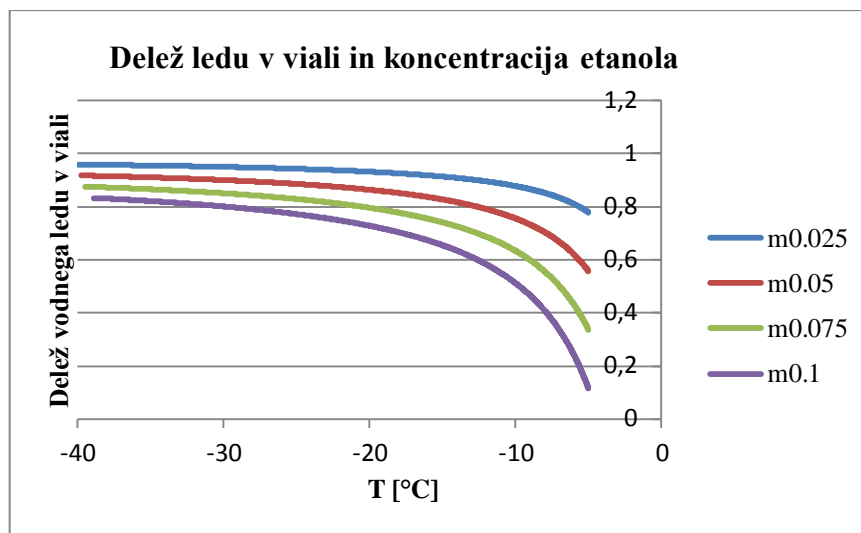
Izmed izbranih metod je metoda termične analize najbolj specifična »bulk« metoda za določanje delta kristalne oblike, žal pa ne loči med alfa in beta kristalno obliko manitola. Nobena izmed uporabljenih metod ne da zanesljivih podatkov o kvantitativni sestavi vzorca, zato bi bilo smiselno narediti več referenčnih zmesi in statistični model za kvantifikacijo z več metodami hrakti (PLS model).

Določanje pojavnosti kristalnih oblik manitola med zmrzovanjem

Pojavnost kristalnih oblik manitola smo vrednotili pri -30°C s sklopitivjo mikroskopske mizice »freeze-drying« mikroskopa in ramanske mikroskopije. Tehnologija spremljanja procesa liofilizacije z ramansko sondo je del FDA PAT iniciative (angl. *Process Analytical Technologies*) (41) z željo za boljšim razumevanjem procesa.

Iz podatkov smo izdelali graf, ki ga prikazuje slika 40 (oznake m0,025; m0,05; m0,075 in m0,10 označujejo 2,5; 5; 7,5 in 10% etanolno raztopino manitola). Iz slike je razvidno, da je tudi pri najnižji temperaturi zmrzovanja (med -30 in -40°C) del vzorca v tekoči fazi in da je delež tekoče faze približno linearno odvisen od začetne koncentracije etanola. V tej raztopini je delež raztopljenega manitola odvisen od topnosti manitola pri tej temperaturi in koncentraciji etanola. Ves manitol torej ni kristaliziran, pač pa je pred začetkom izsuševanja del še raztopljen. Iz te ugotovite je sledila predpostavka dveh možnih načinov kristalizacije manitola, ki smo jo preverili z nizom meritev.

1. *Kristalizacija manitola zaradi povečevanja koncentracije antitopila – deleža etanola in istočasnim zmanjševanjem količine topila zaradi zmrzovanja vode.*
2. *Kristalizacija manitola med evaporacijo etanolne raztopine pri sušenju.*



Slika 40: Delež ledu v viali in koncentracija etanola pri različnih temperaturah

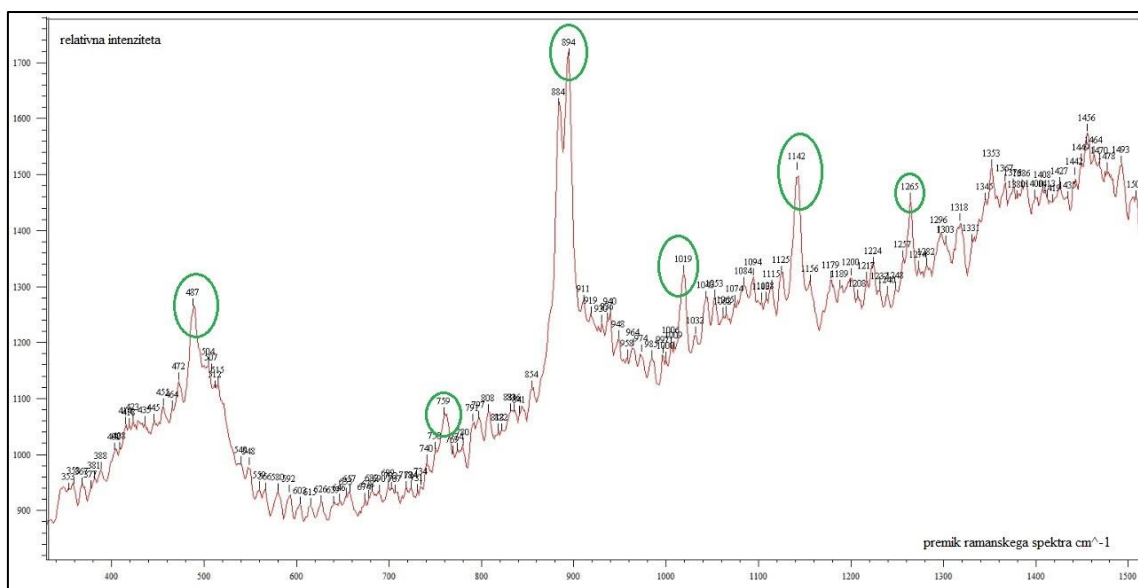
Z dodajanjem takih količin netopila (kot netopilo je v tem primeru etanol) vodnim in etanolnim raztopinam manitola kot se pojavljajo ob zmrzovanju nad -30°C , ne vplivamo na pretvorbo polimorfov pri sobni temperaturi. Filtrati takih raztopin so bili večinoma beta kristalne oblike. Izsledke prikazuje preglednica X.

Način sprožitve kristalizacije	Kristalna oblika manitola z obarjanjem iz etanola
Obarjanje z etanolom (antitopilom) iz vodne raztopine (dodatek do 40% etanola)	beta
Obarjanje z etanolom iz etanolne raztopine (5%) (dodatek etanola do 40%)	Beta
Obarjanje iz vodne raztopine z izhlapevanjem	Beta
Obarjanje iz 5% etanolne raztopine z izhlapevanjem	Beta

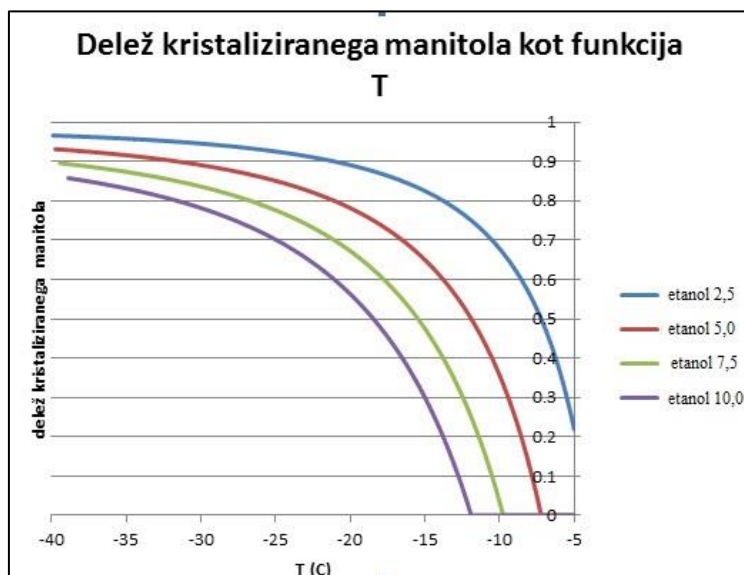
Preglednica X: Kristalne oblike manitola z obarjanjem iz etanola

Če pa smo pripravljene raztopine ohlajali do temperature -30°C smo ugotovili, da v primeru etanolnih raztopin dobimo delta kristalno obliko, v primeru vodnih raztopin pa delta in beta kristalno obliko. V obeh primerih smo uspeli z ramanskim mikroskopom pri

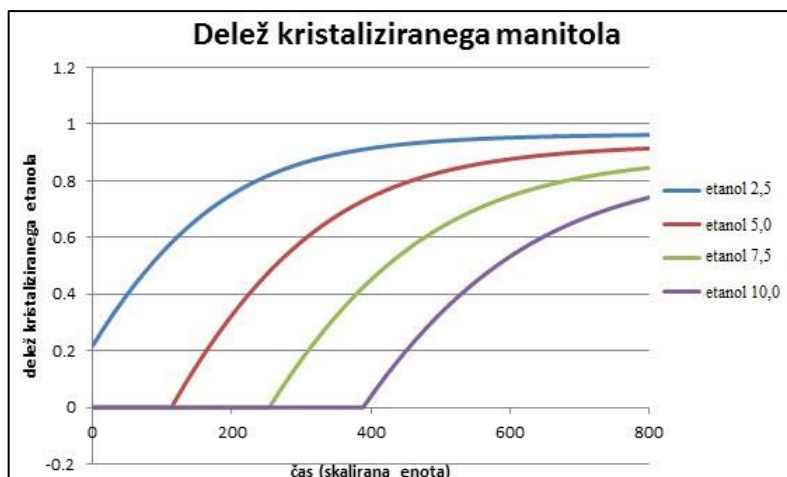
temperaturi -30°C potrditi pristnost manitol hemihidrata, kar je bila pomembna ugotovitev. Posnet spekter manitol hemihidrata z označenimi karakterističnimi vrhovi prikazuje slika 41. Ker pri taki koncentraciji etanola pri -30°C nismo uspeli preseči topnostega produkta manitola v etanolnih raztopinah se je del manitola pojavljal tudi v raztopljeni obliki. Delež kristaliziranega manitola kot funkcijo temperature in funkcijo časa prikazujeta sliki 42 in 43.



Slika 41: Posnet spekter manitol hidrata s karakterističnimi vrhovi ($487, 759, 894, 1019, 1142, 1265\text{ cm}^{-1}$) (41)



Slika 42: Delež kristaliziranega manitola kot funkcija temperature



Slika 43: Delež kristaliziranega manitola kot funkcija časa ohlajanja

Z nizom meritev nismo uspeli potrditi prisotnosti delta kristalne oblike med zmrzovanjem. Iz tega sledijo pomembne ugotovitve, in sicer, da delta kristalna oblika nastaja po prvem predpostavljenem mehanizmu kristalizacije, z dodajanjem netopila a le v primeru hkratnega ohlajanja raztopine.

Beta kristalna oblika najverjetneje nastaja po drugem predpostavljenem načinu kristalizacije, pri evaporaciji etanolne raztopine med primarnim sušenjem. Slednjo hipotezo potrujeta tudi sliki deleža kristalizirane oblike manitola kot funkcija temperature in časa, kjer ugotovimo, da pri pogojih zmrzovanja v formulaciji z 10 % koncentracijo etanola ostane okoli 15% manitola nekristaliziranega. Ta delež nekristaliziranega manitola kristalizira med procesom izparevanja topila v fazi sušenja. Z metodami določevanja kristalnih oblik manitola smo potrdili največji delež beta oblike ravno pri formulacijah z 10% koncentracijo etanola.

Za alfa kristalno obliko pa predvidevamo, da nastane sekundarno, bodisi iz hemihidrata ali amorfnega manitola že med procesom sušenja ali med procesom shranjevanja (kar lahko predstavlja potencialno težavo stabilnosti liofilizatov).

5.4. VREDNOTENJE STRUKTURNIH POSEBNOSTI Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM – SEM

S SEM metodo smo določali strukturne posebnosti liofiliziranih vzorcev in vrednotili njihovo pojavnost v povezavi s koncentracijo etanola in hitrostjo ohlajanja. Vrednotili smo razporeditev velikosti delcev, njihovo povprečno velikost, pojavnost »ježkom« podobnih struktur, obliko (iglic) in ostale posebnosti pri večji povečavi.

Pri vzorcih z manjšim deležem etanola opazimo večje število manjših delcev na mikroskopirani podlagi. Z večanjem deleža etanola pa se delci večajo na račun kompleksnosti strukture, njihovo število pa upada, kar je najverjetneje posledica naknadne prekrystalizacije in prerazporeditve kristalov zaradi prisotnosti tekoče faze. Nizka koncentracija etanola pomeni večji delež vode oz. več ledu na začetku in hitro kristalizacijo. Obratno pa se z večanjem koncentracije etanola zmanjšuje delež ledu na začetku, kar upočasni kristalizacijo. Hkrati pa večji delež etanola pomeni manjšo topnost manitola.

Pojavnost »ježkom« podobnih kristalnih struktur bolj korelira z večjimi hitrostmi ohlajanja, kar prikazuje slika 44 (desno). Največji delež »ježkov« opazimo pri predhodno ohlajenih policah in pri ohlajanju z 10°C/min. Korelacija »ježkom« podobnih struktur kaže tudi določeno odvisnost od koncentracije etanola, kar prikazuje slika 44 (levo). Z večanjem koncentracije etanola delež takih kristalnih oblik pada. Vzorca, ki vsebujeta največji delež »ježkom« podobnih kristalnih struktur sta 005Ta in 006Ta. Na tej točki velja omeniti, da smo »ježkom« podobne kristalne strukture opazili tudi pri nekaterih vzorcih pri 500-kratni povečavi, kot del drugih kristalnih oblik.

Velikost kristalov pomembno korelira s koncentracijo etanola kot je prikazano na sliki 45. Z večanjem koncentracije etanola se večja povprečna velikost delcev, ki so bolj kompleksnih struktur. Kompleksnejše strukture so predvidoma posledica nezamrznjenega manitola pri pogojih zmrzovanja, ki kristalizira pri fazi sušenja in se nalaga na že obstoječe kristale.

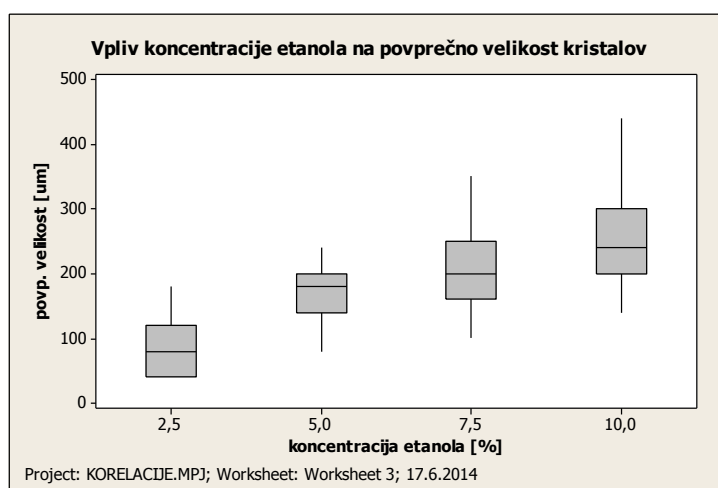
Vrednotili smo še ostrino iglic kristalov pri 500-kratni povečavi. Dodelili smo zgolj opisno oceno in sicer, mehke ali ostre. Iz slike 46 lahko opazimo korelacijo oblike iglic s povečanjem koncentracije etanola. Pri višjih koncentracijah etanola nastajajo ostrejši kristali. Pojavnost iglic pa ni v povezavi s spreminjanjem hitrosti ohlajanja. Ostre iglice se

bolj značilno pojavljajo pri beta kristalni obliki, mehke pa bolj pri alfa. Oblika iglic ni v nobeni korelaciji s pojavnostjo delta kristalne oblike.

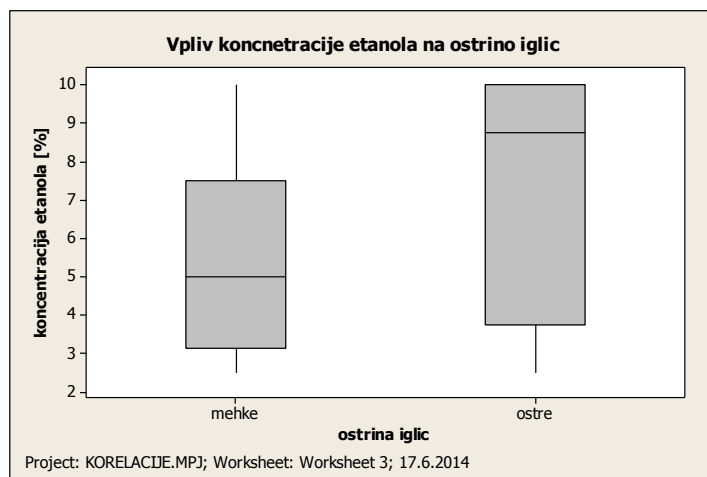
Pri 500-kratni povečavi smo pri c in d formulacijah opazili cvetu podobne kristale, iz katerih izraščajo »ježkom« podobne strukture. Pojavnost cvetu podobnih kristalov je torej funkcija koncentracije etanola. Hitrost ohlajanja nima vpliva ne na pojavnost takih struktur ne na povprečno velikost kristalov.



