

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



MARTINA KOZJEK

MLETJE KARVEDILOLA S SALICILNO KISLINO IN
VREDNOTENJE NASTALIH PRODUKTOV

GRINDING OF CARVEDIOL WITH SALYCILIC ACID AND
EVALUATION OF ARISEN PRODUCTS

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof.dr. Odonu Planinšku in somentorici doc. dr. Biljani Janković za nasvete, pomoč in vodenje pri izdelavi diplomske naloge ter ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi večkrat pomagali. Zahvaljujem se tudi dr. Nini Lah s Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo, ki je opravila analizo rentgenske difrakcije na monokristalu.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm.

Martina Kozjek

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
OKRAJŠAVE	III
1 UVOD	1
1.1 Kokristali	1
1.2 Kristalno inženirstvo in supramolekularna kemija v tvorbi kokristalov	3
1.3 Metode izdelave kokristalov	4
1.3.1 Rešetanje kokristalov	4
1.3.2 Kokristalizacija iz raztopine	6
1.3.3 Pridobivanje kokristalov z mletjem	7
1.3.4 Alternativni načini izdelave kokristalov	8
1.3.4.1 Kokristalizacija in istočasna aglomeracija iz taline	8
1.3.4.2 Tvorba kokristalov z metodo sušenja z razprševanjem	9
1.3.4.3 Kokristalizacija iz raztopine/suspenzije z ultrazvokom	9
1.3.4.4 Tvorba kokristalov z metodo superkritičnih tekočin	9
1.4 Rast kristala	10
1.4.1 Rast monokristala	10
1.4.1.1 Rast iz raztopine	10
1.5 Lastnosti farmacevtskih kokristalov	11
1.5.1 Topnost	11
1.5.2 Temperatura tališča	12
1.5.3 Stabilnost	13
1.5.4 Biološka uporabnost	13
1.6 Metode karakterizacije kokristalov	14
1.7 Farmakodinamika in farmakokinetika karvedilola	15
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali	17
3.2 Metode	19
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1 DSC ANALIZE KARVEDILOLA, SALICILNE KISLINE, FIZIKALNE ZMESI IN MLETIH ZMESI	23
4.2 DOLOČANJE GOSTOTE S HELIJEVIM PIKNOMETROM	27

4.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA KARVEDILOLA, SALICILNE KISLINE IN MLETE ZMESI	27
4.4 POSKUS PRIPRAVE MONOKRISTALA	28
4.5 MONOKRISTALNA RENTGENSKA STRUKTURA	31
4.6 VREDNOTENJE RAZTAPLJANJA ČISTEGA KARVEDILOLA, IZ FIZIKALNE ZMESI IN IZ MLETIH ZMESI	34
4.7 TOPNOST KARVEDILOLA, FIZIKALNE ZMESI IN MLETE ZMESI (SOLI ALI KOKRISTALA) V VODI IN HCl PO 24 URAH	36
5 SKLEP	37
6 LITERATURA:	38

POVZETEK

Večina sodobnih zdravilnih učinkovin je slabo topnih v vodi in posledično imajo nizko biološko uporabnost. Sprememba kristalne oblike, zmanjšanje delcev in amorfizacija lahko prispevajo k boljši vodotopnosti. Podobno izboljšavo omogoča tudi mletje zdravilnih učinkovin z različnimi pomožnimi snovmi, ki lahko vodijo v nastanek soli ali kokristalov.

V sklopu diplomske naloge smo zdravilno učinkovino karvedilol mleli s salicilno kislino brez topila in z dodatkom različnih topil (1,4 – dioksan, aceton, heptan, acetonitril, etilacetat). Pripravljene mlete zmesi smo vrednotili z diferenčno dinamično kalorimetrijo, ki je učinkovita metoda za preučevanje interakcij med komponentami v zmesih. Ugotovili smo, da imata tako mleto kot fizikalna zmes proučevanih spojin spremenjeno tališče, kar kaže na nastanek nove kristalne oblike. Čisti produkt smo dobili pri mletju karvedilola in salicilne kisline v razmerju 1:1 z dodatkom topil acetonitrila in etilacetata.

Z rentgensko praškovo difrakcijo smo ugotovili, da v primeru mlete zmesi karvedilola in salicilne kisline dobimo nove uklonske vrhove. Te interakcije kažejo na nastanek nove spojine oziroma kokristala ali soli.

Za natančno določitev kristalne strukture smo iz raztopine pripravili monokristale ustrežne kakovosti. Kot najboljšo kombinacijo topil smo izbrali zmes nepolarnega topila kloroforma in polarnega etanola v razmerju 1:1 z dodatkom majhne količine ionske tekočine 1 – butil – 3 – metilimidazolijevega tetrafluoroborata. Monokristal je bil igličaste oblike, ki je značilna za večino kokristalov karvedilola. Z rentgensko difrakcijo smo potrdili nastanek soli karvedilolijevega salicilata namesto kokristala. Sol ima protonirano sekundarno aminske skupino, zato je stabilnejša od proste baze. Kristalni sistem molekule je ortorombski in kristalizira v prostorski skupini Fdd₂. Oba tvorilca kristala vsebujeta tudi intramolekularne vodikove vezi.

V nadaljevanju smo preučevali vpliv nove kristalne oblike (kokristala ali soli) na raztapljanje karvedilola v kislem mediju s pH 1,2. Rezultati kažejo, da se raztapljanje karvedilola z izdelavo nove kristalne oblike (kokristala ali soli) bistveno ne spremeni. Razlike se nakazujejo le v začetni hitrosti raztapljanja vzorca, izdelanega z mletjem z dodatkom topila etilacetata. Zanimivo je, da se je karvedilol iz mlete zmesi brez dodatka topila sproščal slabše kot iz fizikalne zmesi. Razlog je verjetno v slabšem močenju delcev oziroma v različnih površinskih lastnostih.

ABSTRACT

Numerous active pharmaceutical ingredients (API) have poor water solubility and consequently reduced bioavailability. Improvement of solubility in water can be achieved by different approaches such as modification of the crystalline form, reducing the particle size or amorphisation. Similar improvement can be achieved by grinding of API with different excipients, which can lead to the formation of salts and cocrystals.

Initially, active ingredient carvedilol was milled with salicylic acid without a solvent or with the addition of small amount of different solvents (1,4 - dioxane, acetone, heptane, acetonitrile, ethyl acetate). Prepared powder mixtures were evaluated by differential scanning calorimetry, which is an effective method for the study of interactions between the components of the mixtures. We have found that both the ground as well as physical mixture of the studied compounds have modified melting point, which indicates formation of a new crystalline form. The pure product was obtained from the milling of carvedilol and salicylic acid in a ratio of 1:1 with the addition of solvents such as acetonitrile or ethyl acetate.

According to X-ray powder diffraction analysis, interactions between components in case of milled mixture of carvedilol and salicylic acid were confirmed by new diffraction peaks. These interactions can indicate the formation of new crystal form (cocrystal or salt).

To determine crystal structure, single crystals of adequate quality were prepared from solution. The best system was a combination of a non – polar solvent chloroform and a polar solvent ethanol in a ratio of 1:1, followed by the addition of small quantity of ionic liquid 1 - butyl - 3 - methylimidazolium tetrafluoroborate. The obtained single crystal was in the form of needles, which is characteristic for cocrystals of carvedilol. X-ray diffraction analysis of single crystal confirmed the formation of salt carvedilolsalicylate instead of cocrystal. Salt has a protonated secondary amine group and is therefore more stable than the free base. It has orthorhombic crystal system and crystallizes in Fdd2 space group. Both crystal formers contain also intramolecular hydrogen bonds.

Additionally, we studied the impact of new crystal form (cocrystal or salt) on dissolution of carvedilol from an acidic medium with a pH of 1.2. The results are showing a little change in dissolution of new crystal form (cocrystal or salt) in comparison with pure carvedilol. There are only some improvements in starting dissolution rate of sample, made by solvent – drop grinding with ethylacetate as solvent. It is interesting that carvedilol was released less from the ground mixture without addition of solvents than from the physical mixture. This is probably due to poor wetting of particles.

OKRAJŠAVE

CSD – Cambridgova banka struktur (Cambridge Structural Database)

CYP – citokrom P450

DMSO – dimetilsulfoksid

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential Scanning Calorimetry)

EAFUS – Vse, kar se lahko doda hrani v ZDA (Everything Added to Food in US)

FDA – Agencija za hrano in zdravila (Food and Drug Agency)

GIT – gastrointestinalni trakt

GRAS – Splošno poznano kot varno (Generally Regarded As Safe)

HME – iztiskanje talin (Hot Melt Extrusion)

IR – infrardeča spektroskopija

ORTEP – Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot

PXRD – rentgenska praškovna difrakcija (Powder X-Ray Diffraction)

SEM – dinamična elektronska mikroskopija (Scanning Electron Microscopy)

SSNMR – nuklearna magnetna resonanca v trdnem stanju (Solid State Nuclear Magnetic Resonance)

SXRD – rentgenska difrakcija na monokristalu (Single X-Ray Diffraction)

THF – tetrahidrofur

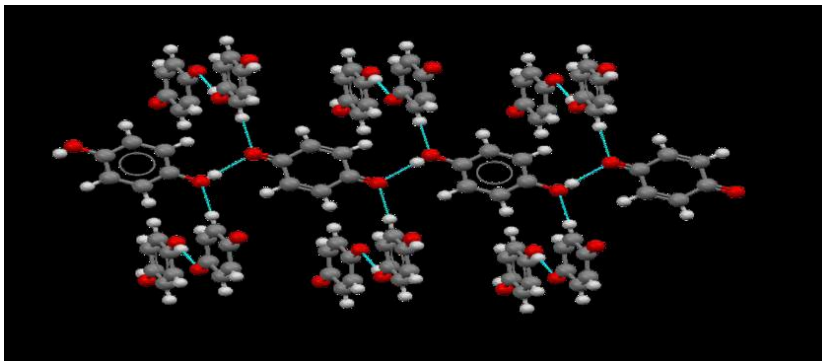
ZU – zdravilna učinkovina

1 UVOD

Zdravilne učinkovine (ZU) so pri sobnih pogojih najpogosteje v trdnem agregatnem stanju v kristalni obliki in jih vgrajujemo v trdne farmacevtske oblike – tablete in kapsule. Oblika in velikost delcev trdne snovi lahko vplivata na farmacevtske postopke, kot so filtracija, sušenje, mletje, mešanje, tabletiranje, raztapljanje, rekristaliziranje in liofilizacija (1). Na farmakokinetične lastnosti zdravilne učinkovine pogosto vplivajo njene fizikalno - kemijske lastnosti. Pri razvoju formulacij lahko fizikalno kemijske lastnosti ZU izboljšamo s tvorbo kokristalov, soli, hidratov/solvatov, različnih polimorfnih oblik ali s tvorbo amorfne oblike. Za kristale je značilno, da so urejeni v kristalno rešetko, ki se ponavlja v treh dimenzijah oziroma je izražena daljnosežna urejenost strukture. Različne kristalne oblike (polimorfi) imajo lahko različno temperaturo tališča, stabilnost, hitrost raztapljanja, intrinzično topnost, biološko uporabnost, obliko delcev, gostoto, barvo in stisljivost (2). V amorfni snovi molekule nimajo reda dolgega dosega, ampak so urejene le v kratkih razdaljah. Prednosti takšnih vzorcev pred kristalno obliko so hitrejše in boljše raztapljanje, vendar so slabše fizikalno oziroma kemijsko stabilni. Imajo tudi težnjo po kristalizaciji.

1.1 Kokristali

Kokristale uvrščamo v skupino t.i. večkomponentnih kristalov, kamor glede na naravo molekul v kristalni rešetki spadajo tudi solvati, klatrati, inkluzijski kompleksi in soli. Molekule v kokristalu so povezane z nekovalentnimi interakcijami: vodikovimi vezmi, koordinacijskimi vezmi, hidrofobnimi interakcijami, van der Waalsovimi vezmi, pi-pi interakcijami in elektrostatskimi vezmi. Zaradi jakosti in usmerjenosti je vodikova vez najpomembnejša za kokristalno formacijo (2). Razlog za raziskovanje in uporabo kokristalov so izboljšanje lastnosti zdravilne učinkovine, in sicer povečanje topnosti, hitrosti raztapljanja, biološke uporabnosti, fizikalne stabilnosti, pretočnosti, stisljivosti, kemijske stabilnosti in zmanjšanje higroskopsnosti (3). O prvem kokristalu, kinhidronu, so poročali že leta 1844. Sestavljen je iz benzokinona in hidrokina v stehiometrijskem razmerju 1:1 (Slika 1).



Slika 1: Prvi kokristal kinhidron, o katerem so poročali že leta 1844 (4).

Še vedno obstaja veliko neenotnosti glede uporabe besede kokristal in njegove definicije (5). Pregled literature pove, da so kokristali iz komponent, ki sta pri sobnih pogojih v trdnem agregatnem stanju, znani kot angl. addition compounds, organske molekularne spojine, mešani binarni molekularni kristali, molekularni kompleksi, kompleksi v trdnem stanju, heteromolekularni kristali, itd (6). Definicija kokristalov po FDA (angl. Food and Drug Agency) pravi, da so to kristalne trdne snovi, ki so sestavljene iz dveh ali več molekul v isti kristalni rešetki. Nekateri avtorji predlagajo širšo definicijo od FDA, in sicer, da so kokristali kristalne trdne snovi, ki so sestavljene iz dveh ali več različnih molekul in/ali ionov, običajno v stehiometrijskem razmerju. Po tej definiciji so med kokristale vključeni tudi solvati in soli (7). V splošnem pa velja, da so kokristali enotne kristalne snovi, s kristalno rešetko sestavljajo iz nevtralnih komponent (molekul) v stehiometrijskem razmerju, in so pri sobnih pogojih v trdnem agregatnem stanju. Torej v splošnem solvatov in soli ne uvrščamo med kokristale.

Soli pogosto uporabljamo namesto prostih kislin ali baz, ker z njihovo uporabo lahko izboljšamo kristalnost, topnost in stabilnost ZU. Kokristali so alternativa solem, ko soli v trdnem agregatnem stanju nimajo primernih lastnosti (8). Tvorba kokristalov ima več prednosti pred tvorbo soli. Prva in najbolj očitna je, da je kokristalizacija zelo mnogostrana. Pri tvorbi kokristala je pomembno samo medsebojno prepoznavanje zdravilne učinkovine in tvorilca kokristala, tvorba soli pa je omejena z zahtevano ustrežno razliko v Pk_a vrednostih med zdravilno učinkovino in potencialnim tvorilcem soli. Potencialnih tvorilcev kokristalov je torej precej več kot tvorilcev soli. Druga prednost kokristalov je njihova sposobnost kontrole strukture nove trdne snovi. Posledično lahko kokristali tvorijo trdno obliko zdravilne učinkovine z določeno strukturo in zato z želenimi lastnostmi v trdnem stanju (9). Nekaterih spojin se ne da enostavno uvrstiti med kokristale ali soli, zato lahko združujejo prednosti kokristalov (kontrola strukture) in soli (stabilnost, topnost v vodi) (10, 11). Razliko med kokristalom in soljo vidimo iz prenosa protona s kisline na bazo. Če do prenosa pride, dobimo sol. V nasprotnem primeru govorimo o kokristalu (8). Včasih proton ostane nekje vmes med kislino in bazo. Takrat govorimo o sol – kokristal continuumu. Z rentgensko difrakcijo na monokristalu vidimo točno lokacijo protona, včasih je razlika med soljo in kokristalom samo 1 Å. Sol – kokristal continuum dobimo predvsem v primeru, da imata kislina in baza svoji pK_a vrednosti blizu skupaj. Tudi kristalno okolje vpliva na prenos protona, zato področje razlikovanja med kokristalom in soljo ostaja predmet znanstvenih raziskav (12, 13). Nygren in sodelavci so z rentgensko in nevtronsko difrakcijo preučevali vodikove vezi med N – oksidom urotropina in mravljično kislino v odvisnosti od temperature. Točna lokacija protona se je spreminjala s temperaturo in pod določenimi pogoji je sistem kazal delen prenos protona od kisline do N – oksida (9, 14). Raziskovali so tudi sposobnost mikonazola za tvorbo soli in kokristalov. Čeprav tvorba vseh produktov izboljša hitrost raztapljanja ZU, le

- ta v maleatni soli in hemifumaratnem kokristalu ni stabilna. Ker je hemisukcinatni kokristal najbolj topen in najstabilnejši, so zaključili, da je primeren za nadaljni razvoj (14).

Kokristal sestavljata ZU (tarčna molekula) in tvorilec kokristala. Zahteve za tvorilce kokristala so, da so bili že prej uporabljeni v komercialnih zdravilih, so farmacevtsko sprejemljivi in netoksični. Dobimo jih na seznamih GRAS (angl. General Regarded As Safe) in EAFUS (angl. Everything Added To Food in United States) (2, 15). Do leta 2002 je bilo samo 100 tvorilcev soli farmacevtsko sprejemljivih in odobrenih s strani regulatornih agencij (16). Na srečo je mnogo farmacevtsko sprejemljivih tvorilcev soli primernih tudi za tvorilce kokristalov (2, 15).

Na trgu najdemo dve zdravili, ki bi ju glede na sedaj sprejeto definicijo lahko kvalificirali kot farmacevtska kokristala: valproat seminatrij (1:1 kompleks natrijevega valproata in valprojske kisline) in escitalopram oksalat – oksalna kislina – hidrat (2:1:1:1 S – citalopram/dioksalat/oksalna kislina/voda), čeprav ob odobritvi teh zdravil izraz kokristal ni bil uporabljen in sta klasificirana kot soli (17).

1.2 Kristalno inženirstvo in supramolekularna kemija v tvorbi kokristalov

Farmacevtske kokristale načrtujemo v okviru kristalnega inženirstva z namenom izboljšanja lastnosti ZU v trdnem stanju brez vpliva na njeno intrinzično strukturo. Na področju raziskovanja kokristalov je pogosto uporabljen izraz supramolekularni sinton (3). Sintoni so strukturne enote oziroma funkcionalne skupine, ki povezujejo molekule med seboj z nekovalentnimi povezavami (2). Homosintoni se povezujejo z isto funkcionalno skupino, heterosintoni pa se povezujejo z različnimi, a komplementarnimi funkcionalnimi skupinami. Na splošno so heterosintoni robustnejši od homosintonov (3). Za identifikacijo stabilnih homo/heterosintonov si lahko pomagamo s CSD (angl. Cambridge Structural Database) (18). Eden najbolj pogosto uporabljenih heterosintonov vsebuje O-H...N vodikovo vez iz karboksilne kisline in primerne N – vsebujočega heterocikla (piridin, imidazol) (3). V farmacevtskih sistemih ne bi šlo brez sintonov karboksi dimera O-H...O in karboksamidnega dimera N-H...O. Pregled Cambridgeove strukturne banke je razkril, da obstaja 5690 kristalnih struktur, ki vsebujejo vsaj eno karboksilno kislino. Samo 34% od teh 5690 primerov je vključenih v supramolekularne homosintone (povezave med istovrstnimi molekulami), ostale karboksilne kisline pa so vključene v potencialne supramolekularne heterosintone (povezave med molekulami z različnimi funkcionalnimi skupinami) z aromatskimi dušikovimi spojinami, amidi, karbonili, fosfonili, alkoholi, kloridi in bromidi (19). Število supramolekularnih sintonov, ki jih uporabljamo v kristalnem inženiringu oziroma pri kokristalizaciji, je majhno, verjetno manjše od deset (11).

Friščić in sodelavci so preučevali elektrostatsko in geometrijsko komplementarnost pri uporabi halogenov kot supramolekularnih sintonov (20). Za vodikove vezi so značilni dvotočkovni kontakti, za pare sintonov halogen – ion pa so značilne enotočkovne interakcije, zato ima perfluorosukcinska kislina v primerjavi z ogljikovodikovim analogom sposobnost spremembe svoje molekularne konformacije. S fluorinacijo tako lahko spremenimo obliko tvorilca kokristala brez spremembe njegove velikosti (14, 21).

Analize kokristalov treh farmacevtsko sprejemljivih tvorilcev kokristalov (4 – aminobenzojska kislina, 2,2 – bpiridin, 4 – nitrofenil – očetna kislina) kažejo, da v velikem deležu kokristalov pričakovane vodikove vezi niso prisotne. Tvorbo kokristalov pričakujemo, če obstajajo ureditve pakiranja z obema molekulama, ki so termodinamsko stabilnejše od čistih kristalov. Pri tem uporabljamo pristop za predvidevanje organskih kristalnih struktur, kot je minimiziranje mrežne energije sistematično ali naključno dobljenih struktur kandidatov. Pri tem pristopu se eksperimentalno dobljena struktura sklada z najstabilnejšo ureditvijo pakiranja. Prednost ocenjevanja mrežne energije je, da so nekatere konformacijske fleksibilnosti, kot je rotacija okrog izbranega niza enojnih vezi, modelirane od začetka in tako nam ni treba izvajati več raziskav z rigidnimi sotvorci. Ta pristop lahko uporabljamo za predvidevanje kristalne strukture solvatov, soli, kokristalov, itd. (22).

1.3 Metode izdelave kokristalov

Kokristale lahko pripravimo iz dveh molekul katerekoli oblike ali velikosti, ki tvorita komplementarno vodikovo vez. Sposobnost ZU za tvorbo kokristala je odvisna od več spremenljivk, kot so tip tvorilca kokristala, razmerje med ZU in tvorilcem kokristala, topilo, temperatura, tlak, kristalizacijska tehnika, itd.

1.3.1 Rešetanje kokristalov

Poznana sta dva pristopa za načrtovanje kokristalov: pri prvem je pomembno strukturno prileganje med komponentami, ki temelji na podobnostih v pakiranju med čistimi komponentami. Pri drugem pristopu so pomembne parne interakcije (supramolekulni sintoni) oziroma energija teh parnih interakcij (18).

Rešetanje kokristalov je eksperimentalen proces, ki odloča, ali določen kandidat za tvorilca kokristala lahko kokristalizira s tarčno ZU. Proces je podoben rešetanju soli in je prilagojen visokozmogljivi tehnologiji (23). Ponavadi ga izvajamo z mletjem. Pridobljeni rezultati so le približni. Za potrditev rezultatov je najboljša metoda rentgenska difrakcija na monokristalu, za katero pa rabimo monokristale primerne kvalitete in velikosti. Tudi identificiranje ustreznih tvorilcev kokristalov je težavno. Za 10 uspešno dobljenih novih kokristalov karbamazepina so preizkusili 50 tvorilcev kokristalov, torej je bila raven uspešnosti 20 %. Odstotek je tako nizek,

ker se heteromerni sistemi (kokristali) tvorijo samo, če so nekovalentne sile med dvema (ali več) molekulami močnejše kot med molekulami v ustreznih homomernih kristalih (18).

Reševanje kokristalov lahko izvedemo empirično ali teoretično. Empiričen pristop je zamuden zaradi velikega števila eksperimentov. Bolj priporočljivo je izbrati tvorilca kokristala na podlagi lastnosti obeh komponent. Strukturne značilnosti ZU, ki jih ocenjujemo, so število, razvrstitev in tip funkcionalnih skupin, simetrija ter konformacijska fleksibilnost skupin, ki lahko sodelujejo v tvorbi vodikove vezi. Z oceno in ureditvijo akceptorjev in donorjev vodikove vezi ter uporabo splošnih pravil, npr. Etter, lahko včasih predvidimo interakcije, na podlagi katerih določimo tvorilca kokristala. Ettoreve smernice za pospeševanje načrtovanja trdnih snovi, ki so povezane z vodikovo vezjo, so sledeče:

- Pri tvorbi vodikovih vezi sodelujejo vsi dobri proton donorji in akceptorji.
- Če v šestčlenskem obroču lahko tvorimo intramolekularno vodikovo vez, jo bomo najverjetneje tvorili namesto intermolekularnih vodikovih vezi.
- Z najboljšimi proton donorji in akceptorji, ki ostanejo po tvorbi intramolekularne vodikove vezi, tvorimo intermolekularne vodikove vezi (3, 24).

Iskanje po Cambridgovski banki struktur, posebno z iskalnim programom Isostar, omogoča napovedovanje tvorbe vodikovih vezi in razvrstitve vodikovih vezi v kristalih. Supramolekularna knjižnica tvorilcev kokristalov je bila razvita na podlagi informacij iz CSD. Po izbiri potencialnega tvorilca kokristala sledi ocenjevanje fizikalnih lastnosti ZU, kar nam omogoča lažjo izbiro eksperimentalnih tehnik za izdelavo kokristala (15).

Reševanje najprej izvajamo v majhnem obsegu in izberemo primerne tvorilce kokristalov, s katerimi kasneje izvedemo še "scale up" (reševanje v večjem obsegu). Pri metodi reševanja iz raztopine v topilu raztopimo majhno količino kokristalnih komponent v stehiometrijskem razmerju. Še primernejša metoda za reševanje je zaradi enostavnosti mletje. Začetno fazo reševanja kokristalov so nedavno začeli izvajati z metodo termične mikroskopije (Koflerjeva tehnika) (3).

Uporaba polimorfni spojini kot kokristalizacijskih komponent predstavlja sodoben izziv (način) tvorbe kokristalov. Če ima molekula več polimorfni oblik, je strukturno fleksibilna in ni zaklenjena v en tip kristalne rešetke ali način pakiranja. Tako obstaja večja možnost za postavitev molekule v drugo ureditev pakiranja v soobstajanju z drugo molekulo (18).

Mohammad in sodelavci so preučevali, kako lahko iz Hansenovega topnostnega parametra predvidimo tvorbo kokristalov. Izračunali so razliko med Hansenovim topnostnim parametrom ZU in 33 kandidatov za tvorilce kokristalov in iz tega predvidevali mešanje ZU indometacina in tvorilcev kokristalov. 4 kandidati za tvorilce kokristalov so z indometacinom tudi tvorili kokristale, od tega sta bila dva kokristala odkrita prvič (25).

1.3.2 Kokristalizacija iz raztopine

Kokristale lahko pripravimo iz raztopine z različnimi tehnikami, in sicer z odparevanjem topila, z ohlajanjem raztopine ali z dodajanjem netopila. Pomembno je upoštevati stehiometrijsko razmerje komponent, sploh če topilo odparimo do suhega. Tako se izognemo obarjanju komponente v prebitku. Pomembna je tudi podobna topnost komponent, da ne pride do obarjanja manj topne komponente (26). Metoda kokristalizacije iz raztopine z ohlajanjem je nedavno dobila veliko pozornosti zaradi možnosti pridobivanja kokristalov v večjem obsegu (3).

Sestavo univerzalnih topil za program rešetanja soli ali kokristalov izberemo po različnih kriterijih, kot so aktivnost topila v zmesi, topnost tvorilcev soli ali kokristalov, kemijska reaktivnost, hlapnost, viskoznost zmesi in interference z analitskimi tehnikami (26).

Uporaba zmesi topil pri tvorbi kokristalov ima številne prednosti, kot so: manjša verjetnost nastanka solvatov, izboljšanje hitrosti kristalizacije, lažje preseganje aktivacijske energije za nukleacijo, zmanjšanje razlik v topnosti med različnimi spojinami. Na drugi strani ima kristalizacija iz kompleksne zmesi topil pomanjkljivosti na industrijski ravni, ker težko kontroliramo pravo sestavo zmesi topil skozi cel proces. Lahko se pojavijo tudi toksikološki problemi. Nastanek kokristalov iz raztopine lahko pospešimo z dodatkom semen (prečiščeni kokristali, ki so pridobljeni z mletjem) (15).

Ober in sodelavci so pripravili kokristal itrakonazola, ki je slabo topen v vodi, in L - jabolčne kisline v tetrahidrofuranu (THF) z uporabo superkričnega ogljikovega dioksida ali tekočega n – heptana kot netopila. ZU in tvorilec kokristala so raztopili v tekočem topilu THF-u in pod tlakom superkričnega ogljikovega dioksida ali s pomočjo netopila n – heptana oborili kokristal. Nato so odstranili THF in posušili kokristale s tokom prebitnega ogljikovega dioksida. Z rentgensko difrakcijo in diferenčno dinamično kalorimetrijo so potrdili nastanek kokristala. Čeprav so delci kokristala, oborjenega s superkričnim ogljikovim dioksidom, večji od delcev kokristala, oborjenega z n-heptanom, se prvi boljše raztapljajo zaradi njihove mikroporozne strukture. Spremembe velikosti delcev, morfologije in ostalih fizikalno - kemijskih lastnosti so preučevali s spreminjanjem procesnih parametrov, vključno s hitrostjo dodajanja ogljikovega dioksida, s tlakom, s temperaturo in s hitrostjo mešanja. Prednosti kokristalizacije s plinastim (superkričnim) netopilom so še zmanjšanje termičnega in mehničnega stresa, ki se inducira med mletjem, zmanjšanje uporabe organskih topil, lahko recikliranje originalnih organskih topil s preprostim zmanjšanjem tlaka in možnost proizvodnje kokristalnih prahov z manjšo vsebnostjo zaostalih topil kot pri metodi odparevanja topila (27).

1.3.3 Pridobivanje kokristalov z mletjem

Kokristali se v trdnem stanju tvorijo s pomočjo aktivacije med mletjem. Z mletjem se pogosto poruši kristalna rešetka in nastane amorfna snov. Zaradi mehanske obremenitve lahko pri mletju pride tudi do spremembe polimorfne oblike. Čistost kokristalne faze raste s časom mletja. Prednost te metode pred kokristalizacijo iz raztopine je večja hitrost reakcije in odsotnost težav povezanih z različno topnostjo komponent v različnih topilih, zato je primernejša za rešetanje (2, 28). Delci, ki jih pridobimo z mletjem, so premajhni za karakterizacijo z metodo rentgenske difrakcije na monokristalu. Napredek praškovnih rentgenskih metod in programi za analizo podatkov (modeliranje kristalne strukture) omogočajo določitev kristalne strukture tudi z metodo rentgenske praškovne difrakcije (29).