Slika 44: Pojavnost »ježkom« podobnih oblik kristalov v odvisnosti od koncentracije etanola (Pearsonov koeficient korelacije: -0,415; p vrednost: 0,028) (levo); Pojavnost »ježkom« podobnih oblik kristalov v odvisnosti od hitrosti ohlajanja (Pearsonov koeficient korelacije: -0,571 ;p vrednost: 0,002)



Slika 45: Vpliv koncentracije etanola na povprečno velikost delcev



Slika 46: Pojavnost oblike iglic pri različnih koncentracijah etanola

6. SKLEP

V sklopu diplomskega dela smo preučevali vplive pogojev ohlajanja in sestave topila na lastnosti liofilizatov manitola. Vrednotili smo vplive na maso, vsebnost vode, pojavnost kristalnih oblik in morfologijo liofiliziranih delcev. Proučevali smo zmrzovanje vodno etanolnih raztopin ter kristalizacijo manitola pri pogojih zmrzovanja. Rezultate smo statistično obdelali in jih strnili v naslednje zaključke in ugotovitve:

- Liofilizati izdelani iz raztopin z različnimi koncentracijami etanola izkazujejo razlike v vizualnem izgledu. Videz elegantne pogače daje raztopina s 5 % etanola in večinoma tudi raztopina z 2,5 % etanola. Raztopini s 7,5 in 10 % etanola dajeta sipek končni produkt.
- Liofilizacijski cikel daje liofilizate z ustrezno vsebnostjo vode.
- V raziskanem območju s hitrostjo ohlajanja polic ne moremo bistveno vplivati na hitrost ohlajanja raztopine zaradi omejenega prenosa toplote med policami in dnom vial.
- Obstaja pomembna korelacija med pozicijo vial v liofilizatorju in temperaturo zmrzišča raztopine. Viale, ki so pozicionirane bližje vratom zmrznejo pri nižji temperaturi kot vial, ki so globlje v liofilizatorju.
- Koncentracija etanola, hitrost ohlajanja ter kombinacije obeh parametrov nimajo vpliva na temperaturo zmrzišča raztopine, kar pomeni, da temperatura zmrzišča ni funkcija tehnološkega procesa in sestave raztopine v raziskovanem območju, temveč zgolj funkcija čistosti vial, prisotnosti kristalizacijskih jeder v raztopin, mehanskih ali drugih dejavnikov okolja.
- V vseh vzorcih je pojavnost delta kristalne oblike manitola največja in se giblje med 60 in 95%. Ostali del predstavljata alfa in beta kristalni obliki v različnih razmerjih. Razmerje kristalnih oblik je funkcija koncentracije etanola.
- Pri nižjih koncentracijah etanola prevladuje delta kristalna oblika manitola, ki nastaja ko se raztopina koncentrira s kristalizacijo čiste vode.
- Beta kristalna oblika kristalizira v največjem obsegu z izparevanjem topila pri formulaciji z 10% etanola. Nastaja z izparevanjem topila pri sušenju ali po obarjanju z netopilom pri sobnih pogojih

- Pri pogojih zmrzovanja po programu za liofilizacijski cikel (temperatura -30°C) smo potrdili pristonost metastabilne oblike manitol-hidrata z metodo krioramanske spektroskopije.
- Koncentracija etanola vpliva na morfologijo delcev liofilizatov (povprečno velikost delcev, ostrino iglic, pojavnost določenih kristalnih struktur)

7. LITERATURA

1. Osnove liofilizacije (I del). Bojan Povh, institut za elektroniko in vakuumsko tehniko, Teslova 30, Ljubljana. Vakuunist 18/4 (1998)
2. Feroz Jameel, Susan Hershenson: Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals, Feroz Jameel, Jim Searles: Development and optimization of the freeze-drying processes, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, 2010: 763-796
3. Cameon P: Good pharmaceutical freeze-drying practice, Murgatroyd K: The freeze drying process, Interpharm Press, Inc., USA, 1997, 1-58
4. Julia Christina Kasper, Wolfgang Friess: The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods nad consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 78 (2011) 248-263
6. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: The importance of process water, Interpharm/CRC Press LLC, Florida, 2002: 59-82
7. R. Geidobler, G. Winter, Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review, Eur. J. Pharm. Biopharm. (2013),
8. <http://cavemanchemistry.com/oldcave/projects/alcohol/> (marec 2014)
9. <http://www.fov.uni-mb.si/index.php?t=books&id=83> (avgust 2013)
10. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phase_diagram_ethanol_water_s_l_en.svg (marec 2014)
11. Searles JA, Carpenter JF, Randolph TW: Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freeze-induced drying rate heterogeneity, and determine Tg in pharmaceutical lyophilization, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 90 (No. 7), 2001: 827-887
12. Xiaolin (Charlie) Tang and Michael J. Pikal: Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice, Pharmaceutical Research, Vol. 21, No. 2, February 2004

13. Akira Takada, Steven L. Nail, Masakatsu Yonese: Subambient Behavior of Mannitol in Ethanol- Water Co-solvent System, Pharmaceutical Research An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists ©Springer Science+Business Media, LLC 2008, 10.1007/s1 1095-008-9775-0
14. Jennings TA: Lyophilization. Introduction and basic principles: The primary drying process, CRC Press LLC, Florida, 2002: 283-354
15. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: Secondary drying processes, CRC Press LLC, Florida, 2002: 355-392
16. Anikt Baheti, Lokesh Kumar, Arvind K.Bansal: Excipients used in lyophilizations of small molecules, J.Excipients and Food Chem 2010: 41-53
17. <http://epswww.unm.edu/xrd/xrdbasics.pdf> (januar 2014)
18. [http://sl.wikipedia.org/wiki/Polimorfizem_\(kristalografija\)](http://sl.wikipedia.org/wiki/Polimorfizem_(kristalografija)) (januar 2014)
19. Training Course, Derek Robinson, Terry Threlfall: Understanding Polymorphism & Crystallisation issues in the Pharmaceutical Industry, 10-12 April 2013 Budapest
20. <http://www.ta-prime.co.uk/assets/file/Mannitol.pdf> (april 2014)
21. http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB7720972_EN.htm (april 2014)
22. <http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Manitol> (september 2013)
23. Arthur H. Kibbe: Handbook of pharmaceutical excipients third edition, 2000 American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press, USA: 324-328
24. Akira Takada, Steven L.Nail, Masakatsu Yonese: Influence of Ethanol on Physical State of Freeze-Dried Mannitol, Pharmaceutical Research, Vol. 26, No. 5 May 2009
25. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mannitol_structure.png#globalusage (september 2013)
26. Sampath Krishnan, Wenjin Cao, Joseph Phillips, Applying Raman Spectroscopy to Design of Lyophilization Cycles for Protein Formulation Development, APR, september/october 2009

27. [http://www.pharmpress.com/files/docs/Excipients7e_samplemonos\(1\).pdf](http://www.pharmpress.com/files/docs/Excipients7e_samplemonos(1).pdf)
28. Remmele et al. Development of Stable Lyophilized Protein Drug Products; Current Pharmaceutical Biotechnology, 2012, 471-496
29. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: Introduction, CRC Press LLC, Florida, 2002: 1-13
30. <http://www.ssfs.si/download/Kng/Predstavitev%20Termometrija,%20oktober%2006.pdf> (oktober 2013)
31. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 6th Ed: Thermal methods, 2007/ 1998, Thomson Brooks/Cole: 894-908
32. <http://www.lotric-certificiranje.si/cob/show/36> (oktober 2013)
33. Jennings TA: Lyophilization: Introduction and basic principles: Thermal analytical methods, CRC Press LLC, Florida, 2002: 109-160
34. http://www.chemie.unibas.ch/~team2010/JHanusch/PC11_DSC_C8.pdf (november 2013)
35. http://en.wikipedia.org/wiki/Bunsen_reaction (november 2013)
36. http://at.mt.com/dam/mt_ext_files/Editorial/LandingPage/8/DACH_PRO_Image/51725145a_v04_11gtpkftitrbcomplet.pdf (november 2013)
37. http://www.si-analytics.com/fileadmin/upload/Informationen/Titration/INT/Technical-Data_TitroLine-KF-trace_742-KB_PDF-English.pdf (november 2013)
38. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 6th Ed: Raman Spectroscopy, 2007/ 1998, Thomson Brooks/Cole: 481-497
39. http://en.wikipedia.org/wiki/Raman_spectroscopy (november 2013)
40. Saly Romero-Torres, Hakan Wikstorm, Edward R. Grant, Lynne S. Taylor: Monitoring of Mannitol Phase Behavior during Freeze-Drying Using Non-Invasive Raman Spectroscopy, Research article Vol. 61, No. 2, March-April 2007
41. http://sl.wikipedia.org/wiki/Rentgenska_pra%C5%A1kovna_difrakcija (februar 2014)

42. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 6th Ed: Surface characterization by spectroscopy and microscopy, 2007/ 1998, Thomson Brooks/Cole: 587-624

43. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA: Principles of instrumental analysis, 6th Ed: Atomic X-ray spectrometry, 2007/ 1998, Thomson Brooks/Cole: 301-329

44. http://sl.wikipedia.org/wiki/Vrsti%C4%8Dni_elektronski_mikroskop (januar 2014)

45. http://sl.wikipedia.org/wiki/%C5%A0katla_z_brki (april 2014)

8. PRILOGE

8.1. Priloga 1: Določanje vode s titracijo po Karl Fisherju

8.2. Priloga 2: Proučevanje krivulje ohlajanja

8.3. Priloga 3. Vrednotenje DSC termogramov

8.4. Priloga 4: Termogrami vzorcev

8.5. Priloga 5: Rezultati ramanske spektroskopije

8.6. Priloga 6: Rezultati rentgenske praškovne difrakcije

8.7. Priloga 7: Difraktogrami vzorcev

8.8. Priloga 8: Opisno vrednotenje vzorcev s SEM

8.9. Priloga 9: SEM slike

PRILOGE

PRILOGA 1: Določanje vode s titracijo po Karel Fisherju

Oznaka vzorca	Meritev	Vsebnost vode [%]	Povprečje (M) standardni odklon (SD)	Oznaka vzorca	Meritev	Vsebnost vode [%]	Povprečje (M) standardni odklon (SD)
001Ta	1.	0,329		004Tc	1.	0,196	
001Ta	2.	0,386	M= 0,358	004Tc	2.	0,222	M= 0,208
001Ta	3.	0,642*	SD= 0,040	004Tc	3.	0,205	SD= 0,013
001Tb	1.	0,297		004Td	1.	0,259	
001Tb	2.	0,306	M= 0,305	004Td	2.	0,215	M= 0,230
001Tb	3.	0,311	SD= 0,007	004Td	3.	0,216	SD= 0,025
001Tc	1.	0,309		005Ta	1.	0,275	
001Tc	2.	0,355	M=0,330	005Ta	2.	0,24	M= 0,257
001Tc	3.	0,327	SD= 0,023	005Ta	3.	0,255	SD= 0,018
001Td	1.	0,436		005Tb	1.	0,229	
001Td	2.	0,391	M= 0,425	005Tb	2.	0,216	M= 0,217
001Td	3.	0,448	SD= 0,030	005Tb	3.	0,207	SD= 0,011
002Ta	1.	0,331		005Tc	1.	0,275	
002Ta	2.	0,409	M= 0,361	005Tc	2.	0,240	M= 0,236
002Ta	3.	0,343	SD=0,042	005Tc	3.	0,255	SD= 0,032
002Tb	1.	0,324		005Td	1.	0,229	
002Tb	2.	0,305	M= 0,295	005Td	2.	0,216	M= 0,253
002Tb	3.	0,257	SD= 0,035	005Td	3.	0,207	SD= 0,011
002Tc	1.	0,243		006Ta	1.	0,265	
002Tc	2.	0,236	M= 0,258	006Ta	2.	0,267	M= 0,251
002Tc	3.	0,294	SD= 0,032	006Ta	3.	0,220	SD= 0,027
002Td	1.	0,298		006Tb	1.	0,193	
002Td	2.	0,323	M= 0,308	006Tb	2.	0,277	M= 0,382
002Td	3.	0,304	SD= 0,013	006Tb	3.	0,676	SD= 0,258
003Ta	1.	0,302		006Tc	1.	0,179	
003Ta	2.	0,311	M= 0,325	006Tc	2.	0,202	M= 0,197
003Ta	3.	0,363	SD= 0,033	006Tc	3.	0,210	SD= 0,016
003Tb	1.	0,228		006Td	1.	0,161	
003Tb	2.	0,225	M= 0,233	006Td	2.	0,174	M= 0,180
003Tb	3.	0,245	SD=0,011	006Td	3.	0,204	SD= 0,022
003Tc	1.	0,247		007Ta	1.	0,215	
003Tc	2.	0,206	M= 0,228	007Ta	2.	0,218	M= 0,228
003Tc	3.	0,230	SD= 0,021	007Ta	3.	0,252	SD= 0,021
003Td	1.	0,251		007Tb	1.	0,221	
003Td	2.	0,182	M= 0,215	007Tb	2.	0,232	M= 0,228
003Td	3.	0,213	SD= 0,035	007Tb	3.	0,230	SD= 0,006
004Ta	1.	0,270		007Tc	1.	0,245	
004Ta	2.	0,250	M= 0,240	007Tc	2.	0,242	M=0,215
004Ta	3.	0,200	SD= 0,036	007Tc	3.	0,159	SD= 0,049
004Tb	1.	0,196		007Td	1.	0,174	
004Tb	2.	0,237	M= 0,233	007Td	2.	0,215	M= 0,216
004Tb	3.	0,267	SD= 0,036	007Td	3.	0,260	SD= 0,043

PRILOGA 2: Proučevanje krivulje ohlajanja

Vzorec	T "freezing point" [°C]		sprememba T [°C] po zamrznitvi	max. hitrost na termočlenu Metoda linearnega prileganja hitrost [°/min]
	termočlen	polica		
001Ta	-9,3	-17	6,5	0,3971
001Tb	-13,8	-24,3	10,5	0,419
001Tc	-13,8	-24,3	8	0,3889

vzorec	T freezing point [°C]		sprememba T [°C] po zamrznitvi	hitrost ohlajanja polic [°/min]	max. Hitrost na termočlenu		prevoj na začetku	točka prevoja po zamrznitvi	linearnost krivulje po zamrznitvi	
	termočlen	polica			z linearnim fittom slope [°/h]	z odvodom [°/min]				
002Ta 1	-9,9	-36,7	8,1	2,5	-0,02992	1,75	/	da	33,5 min; -15,7°C	ne
002Ta 2	-8,4	-30,2	5,2	2,5	-0,02774	1,66	/	da	31 min; -16,9°C	ne
002Tb 1	-12,9	-37,0	6,9	2,5	-0,03245	1,95	2,02	da	32,9 min; -19,4°C	ne
002Tb 2	-12,9	-37,7	6,9	2,5	-0,03268	1,96	2,01	da	33,6 min; -20,1°C	ne
002Tc 1	-13,7	-35,0	8,2	2,5	-0,03179	1,91	2,63	da	27,2 min; -21,6	ne
002Tc 2	-6,4	-33,0	3,5	2,5	-0,02255	1,35	1,62	ne	33,5 min; -14,1°C	da
002Td 1	-12,9	-36,1	6,9	2,5	-0,03255	1,95	2,01	da	34,3 min; -20,9	da
002Td 2	-7,1	-35,7	3,1	2,5	-0,02798	1,69	1,74	da	33,8 min; -15,0°C	da
003Ta 1	-9,9	-45	8,1	5	-0,02923	1,75	3,80	da (izrazit)	33,6 min; -15,8°C	da
003Ta 2	-5,8	-39	2,8	5	-0,04231	2,59	3,39	ne	32,0 min; -17,3°C	da
003Tb1	-12,5	-42	7,8	5	-0,4425	2,67	3,35	da (izrazit)	33,9 min; -18,4°C	ne
003Tb 2	-3,8	-42,6	2,1	5	-0,3358	2,01	2,25	da (izrazit)	31,3 min; -15,3°C	ne
003Tc 1	-8,9	-41,1	5,5	5	-0,04808	2,88	3,26	da	29,4 min; -18,4°C	ne
003Tc 2	-6,9	-47,6	4,1	5	-0,03466	2,08	2,74	ne	30,7 min; -18,8°C	ne
003Td 1	-13,1	-44,4	7,2	5	-0,04036	2,42	3,00	da	33,5 min; -22,8°C	ne
003Td 2	-4,3	-41	0,2	5	-0,03691	2,21	2,57	da	34,4 min; -18,2°C	da

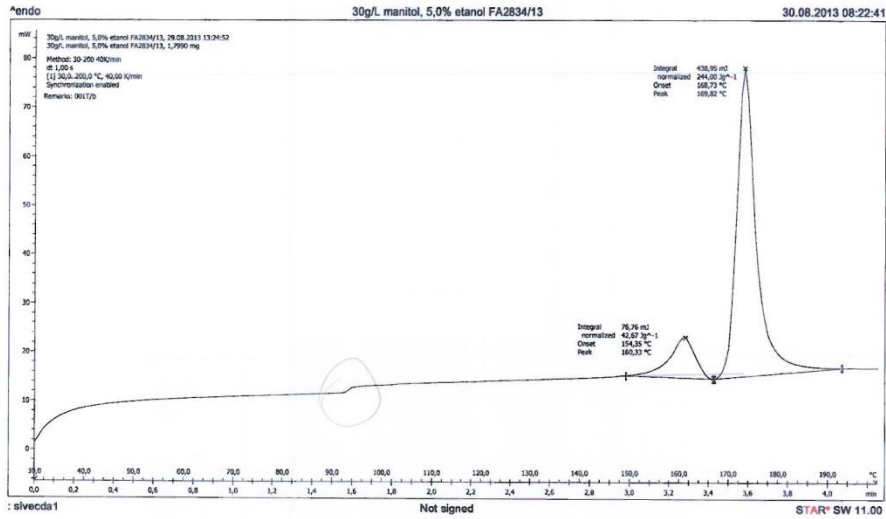
vzorec	T freezing point [°C]		sprememba T [°C] po zamrznitvi	hitrost ohlajanja police [°/min]	max. Hitrost na termočlenu			prevoj na začetku	točka prevoja po zamrznitvi	linearnost krivulje po zamrznitvi
	termočlen	polica			z linearnim fittom		z odvodom [°/min]			
					slope [°/h]	hitrost [°/min]				
004T a1	-8,0	-44	6,1	7,5	-0,0423	2,54	3,21	da (rahel)	33,9 min; -16,2°C	ne
004Ta 2	-6,6	-43,2	3,4	7,5	-0,0033	1,98	2,64	ne	32,3 min; -14,5°C	ne
004Tb 1	-15,4	-45	1,2	7,5	-0,03843	2,31	2,42	da (rahel)	35,8 min; -20,1°C	ne
004Tb 2	-6,4	-44,9	4,5	7,5	-0,03806	2,28	2,8	da (rahel)	34,2 min; -15,1°C	ne
004Tc 1	-16	-45	9,2	7,5	-0,04062	2,44	2,62	da (rahel)	35,6 min; -22,2°C	ne
004Tc 2	-9,3	-45	6	7,5	-0,03627	2,18	2,48	ne	33,4 min; -14,2°C	ne
004Td 1	-14,4	-45	9,2	7,5	-0,04298	2,58	2,92	da (rahel)	33,8 min; -20,0°C	ne
004Td 2	-7	-45	2,9	7,5	-0,04078	2,25	2,66	da (rahel)	34,7 min; -15,4°C	ne
006Ta 1	-11,1	-45	9,2	police na -45	-0,05666	3,40	5,69	da (izrazit)	23,7 min; -15°C	ne
006Ta 2	-12	-45	8,5	police na -45	-0,07717	4,63	5,62	ne	17,5 min; -18,5°C	ne
006Tb 1	-18,2	-45	11,5	police na -45	-0,04161	2,50	3,95	da (rahel)	25,2 min; -22,2°C	ne
006Tb 2	-6,9	-45	5,0	police na -45	-0,06931	4,16	5,06	da	19,5 min; -15,0°C	ne
006Tc 1	-15,4	-45	10,4	police na -45	-0,04798	2,89	3,78	da (rahel)	23,4 min; -21,2	ne
006Tc 2	-7,2	-45	4,1	police na -45	-0,0777	4,66	6,43	ne	19,1 min; -17°C	ne
006Td 1	-13,8	-45	7,7	police na -45	-0,05026	3,02	4,07	da (rahel)	22,82 min; -20,7°C	ne
007Ta 1	-4	-48	2,4	10	-0,03857	2,31	2,63	da	31,7 min; -14,1°C	da
007Ta 2	-13	-45	9,6	10	-0,03981	2,39	2,63	da (rahel)	33,3 min; -14,7°C	da
007Tb 1	-11,4	-45	6,5	10	-0,03376	2,03	2,25	da	36,2 min; -16,9°C	da
007Tb 2	-3,8	-45	2	10	-0,03583	2,15	2,23	da	35,7 min; -15,3°C	da
007T c 1	-13,7	-45	9,5	10	-0,03572	2,14	2,25	da	36,3 min; -18,4°C	da
007T c 2	-10,3	-45	7,1	10	-0,003366	2,02	2,15	ne	36,8 min; -15,9°C	da
007Td 1	-11,3	-45	5,9	10	-0,03064	1,84	2,02	da (zelo rahel)	39,0 min; -16,6°C	da
007Td 2	-12,1	-45	7,5	10	-0,03328	2	2,15	da	37,2 min; -16,2°C	da

PRILOGA 3: Vrednotenje DSC termogramov

Oznaka vzorca	Drugi vrh			Prvi vrh			Lociranos t vhrrov glede na bazno linijo	Prevoj
	Integral normalized [Jg ⁻¹]	Onset [°C]	Peak [°C]	Integral normalized [Jg ⁻¹]	Onset [°C]	Peak [°C]		
001T/a	195,52	168,88	170,30	55,43	155,19	160,27	nad	NE
001T/b	244,00	168,73	169,82	42,67	154,35	160,33	pod	DA
001T/c	190,38	169,44	171,00	29,41	154,62	161,21	pod	NE
001T/d	142,36	169,57	172,22	20,07	153,00	160,68	pod	NE
002T/a	96,57	169,02	171,29	36,43	154,95	160,21	nad	DA
002T/b	285,28	167,93	169,31	26,74	150,68	158,38	na BL	NE
002T/c	253,15	168,55	170,07	20,22	153,97	160,08	na BL	NE
002T/d	232,61	168,42	169,84	20,10	153,86	159,38	pod	NE
003T/a	151,04	168,84	171,06	58,86	154,90	160,05	na BL	DA
003T/b	273,78	168,22	169,30	38,40	154,24	159,50	na BL	NE
003T/c	235,01	168,56	170,28	29,40	153,95	160,10	pod	NE
003T/d	295,05	167,75	168,51	25,58	152,94	158,68	pod	NE
004T/a	241,10	168,42	170,21	36,04	154,35	159,92	pod	NE
004T/b	260,58	168,09	169,32	39,28	153,92	159,95	pod	NE
004T/c	306,70	168,14	169,65	21,92	154,36	159,87	na BL	NE
004T/d	302,27	169,49	170,28	24,76	155,61	161,01	pod	DA
005T/a	278,38	169,19	170,27	44,47	154,73	160,86	pod	NE
005T/b	240,33	169,00	170,85	66,13	154,79	160,97	pod	NE
005T/c	270,25	169,59	171,35	34,96	154,57	161,00	pod	DA
005T/d	291,88	169,58	171,18	26,06	155,73	161,02	pod	NE
006T/a	227,68	169,21	170,83	72,33	155,80	161,47	na BL	NE
006T/b	212,88	169,30	171,47	39,13	155,82	161,44	pod	NE
006T/c	289,72	169,33	170,44	29,92	155,88	160,98	pod	NE
006T/d	270,85	169,52	170,98	22,14	153,98	161,40	na BL	NE
007T/a	249,08	169,13	170,74	46,89	154,67	160,97	pod	NE
007T/b	259,53	169,61	171,27	37,12	156,16	160,97	nad	NE
007T/c	230,20	170,23	171,81	33,20	155,27	161,94	pod	NE
007T/d	219,08	170,01	172,19	24,09	155,14	161,58	pod	NE

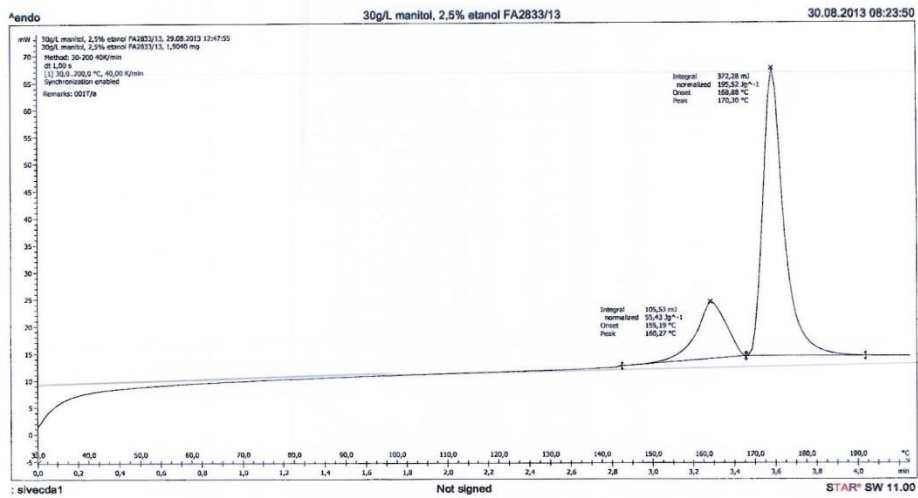
PRILOGA 4: Termogrami vzorcev

vzorec 001Ta



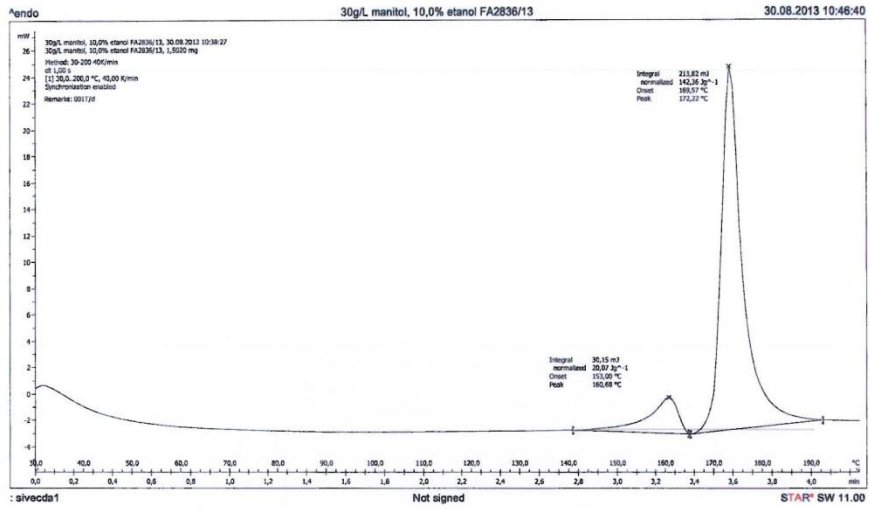
*DO 30.8.13
R 30.8.13*

vzorec 001Tb



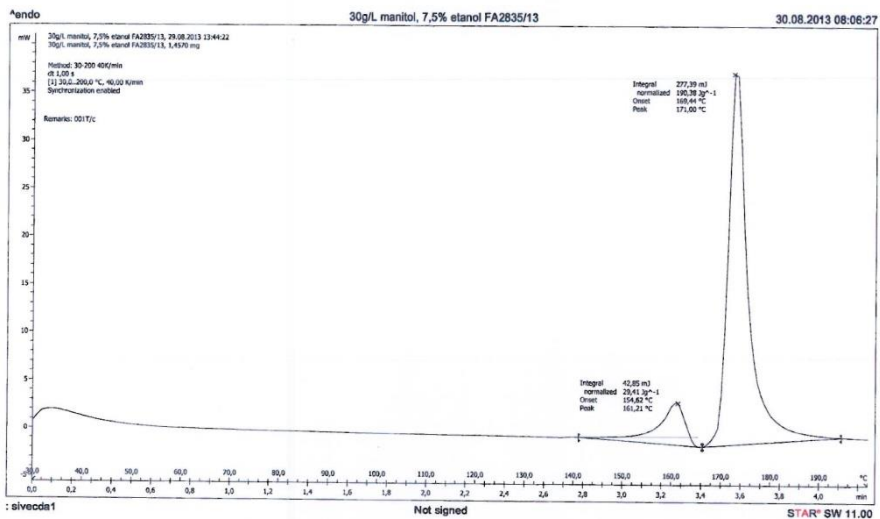
*DO 30.8.13
R 30.8.13*

vzorec 001Tc



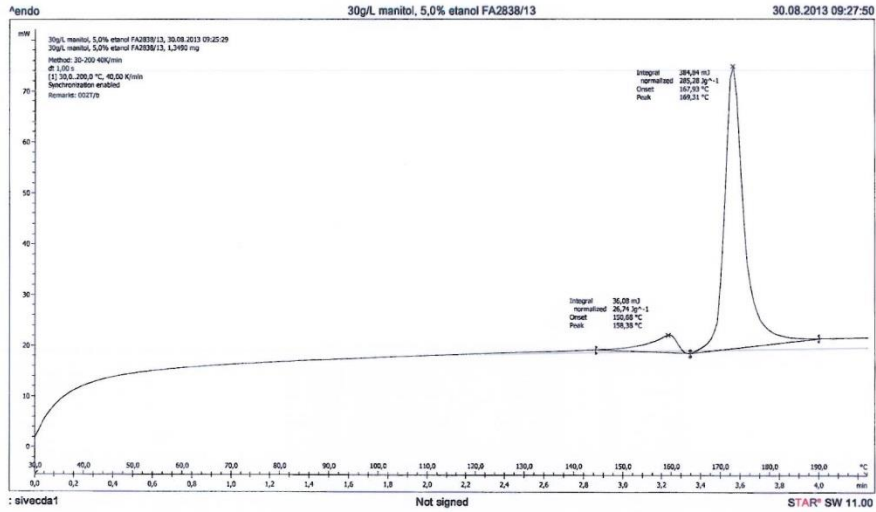
DO 30.8.13
B.B.P.13

vzorec 001Td



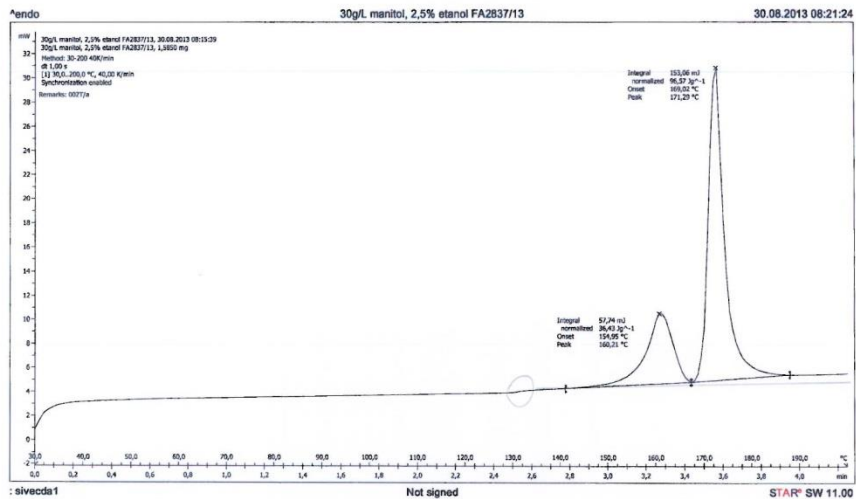
DO 30.8.13
B.B.P.13

Vzorec 002Ta



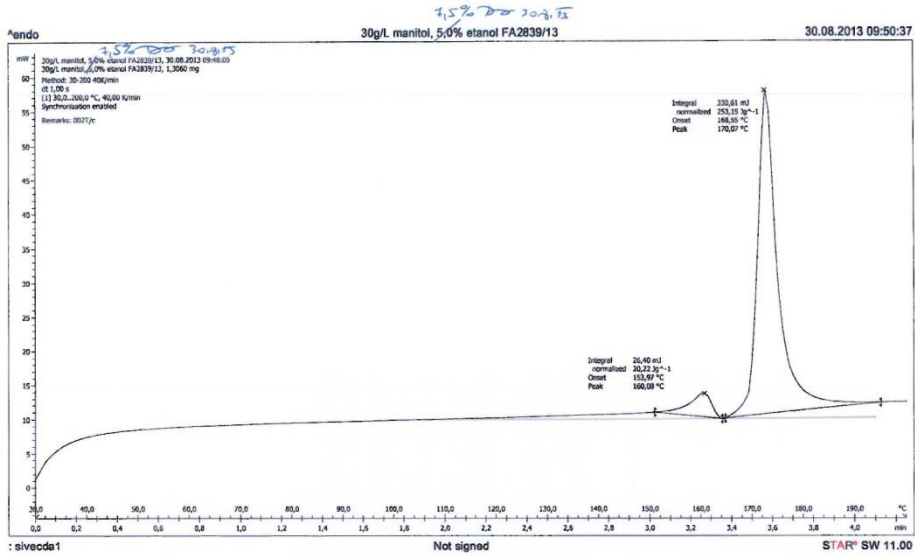
30.8.13
D.S. & A.

Vzorec 002Tb



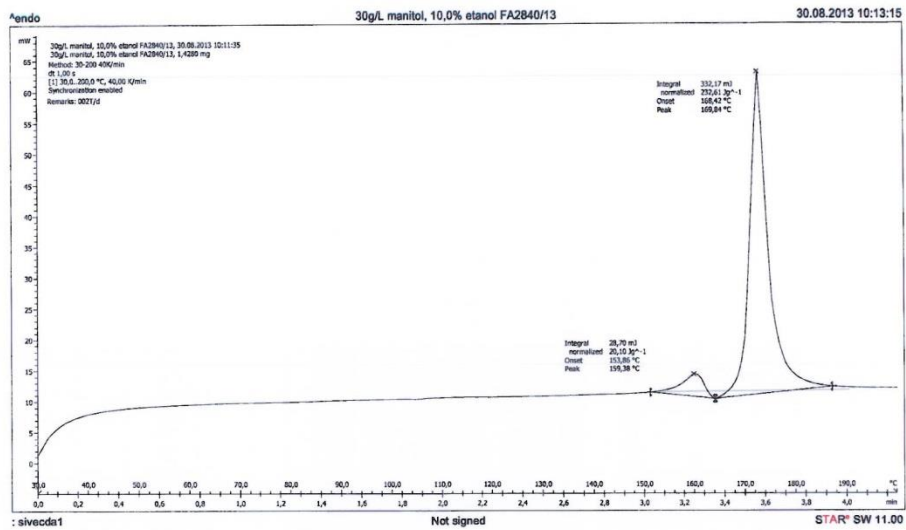
30.8.13
D.S. & A.