Metodo kokristalizacije z mletjem razdelimo na mletje brez topila in mletje z dodatkom topila. Mletje brez dodatka topila ali suho mletje predstavlja mešanje kokristalnih komponent v ustreznem stehiometrijskem razmerju ter mletje, ki lahko poteka ročno, z uporabo terilnice in pestila, ali strojno, z uporabo krogličnega ali vibracijskega mlina. Pri tej metodi je dobro, da ima eden od reaktantov dovolj velik parni tlak v trdnem stanju (29). Proces suhega mletja lahko poteka po različnih mehanizmih, med katere spadajo molekularna difuzija, tvorba evtektika in kokristalizacija, posredovana z amorfno fazo. Plin, tekočina in amorfna trdna snov, ki so intermediati teh metod, imajo povečano mobilnost in/ali višjo energijo molekul glede na začetno kristalno obliko (3, 29).

Z mletjem z dodatkom topila lahko pomembno povečamo hitrost tvorbe kokristala. Do izboljšanja kinetike pride zaradi dodatne stopnje orientacijske in konformacijske svobode, ki se odpre molekulam na različnih mejnih ploskvah ter večje možnosti za nastanek trkov med molekulami. Poleg tega predvidevamo, da se med procesom mletja v topilu tvorijo majhna kokristalna semena, kar lahko poveča hitrost kokristalizacije (3). Dodatna prednost mletja s topilom je nadzor polimorfne izida kokristalizacije (30). Temeljna zahteva pri izbiri topila je, da lahko raztopi vsaj del originalne komponente. Pri tej metodi v primerjavi s kokristalizacijo iz raztopine porabimo zelo majhno količino topila in s tem prihranimo ter varujemo okolje (3). Sinteza kokristalov z mletjem torej ponuja velik potencial v kontekstu zelene kemije (visok izkoristek, regio/stereospecifičnost, odsotnost topil in stranskih produktov) (31).

Na drugi strani je mletje lahko zamudno, ker moramo vsak tvorilec kokristala posebej zmleti z zdravilno učinkovino. Nova metoda mletja kokristalov v obliki koktajlov - zmesi omogoča istočasno mletje štirih tvorilcev kokristalov z isto funkcionalno skupino in zdravilne učinkovine. Po mletju izvedemo termično analizo in če pride do nastanka nove kristalne oblike, je treba poskus ponoviti s posamičnim mletjem enega tvorilca kokristala in ZU, da ugotovimo, pri katerih zmesih pride do nastanka kokristala. Metoda je primerna za detekcijo kokristalov, ki nastanejo s fizikalno močnejšimi interakcijami med zdravilno učinkovino in

tvorilcem kokristala. Z novo metodo so dobili kokristal karbamazepina s sečnino. Pri mletju brez topila in z dodatkom topil acetona ali vode so v vzorcih poleg kokristala opazili še karbamazepin polimorfne oblike III. Pri mletju z dodatkom n – heptana zaostalega karbamazepina ni bilo (32). Metoda mletja s topilom je zelo uporabna za proizvodnjo kokristalov v majhnem obsegu. Za možnost uporabe metode v večjem obsegu so razvili prilagodljiv planetaren mlin, ki lahko zmelje 48 vzorcev v eni paralelki. Ugotovili so, da kokristali najhitreje nastanejo iz majhnih delcev velikosti 20 – 45 mikrometrov, zato so tvorilce kokristalov pred kokristalizacijo zmelili do ustrezne velikosti (14).

Majhna količina topila ima v nekaterih primerih samo fizikalno vlogo; deluje kot drsilo v reakciji in predstavlja medij za pospeševanje molekularne difuzije. V ostalih primerih ima narava topila lahko velik vpliv na potek mehanokemijske kokristalizacije s tvorbo multikomponentnega inkluzijskega ogrodja. Mletje s topilom poteka na območju faznega diagrama z malo topila, zato nastane kokristal kot najstabilnejša faza z vidika termodinamike. S suhim mletjem zmesi pimelične kisline in 1,1-bis(4-piridil)ferocena ne dobimo kokristala ali soli. Izpostavitve suhe, zmlete zmesi param diklorometana, kloroforma, dietiletra, nitrometana ali etilaktata vodijo k kokristalu v stehiometrijskem razmerju 1:1. Če kot topilo uporabimo metanol, vodo ali izopropilni alkohol v plinastem agregatnem stanju, nastane piridinijeva sol s stehiometrijskim razmerjem 1:2. (29).

1.3.4 Alternativni načini izdelave kokristalov

1.3.4.1 Kokristalizacija in istočasna aglomeracija iz taline

Iztiskanje talin (angl. hot melt extrusion - HME) je široko uporabljena tehnologija v industriji polimerov in hrane, ki je primerna za pripravo različnih odmernih oblik in dostavnih sistemov zdravilnih učinkovin. Prednosti metode so, da je kontinuirana, poteka v enem koraku, poteka brez uporabe topil in je prenosljiva v industrijo (33). S kokristalizacijo iz taline so pripravili krogličasto aglomeriran kokristal ibuprofena in nikotinamida v stehiometrijskem razmerju 1:1. Parametri izdelave (nadzorovano segrevanje, strižna obremenitev, čas zadrževanja) so vplivali na lastnosti produkta. Povečanje strižne obremenitve je vodilo do večje čistosti kokristala. Povečanje časa zadrževanja in temperature na tem strižnem nivoju je vplivalo na večjo intenziteto kokristalnega vrha. Dodatno izboljšanje v intenziteti kokristalnega vrha so dosegli z iztiskanjem pri nizki strižni hitrosti in z dodatnim zvišanjem temperature. Izkoristek procesa so povečali z mešanjem in s procesiranjem nad evtektično točko, potrebno za nastop kokristalizacije (33, 34).

1.3.4.2 Tvorba kokristalov z metodo sušenja z razprševanjem

Z metodo sušenja z razprševanjem pridobivamo delce iz raztopine ali suspenzije, tako da z vročim tokom zraka dosežemo hitro izhlapevanje topila. Metoda služi načrtovanju delcev s posebnimi fizikalnimi lastnostmi (npr. oblika, velikost, gostota, površinske lastnosti). Materiali, ki jih pridobimo s sušenjem z razprševanjem, so pogosto amorfni zaradi hitrega sušenja. Sušenje z razprševanjem načeloma poteka v dveh stopnjah: pretvorba poteka od tekočine do amorfne oziroma delno kristalne trdne snovi v prvi stopnji in od amorfne do kristalne faze v drugi stopnji (35). Za pretvorbo amorfa v kokristal je nujna večja molekularna gibljivost in komplementarnost. Voda kot plastifikator poveča hitrost kokristalizacije (35, 63). Kokristali lahko prednostno tvorijo jedra in rastejo v zelo prenasičenih področjih zaradi hitrega odparevanja topila iz kapljic, prisotnosti tvorilca kokristala in/ali interakcij med ZU in tvorilcem kokristala v tekoči fazi. V nasprotju z metodo kokristalizacije iz raztopine z izhlapevanjem topila, so z metodo sušenja z razprševanjem večkrat dobili čiste kokristale (35).

Metoda bi lahko bila uporabna tudi na industrijski ravni (34).

1.3.4.3 Kokristalizacija iz raztopine/suspenzije z ultrazvokom

V poskusih so ugotovili, da se v gostih suspenzijah kokristali tvorijo lažje kot v redkih. Pri pridobivanju kokristalov z ultrazvokom iz raztopine je nukleacija iz raztopine spremenjena zaradi kavitacijske energije ultrazvočnih valov. Zaradi kavitacije pride do nukleacije pri nižji ravni prenasičenja. Poleg tega se prenasičenje doseže lažje kot pri kristalizaciji iz raztopine brez uporabe ultrazvoka (3, 36).

1.3.4.4 Tvorba kokristalov z metodo superkritičnih tekočin

Z metodo superkritičnih tekočin lahko pridobimo različne trdne oblike ZU, kot so polimorfi, kokristali z značilno stehiometrijo, polimorfi kokristalov, itd. Uporabnost superkritičnih tekočin temelji na treh glavnih lastnostih: na moči topila, ki je močno odvisna od tlaka; na mešanju z organskimi tekočinami, kar deluje na raztopljene substance kot netopilo in na izboljšanju atomizacije pri znižanju tlaka v razpršilniku (3, 37). Nad kritično točko superkritičnih tekočin se gostota in možnost solvatacije substance približujeta lastnostim tekočine in zato že majhne spremembe v temperaturi in tlaku superkritičnih tekočin povzročijo pomembne spremembe v gostoti in moči raztapljanja. Zaradi tega je v superkritičnih tekočinah veliko toplencev dobro topnih. Zaradi trenutne posušitve kapljic med znižanjem tlaka superkritične zmesi, ki potuje skozi cev (odprtino), se izognemo obarjanju čistih komponent. Kokristale tako oborimo v primernem stehiometrijskem razmerju glede na začetno molsko razmerje čistih komponent v raztopini. Za razliko od klasičnih tehnik, s to tehniko brez izgube aktivnosti razvijamo substance, ki so občutljive na visoko temperaturo ali visoke strižne obremenitve. Ostale prednosti metode superkritičnih tekočin so, da tvorba kokristalov poteka

v enem koraku, da predstavljajo možnost za novo medmolekulsko prepoznavanje, zato lahko nastanejo novi polimorfni kokristali, da je proces okolju prijazen zaradi manjše uporabe organskih topil in zmernih temperatur, da je proces primeren za strukturno nestabilne substance, itd. Z različnimi metodami superkritičnih tekočin in z medprocesnim spreminjanjem eksperimentalnih pogojev (temperatura, tlak) dobimo kokristale različnih oblik. Sprememba oblike in velikosti kokristalnih delcev imata pomemben vpliv na njihove fizikalno – kemijske in farmakokinetične lastnosti (hitrost raztapljanja, biološka uporabnost, stabilnost v trdnem stanju) (38, 39). Padrela je s tehniko superkritičnih tekočin proizvedel kokristal indometacin/saharin z različno velikimi (nanometerskimi – mikrometerskimi) in oblikovanimi delci (3). Kokristale saharina z indometacinom, teofilinom, kofeinom, sulfametazonom, aspirinom in karbamazepinom so iz etanolnih raztopin prav tako pridobili s pomočjo superkritičnega ogljikovega dioksida (34).

1.4 Rast kristala

Kristalizacija poteka v dveh stopnjah. Prva stopnja je proces tvorbe jeder ali nukleacija, v kateri se tvorijo začetna jedra oziroma nukleusi. Centre za nukleacijo lahko dobimo z dodatkom majhnih, prej pripravljenih kristalov oziroma semen (13). Po nukleaciji hitro sledi druga faza: to je rast kristala, ki poteka navzven od položaja nukleacije. Idealna kristalna površina raste z razširjanjem enega sloja posamezne ploskve (40).

1.4.1 Rast monokristala

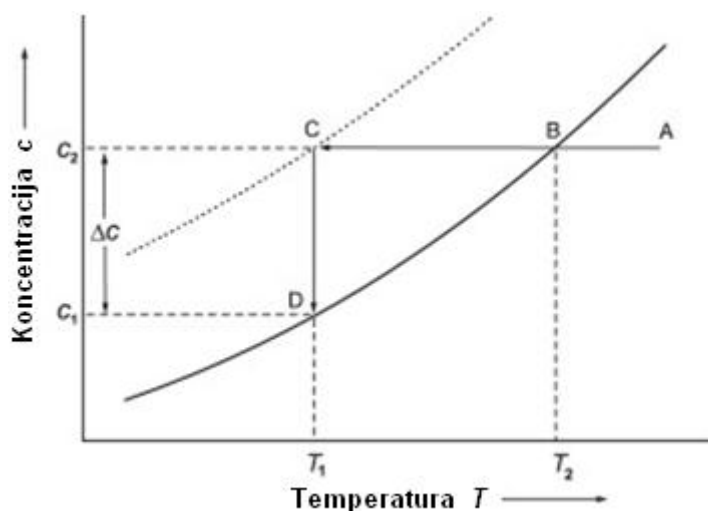
Za potrditev nastanka kokristala je najboljša metoda rentgenska difrakcija na monokristalu, pri kateri dobimo strukturo nastale spojine. Za delo z rentgensko difrakcijo na monokristalu je cilj pridobiti majhno število relativno velikih (0,1-0,4 mm) monokristalov. Monokristal je kristalna trdna snov, ki ima v celoti ohranjeno kristalno rešetko. Pri pridobivanju monokristalov je pomembno, da rastejo počasi, od nekaj minut do mesecev, kar je odvisno od sistema. Metode rasti so:

1.4.1.1 Rast iz raztopine

Kokristalizacija iz raztopine poteka na tri načine: s počasnim ohlajanjem raztopine, s počasnim izhlapevanjem topila in z metodo z gradientne temperature. Metoda s počasnim izhlapevanjem topila je najenostavnejša in najboljša za spojine, ki niso občutljive na laboratorijske pogoje. Tehnika počasnega ohlajanja je primerna za sisteme z zmerno topnostjo in s temperaturo vrelišča topila, ki je manjša od 100 °C.

Iz raztopine lahko rastejo materiali, ki imajo visoko topnost v določenem topilu in se razlikujejo v topnosti pri različnih temperaturah. Do kristalizacije pride pri prenasičenju, ki ga

lahko dosežemo z znižanjem temperature, z zmanjšanjem volumna topila ali s povečanjem tlaka. Zelo veliki, čisti kristali lahko zrastejo iz raztopine v območju metastabilne meje med nasičeno in prenasičeno raztopino (Slika 2). Pravilnost kristalov lahko izboljšamo s segrevanjem do kritične temperature in s sledečim ohlajanjem. Zmanjševanje topnosti kristalov v raztopini in posledično kristalizacijo dosežemo tudi s spremembo pH – ja, z nekaterimi solmi Hofmeisterove serije (nekateri ioni povzročajo obarjanje predvsem beljakovin, ostali nasprotno izboljšajo topnost beljakovin) ali s polimeri (41). Glavni pomanjkljivosti rasti iz raztopine pri nizki temperaturi sta počasnost (nizki izkoristki) in vključitev topila v kristal, prednost pa je intaktnost strukture nastalih kristalov.



Slika 2: Prikaz metastabilnega območja, v katerem pride rasti kristalov (42).

Na Sliki med polno in črtkano črto vidimo metastabilno področje, kjer je raztopina že prenasičena, a ne nastajajo nova stabilna jedra, ampak tista, ki so že nastala, pridobivajo na masi. Z ohlajanjem in izhlapevanjem topila pridemo v območje med točkama B in C in v območje med D in C (metastabilno področje), kjer je izpolnjen pogoj za kristalizacijo. Pri počasnem ohlajanju nastane malo jeder, zato lahko zrastejo večji kristali. Na drugi strani pri hitrem ohlajanju dobimo veliko malih kristalov (42, 43).

1.5 Lastnosti farmacevtskih kokristalov

1.5.1 Topnost

Topnost je maksimalna koncentracija topljenca, ki z danim volumnom topila daje nasičeno homogeno molekularno disperzijo. Koncentracija nasičene raztopine je torej merilo topnosti snovi. Odvisna je od polarnosti, tvorbe H – vezi, asociacije, solvatacije, acido – baznih lastnosti, kristalne strukture, itd (44).

Topnost lahko izboljšamo s fizikalno modifikacijo (zmanjšanje velikosti delcev z mikronizacijo ali nanosuspenzijo, sprememba kristalne rešetke, amorfizacija in kokristalizacija, trdne disperzije, evtektične zmesi, trdne raztopine, kriogene tehnike), s kemijsko modifikacijo (sprememba pH – ja, pufra, derivatizacija, kompleksacija, tvorba soli) in z ostalimi načini (superkritične tekočine, površinsko aktivne snovi, solubilizatorji, kotopila, itd) (45, 46).