Vzorec 002Tc



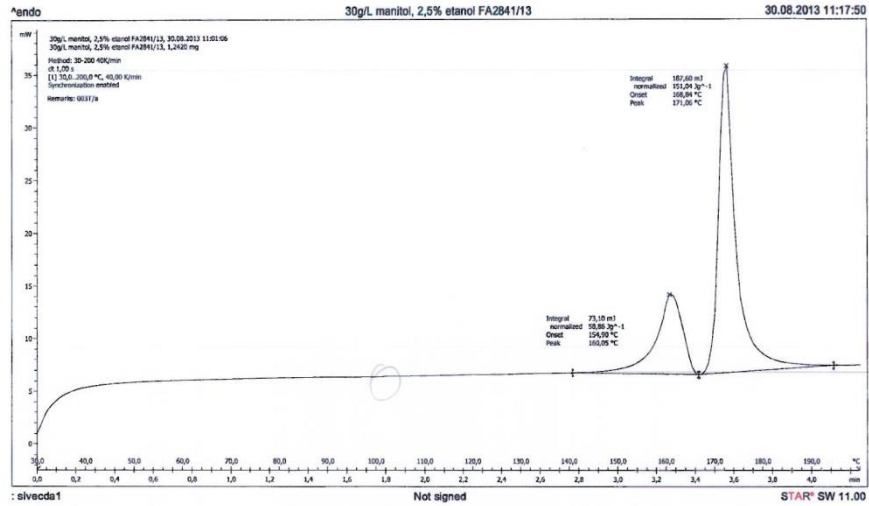
1,5% do 30.8.13
100 30.8.13
230.8.13

Vzorec 002Td



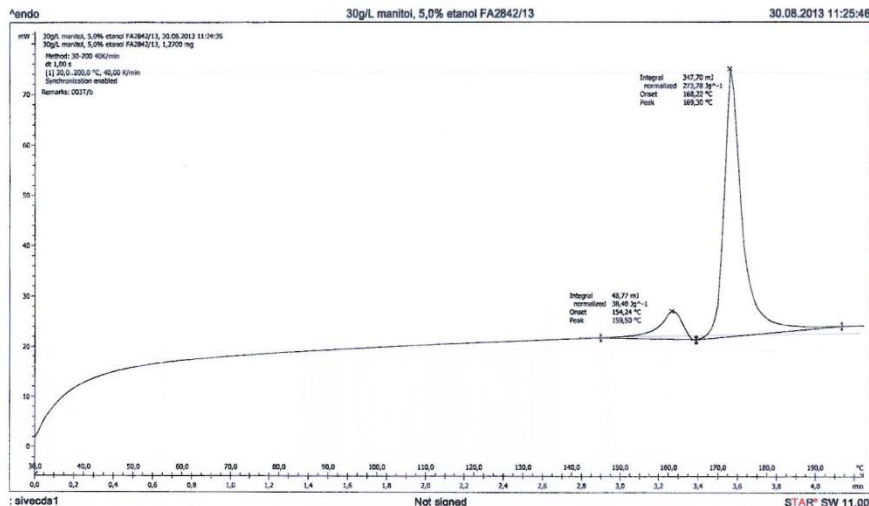
100 30.8.13
230.8.13

Vzorec 003Ta



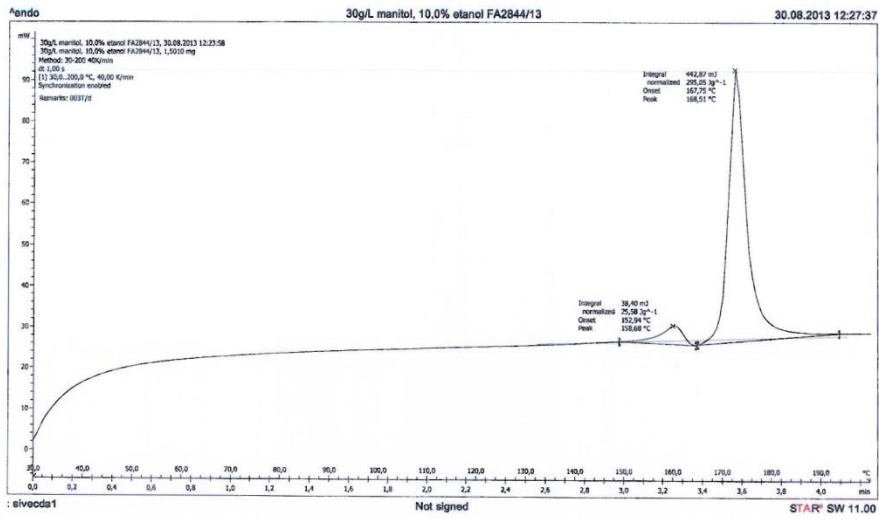
Do 30.8.13
P.30.8.13

Vzorec 003Tb



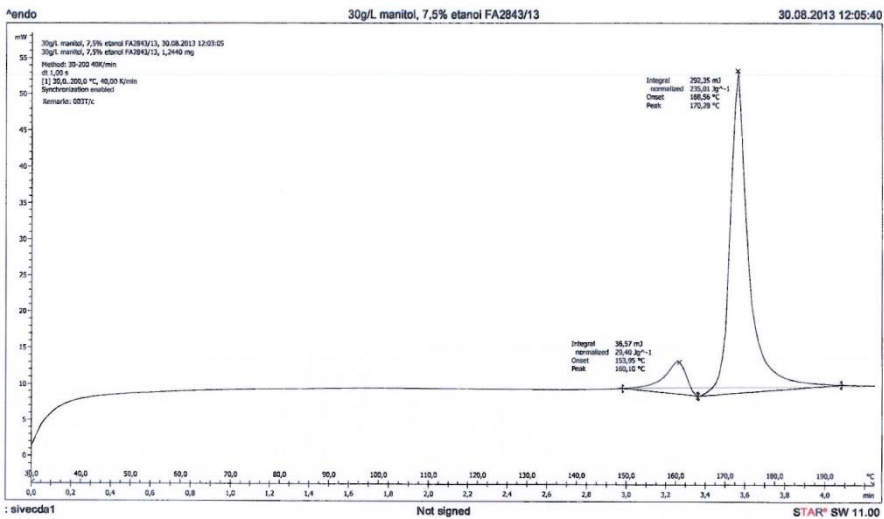
Do 30.8.13
P.30.8.13

Vzorec 003Tc



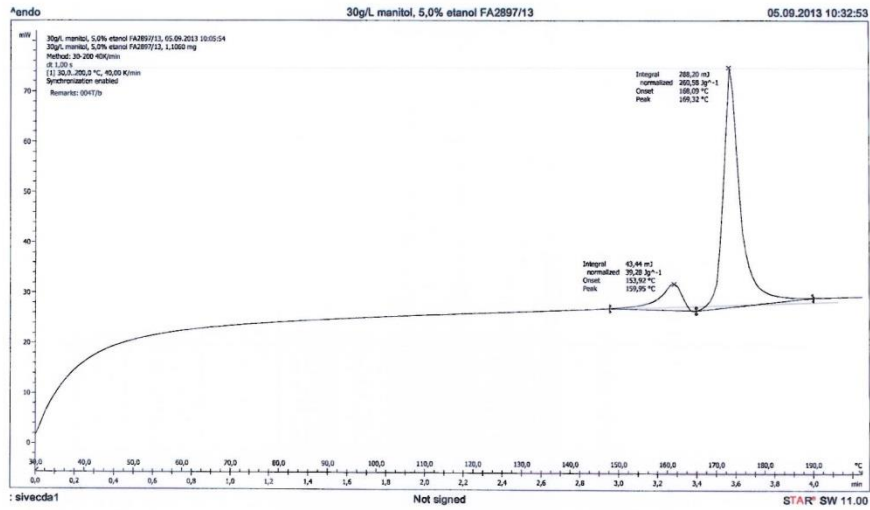
PO 30.8.13
R30.8.13

Vzorec 003Td



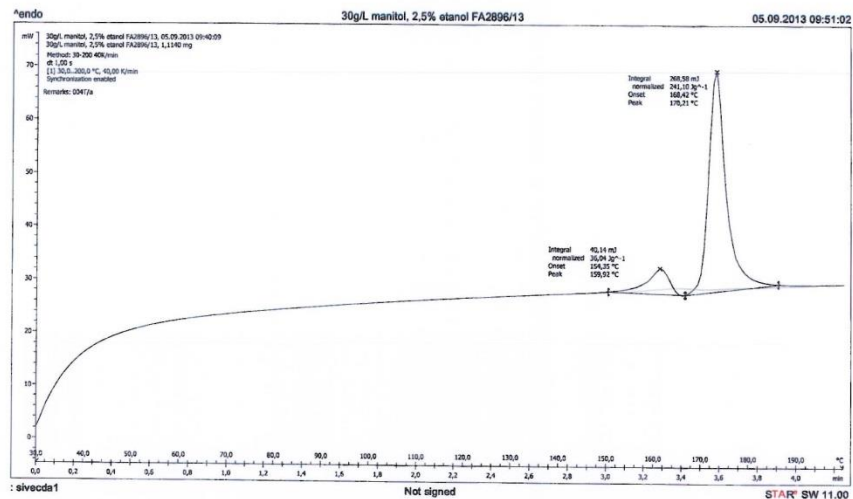
PO 30.8.13
R30.8.13

Vzorec 004Ta



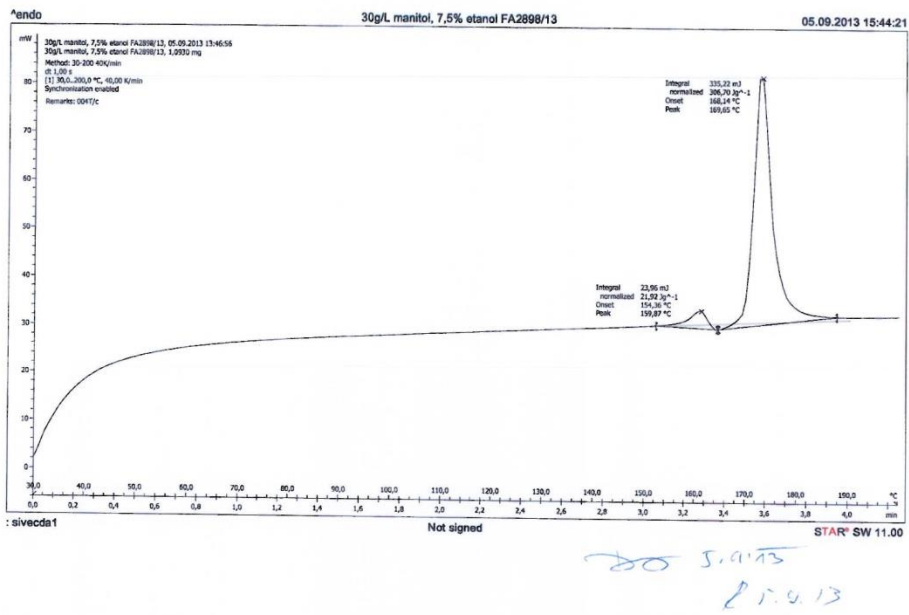
Handwritten signature and date: 5.9.13 R.S.U.S

Vzorec 004Tb

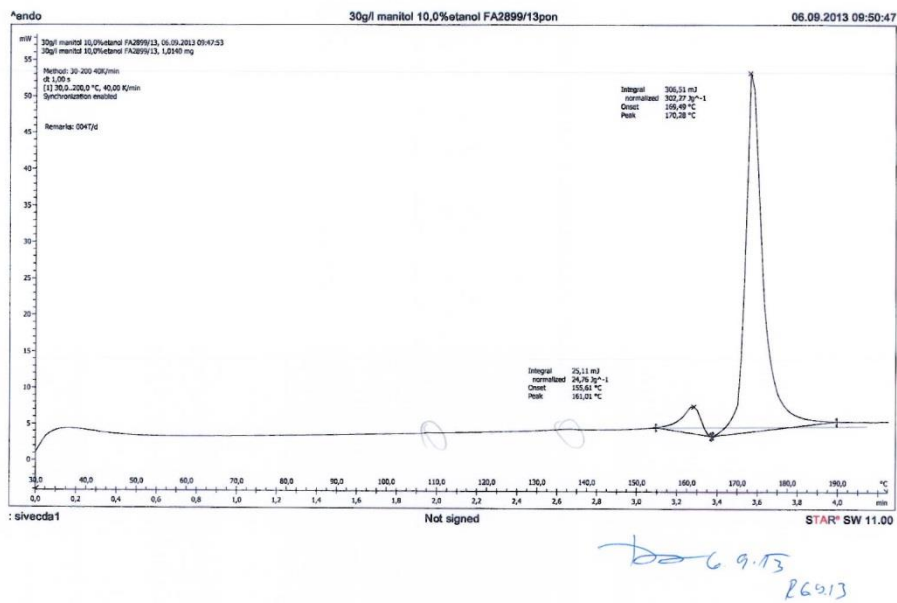


Handwritten signature and date: 5.9.13 R.S.U.S

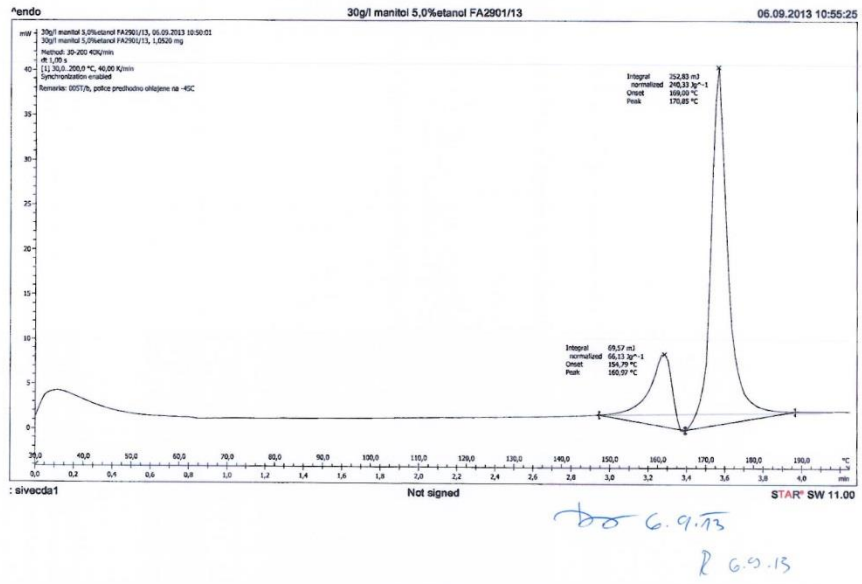
Vzorec 004Tc



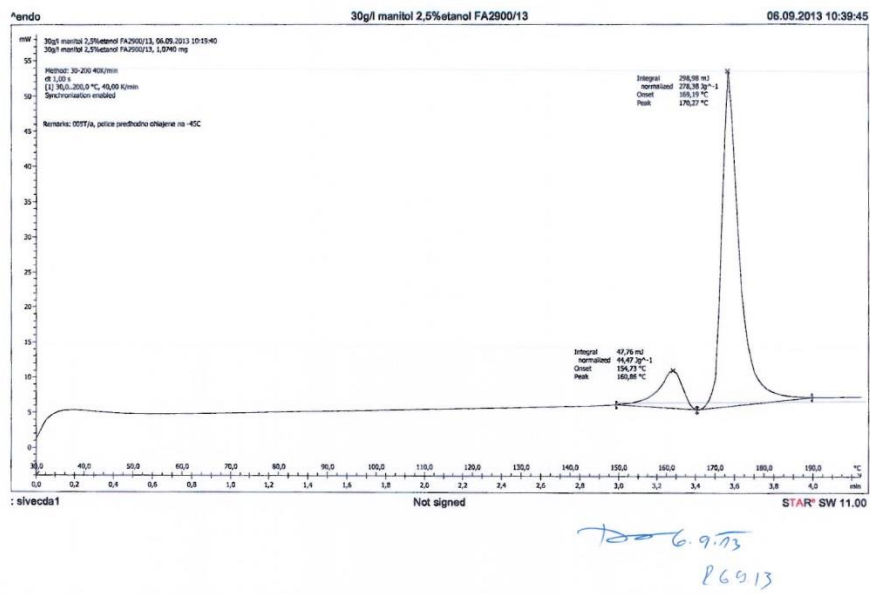
Vzorec 004Td



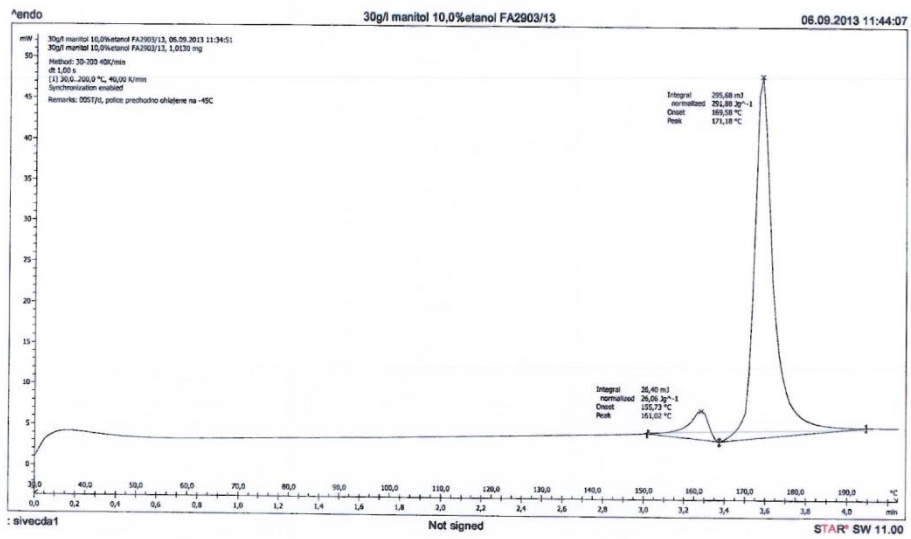
Vzorec 005Ta



Vzorec 005Tb

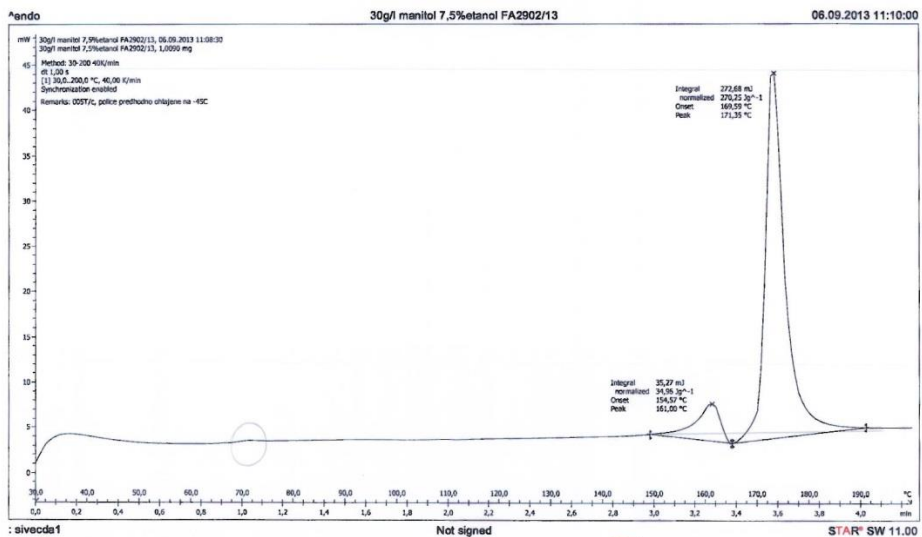


Vzorec 005Tc



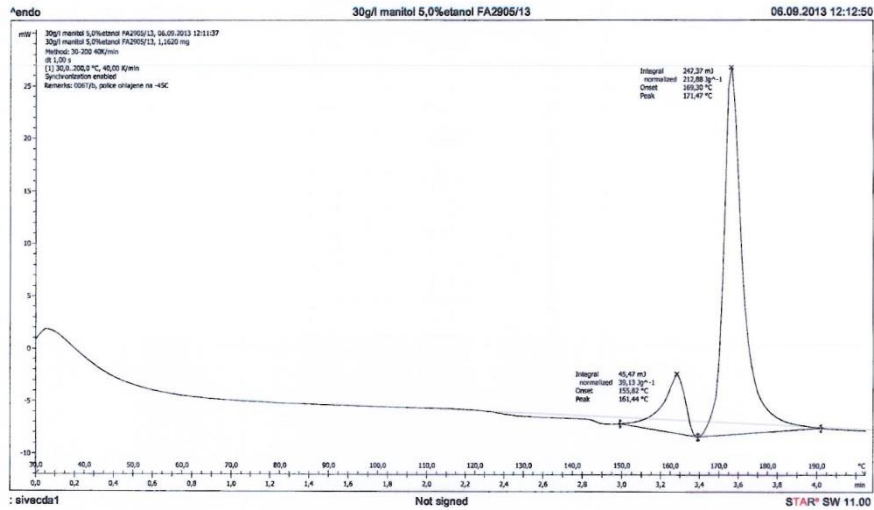
6.9.13
26.9.13

Vzorec 005Td

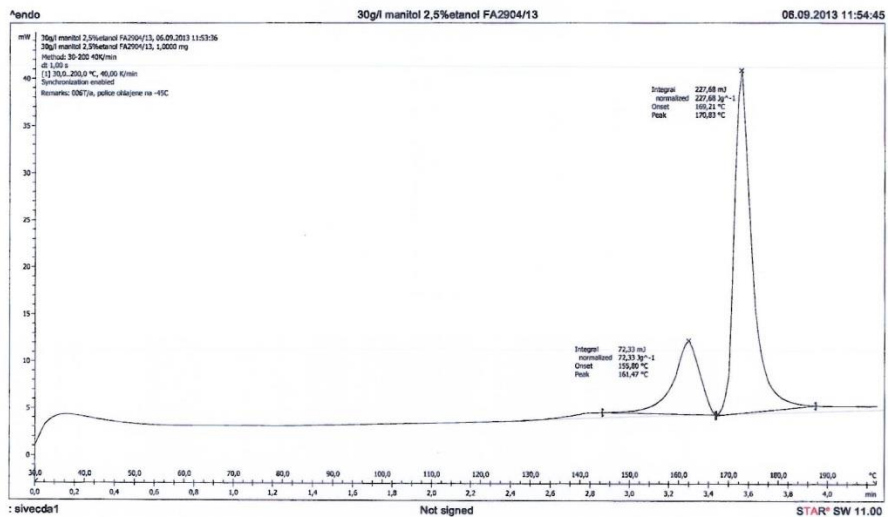


6.9.13
26.9.13

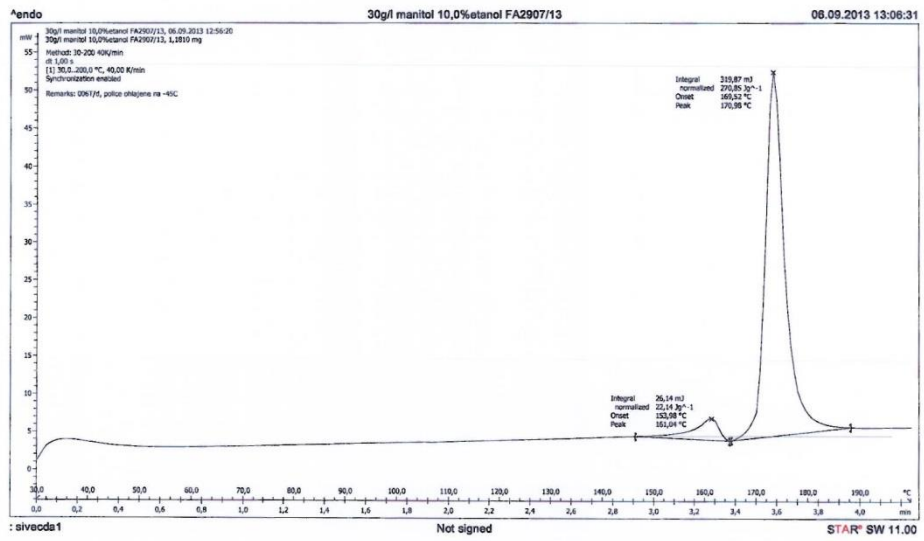
Vzorec 006Ta



Vzorec 006Tb

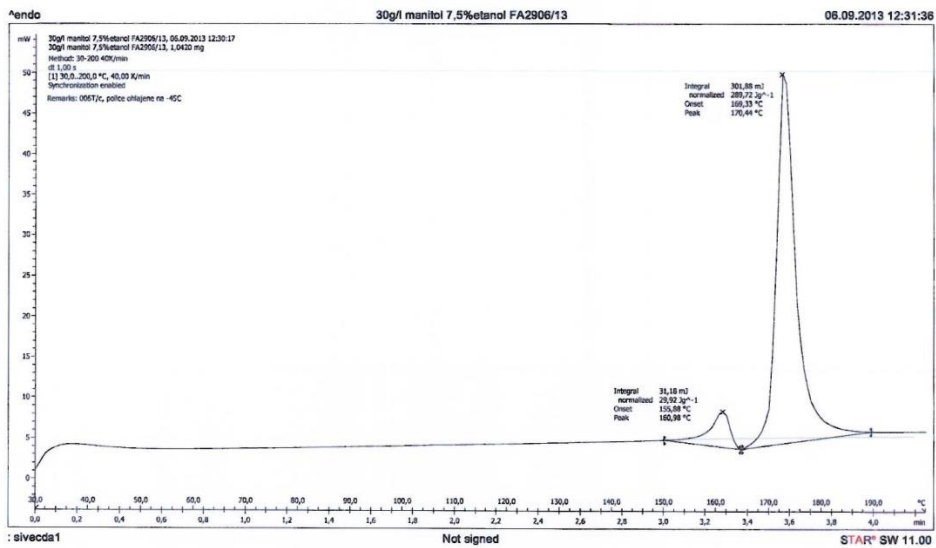


Vzorec 006Tc



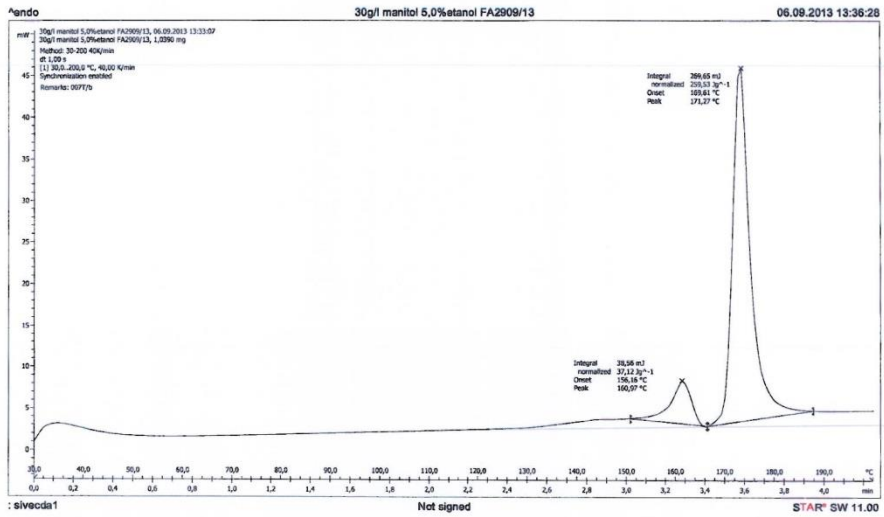
6.9.13

Vzorec 006Td



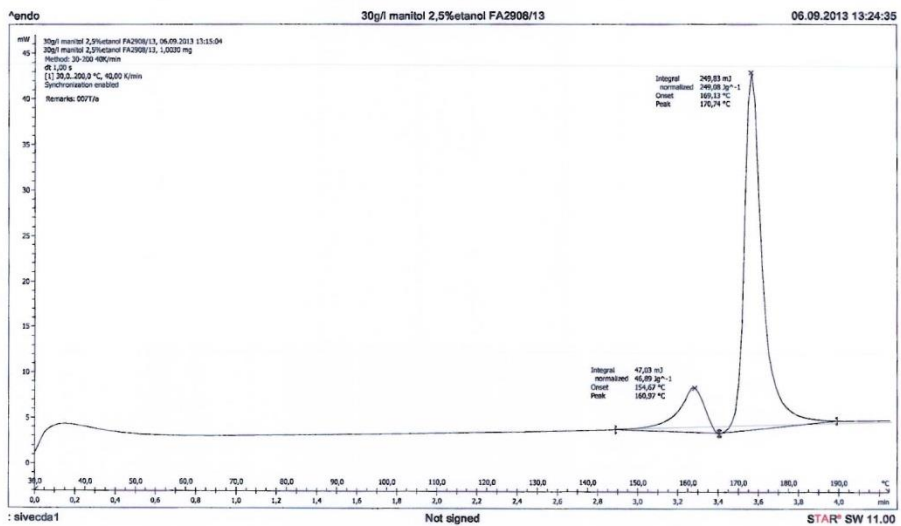
6.9.13
PC.9.13

Vzorec 007Ta



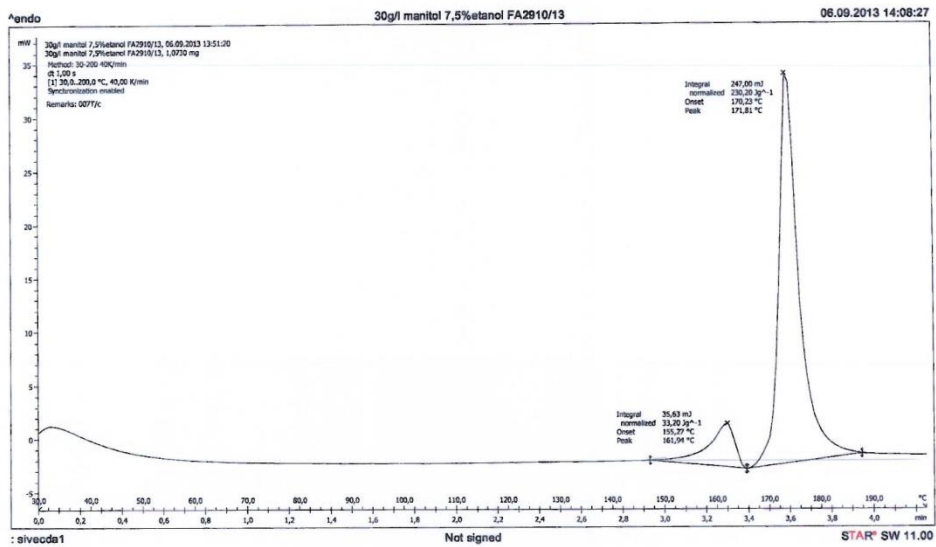
DO 6.9.13
P6.9.13

Vzorec 007Tb



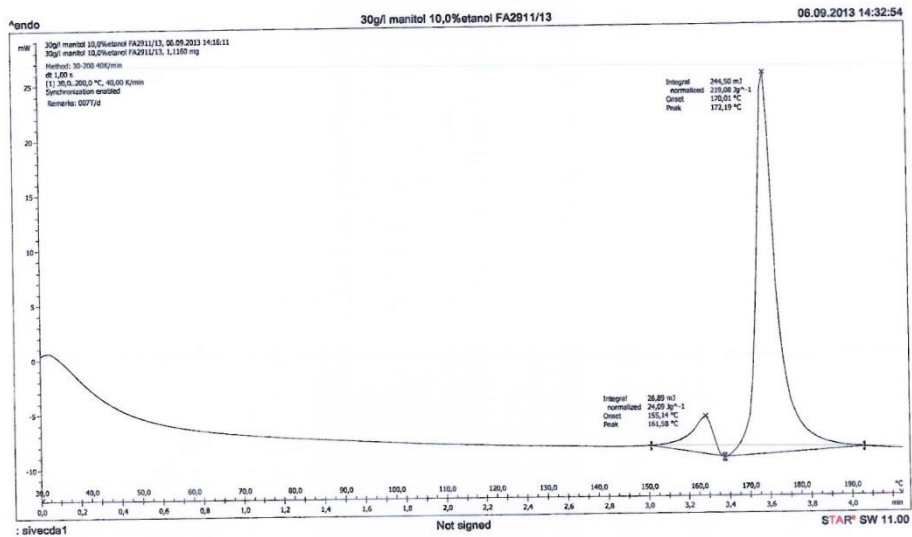
DO 6.9.13
P6.9.13

Vzorec 007Tc



6.9.13
16.9.13

Vzorec 007Td



6.9.13
16.9.13

PRILOGA 5: Rezultati Ramanske spektroskopije

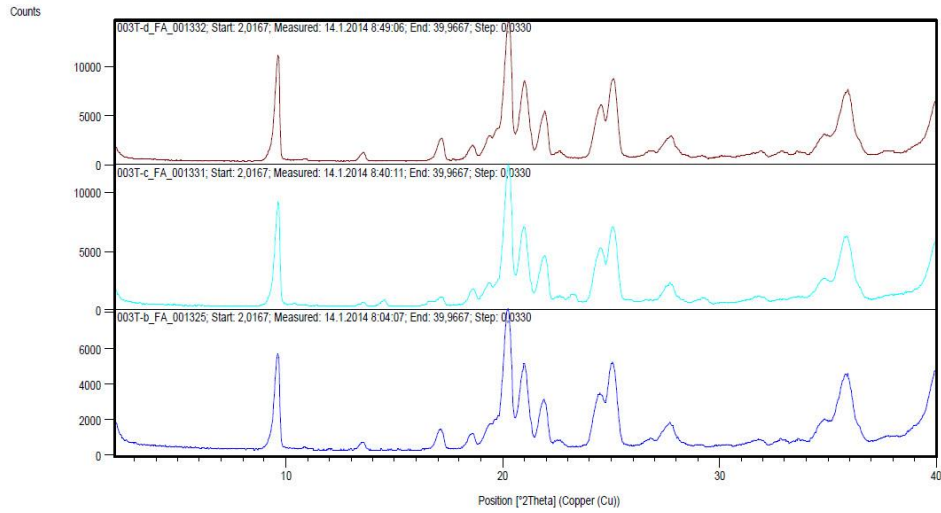
vzorec	laser	alfa polimorf			beta polimorf			delta polimorf			Kvantitativni deleži kristalnih oblik manitola			Kvantitativni delež kristalnih oblik manitola z upoštevanjem šuma		
		x	x - šum	SD	x	x - šum	SD	x	x - šum	SD	alfa	beta	delta	alfa	beta	delta
001Ta	IR	0,048	0,038	0,027	0,454	0,454	0,042	0,804	0,784	0,05	3,7%	34,8%	61,6%	3,0%	35,6%	61,4%
001Tb	IR	0,041	0,031	0,042	0,373	0,373	0,099	0,528	0,508	0,126	4,4%	39,6%	56,1%	3,4%	40,9%	55,7%
001Tc	IR	0,023	0,013	0,043	0,356	0,356		0,52	0,5	0,112	2,6%	39,6%	57,8%	1,5%	41,0%	57,5%
001Td	IR	0,016	0,006	0,03	0,169	0,169		0,573	0,553	0,194	2,1%	22,3%	75,6%	0,8%	23,2%	76,0%
002Ta	IR	0,048	0,018	0,03	0,048	0,048	0,025	0,759	0,739	0,0733	5,6%	5,6%	88,8%	2,2%	6,0%	91,8%
002Tb	IR	0,027	0,017	0,032	0,036	0,036	0,024	0,639	0,619	0,08	3,8%	5,1%	91,0%	2,5%	5,4%	92,1%
002Tc	IR	0,039	0,009	0,047	0,172	0,172	0,171	0,632	0,612	0,141	4,6%	20,4%	75,0%	1,1%	21,7%	77,2%
002Td	IR	0,044	0,014	0,029	0,126	0,126	0,182	0,777	0,757	0,001	4,6%	13,3%	82,0%	1,6%	14,0%	84,4%
003Ta	IR	0,035	0,005	0,034	0,04	0,04	0,024	0,735	0,715	0,064	4,3%	4,9%	90,7%	0,7%	5,3%	94,1%
003Tb	IR	0,089	0,059	0,068	0,087	0,087	0,102	0,721	0,701	0,086	9,9%	9,7%	80,4%	7,0%	10,3%	82,8%
003Tc	IR	0,166	0,136	0,113	0,28	0,28	0,216	0,484	0,464	0,173	17,8%	30,1%	52,0%	15,5%	31,8%	52,7%
003Td	IR	0,053	0,023	0,063	0,117	0,117	0,18	0,595	0,575	0,151	6,9%	15,3%	77,8%	3,2%	16,4%	80,4%
004Ta	IR	0,069	0,039	0,039	0,043	0,043	0,022	0,715	0,695	0,062	8,3%	5,2%	86,5%	5,0%	5,5%	89,4%
004Tb	IR	0,01	0	0,035	0,035	0,035	0,027	0,439	0,419	0,107	2,1%	7,2%	90,7%	0,0%	7,7%	92,3%
004Tc	IR	0,174	0,164	0,039	0,069	0,069	0,059	0,686	0,666	0,08	18,7%	7,4%	73,8%	18,2%	7,7%	74,1%
004Td	IR	0,045	0,035	0,059	0,127	0,127	0,172	0,585	0,565	0,131	5,9%	16,8%	77,3%	4,8%	17,5%	77,7%
005Ta	rdeči	0,094	0,034	0,032	0,004	0,004	0,027	0,414	0,394	0,059	18,4%	0,8%	80,9%	7,9%	0,9%	91,2%
005Tb	IR	0,044	0,034	0,045	0,044	0,044	0,023	0,695	0,675	0,093	5,6%	5,6%	88,8%	4,5%	5,8%	89,6%
005Tc	rdeči	0,122	0,062	0,058	0,067	0,067	0,139	0,348	0,328	0,094	22,7%	12,5%	64,8%	13,6%	14,7%	71,8%
005Td	IR	0,0253	0,0153	0,03	0,149	0,149	0,178	0,592	0,572	0,138	3,3%	19,4%	77,3%	2,1%	20,2%	77,7%
006Ta	rdeči	0,125	0,065	0,032	0,000	0,000	0,028	0,59	0,57	0,078	17,5%	0,0%	82,5%	10,2%	0,0%	89,8%
006Tb	rdeči	0,239	0,179	0,071	0,011	0,011	0,041	0,604	0,584	0,091	28,0%	1,3%	70,7%	23,1%	1,4%	75,5%
006Tc	rdeči	0,187	0,127	0,071	0,01	0,01	0,028	0,44	0,42	0,075	29,4%	1,6%	69,1%	22,8%	1,8%	75,4%
006Td	rdeči	0,155	0,095	0,082	0,025	0,025	0,068	0,443	0,423	0,09	24,9%	4,0%	71,1%	17,5%	4,6%	77,9%
007Ta	rdeči	0,074	0,014	0,032	0,007	0,007	0,029	0,341	0,321	0,059	17,5%	1,7%	80,8%	4,1%	2,0%	93,9%
007Tb	rdeči	0,095	0,035	0,046	0,015	0,015	0,041	0,315	0,295	0,075	22,4%	3,5%	74,1%	10,1%	4,3%	85,5%
007Tc	rdeči	0,087	0,027	0,04	0,032	0,032	0,08	0,357	0,337	0,079	18,3%	6,7%	75,0%	6,8%	8,1%	85,1%
007Td	rdeči	0,061	0,001	0,04	0,078	0,078	0,147	0,249	0,229	0,092	15,7%	20,1%	64,2%	0,3%	25,3%	74,4%

PRILOGA 6: Rezultati rentgenske praškovne difrakcije

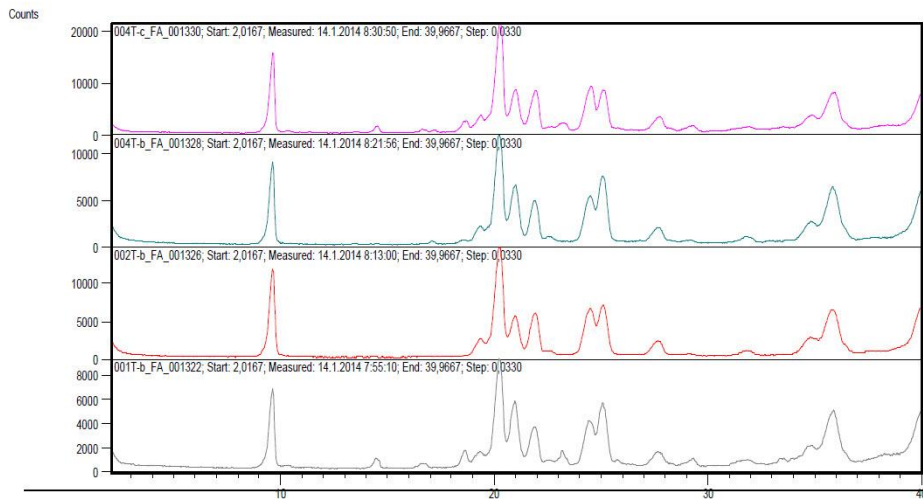
vzorec	Pojavnost kristalnih oblik manitola	intenziteta vrhov	
		alfa	beta
001Ta	delta + beta	0	180
001Tb	delta + beta	0	835
001Tc	delta + beta	0	570
001Td	delta + beta	0	990
002Ta	delta	0	0
002Tb	delta + (alfa)	Na meji detekcije	0
002Tc	delta + beta + alfa	1320	260
002Td	delta + beta + alfa	940	370
003Ta	delta + (alfa)	Na meji detekcije	0
003Tb	delta + beta + alfa	1120	0
003Tc	delta + beta + alfa	750	570
003Td	delta + alfa	2250	0
004Ta	delta + alfa	750	0
004Tb	delta + alfa + (beta)	360	Na meji detekcije
004Tc	delta + beta + alfa	480	1240
004Td	delta + beta + alfa	210	220
005Ta	Delta	0	0
005Tb	delta + alfa + (beta)	280	Na meji detekcije
005Tc	delta + beta + alfa	190	1160
005Td	delta + beta + alfa	110	370
006Ta	delta + alfa	210	0
006Tb	delta + alfa	4870	0
006Tc	delta + alfa	3360	0
006Td	delta + beta + alfa	1640	2250
007Ta	delta + alfa	310	0
007Tb	delta + alfa	1750	0
007Tc	delta + beta + alfa	110	200
007Td	delta + beta + alfa	750	1240