Okrog 40% zdravil na trgu je slabo topnih. Poleg tega ima slabo topnost kar 80 – 90 % kandidatov za ZU (17). In vitro metode rešetanja so namreč izpodrinile in vivo metode rešetanja na živalih. S tem smo zanemarili izziv dostave učinkovine v fazi odkrivanja farmakološko aktivnih spojin (17).

Kokristali predstavljajo eno izmed možnosti izboljšanja raztapljanja zdravilnih učinkovin. Na topnost kokristala vpliva tako vrsta medija kot tudi pH vrednost (17, 62). Raziskave Jagadeesha in sodelavcev so pokazale, da do največjega raztapljanja farmacevtskih kokristalov pride po 30 minutah in da je dovolj velika topnost v najboljših primerih ohranjena zadosti časa (4 – 6 ur). Do izboljšane topnosti pride zaradi pojava prenasičenja raztopine, ki je značilna tudi za amorfne učinkovine (14, 17).

Sprememba topnosti kokristalov lahko po Rodriguez Hornedu zavzame širok razpon vrednosti: od 0,1 (10 krat zmanjšana topnost) do 152 (152 krat povečana topnost). Za topnost kokristalov se pričakuje, da je približno v sorazmerju s topnostjo tvorilca kokristala (11, 47).

Pri kokristalu eksemestan/maleinska kislina je prišlo do povečanja raztapljanja zaradi tvorbe finih delcev, pri kokristalu megestrol acetat/saharin pa zaradi vzdrževanja kokristalne oblike in hitrega raztapljanja pred pretvorbo v originalen kristal čiste učinkovine (3).

1.5.2 Temperatura tališča

Nekovalentne sile med molekulami v kokristalu igrajo ključno vlogo v kontroli mrežne energije in posledično termične stabilnosti. Zato je temperatura tališča tista lastnost trdnega materiala, ki jo najlažje spremenimo s kokristalizacijo in tudi najlažje spremljamo s standardno opremo za termično analizo. Kontrola temperature tališča trdne oblike ZU ima precejšnji tehnološki pomen, saj neželjeno taljenje lahko vpliva na veliko faz v procesiranju ZU, vključno z granulacijo, s tabletiranjem in s pripravo inhalacijskih formulacij.

Temperatura tališča je osnovna fizikalna lastnost, ki je določena s temperaturo, pri kateri je trdna faza v ravnotežju z tekočo fazo. Določanje temperature tališča farmacevtskega produkta je zelo pomembno zaradi povezave med temperaturo tališča farmacevtskega produkta in njegovo procesabilnostjo, topnostjo in stabilnostjo. Schultheiss in sodelavci so analizirali 50 vzorcev kokristalov, 51% kokristalov je imelo temperaturo tališča med ZU in tvorilcem kokristala, 39% jih je imelo tališča nižje od ZU in tvorilca kokristala, 6% je imelo

višje tališče, 4% pa jih je imelo enako tališče kot ZU in tvorilec kokristala. V tej raziskavi so ugotovili tudi, da ni korelacije med temperaturo tališča kokristalov in logaritmom topnosti (48). V drugi raziskavi so kokristalizirali ZU heksametilenbisacetamid s serijo tvorilcev kokristalov (pet različnih alifatskih karboksilnih kislin) s podobnimi strukturami, a z različnimi temperaturami tališča. Temperature tališča kokristalov so bile direktno povezane s temperaturami tališča dikarboksilnih kislin.

Fleischman je ugotovil, da se štirje kokristali z enako osnovno heteromerno O-H...N vodikovo vezjo, a z različnim pakiranjem, razlikujejo v temperaturi tališča. Ugotovil je tudi, da visoke temperature tališča kokristalov lahko prispevajo k slabi topnosti kokristalov (3).

Vishweshwar in sodelavci so opazili, da temperature tališča kokristalov izonikotinamida s terminalnimi alifatskimi dikarboksilnimi kislinami sledijo istemu trendu kot temperature tališča čistih tvorilcev kokristala. Temperature tališča kokristalov se izmenjujejo glede na število ogljikovih atomov v tvorilcu kokristala, višje so pri kokristalih z dikarboksilnimi kislinami s parnim številom ogljikovih atomov (11).

1.5.3 Stabilnost

Kljub prednostim kokristalov so zdravila v taki obliki na trgu izjemno redka ali pa jih sploh ni. Eden razlogov zato je skrb, ali so kokristali termodinamično stabilni (49).

Testiranje stabilnosti na novo razvitih kokristalov običajno vključuje štiri vidike: relativni vlažnostni stres, termični stres, kemijsko stabilnost in stabilnost v raztopini.

Kokristal ni neobčutljiv na visoko vlažnost in tekočo vodo. Lahko se preprosto raztopi ali pa se obori ena komponenta. V prisotnosti vode lahko pride tudi do transformacije trdne faze ZU (polimorfna transformacija, tvorba hidrata ali kristalizacija amorfne faze) ali do mikrobiološke kontaminacije (49).

Hidracijska stabilnost racemnih kokristalov je v primerjavi s kiralnimi analogi mnogo višja (11). Stabilnost kokristalov karbamazepina s 4 – aminobenzojsko kislino v stehiometrijskem razmerju 1:1 in 2:1 je odvisna od koncentracije liganda v raztopini. Kokristal, ki vsebuje več liganda, je stabilnejši pri višji koncentraciji liganda v raztopini (50).

Kokristal saharina z adefovir dipvoksilom v stehiometrijskem razmerju 1:1 je termično stabilnejši in se glede na samo zdravilno učinkovino boljše raztaplja. Medtem ko adefovir dipvoksil polimorfne oblike I med segrevanjem pri 60 °C popolnoma razpade v 18 dneh, kokristal med segrevanjem pri istih pogojih ostane kemijsko stabilen 47 dni (14).

1.5.4 Biološka uporabnost

Biološka uporabnost je farmakološko merilo deleža neke snovi, ki je v nespremenjeni obliki na voljo v sistemskem krvnem obtoku. Običajno se izraz nanaša na količino absorbirane

učinkovine, ki je dejansko na razpolago v tarčnem tkivu. Na psih so ugotavljali biološko uporabnost karboksamida v obliki kokristala z glutarno kislino. Ugotovili so, da ima kokristal več kot trikrat večjo biološko uporabnost od samega karboksamida in da povečanje odmerka ni sorazmerno s povečanjem biološke uporabnosti. Ugotovili so tudi, da so kokristali v vodi 18 - krat bolj topni kot karboksamid (50).

1.6 Metode karakterizacije kokristalov

Karakterizacija kokristalov je pomemben sestaven del raziskav kokristalov. Osnovne fizikalnokemijske lastnosti kokristalov lahko karakteriziramo z rentgensko praškovno difrakcijo (PXRD), z rentgensko difrakcijo na monokristalu (SXR), z infrardečo spektroskopijo (IR), z Ramansko spektroskopijo, z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), z nuklearno magnetno resonanco v trdnem stanju (SSNMR), z dinamično elektronsko mikroskopijo (SEM) in s teraherčno spektroskopijo (2).

PXRD metoda je pomembna tehnika za identifikacijo in karakterizacijo različnih trdnih oblik ZU. Ni primerna za ločevanje solvatov, hidratov ali polimorfnih oblik kokristalov (51). Nekaterih trdnih snovi ne moremo pripraviti v obliki zadostno velikih kristalov za rentgensko difrakcijo na monokristalu, saj ima večina materialov namesto kristalne polikristalno zgradbo, in jih lahko določimo le z rentgensko praškovno difrakcijo, pri kateri najprej določimo celično enoto, nato rešimo strukturo in nazadnje sledi še definiranje strukture spojine (52). Do pomembnega napredka pri določevanju strukture organskih molekul je prišlo z razvojem "direct – space" metode za rešitev strukture spojine. Metoda poteka v več korakih. Najprej proizvedemo poskusne strukture. Nato izvedemo naključne premestitve na poskusni strukturi ter izračunamo vzorec/ moč/ strukturne faktorje praškovne difrakcije. Na koncu primerjamo dobljene podatke z eksperimentalnimi ter sprejmemo ali zavrujemo strukturo na podlagi različnih kriterijev (53).

Najzmogljivejša analizna metoda za strukturno karakterizacijo kokristalov je rentgenska difrakcija na monokristalu, ki nam poda absolutno kristalno strukturo.

Z IR spektroskopijo preučujemo sestavo (navadno) organskih spojin, ugotavljamo strukturo in sestavo spojine glede na odstotek prepuščanja infrardeče svetlobe skozi vzorec. Ta metoda lahko predstavlja močno orodje za razlikovanje kokristalov od soli, ko je v vodikovo vez vključena karboksilna kislina.

Z diferenčno dinamično kalorimetrijo zaznamo vse toplotne učinke, ki nastopijo pri faznih spremembah ali kemijskih reakcijah. Z določanjem temperatur tališč oziroma območij taljenja in temperatur steklastih prehodov natančneje opredelimo vrsto materiala (3).

Močno orodje za določanje strukture je tudi jedrska magnetna resonanca v trdnem stanju (SSNMR) zaradi visoke ločljivosti, sposobnosti za direktno razreševanje ključnih atomov v

strukturi s pomočjo različnih NMR aktivnih jeder in zaradi fleksibilnosti v načrtovanju eksperimenta. Primerna je tudi za določevanje polimorfov. S to metodo lahko hitro zaznamo združitev molekul, ki tvorijo kokristale. Zaznamo lahko tudi prisotnost faznih zmesi, ki nastanejo, ko se kokristali ne tvorijo. Metoda ^1H SSNMR je posebej uporabna v raziskavah kokristalov zaradi sposobnosti določitve položaja vodikove vezi. Slabosti metode so možna omejena ^1H ločljivost in slaba dostopnost instrumentov (2, 54).

1.7 Farmakodinamika in farmakokinetika karvedilola

Zdravilna učinkovina karvedilol je racemat, enantiomera imata različne učinke in presnovo. Enantiomer S (-) je α_1 in β blokator, enantiomer R (+) pa zavira le α_1 receptorje. Prednost uporabe kombinacije α in β blokatorja je v manjših stranskih učinkih, saj v nasprotju s selektivnimi α_1 blokatorji ne pride do refleksne tahikardije. Izognemo se tudi poslabšanju hemodinamike zaradi negativnega ionotropnega efekta β blokatorjev, saj karvedilol deluje tudi vazodilatacijsko (α_1 učinek).

Karvedilol se absorbira iz GIT. V plazmi je prisoten vezan na beljakovine. Zaradi hitrega presnavljanja s CYP2D6 in CYP2C9 že pri prvem prehodu skozi jetra je njegova biološka uporabnost le 30%. Biološko uporabnost so povečali na 70 % s transdermalnimi obliži. Presnovki so predvsem β blokatorji, npr. 4 – hidroksifenilni derivat deluje 13 – krat močnejše od karvedilola. V primerjavi s karvedilolom so aktivni presnovki šibki vazodilatatorji. Stereoselektivnost presnove se kaže v tem, da je plazemska koncentracija karvedilola R (+) dva do trikrat večja od karvedilola S (-). Tudi razpolovni čas izločanja je različen: 5 do 9 ur za karvedilol R (+) in 7 do 11 ur za karvedilol S (-). Priporočeno odmerjanje je največ 2-krat dnevno po 25 mg.

Terapevtske indikacije karvedilola so zdravljenje esencialne hipertenzije ter kronične stabilne angine pektoris, dopolnilno zdravljenje zmernega do hudega srčnega popuščanja in zdravljenje akutnega miokardnega infarkta pri bolnikih z levo ventrikularno disfunkcijo (55).

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je priprava nove kristalne oblike (kokristala) iz zdravilne učinkovine karvedilola, ki je slabo topen v vodi, in farmacevtsko sprejemljive pomožne snovi salicilne kisline.

Komponenti bomo mleli brez dodatka topila in z dodatkom topila. Kot topila bomo uporabili heptan, etilacetat, acetonitril, aceton in 1,4 – dioksan. Vse mlete zmesi bomo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo, ki jo odlikuje hitrost, enostavnost in učinkovitost pri proučevanju kristalnih struktur. Metoda ni primerna za potrditev nastanka kokristala, saj zazna tudi soli in evtektične zmesi.

Za potrditev nastanka kokristala oziroma soli je najboljša metoda rentgenska difrakcija na monokristalu, pri kateri dobimo natančno strukturo nastale spojine. Za delo z rentgensko difrakcijo na monokristalu bomo poskušali pridobiti majhno število relativno velikih (0,1 – 0,4 mm) monokristalov. Za izdelavo monokristalov bomo uporabili različna čista topila in zmesi različnih topil. Pazili bomo, da bodo imeli monokristali za rast dovolj časa. Ker vedno ne dobimo primernih vzorcev za rentgensko difrakcijo na monokristalu, bomo vzorce vrednotili tudi z rentgensko praškovo difrakcijo. S helijevim piknometrom bomo preverili, ali se gostoti mlete in fizikalne zmesi razlikujeta.

Kokristali oziroma soli predstavljajo eno izmed možnosti izboljšanja raztapljanja zdravilnih učinkovin. Z merjenjem hitrosti raztapljanja čistega karvedilola, mletega karvedilola, fizikalne zmesi in mletih zmesi s topilom ali brez topila iz kislega medija s pH 1,2 bomo ugotavljali vpliv kokristalizacije oziroma tvorbe soli na hitrost raztapljanja karvedilola. Primerjali bomo tudi 24 – urno topnost karvedilola, fizikalne zmesi in kokristala oziroma soli v vodi in v kislem mediju s pH 1,2.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Učinkovina:

- karvedilol (Krka, Slovenija)

Karvedilol je bela oziroma skoraj bela kristalna snov, ki je zelo težko topna v vodi, zmerno topna v alkoholu ter zelo težko topna v razredčenih kislinah. Je šibko bazičen s pKa 7,8 in lipofilen ($\log P = 3,967$). Ima tudi polimorfne lastnosti. Po nekaterih podatkih je njegova topnost pri pH 9 pod 1 $\mu\text{g/L}$ ter pri pH 7 = 23 mg/L. Največjo topnost doseže pri pH 5 (približno 100 mg/L), pri nižjih pH – jih (v želodcu) se topnost zniža zaradi tvorbe soli s HCl. Pokazalo se je, da je sol karvedilola s fosfatom mnogo bolj topna v vodi od proste baze (karvedilola) ali soli s HCl. Ta nova kristalna oblika je tudi stabilnejša, ker je sekundarna aminska skupina karvedilola (glavni razlog za razpad molekule, saj nukleofilno reagira z estri, aldehidi v ekscipientih, itd) protonirana. Nekateri v tem vidijo priložnost za zadržano sproščanje (absorpcijo v nižjih predelih GIT) in redkejšo odmerjanje (56).

Spada med antihipertenzive, in sicer neselektivno inhibira β -adrenergične receptorje ter selektivno α_1 -adrenergične receptorje. Poleg tega je še antioksidant z antiproliferativnimi lastnostmi.