PRILOGA 7: Difraktogrami vzorcev

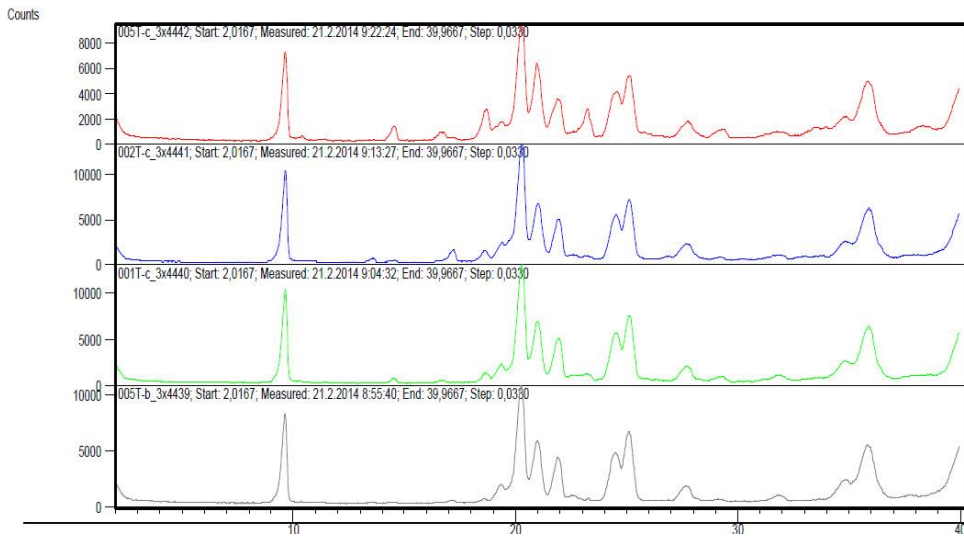
Vzorci 003Td, 003Tc, 003Tb



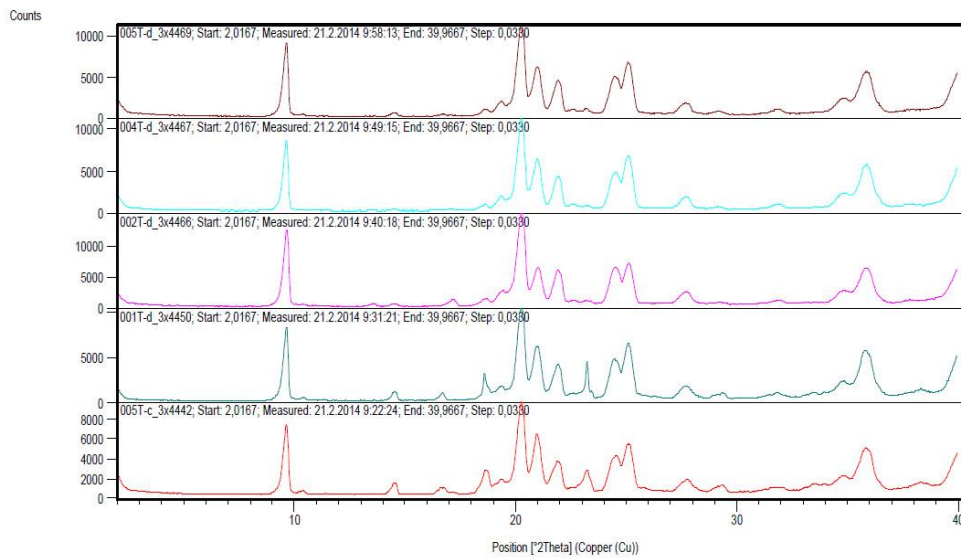
Vzorci 004Tc, 004Tb, 002Tb, 001Tb



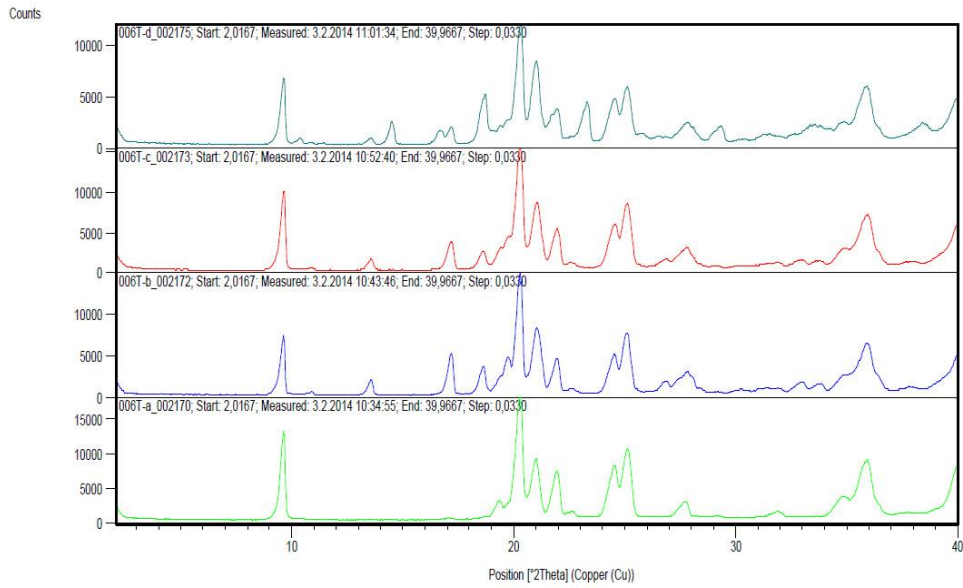
Vzorci 005Tc, 002Tc, 001Tc, 005Tb



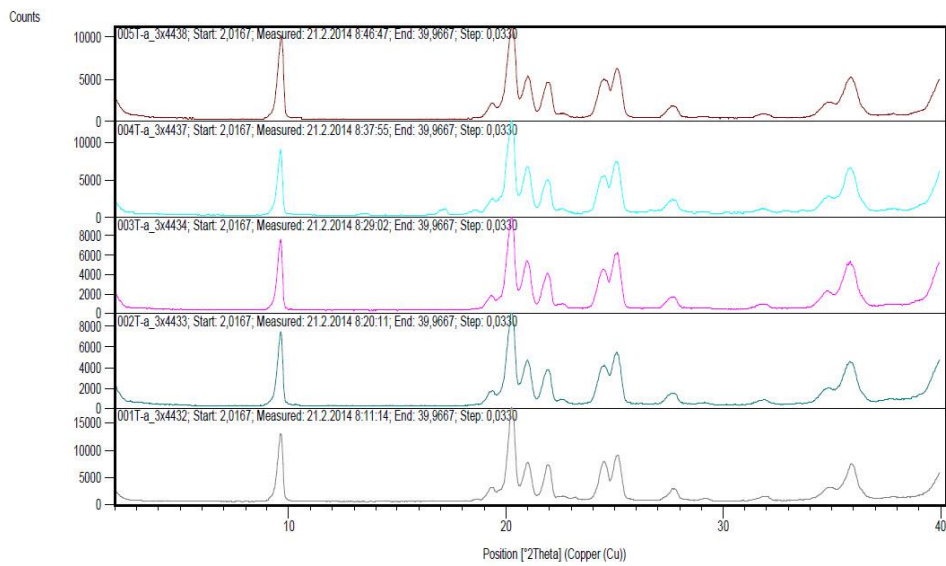
Vzorci 005Td, 004Td, 001Td, 005Tc



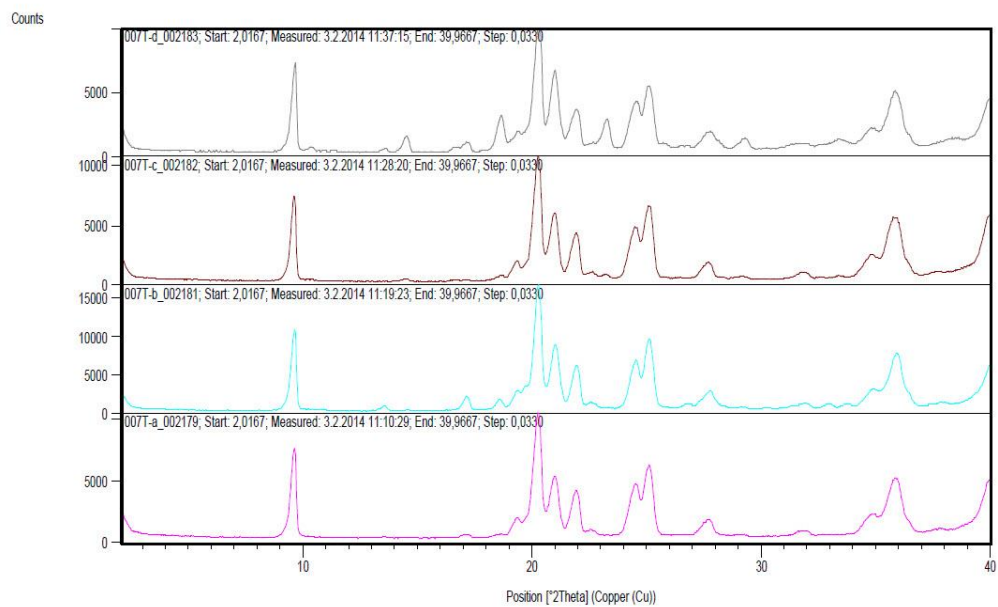
Vzorci 006Td, 006Tc, 006Tb, 006Ta



Vzorci 005Ta, 004Ta, 003Ta, 002Ta, 001Ta



Vzorci 007Td, 007Tc, 007Tb, 007Ta



PRILOGA 8: Opisno vrednotenje SEM

vzorec	opis	»Ježki«	100x povečava			približna ocena števila delcev na podlago	2500x povečava ostre/mehke iglice	500x povečava posebnosti	Opombe
			Velikost delcev [um]	povp. velikost					
001Ta	večje število delcev, različno razporejenih po prostoru	/	od 20 do 200	120		od 100 do 200	mehke	ježkom podobne strukture opazne šele pri večji povečavi	/
001Tb	delci zloženi v večje agregate, različno razporejeni v prostor	/	od 40 do 500	240		od 10 do 15	mehke	/	/
001Tc	delci posamič in zloženi v večje agregate, različno razporejeni v prostor	2%	od 40 do 500	200		od 15 do 30	mehke	/	/
001Td	delci zloženi v večje agregate, različno razporejeni v prostor	/	od 80 do 300	240		od 15 do 20	ostre	področja kjer so iglice mehke in področja kjer so iglice zelo ostre	/
002Ta	delci zloženi v večje agregate v primerjavi z 001Ta vzorcev, različno razporejeni v prostor	/	od 60 do 300	180		od 20 do 30	mehke	ježkom podobne strukture opazne šele pri večji povečavi. Ježki izraščajo iz ploščatih in kompleksnejših tvorb	delci so zalo različnih velikosti
002Tb	delci zloženi v večje, ploščate agregate, različno razporejeni v prostor	6%	od 100 do 300	200		od 10 do 20	mehke	več ježkom podobnih struktur, ki izraščajo iz površin ploščatih ali kompleksnejših tvorb	/
002Tc	delci zloženi v večje kompleksnejše agregate različno razporejene v prostor	/	od 60 do 450	200		od 10 do 15	ostre	/	delci so zalo različnih velikosti
002Td	večji delci oz agregati različno razporejeni v prostor	/	od 150 do 300	250		od 10 do 15	mehke	prisoten delec v obliki cveta	/

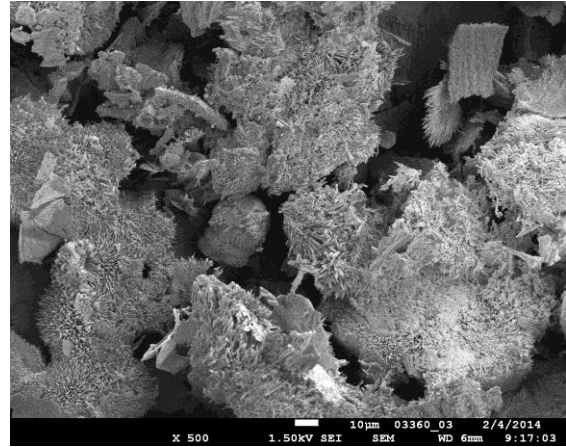
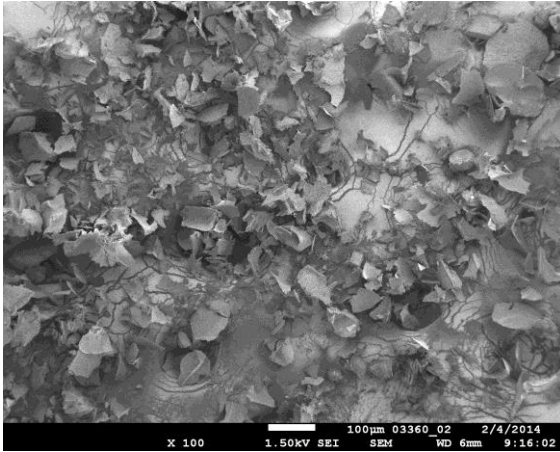
vzorec	opis	100x povečava			približna ocena števila delcev na podlago	2500x povečava ostre/mehke iglice	500x povečava posebnosti	Opombe
		»Ježki«	velikost delcev [um]	povp. velikost				
003Ta	manjši ploščati delci bolj okroglih oblik	/	od 40 do 100	80	od 100 do 150	mehke	/	/
003Tb	delci zloženi v večje agregate, različno razporejene v prostor	/	od 100 do 250	180	od 20 do 25	mehke	/	/
003Tc	delci zloženi v večje agregate, različno razporejene v prostor	5%	od 100 do 250	160	od 20 do 25	mehke	iz enega "delca" v obliki cveta izraščajo majhni ježki	/
003Td	delci zloženi v večje agregate, različno razporejene v prostor	/	od 100 do 300	200	od 20 do 25	mehke (raven rob)	opažena oblika cveta	/
004Ta	manjši ploščati delci bolj okroglih oblik	7%	od 20 do 100	40	od 150 do 200	ostra in mehka področja	različne oblike kristalov, cvetom podobni kristali, ježki, ostre iglice	/
004Tb	delci različnih oblik, večji agregati različno razporejene v prostor	/	od 100 do 350	200	od 30 do 40	mehke	prisoten delec v obliki cveta	/
004Tc	delci različnih oblik, večji agregati različno razporejene v prostor	/	od 40 do 550	250	od 30 do 40	mehka in ostra področja	prisotni delci v obliki cveta	/
004Td	delci zloženi v večje agregate, različno razporejene v prostor	/	od 40 do 600	300	od 15 do 20	mehka in ostra področja	izraščanje ježkov na cvetom podobnim delcem	/

vzorec	opis	100x povečava			približna ocena števila delcev na podlago	2500x povečava ostre/mehke iglice	500x povečava posebnosti	Opombe
		»Ježki«	Velikost delcev [um]	povp. velikost				
005Ta	manjši ploščati delci bolj okroglih oblik	20%	od 15 do 200	80	od 200 do 250	ostre	izraščanje manjših ježkov iz enega agregata	/
005Tb	delci zloženi v večje agregate, različno razporejene v prostor	15%	od 60 do 450	160	od 30 do 40	mehke	izraščanje manjših ježkov iz enega agregata	/
005Tc	delci zloženi v večje agregate, različno razporejene v prostor	/	od 120 do 650	350	od 10 do 15	mehke	/	/
005d	en večji agregat ter nekaj manjših delcev	/	od 80 do 800	/	15	ostre	prisotni delci v obliki cveta	/
006Ta	manjši ploščati delci bolj okroglih oblik	ocena do 50% ježkov	od 10 do 150	40	300 in več	mehke*	izraščanje manjših ježkov iz posameznih delcev	*ježkasta področja imajo ponekod bolj ostre iglice
006Tb	delci nekoliko večji kot pri vzorcu 006Ta, tvorijo večje agregate, različno razporejene v prostor	30%	od 40 do 250	80	od 100 do 150	mehke	/	/
006Tc	delci zloženi v večje agregate približno enakih velikosti, različno razporejeni v prostor	10%	od 60 do 200	100	od 100 do 150	mehke	pri večji povečavi izraščanje manjših ježkov iz posameznih delcev	/
006Td	večji delci (kot pri abc vzorcih) zloženi v večje agregate, približno enakih velikosti, različno razporejeni v prostor	2%	od 100 do 300	200	od 20 do 30	mehke	/	/

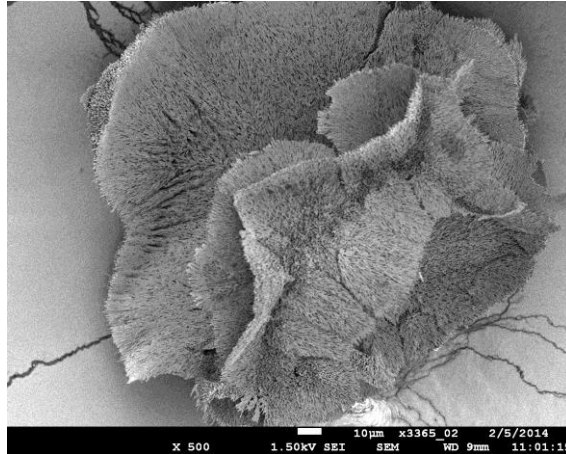
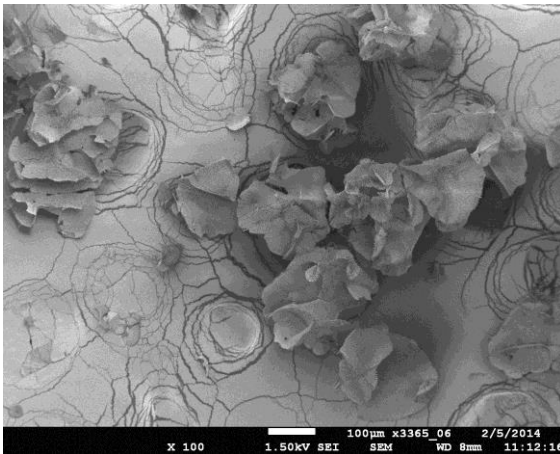
vzorec	opis	100x povečava			približna ocena števila delcev na podlago	2500x povečava ostre/mehke iglice	500x povečava posebnosti	Opombe
		»Ježki«	velikost delcev [um]	povp. velikost				
007Ta	manjši ploščati delci bolj okroglih oblik	10%	od 40 do 160	60	od 200 do 300	mehke	/	/
007Tb	večji delci približno enakih velikosti zloženi v večje agregate, različno razporejeni v prostor	16%	od 100 do 250	140	od 20 do 30	večja mehka in ponekod manjša ostra področja	prisotni delci v obliki cveta, iz cvetkov se izražajo ostri ježki	/
007Tc	velik igličast delec in več manjših delcev	/	od 100 do 500	250	od 20 do 30	večinoma mehke, ponekod manjša ostra področja	pristoni majhni delci, ki izkazujejo obliko cveta v obliki cveta	/
007Td	veliko delcev/ agregatov neenakomernih oblik (vendar drugačnih kot pri 007Ta vzorcu) različno razporejeni v prostor	en velik ježkast predel (predstavlja cca 5% slike)	od 50 do 300	140	300 in več	mehke	prisotni delci v obliki cveta	izračunavanje ježkov iz posameznih delcev. Delci zglejajo kot odlomljeni koščki večjega delca zato je nemogoče točneje oceniti število delcev na podlago

PRILOGA 9: SEM slike vzorcev

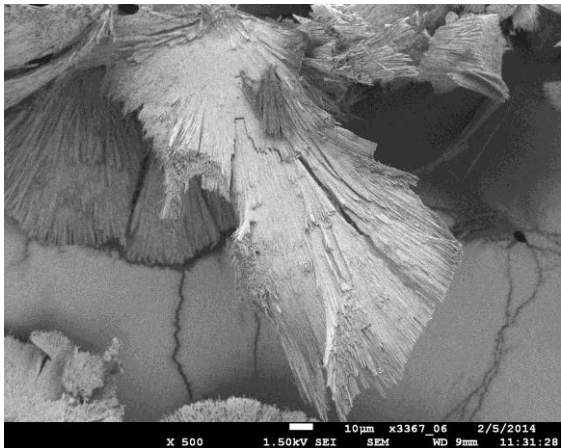
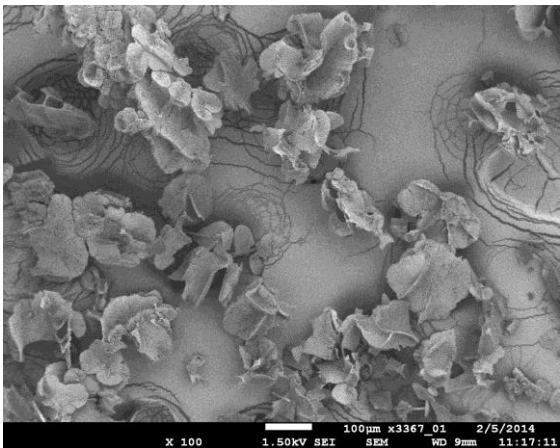
Vzorec 001Ta



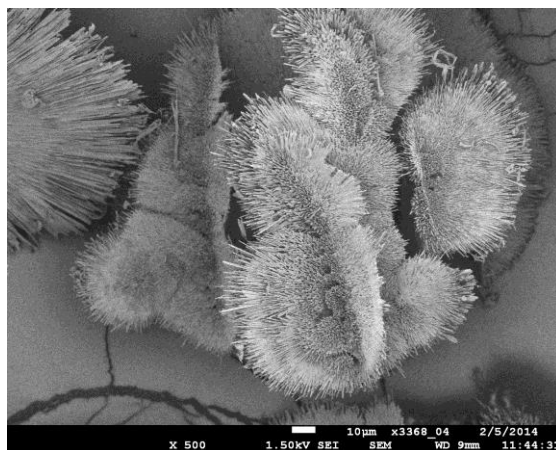
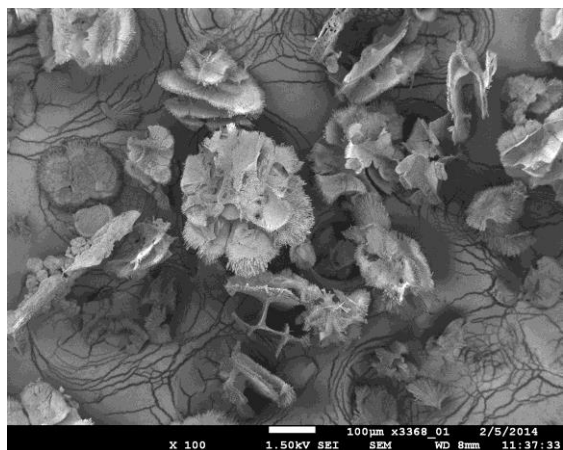
Vzorec 001Tb