Pomožna snov:

- salicilna kislina (Sigma Aldrich, Nemčija)

Topila, uporabljena pri mletju z dodatkom topila:

- 1,4 – dioksan (Merck, Nemčija)
- aceton (Merck, Nemčija)
- acetonitril (Riedel de Haen, Nemčija)
- etilacetat (Merck, Nemčija)
- heptan (Merck, Nemčija)

Reagenti za pripravo medijev za test sproščanja:

- koncentrirana klorovodikova kislina za analizo (37% HCl) (Merck, Nemčija)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Merck, Nemčija)
- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid (Merck, Nemčija)
- prečiščena voda

Topila za pripravo monokristala:

- 1,2 – dikloroetan (Merck, Nemčija)
- 1,4 – dioksan (Merck, Nemčija)
- aceton (Merck, Nemčija)
- acetonitril (Riedel de Haen, Nemčija)
- dimetilsulfoksid (Merck, Nemčija)
- etanol (Merck, Nemčija)
- etilacetat (Merck, Nemčija)
- heksan (Merck, Nemčija)
- izopropanol (Merck, Nemčija)
- kloroform (Merck, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- tetrahifrofuran (Merck, Nemčija)
- ionska tekočina 1 – butil – 3 – metilimidazolijev tetrafluoroborat (Merck, Nemčija)

Aparature:

- analizna tehtnica Mettler Toledo AG 245, Švica
- tehtnica A&D IntstrumentsLTD, GH-300-EC, Italija
- vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija
- diferenčni dinamični kalorimeter: Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30, Švica
- naprava za merjenje pH vrednosti raztopin: pH METER, Mettler Toledo MA235, Švica
- naprava za test sproščanja: Erweka DT6, Nemčija
- spektrofotometer: Hewlett Packard, HP 8453, UV – Visible spectroscopy system, Nemčija
- osebni računalnik Hewlett Packard Vectra XA povezan z UV spektrofotometrom
- difraktometer za rentgensko difrakcijo na monokristalu Agilent SuperNOVA diffractometer, ZDA
- helijev piknometer: AccuPyc 1330, Micromeritics, Norcross, ZDA
- magnetno mešalo MM – 531, Železniki, Slovenija

3.2 Metode

Mletje vzorcev:

Vzorke smo mleli z vibracijskim mlinom Pulverisette 0 (Slika 3) pri 3000 – 3600 nihajev/min pri amplitudi 1 – 3 mm. Mleli smo karvedilol, fizikalno zmes karvedilola s salicilno kislino v stehiometrijskem razmerju 1:1 brez topila ali z dodatkom 50 μ l topila (heptan, etilacetat, acetonitril, aceton, 1,4 - dioksan). Pred mletjem smo zmes premešali, mlin zaprli in nastavili čas mletja, ki je bil 30 minut. Vzorci so imeli skupno maso 1 gram.

Vibracijski mlin melje prašek s pomočjo drgnjenja, trenja in zadevanja krogle ob vzorec v možnarju. Možnar vibrira elektromagnetno, s pomočjo elektromotorja, vibracije pa se prenesejo iz krogle na mleti material in obratno. Manjšanje grobih delcev je na začetku mletja posledica udarcev krogle ob delce, kasneje pa se drobni delci zmeljejo zaradi drgnjenja materiala med kroglo in dnom možnarja. Zaradi vibracij se material nenehno poseda in se tako tudi dobro premeša.



Slika 3: Vibracijski mlin Pulverisette (57)

Priprava fizikalne zmesi:

Natehtali smo karvedilol in salicilno kislino v stehiometrijskem razmerju 1:1 v skupni masi 1 g. Zatehtane količine smo v posodici s stresanjem mešali 10 minut.

Diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. Differential Scanning Calorimetry – DCS):

DSC analiza vzorcev je bila opravljena z diferenčnim dinamičnim kalorimetrom Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1 (Slika 4), opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.30 na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Vzorce smo segrevali s hitrostjo 10 K/min v območju merjenja od 263 K do 453 K. Meritve so bile opravljene v dušikovi atmosferi (pretok dušika je znašal 50 ml/min).



Slika 4: Diferenčni dinamični kalorimeter Mettler toledo z avtomatskim vzorčevalnikom in opremo za ohlajanje tekočega dušika (58).

Določanje gostote:

Gostoto smo določili s helijevim piknometrom AccuPyc 1330, Micromeritics na Fakulteti za farmacijo. Natehtali smo približno 1,7 g karvedilola, 3 g salicilne kisline, 1,5 g fizikalne zmesi in 1 g mlete zmesi z acetonitrilom in opravili analize v treh ponovitvah. Povprečen rezultat je podan za gostoto.

Rentgenska praškovna difrakcija:

Praškovni difraktogrami so bili posneti z difraktometrom Philips X+Port Pro MPD. Območje snemanja je obsegalo $3 - 31^\circ 2\theta$. Integracijski čas je bil 100 sekund, korak pa $0,033^\circ$.

Poskus priprave monokristala:

Najprej smo ocenili topnost karvedilola in salicilne kisline v različnih nepolarnih (heksan, kloroform, 1,4 – dioksan) in polarnih (etanol, etilacetat, dimetilsulfoksid, acetonitril, metanol, izopropanol, tetrahidrofuran) topilih. Topila imajo z izjemo dimetilsulfoksida in 1,4 – dioksana temperaturo vrelišča pod 100 °C, zato so hitro izhlapevala in je bilo težje oceniti topnost. Izbira topila temelji na primerljivi topnosti obeh komponent, ki jih uporabljamo za pripravo kokristala. Pomagali smo si z zmesmi polarnega in nepolarnega topila ali z zmesmi dveh polarnih topil. Del pripravljenih zmesi smo segreli do popolnega raztapljanja komponent, in pustili da kristali rastejo kontrolirano ob počasnem izhlapevanju topila. Drugi del vzorcev smo po segrevanju hitro ohladili v hladilniku (10 min na -4 °C) ter pustili da kristali počasi rastejo pri sobni temperaturi ob počasnem izhlapevanju. Za pospeševanje kristalizacije smo v raztopino pri sobni temperaturi dodajali tudi delce predhodno zmlete zmesi – semena. Vzorce smo ponavadi pustili stati približno en teden in občasno preverili morebitno rast kristalov.

Določanje strukture monokristala z rentgensko difrakcijo:

Rentgenska difrakcija na monokristalu je bila izvedena na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo na Agilent SuperNOVAdiffractometer z mikrofokusnim rentgenskim virom z uporabo MoKa radiacije ($\lambda=0.71073 \text{ \AA}$) pri temperaturi 293 K. Redukcija in integracija podatkov je bila izvedena s programom CRYCALISPRO (59). Absorpcijske popravke so uporabili na osnovi ponavljajočih in simetrično – ekvivalentnih refleksij (odbojev). Strukturo so rešili s standardno direktno metodo, izvedeno v SIR (60) in prečiščeno na F^2 z uporabo SHELXL s stisnjenim modelom za H - atome.

Preskus raztapljanja:

Preskus raztapljanja smo izvedli po Ph. Eur. 7th Ed. z uporabo naprave z vesli Erweka DT6 na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Masa vzorca je vsebovala 25 mg učinkovine, kar ustreza enkratnemu odmerku te učinkovine. Za preskus raztapljanja smo uporabili dva različna medija, in sicer fosfatni pufer (pH = 6,8) in kisel medij (pH = 1,2). Ker je bilo raztapljanje v fosfatnem mediju nizko, smo se kasneje bolj osredotočili na kisel medij.

Ob določenih časovnih intervalih (1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) smo z brizgo odvzeli 10 ml vzorca iz raztopine in ga filtrirali z uporabo filtra Minisart RC 25 0,45 μm (Sartorius, Nemčija). Ker prostornine odvzetega vzorca nismo nadomeščali, smo pri računanju upoštevali njeno izgubo. Poskus smo naredili v 3 paralelkah, v 900 ml ustreznega medija pri temperaturi 37 °C in hitrosti mešanja 50 obratov na minuto. Koncentracijo učinkovine smo določili spektrofotometrično z UV-VIS spektrofotometrom Hewlett Packard, HP8453

(Nemčija) na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Absorbanco smo merili pri 332 nm v kivetih iz kvarčnega stekla in s potjo žarka 1,0 cm.

Priprava medija za raztapljanje:

Fosfatni pufer (pH = 6,8): v 1000 ml bučo smo natehtali 6,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in dodali 900 ml prečiščene vode. Z raztopino 0,9 g NaOH v 100 ml vode smo uravnali pH. pH smo umerili s pH metrom Mettler Toledo MA235 (Švica).

Kisel medij - klorovodikova kislina (pH = 1,2): V 1000 ml bučo smo zlili 900 ml prečiščene vode in v digestoriju dodali 8,5 ml 37% koncentrirane HCl. Bučo smo nato do oznake dopolnili s prečiščeno vodo in dobro premešali na magnetnem mešalu.

Izdelava umeritvene premice:

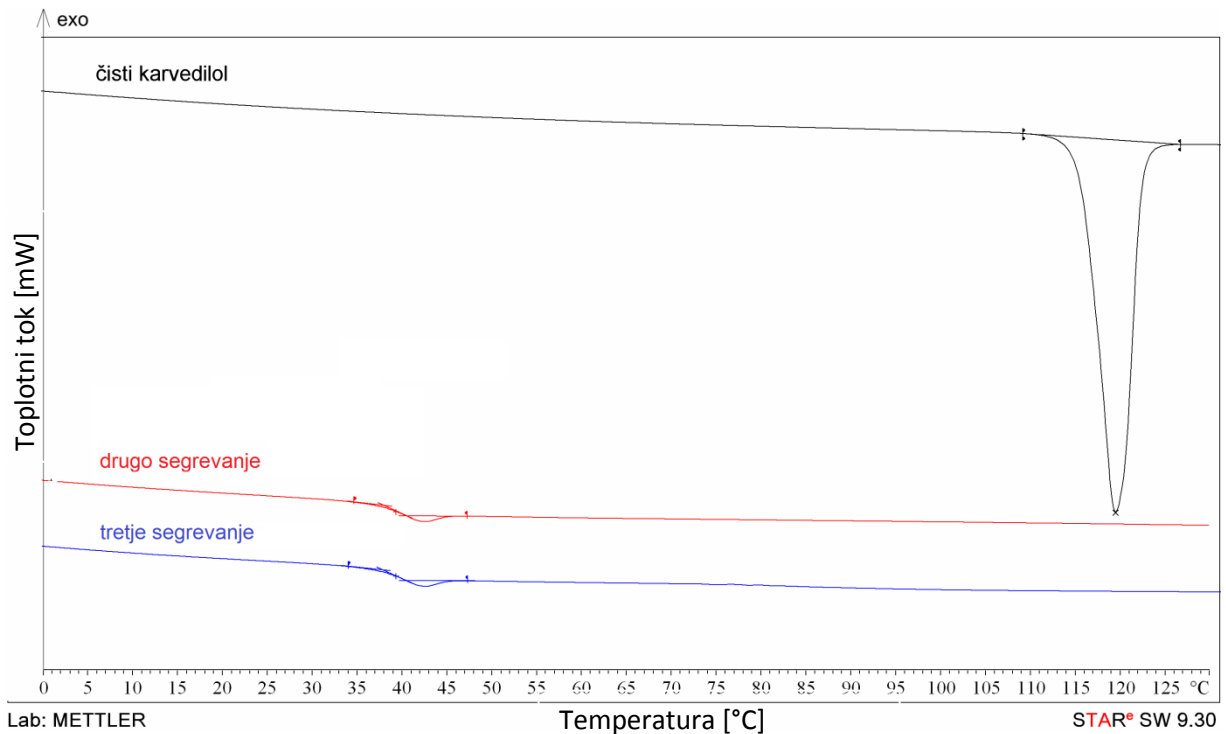
Natehtali smo okoli 10 mg karvedilola za pripravo standarda. Učinkovino smo raztopili v 10 ml metanola in dopolnili s prečiščeno vodo do 250 ml. Iz raztopine smo pripravili razredčitve 2/10, 2,5/10, 3/10, 4/10, 4,5/10 in 5/10, ter jih pomerili spektrofotometrično. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Program Hewlett Packard Vectra XA je izračunal umeritveno premico na podlagi absorbanca spektrofotometričnih meritev.

Topnost karvedilola, fizikalne zmesi in mlete zmesi v vodi in v kislem mediju s pH 1,2 po 24 urah:

V 250 ml erlenmajerico smo natehtali približno 100 mg ustreznih vzorcev, dodali magnet in ustrezen medij do oznake. Po 24 urah mešanja pri 37 °C smo spektrofotometrično določili koncentracijo karvedilola.

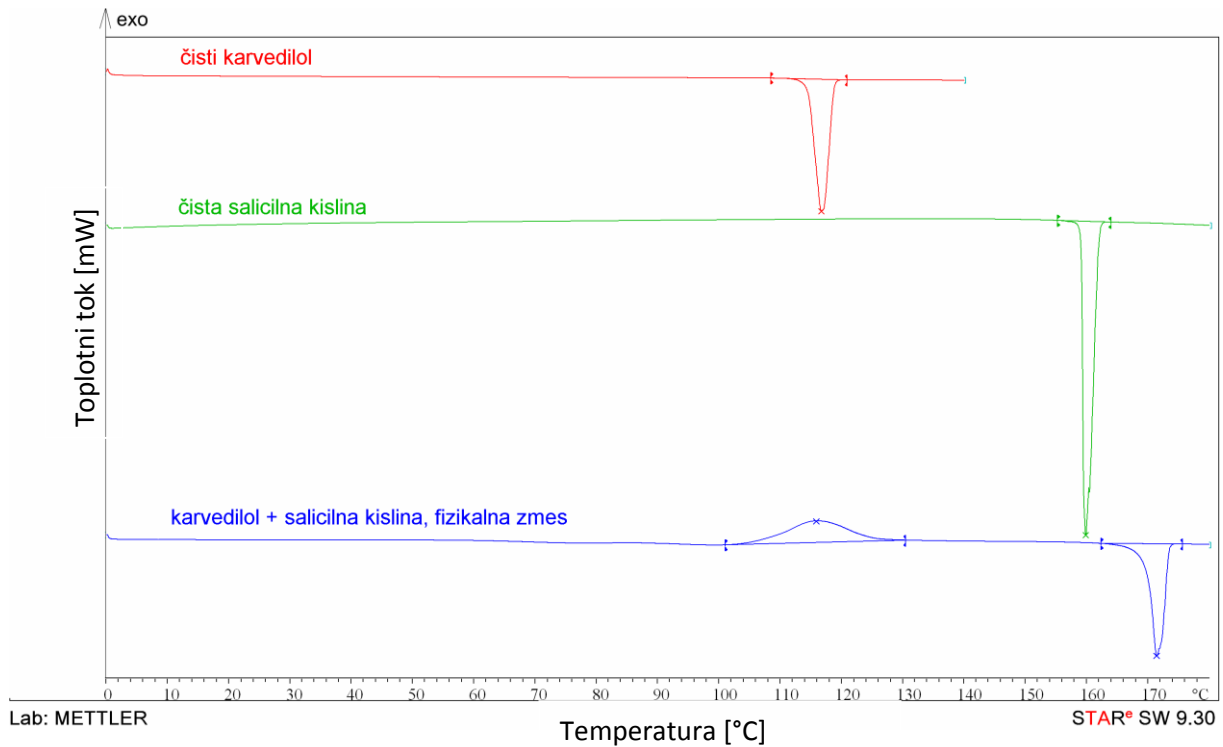
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 DSC ANALIZE KARVEDILOLA, SALICILNE KISLINE, FIZIKALNE ZMESI IN MLETIH ZMESI