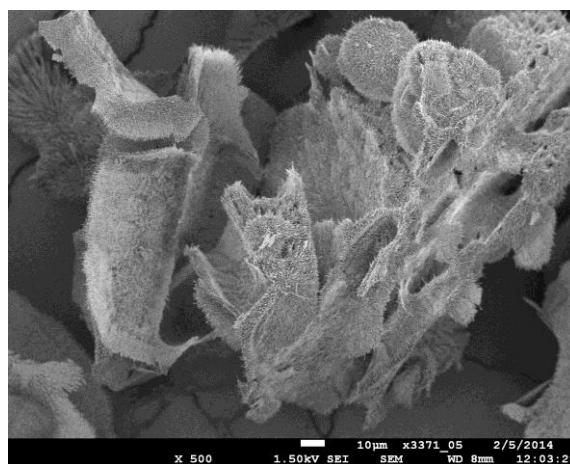
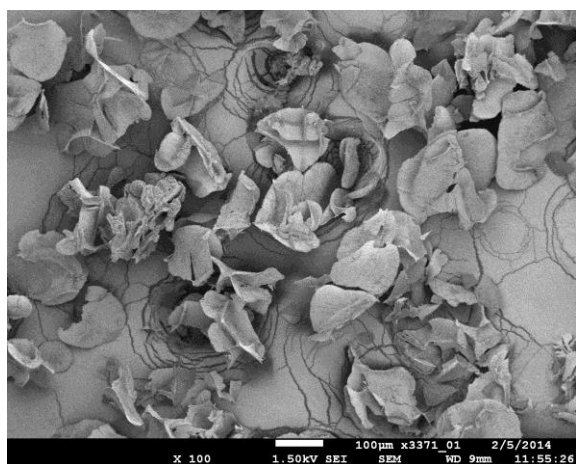
Vzorec 001Tc



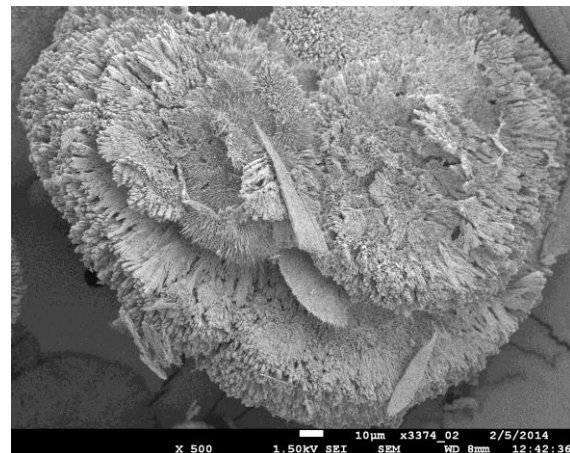
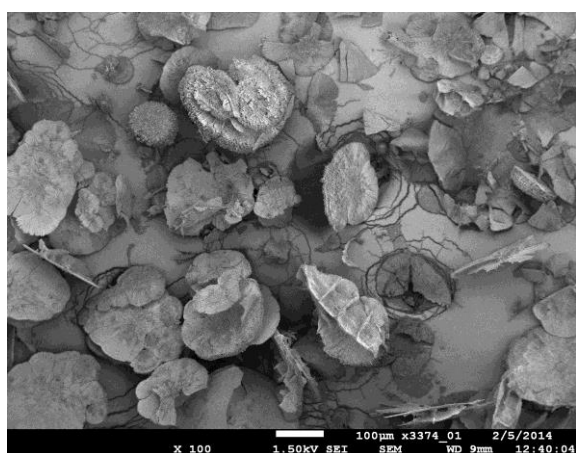
Vzorec 001Td



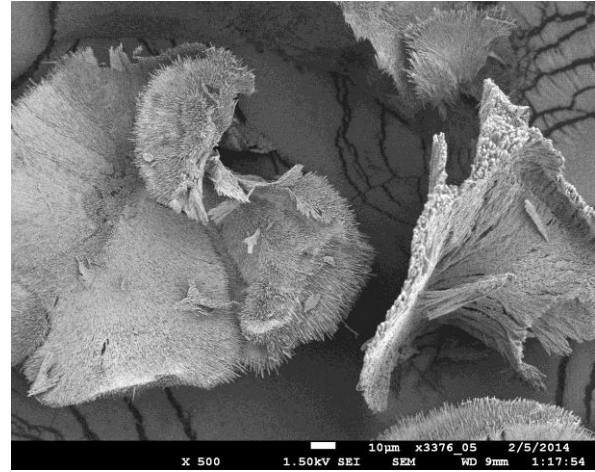
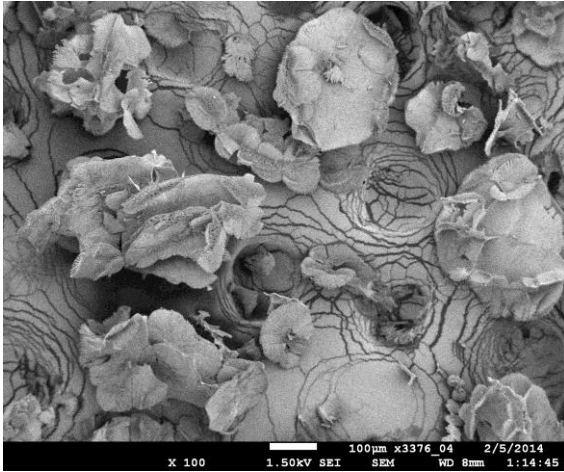
Vzorec 002Ta



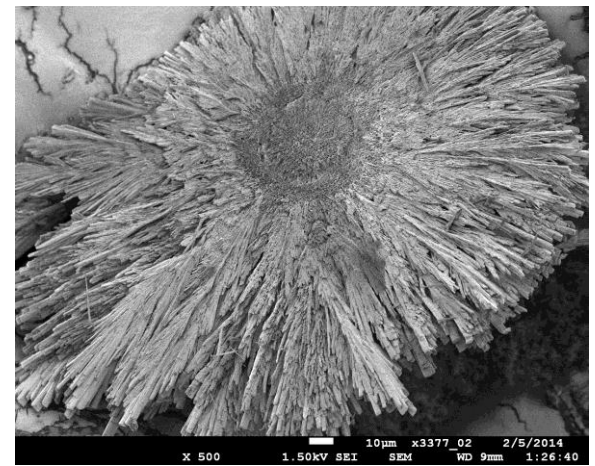
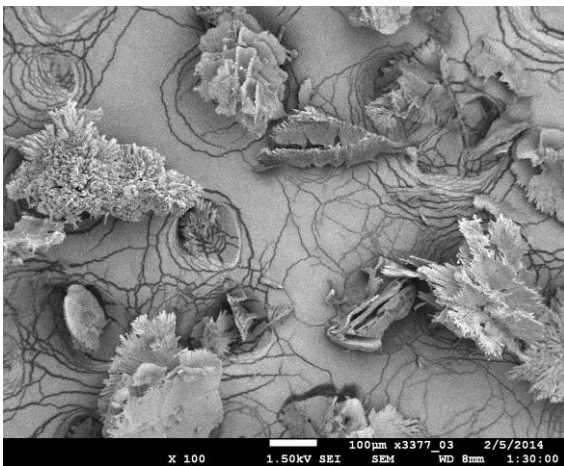
Vzorec 002Tb



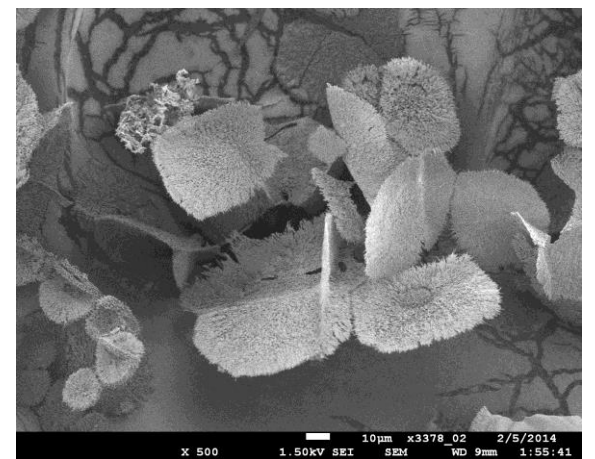
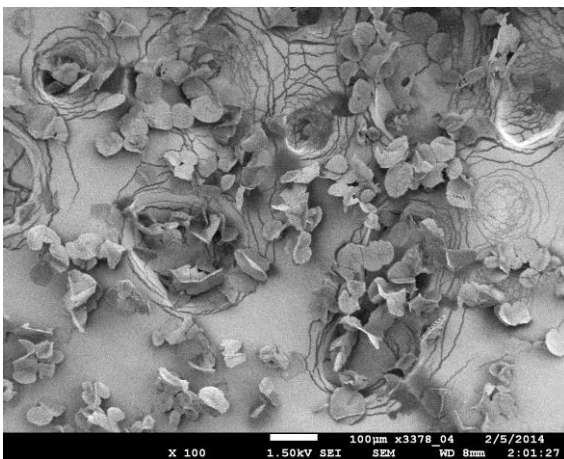
Vzorec 002Tc



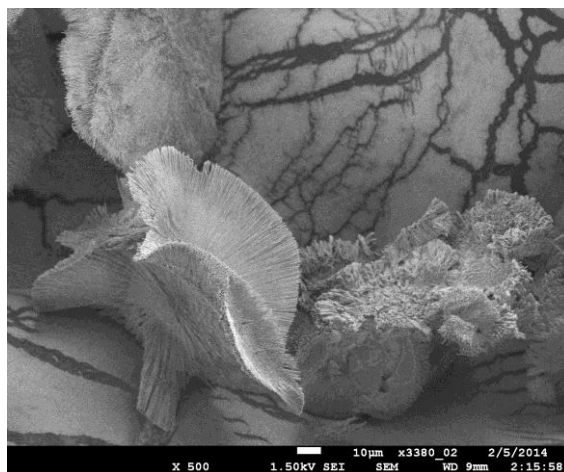
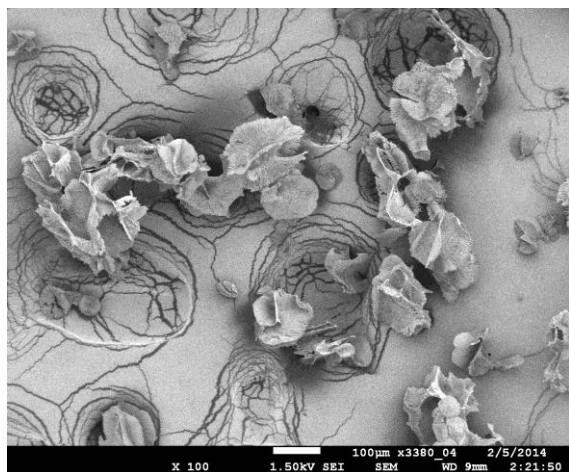
Vzorec 002Td



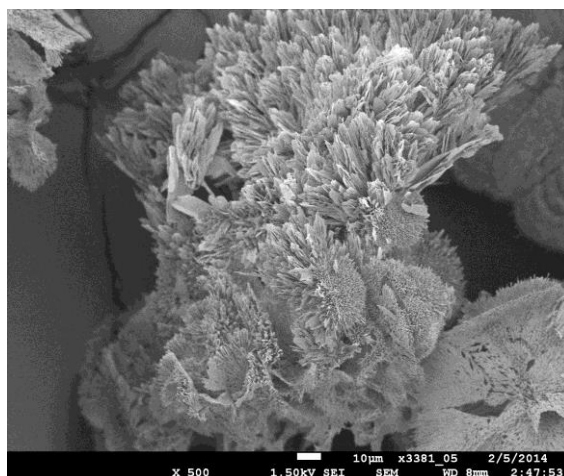
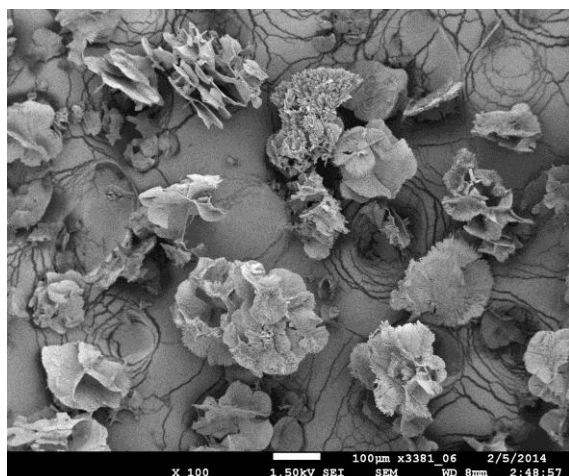
Vzorec 003Ta



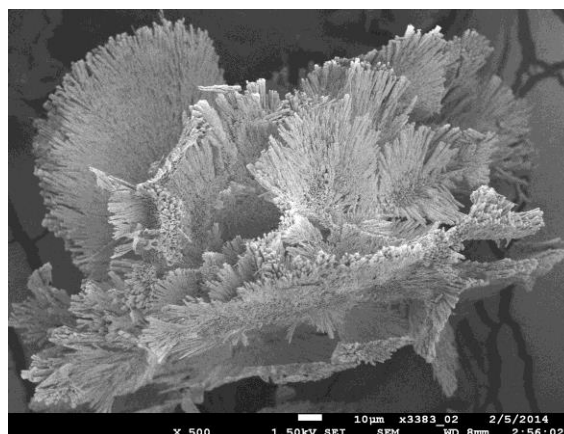
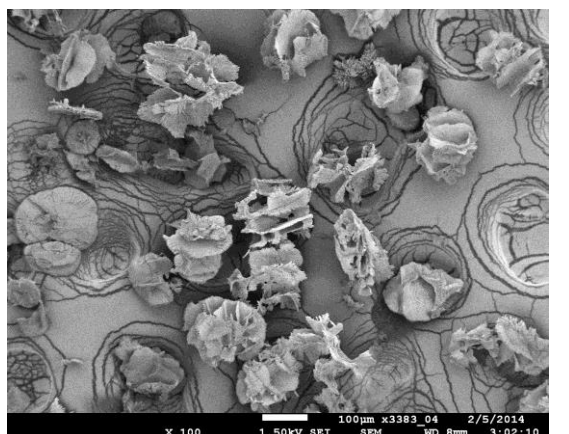
Vzorec 003Tb



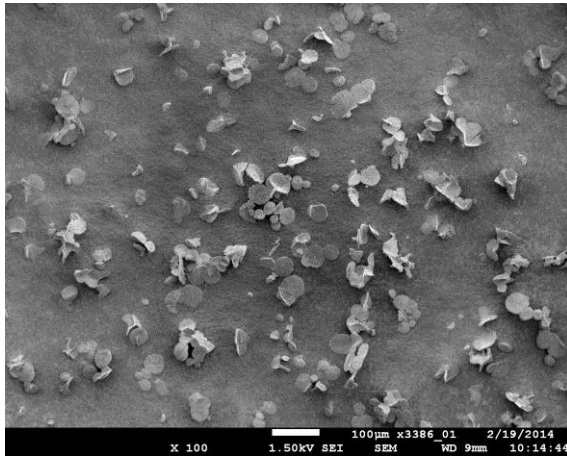
Vzorec 003Tc



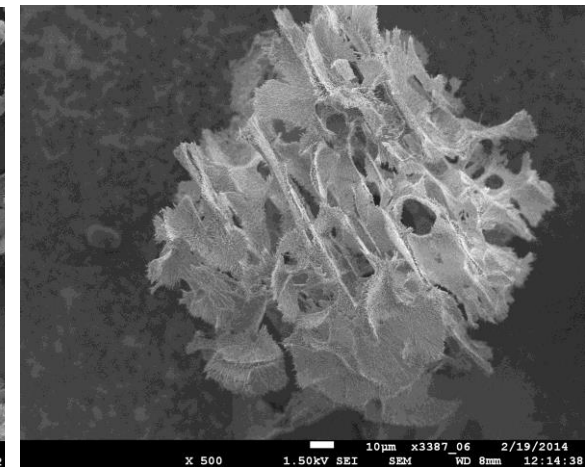
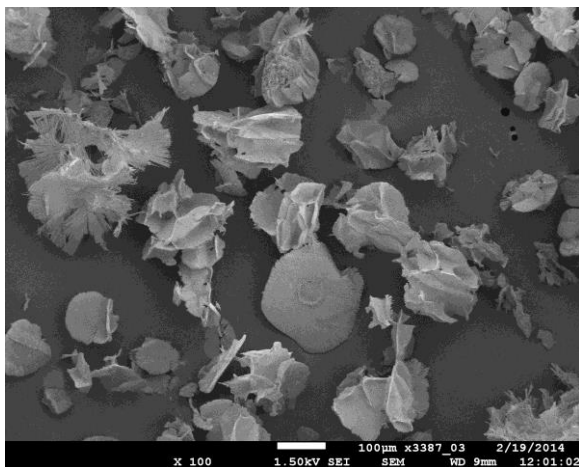
Vzorec 003Td



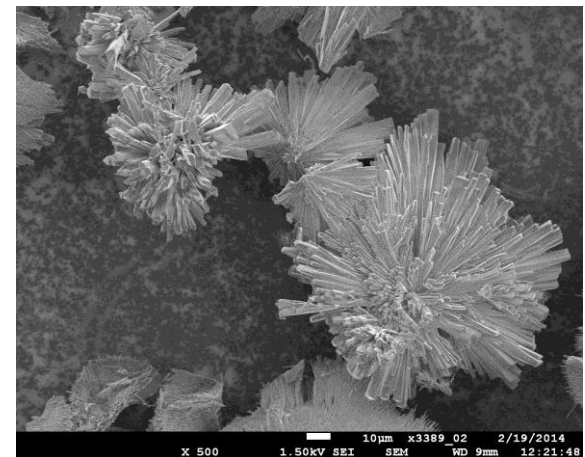
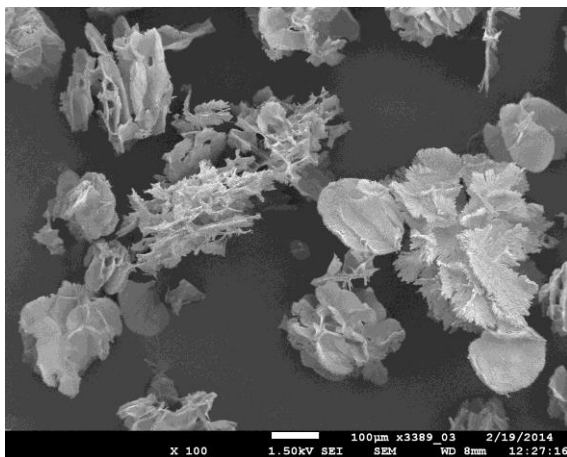
Vzorec 004Ta



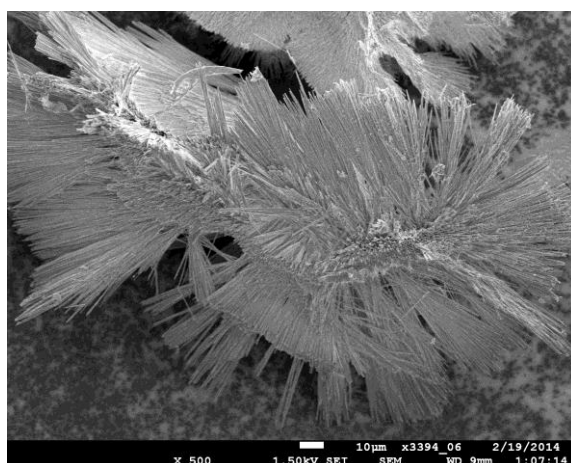
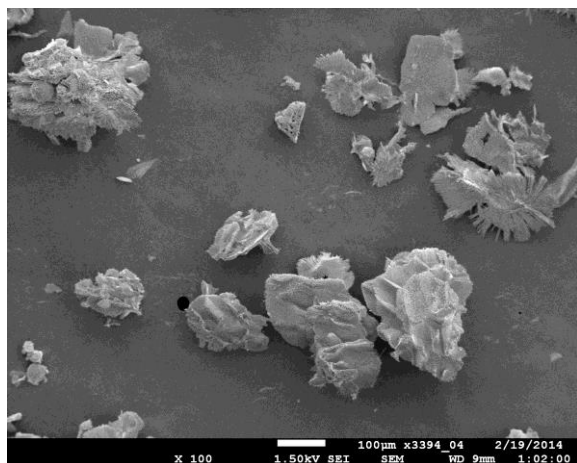
Vzorec 004Tb