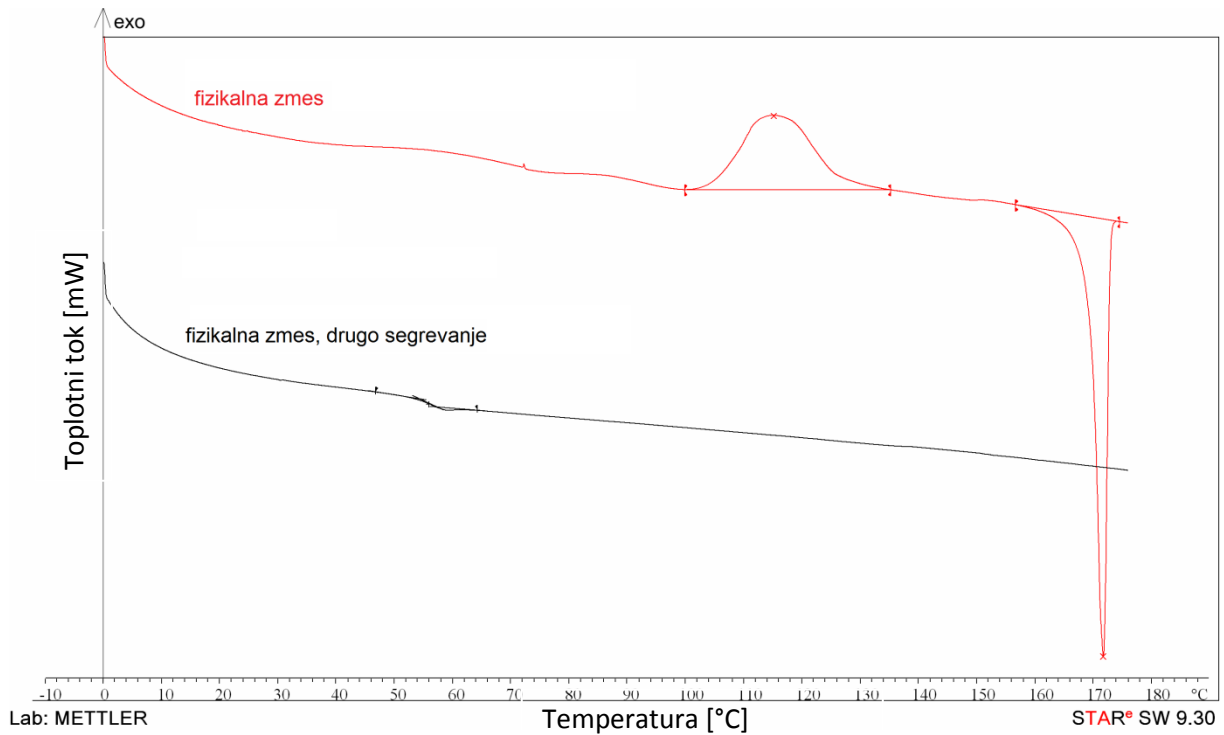
Slika 5: DSC krivulje izhodnega karvedilola, prvo in drugo segrevanje ohlajene taline

Slika 5 predstavlja DSC krivulje izhodnega karvedilola med prvim, drugim in tretjim segrevanjem. Na DSC krivulji izhodnega karvedilola po prvem segrevanju vidimo endotermen vrh pri 115 °C, ki predstavlja taljenje karvedilola polimorfne oblike II (61) . Pri drugem in tretjem segrevanju nismo zaznali taljenja, ampak le steklasti prehod pri 39 °C. S taljenjem in ohladitvijo taline je prišlo do amorfizacije učinkovine.



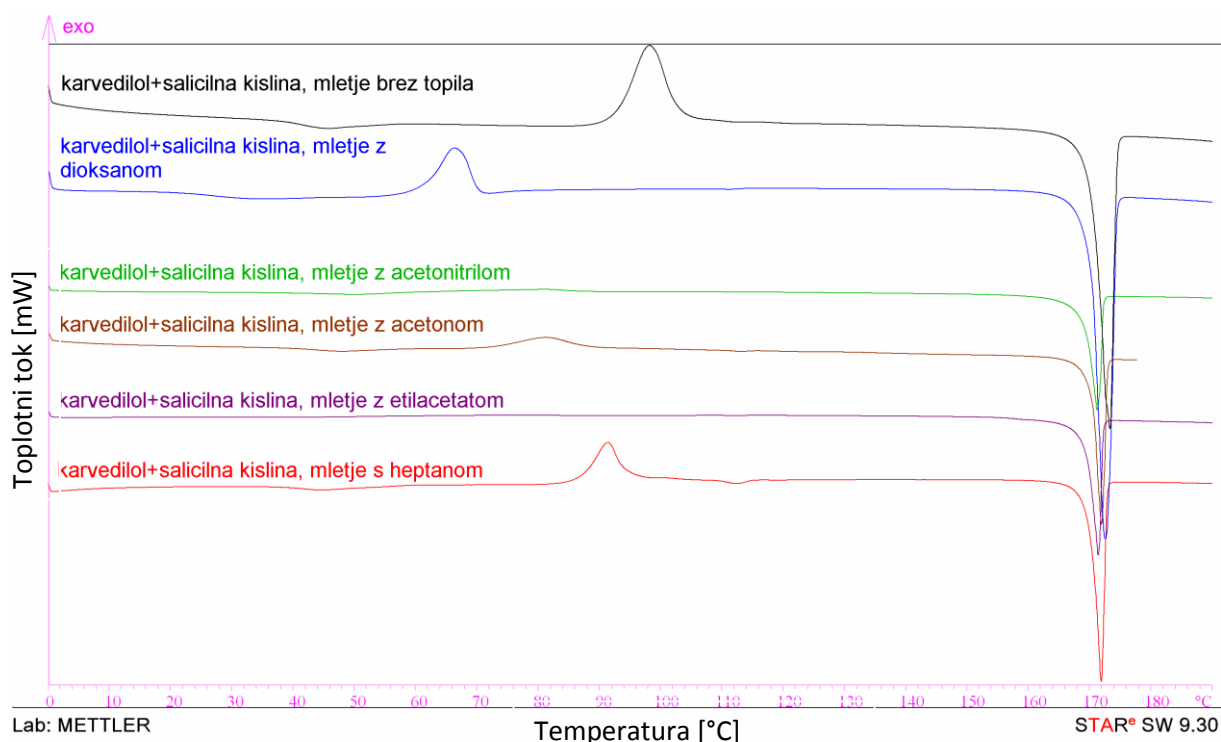
Slika 6: DSC krivulje karvedilola, salicilne kisline in fizikalne zmesi v razmerju 1:1

Slika 6 predstavlja DSC krivulje karvedilola, salicilne kisline in njune fizikalne zmesi. Na DSC krivulji karvedilola vidimo endotermni vrh pri 115 °C, ki predstavlja njegovo tališče. Endotermni vrh salicilne kisline pri 159 °C predstavlja njeno tališče. Endotermen vrh pri 170 °C najverjetneje predstavlja tališče nove kristalne oblike (kokristala ali soli), ki nastane že pri segrevanju fizikalne zmesi. Najverjetneje nova entiteta (kokristal ali sol) nastane pri 106 °C, ko v DSC krivulji zaznamo eksotermno reakcijo.



Slika 7: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in salicilne kisline (zgoraj) in segrevanje ohlajene taline (spodaj)

Poskus s fizikalno zmesjo smo ponovili in spet smo dobili dva vrhova, tališče pri 170 °C in dodatni eksotermni vrh pri 106 °C, kar je razvidno iz slike 7. Pri drugem segrevanju staljene zmesi smo zaznali le steklasti prehod pri 56 °C. Vrednost se razlikuje od temperature steklastega prehoda karvedilola pri 39 °C (Slika 5). Pojav je zanimiv zaradi možne stabilizacije amorfne oblike učinkovine ob dodatku salicilne kisline.



Slika 8: DSC krivulje mletih zmesi karvedilola ($m = 746$ mg) in salicilne kisline ($m = 254$ mg) brez dodatka topila in z dodatkom 50 μ l topila (1,4 – dioksan, acetonitril, aceton, etilacetat, heptan)

Slika 8 predstavlja DSC krivulje mletih zmesi karvedilola in salicilne kisline brez dodatka topila in z dodatkom različnih topil. Tališče vseh zmesi predstavlja endotermen vrh pri 170 °C in se razlikuje od tališča karvedilola ali salicilne kisline. Čisti produkt (brez dodatnih eksotermnih vrhov) je nastal le pri mletju z dodatkom acetonitrila in etilacetata, ki sta polarni topili. Pri mletju brez topila in z nepolarnima topiloma dioksanom in heptanom smo dobili poleg tališča še eksotermen vrh pri različni temperaturah. Spet je najverjetneje prišlo do reakcije med komponentama, s katero nastane nov kristal. Podoben pojav smo opazili tudi pri fizikalni zmesi (Sliki 6, 7), kar nakazuje možen mehanizem kokristalizacije z difuzijo in/ali preko amorfne faze. Tudi pri mletju s polarnim acetonom se je poleg tališča pojavil mali eksotermen vrh pri 79 °C. Velikosti eksotermnih reakcij so povezane z obsegom interakcije med komponentama. Rezultati kažejo, da reakcija poteče hitreje pri mletju s polarnejšimi topili z večjo dielektrično konstanto. Sicer igra topnost pri izbiri topil za mletje manjšo vlogo, a zahtevana je vsaj delna topnost zmesi v izbranem topilu. Salicilna kislina je lahko topna v acetonu, dioksanu in etilacetatu ter topna v acetonitrilu. Tako kot karvedilol v heptanu ni topna. Karvedilol je lahko topen v dioksanu in topen v acetonu, pa kljub temu v teh dveh primerih ni nastal čisti produkt. V etilacetatu in acetonitrilu je karvedilol le zmerno topen, a smo dobili s tema dvema topiloma čista produkta.

4.2 DOLOČANJE GOSTOTE S HELIJEVIM PIKNOMETROM

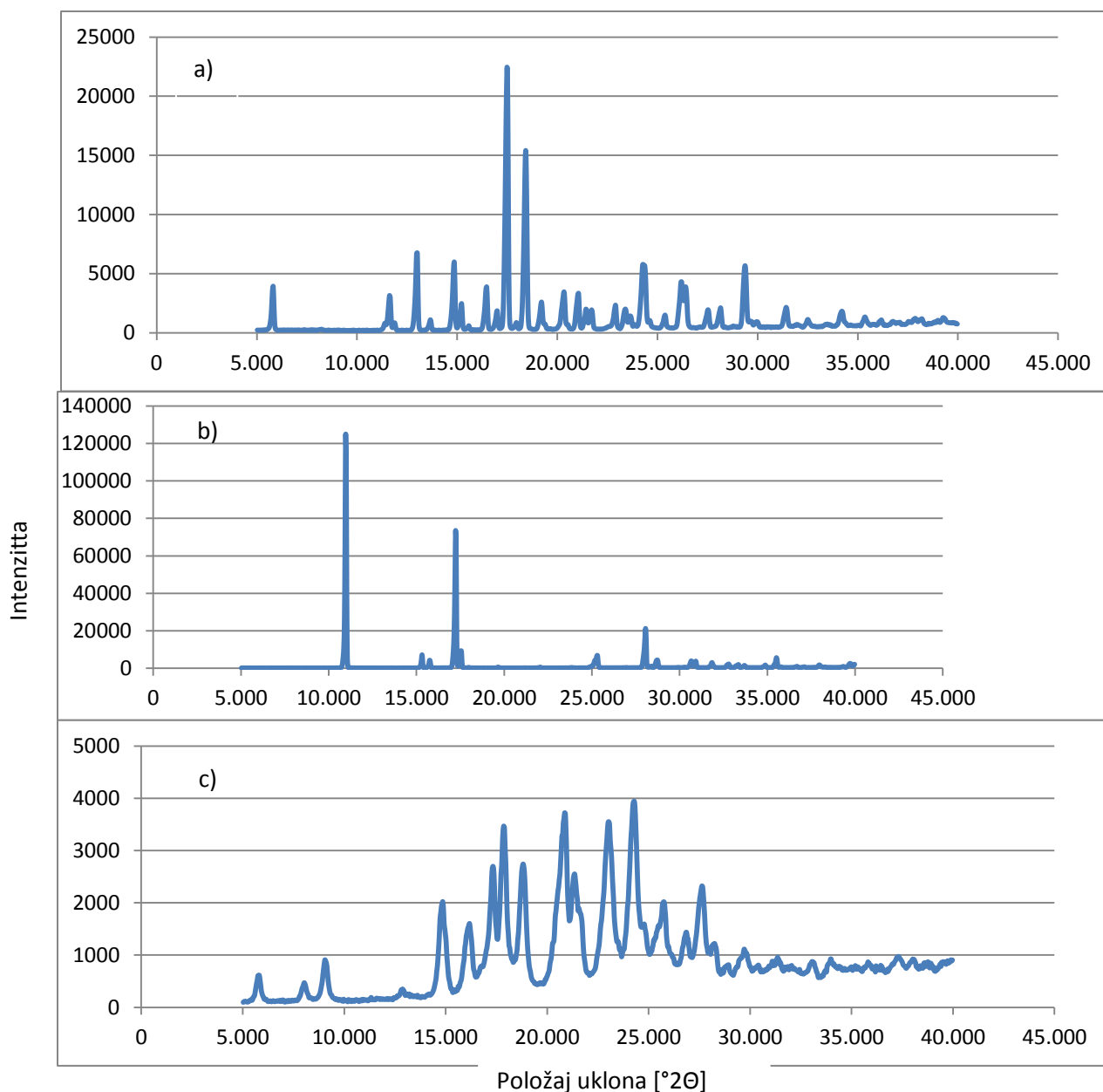
Tabela 1: Gastota karvedilola, salicilne kisline, fizikalne in mlete zmesi.

gostota	povprečna gostota
karvedilol	1,2785 g/cm ³
salicilna kislina	1,4281 g/cm ³
fizikalna zmes	1,3010 g/cm ³
kokristal/sol z acetonitrilom	1,3041 g/cm ³
teoretična gostota zmesi	1,3150 g/cm ³

S helijevim piknometrom smo izmerili gostote karvedilola, salicilne kisline in njune fizikalne zmesi (Tabela 1). Iz gostote karvedilola in salicilne kisline smo izračunali teoretično gostoto, ki bi jo morala imeti fizikalna zmes. Gastota mlete in fizikalne zmesi se za 0,011 g/cm³ oziroma 0,014 g/cm³ razlikuje od teoretične gostote zmesi. Ugotavljamo, da je gostota mlete zmesi podobna gostoti fizikalne zmesi.

4.3 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA KARVEDILOLA, SALICILNE KISLINE IN MLETE ZMESI

S primerjanjem difraktogramov karvedilola, salicilne kisline in mlete zmesi smo ugotavljali, ali komponenti tvorita novo kristalno obliko. V primeru, da med komponentami ni interakcij, je difraktogram zmesi vsota difraktogramov posameznih komponent. V primeru mletega karvedilola s salicilno kislino ugotavljamo prisotnost novih uklonskih vrhov (Slika 9). Te razlike potrjujejo nastanek nove kristalne oblike z mletjem. Pri $6^{\circ} 2 \theta$ vidimo uklon, ki je značilen za karvedilol. Iz slike je vidno, da dodatna faza v vzorcu, mletem s topilom, predstavlja novo kristalno obliko, z značilnima uklonoma pri 8θ in $9^{\circ} 2 \theta$.



Slika 9: Praškovni difraktogrami a) karvedilola, b) salicilne kisline, c) mleta zmesi karvedilol: salicilna kislina 1:1 ob dodatku topila etilacetata; y os predstavlja relativno intenziteto

4.4 POSKUS PRIPRAVE MONOKRISTALA

Monokristal smo poskusili pripraviti z metodo izhlapevanja topila iz raztopine. Kokristalizacija oziroma tvorba soli poteka lažje, če sta obe komponenti (karvedilol in salicilna kislina) podobno topni v določenem topilu. V tabeli 2 so navedene ocenjene topnosti karvedilola in salicilne kisline v različnih topilih. Razen 1,4 – dioksana, kloroforma in heksana smo uporabili polarna topila. Problem pri večini topil je bilo hitro izhlapevanje. Salicilna kislina je v večini uporabljenih topil boljše topna od karvedilola in se dobro topi v polarnih in nepolarnih topilih. Topila, kjer bi bila karvedilol in salicilna kislina podobno topna, nismo našli, zato smo

uporabili zmesi topil. Najboljše rezultate smo dobili pri kombinaciji polarnega in nepolarnega topila. V tabeli 3 so zbrani podatki o uporabljenih topilih in zmesih topil, temperaturi eksperimenta in masi učinkovine in pomožne snovi. Problem pri pripravi monokristala je bil, da so velikokrat nastali kristali v obliki drobnih iglic, ki niso bili primerni za analizo. Kombinacija, ki je rezultirala z nastankom primerne monokristala, je bila iz zmesi topil nepolarnega kloroforma in polarnega etanola v volumskem razmerju 1:1 in z dodatkom 80 μ l topila ionske tekočine 1–butil–3–metilimidazolijevega tetrafluoroborata pri sobni temperaturi.

Tabela 2: približna topnost (mol/L) karvedilola in salicilne kisline v različnih topilih

topilo	topnost karvedilola (mol/L topila)	topnost salicilne kisline (mol/L topila)
etanol	0,025 – 0,028	2,400 – 3,570
etil acetat	0,029 – 0,033	0,462 – 0,571
dimetilsulfoksid (DMSO)	2,015 – 2,453	10,514 – 11,701
aceton	0,128 – 0,145	2,447 – 2,730
1,4 – dioksan	0,432 – 0,470	3,890 – 4,189
acetonitril	približno 0,036	0,478 – 0,563
metanol	približno 0,223	približno 3,150
kloroform	približno 0,190	nismo določali
heksan	0	nismo določali
izopropanol	0,012 – 0,0133	nismo določali
tetrahidrofuran (THF)	približno 0,787	nismo določali

Tabela 3: Uporabljena topila in pogoji pri poskusu priprave monokristala (igličastih kristalov)

topila	razmerje topil (v ml)	pogoji (sobna T, hladilnik)	opombe (semena, ionska tek.)	nastanek primernega kristala
DMSO : etilacetat	1:1	sobna T, hladilnik	dodamo semena	ne
1,4 – dioksan : acetonitril	1,5:1 ; 2:1	sobna T	/	ne
aceton	2 ml	sobna T	hitro izhlapeva	ne
THF : acetonitril	1:2 ; 1:1	sobna T, hladilnik	semena	ne
kloroform : etanol	1:1 ; 2:2; 1,4:0,4 ; 3:1	sobna T, hladilnik	semena, uravnavanje izhlapevanja	ne, obetaven
THF : etilacetat	1:1	sobna T, hladilnik	semena, uravnavanje izhlapevanja	ne, obetaven
aceton : acetonitril	1:1	sobna T, hladilnik	semena	ne, obetaven
aceton : acetonitril	1:1	hladilnik	ionska tekočina (80 μ L)	ne
kloroform : etanol	1:1	sobna T	ionska tekočina (80 μ L)	nastanejo igličasti kristali

4.5 MONOKRISTALNA RENTGENSKA STRUKTURA

Z rentgensko difrakcijo na monokristalu smo ugotovili, da imamo sol karvedilolijev salicilat. Salicilatna hidroksilna skupina je neenakomerno neurejena (0,65:0,35) v dveh alternirajočih pozicijah, a so entropijo uspešno rešili. Karvedilolna skupina vsebuje kiralni center. Spojina kristalizira v prostorski skupini *Fdd2*, a je vrednost parametra Flack *X* neprepričljiva. Zaradi tega ne moremo določiti absolutne konfiguracije. Izbrani podatki o kristalu in ostale informacije o določitvi strukture so navedeni v tabeli 4.

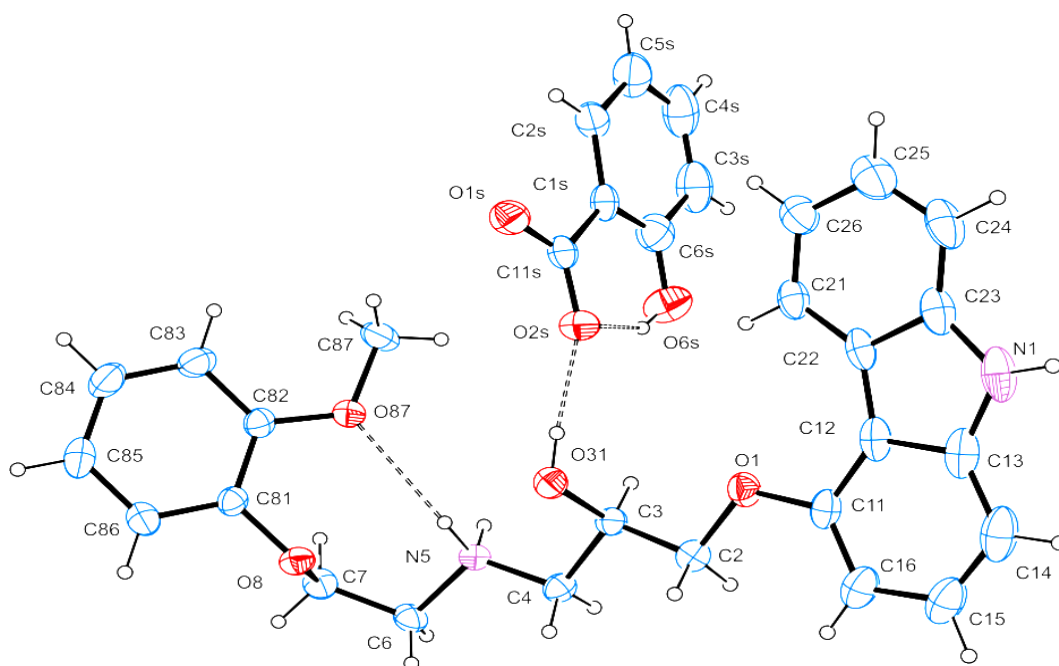
Tabela 4: Kristalografski podatki za karvedilolsalicilat.

Formula	$C_{31}H_{32}N_2O_7$
Molekulska masa (g/mol)	544.59
Kristalni sistem	Ortorombski
Prostorska skupina	<i>Fdd2</i>
<i>a</i> (Å)	43.430(2)
<i>b</i> (Å)	41.7057(17)
<i>c</i> (Å)	6.0358(3)
<i>V</i> (Å ³)	10932.5(9)
<i>Z</i>	16
<i>D</i> _{calc.} (g/cm ³)	1.324
μ (mm ⁻¹)	0.094
Merjene refleksije / Edinstvene refleksije	10984/4707
Opazovane refleksije ($I > 2\sigma(I)$)	2810
<i>R</i> _{int}	0.016
<i>R</i> ₁ (opazovane/vse refleksije)	0.051/0.101
<i>wR</i> ₂ (opazovane/vse refleksije)	0.099/0.116

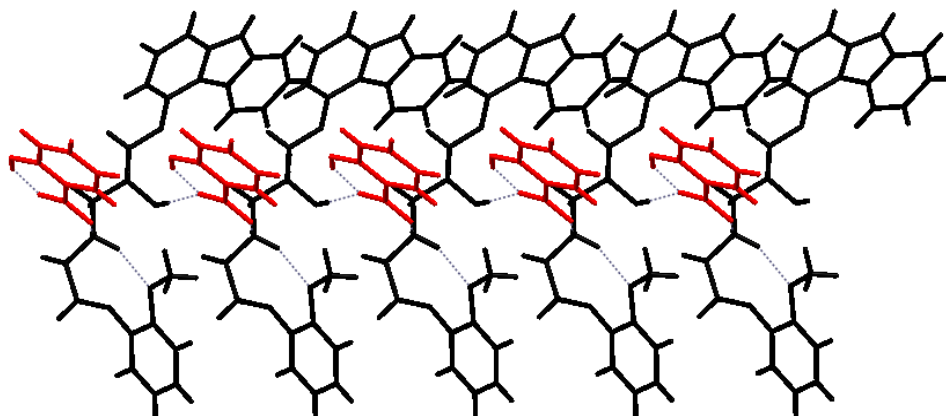
Opis kristalne strukture

Kristalni produkt je sol karvedilola in salicilne kisline. Kristalizira v ortorombski prostorski skupini *Fdd2* z asimetrično enoto sestavljeno iz kationa karvedilola in aniona salicilata, kot je prikazano v Sliki 7. Karvedilolna skupina nosi pozitivni naboj na protoniranem aaminskem dušikovem atomu (N5). Salicilatna skupina vsebuje deprotonirano karboksilno skupino, medtem ko je hidroksilna skupina ohranjena. Obe skupini imata običajno geometrijo, dolžine vezi in koti so normalni. Klasične intramolekularne vodikove vezi smo opazili v obeh tvorilcih kristala. Aminska skupina (N5) je povezana z vodikovo vezjo s kisikovim atomom metoksi

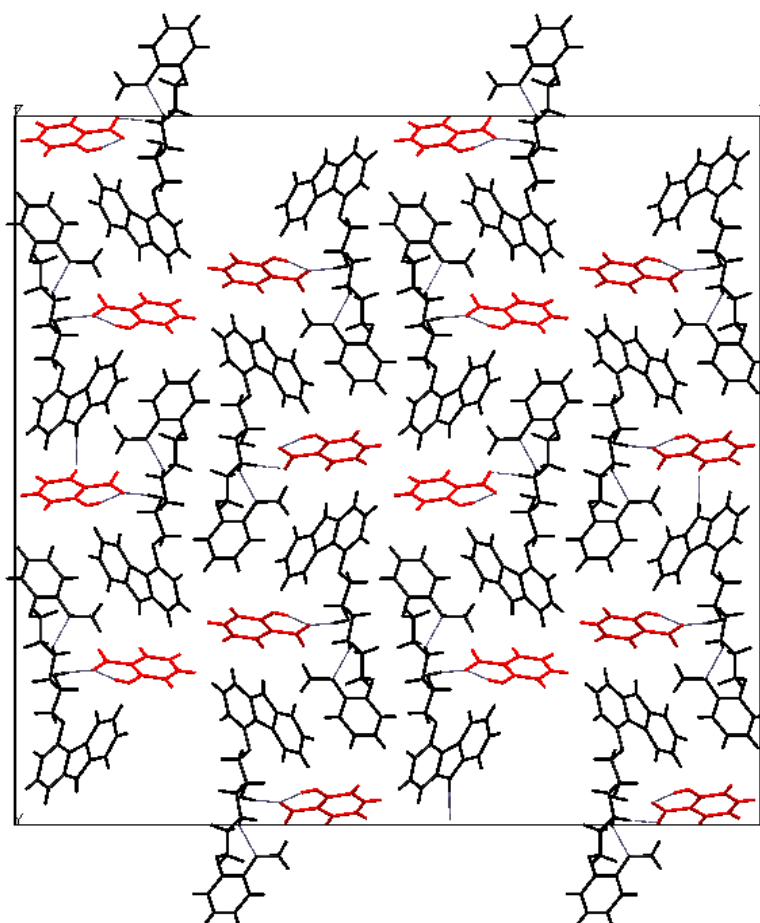
skupine (O87) v karvedilolu, in običajna intramolekularna H – vez je opazna v salicilatu med donorjem hidroksilno skupino in karboksilatnim kisikovim atomom kot akceptorjem. Obe spojini sta povezani z dodatnimi vodikovimi vezmi, ki vključujejo hidroksilne in amino skupine karvedilola kot donorje in oba karboksilatna kisikova atoma iz sosednjih salicilatnih ionov kot akceptorje. Tako so linearne verige izmenjajočih karvedilolnih in salicilatnih skupin tvorjene preko c osi (Slika 11). Za podrobnosti o vodikovih vezeh, glej Tabela 5. Pogled na kristalno pakiranje v enotni celici je predstavljen na Sliki 9.



Slika 10: ORTEP pogled asimetrične enote z označenimi atomi. Premestitveni elipsoidi so narisani s 30% verjetnostjo. Predstavljena je samo orientacija glavne komponente neurejenega salicilatnega aniona. Intramolekularne vodikove vezi so narisane kot črtkane črte.



Slika 11: Pogled na linearno verigo karvedilolnih in salicilatnih skupin, povezanih z vodikovimi vezmi. Karvedilolne in salicilatne skupine so narisane črno in rdeče. Vodikove vezi so narisane kot črtkane črte.



Slika 12: Pogled na enotno celico preko c – osi. Karvedilolne in salicilatne skupine so pobarvane črno in rdeče. Vodikove vezi so narisane kot črtkane črte.