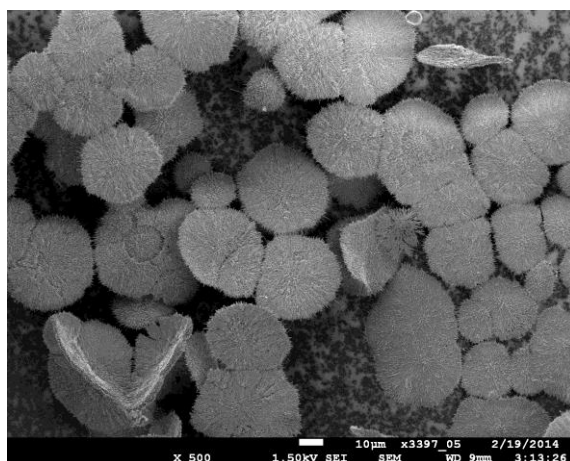
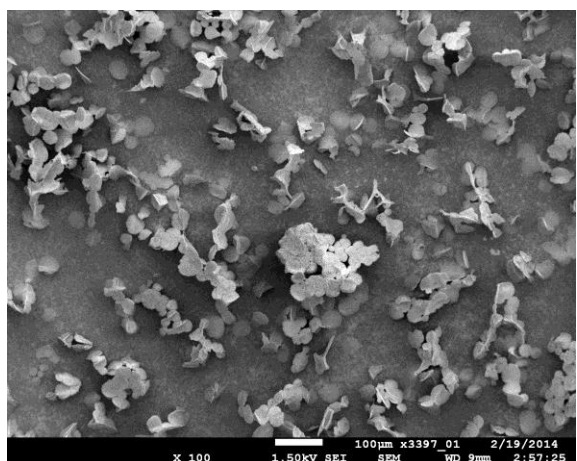
Vzorec 004Tc



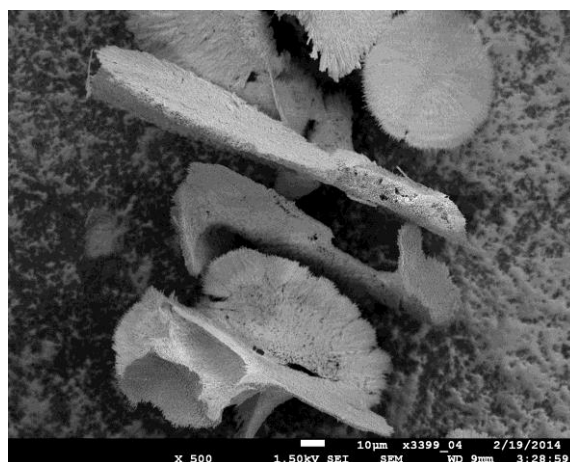
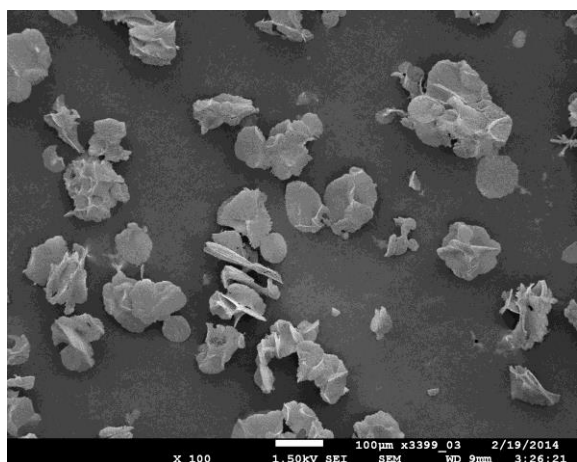
Vzorec 004Td



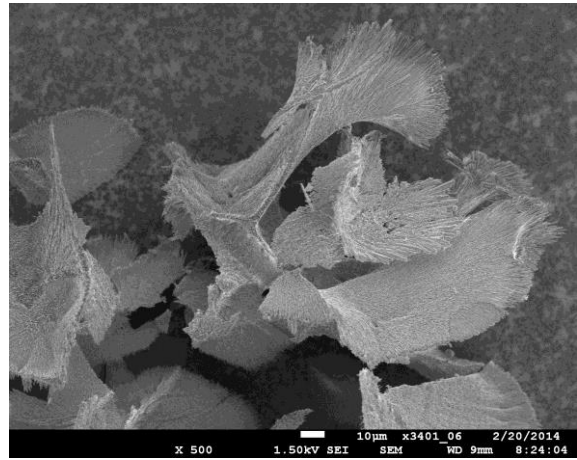
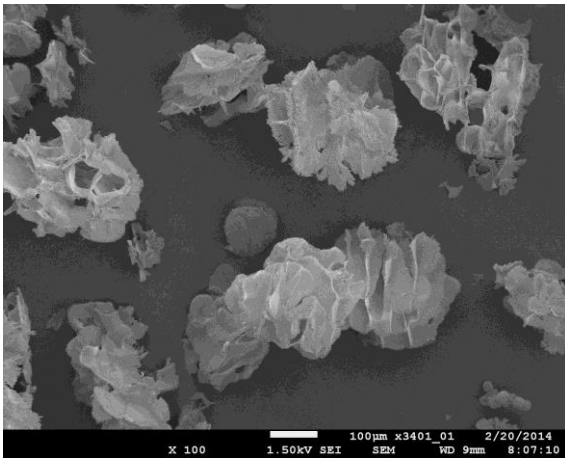
Vzorec 005Ta



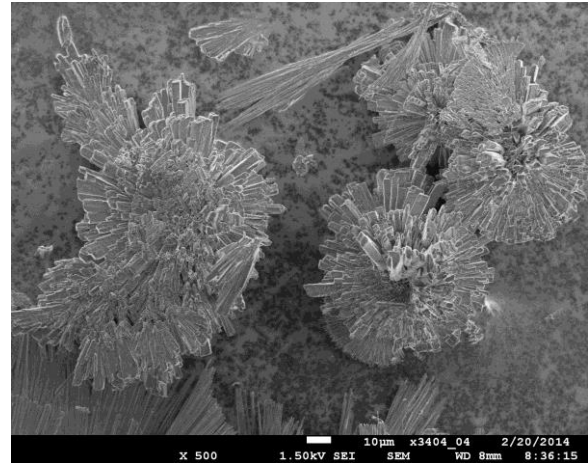
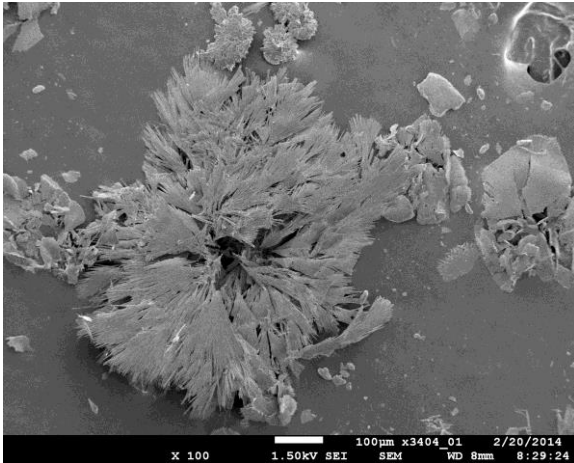
Vzorec 005Tb



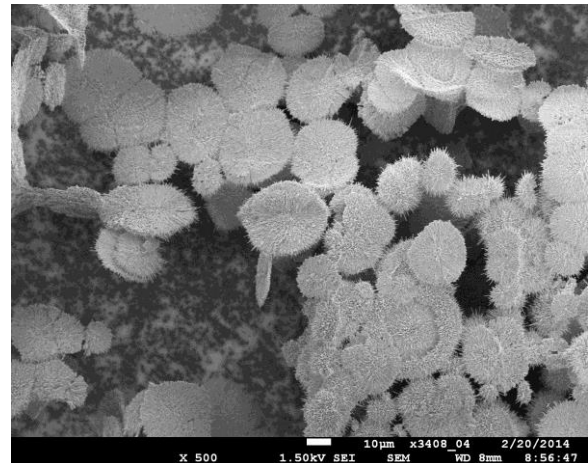
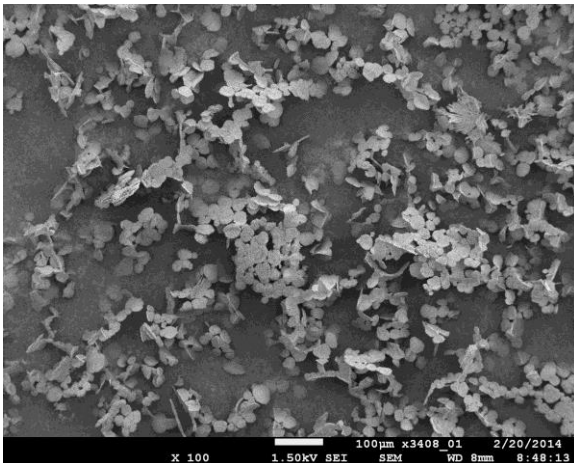
Vzorec 005Tc



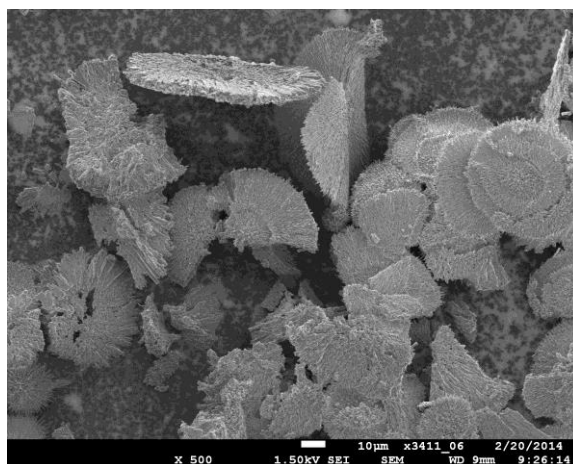
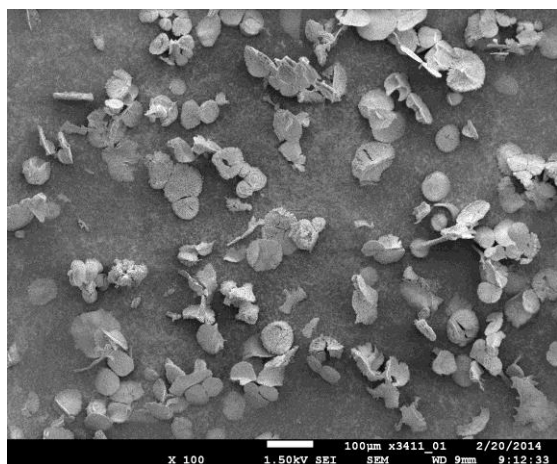
Vzorec 005Td



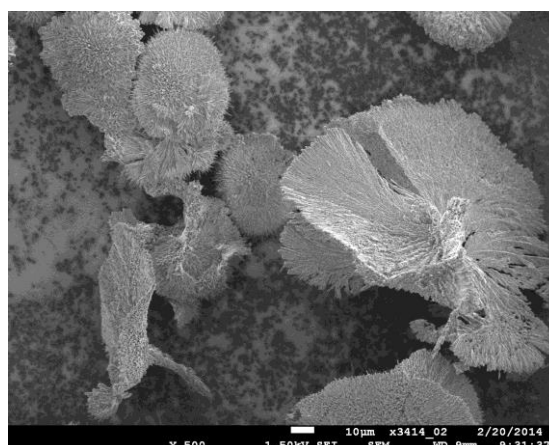
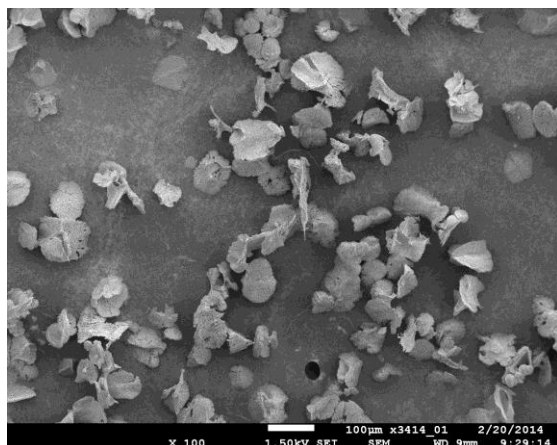
Vzorec 006Ta



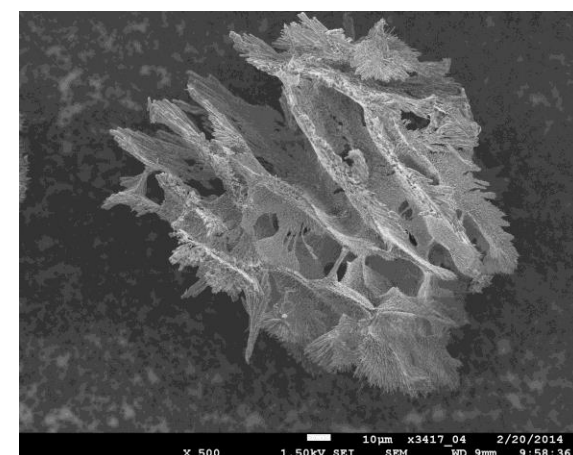
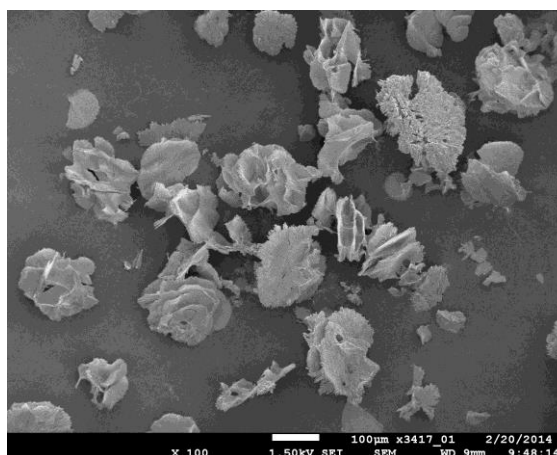
Vzorec 006Tb



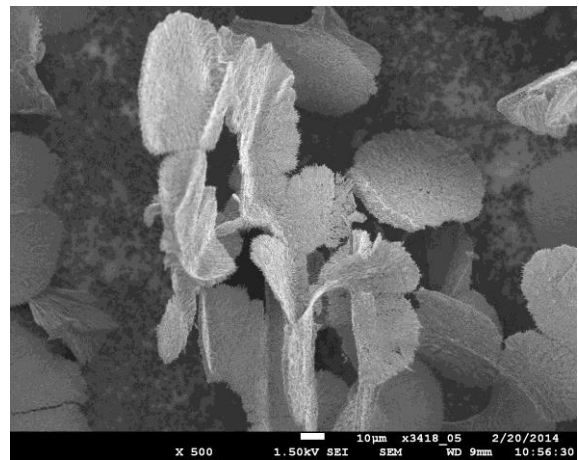
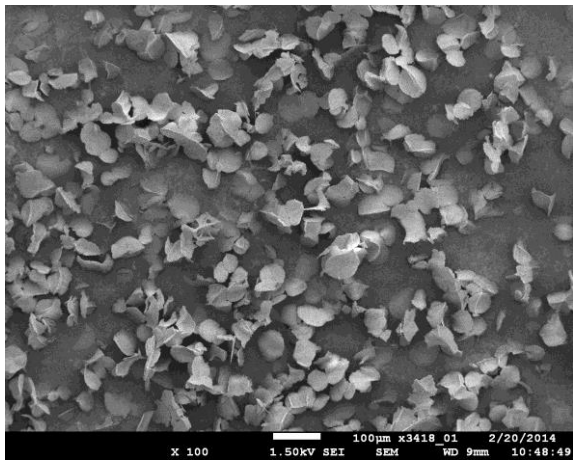
Vzorec 006Tc



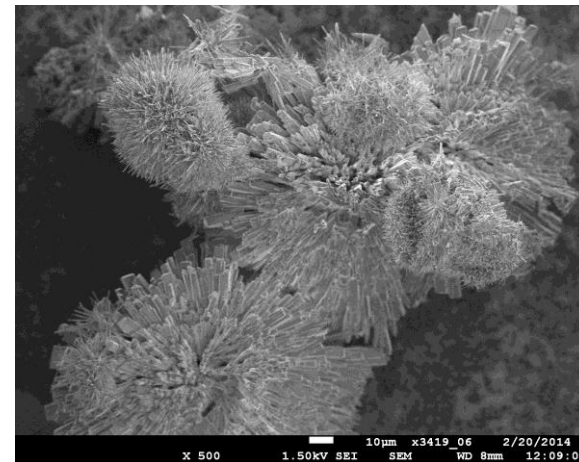
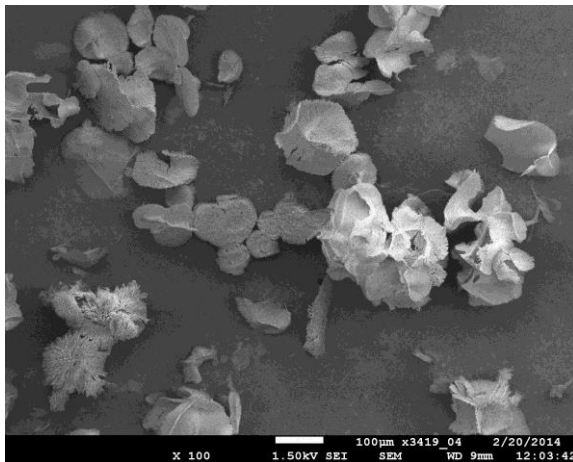
Vzorec 006Td



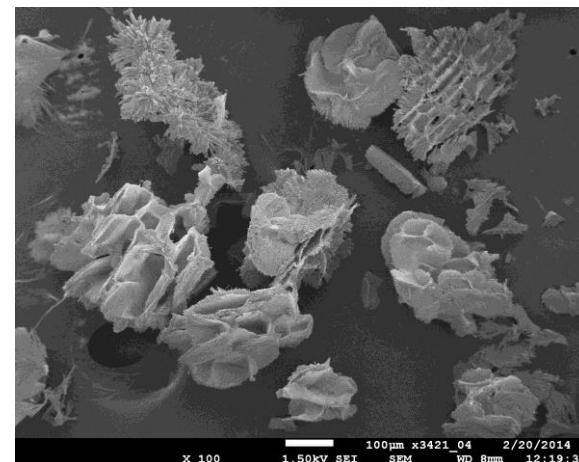
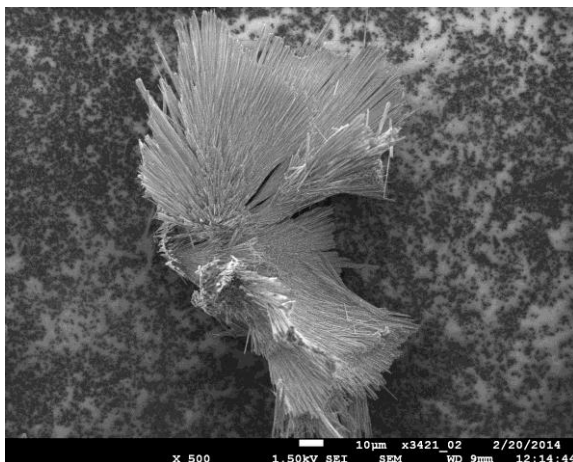
Vzorec 007Ta



Vzorec 007Tb



Vzorec 007Tc



Vzorec 007Td