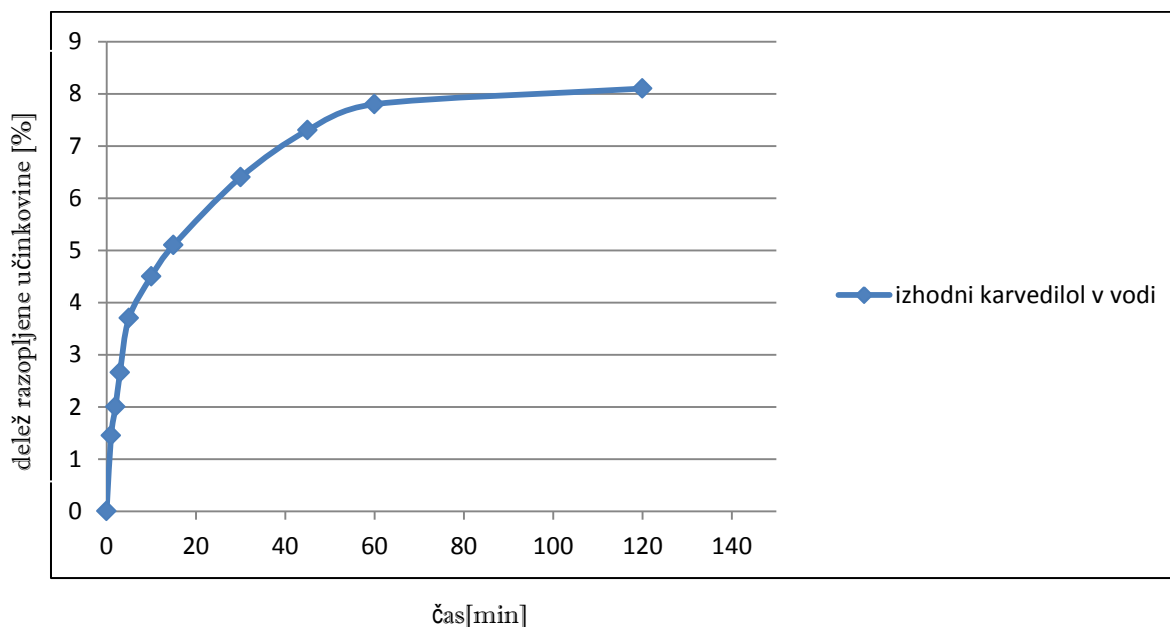
Tabela 5: Geometrija vodikovih vezi (Å, °)

D-H...A	D-H	H...A	D...A	D-H...A
N5-H5b...O87	0.99(5)	2.35(5)	3.105(4)	133(4)
O31-H31...O2s	0.88(4)	1.83(4)	2.687(4)	166(5)
N5-H5a...O1s ⁱ	0.88(3)	1.77(3)	2.648(4)	175(2)
N1-H1...O6s ⁱⁱⁱ	0.86	2.34	3.189(5)	168.7
O6s-H6s...O2s	0.82	1.85	2.589(6)	149.0
O6s'-h6s'...O1s	0.82	1.72	2.477(4)	152.2

Kode simetrije: i) x, y, z+1; ii) -x-0.75, x+0.25, z+0.25

4.6 VREDNOTENJE RAZTAPLJANJA ČISTEGA KARVEDILOLA, IZ FIZIKALNE ZMESI IN IZ MLETIH ZMESI

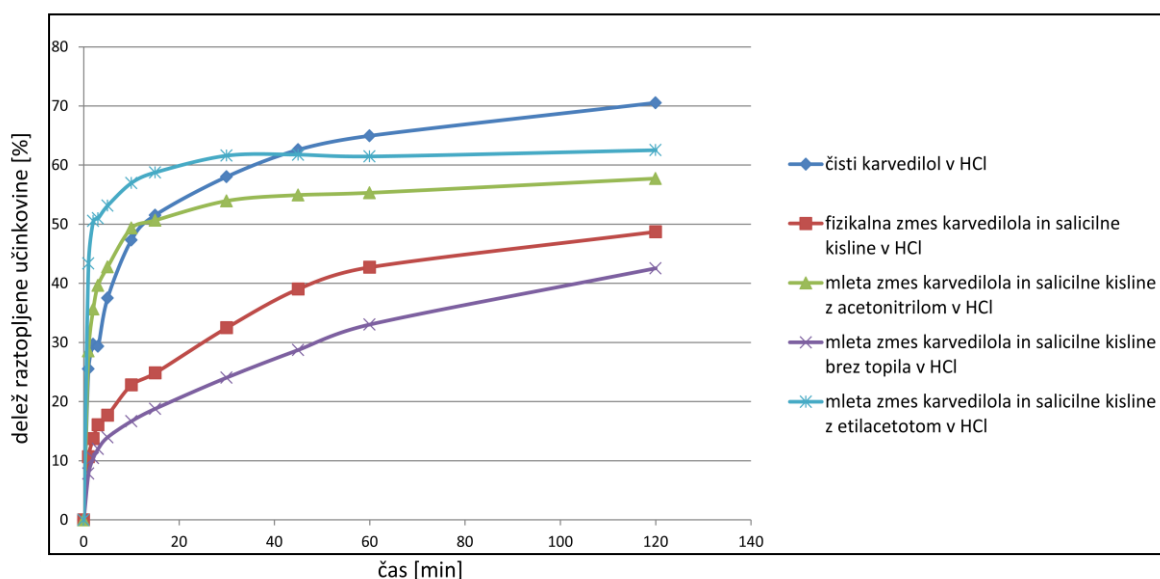
Zdravilna učinkovina se mora raztopiti, da se lahko absorbira iz gastrointestinalnega trakta. S tvorbo soli ali kokristalov lahko izboljšamo raztapljanje težko topnih ZU. Primerjali smo raztapljanje karvedilola, fizikalne zmesi in mletih zmesi v vodi in v kislem mediju s pH 1,2.



Slika 13: Profil raztapljanja karvedilola v vodi

Slika 13 prikazuje raztapljanje karvedilola v vodi. Topnost po 2 urah znaša približno 2,5 mg/L. Topnost karvedilola v alkalnih in nevtralnih medijih je še posebej nizka in znaša pod 1 mg/L pri pH 9 in okrog 23 mg/L pri pH 7. Karvedilol je najbolj topen pri pH 5, kjer je njegova

topnost 100 mg/L. Pri nižjih pH – jih se topnost ponovno zniža zaradi tvorbe soli s HCl, česar mi z merjenjem topnosti po 24 urah nismo potrdili (Tabela 6).



Slika 14: Profil raztapljanja čistega karvedilola, fizikalne zmesi karvedilola in salicilne kisline in mletih zmesi brez topila ter z dodatkom topil etilacetata ali acetonitrila v kislem mediju s pH 1,2.

Podatki o raztapljanju v kislem mediju s pH 1,2 so zbrani na Sliki 14. Največji delež raztopljene učinkovine je iz vzorca s čistim karvedilolom (71%), sledi mleta zmes s topilom etilacetatom (62%), mleta zmes s topilom acetonitrilom (58%), fizikalna zmes (50%) in nazadnje mleta zmes brez dodatka topila (43%). Po prvi minuti je največji delež raztopljene učinkovine iz vzorca mlete zmesi z etilacetatom (44%), sledi mleta zmes z acetonitrilom (30%), čisti karvedilol (27%) in ostali vzorci. Rezultati kažejo, da se raztapljanje karvedilola z izdelavo nove kristalne strukture bistveno ne spremeni. Razlike se nakazujejo le v začetni hitrosti raztapljanja vzorca, izdelanega z mletjem z uporabo etilacetata.

Zanimivo je, da se karvedilol slabša raztaplja iz mlete zmesi brez dodatka topila kot iz fizikalne zmesi. Možna razlaga tega pojava je spet tvorba aglomeratov med mletjem in slabše močenje delcev.

4.7 TOPNOST KARVEDILOLA, FIZIKALNE ZMESI IN MLETE ZMESI(SOLI ALI KOKRISTALA) V VODI IN HCl PO 24 URAH

Tabela 6: Topnost karvedilola, fizikalne zmesi in mlete zmesi (soli ali kokristala) v vodi in HCl po 24 urah

Topnost po 24 h	povprečna konc.
karvedilol v vodi	32,0 mg/L
karvedilol v HCl	183,4 mg/L
fizikalna zmes v vodi	142,4 mg/L
fizikalna zmes v HCl	162,2 mg/L
mleta zmes (sol ali kokristal) v vodi	129,7 mg/L
mleta zmes (sol ali kokristal) v HCl	179,6 mg/L

V Tabeli 6 so zbrani podatki o topnosti izbranih vzorcev v vodi in HCl po 24 urah. V literaturi najdemo podatek, da je topnost karvedilola v vodi 23 mg/L, v kislem mediju pa manjša od 100 mg/L. Naši rezultati se le deloma skladajo s tema podatkom, topnost karvedilola v vodi je 32 mg/L, v kislem mediju pri pH 1,2 pa 183,4 mg/L. S tvorbo fizikalne zmesi med karvedilolom in salicilno kislino smo izboljšali topnost karvedilola v vodi na 142,4 mg/L, topnost v HCl pa se je nekoliko zmanjšala na 162,2 mg/L. Topnost karvedilola v vodi iz mlete zmesi, ki znaša 129,7 mg/L, je malo nižja kot iz fizikalne zmesi. V HCl se karvedilol iz mlete zmesi topi podobno kot sam karvedilol. S tvorbo fizikalne in mlete zmesi v primerjavi s samim karvedilolom torej izboljšamo topnost v vodi, topnost v HCl pa se celo nekoliko zmanjša (fizikalna zmes) ali ostane podobna (mleta zmes). Predpostavljamo, da so rezultati posledica prisotnosti salicilne kisline v mediju za raztapljanje.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo najprej mleli učinkovino karvedilol v čisti obliki in v zmesi s pomožno snovjo salicilno kislino. Salicilno kislino smo izbrali zaradi njene primernosti kot farmacevtske pomožne snovi in ker se za kokristalizacijo najpogosteje uporabi sinton karboksilna kislina – dušikov heterocikel. Karvedilol ima tudi veliko potencialnih mest za tvorbo vodikovih vezi, ki veljajo za najpomembnejše interakcije v kokristalih.

Mletje se je izkazalo kot primerna metoda za tvorbo kokristalov, saj omogoča hitro in enostavno pripravo večjih količin mletih vzorcev za nadaljne vrednotenje. Z mletjem nam je uspelo pripraviti novo kristalno obliko, ki vsebuje karvedilol in salicilno kislino v stehiometrijskem razmerju 1:1, kar smo dokazali s termično analizo. Tališče te oblike je višje od tališča posameznih komponent. Pri mletju brez topila ne pride do interakcije med komponentama. Čisti produkt smo dobili pri mletju z dodatkom topil etilacetata in acetonitrila. Rentgenska praškovna difrakcija je pokazala, da pride med komponentama do interakcij, saj se v difraktogramu pojavijo uklonski maksimumi, ki ne pripadajo nobeni od čistih komponent. Iz zmesi nepolarnega topila kloroforma in polarnega etanola v razmerju 1:1 z dodatkom 80 μL ionske tekočine 1 – butil – 3 – metilimidazolijevega tetrafluoroborata smo dobili monokristal, ki predstavlja sol. Sol kristalizira v ortorombski prostorski skupini $Fdd2$ z asimetrično enoto sestavljeno iz kationa karvedilola in aniona salicilata.

Primerjali smo raztapljanje čistega karvedilola, fizikalne in mletih zmesi v kislem mediju. Ugotovili smo, da nova kristalna oblika karvedilola in salicilne kisline bistveno ne spremeni raztapljanja karvedilola glede na raztapljanje čiste kristalne oblike.

6 LITERATURA:

1. Datta S, Grant DJ. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. *Nat Rev Drug Disc.* 2004; 3 (1); 42 – 57.
2. Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F. Kokristali zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn.* 2010; 61 (1); 30 - 36.
3. Qiao N, Li M, Schlindwein W, Malek N, Davies A, Trappitt G. Pharmaceutical cocrystals: An overview. *Int J Pharm.* 2011; 419 (1 – 2); 1 – 11.
4. Stahly P. A survey of cocrystals reported prior to 2000. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (10); 4212 – 4229.
5. Desiraju GR. Crystal and co-crystal. *CrystEngComm.* 2003; 5; 466-467.
6. Vishweshwar P, McMahon J, Bis J, Zaworotko M. Pharmaceutical co-crystals. *JPharm Sci.* 2006; 95 (3); 499-516.
7. Zaworotko M. Polymorphs, Salts and Cocrystals: What's in a name? *Cryst Growth Des.* 2012; 12 (5); 2147 – 2152.
8. Sekhon BS. Pharmaceutical co-crystals – a review. *Ars Pharm.* 2009; 50 (2); 99-117.
9. Aakeroy CB, Fasulo ME, Desper J. Cocrystal or Salt: Does It Really Matter? *Mol Pharm.* 2007; 4 (3); 317 – 322.
10. Trask AV, Motherwell WD, Jones W. Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization. *Int J Pharm.* 2006; 320 (1 – 2); 114 – 123.
11. Friščić T, Jones W. Benefits of cocrystallisation in pharmaceutical material science: an update. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62 (11); 1547 – 1559.
12. Scott L, Childs G, Stahly P, Park A. The salt-cocrystal continuum: the influence of crystal structure on ionization state. *Mol Pharm.* 2007; 4 (3); 323 – 338.
13. Nanjwade V, Maste M, Shamrez A, Basavaraj K. New trends in the cocrystallization of active pharmaceutical ingredients. *J Pharm Science.* 2011; 1 (8); 1 – 5.
14. Brittain H. Cocrystal systems of pharmaceutical interest. *Cryst Growth Des.* 2012; 12 (11); 5823 – 5832.
15. Stahly GP. Diversity in Single and Multiple Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. *Cryst Growth Des.* 2007; 7 (6); 1007 – 1026.
16. Stahl PH, Wermuth CG. *Handbook of pharmaceutical Salts.* VHCA and Wiley-VCH: Zuerich and Weinheim, 2002.
17. Jagadeesh Babu N, Nangia A. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst Growth Des.* 2011; 11 (7); 2662 – 2679.
18. Blagden N, Berry D, Parkin A, Javed H, Ibrahim A, Seaton C. Current directions in cocrystal growth. *New J Chem.* 2008; 32; 1659 – 1672.

19. Weyna D, Shattock T, Vishweshwar P, Zaworotko M. Synthesis and Structural Characterization of Cocrystals and Pharmaceutical Cocrystals: Mechanochemistry vs Slow Evaporation from Solution. 2009; 9 (2); 1106 – 1123.
20. Friščić T, Reid D, Day G, Duer M. Effect of fluorination on molecular conformation in the solid state. Tuning the conformation of cocrystal formers. *Cryst Growth Des.* 2011; 11; 972 – 981.
21. Aakeroy C, Chopade P, Desper J. Avoiding synthon crossover in crystal engineering with halogen bonds and hydrogen bonds. *Cryst Growth Des.* 2011; 11; 5333 – 5336.
22. Karamertzanis P, Kazantsev A, Issa N, Price S. Can the Formation of Pharmaceutical Cocrystals Be Computationally Predicted? 2. Crystal Structure Prediction. *J Chem Theory Comput.* 2009; 5 (5); 1432 – 1448.
23. Morissette S, Almarsson , Peterson M. High throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56 (3); 275 – 300.
24. Etter MC, Encoding and decoding hydrogen – bond patterns of organic compounds. *Acc.Chem. Res.* 1990; 23; 120 – 126.
25. Mohammad MA, Alhawaleh A, Velaga SP. Hansen solubility parameter as a tool to predict cocrystal formation. *Int J Pharm.* 2011;407 (1 – 2); 63 – 71.
26. Rager T, Hilfiker R. Cocrystal formation from Solvent Mixtures. *Cryst Growth Des.* 2010; 10 (7); 3237 – 3241.
27. Ober CA, Montgomery SE, Gupta RB. Formation of itraconazole/L-malic acid cocrystals by gas antisolvent cocrystallization. *Powder Tech.* 2013; 236; 122 – 131.
28. Schultheiss N, Newmann A. Pharmaceutical Cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (6); 1950 – 1967.
29. Friščić T, Jones W. Recent advances in understanding the mechanism of cocrystal formation via grinding. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (3); 1621 – 1637.
30. Trask AV, Motherwell W, Jones W. Solvent drop – grinding: green polymorph control of cocrystallization. *Chem Commun.* 2004; 7; 890 – 891.
31. Shan N, Zaworotko M. The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Disc Today.* 2008; 13 (9 – 10); 440 – 446.
32. Yamamoto K, Tsutsumi S, Ikeda Y. Establishment of cocrystal cocktail grinding method for rational screening of pharmaceutical cocrystals. *IntJ Pharm.* 2012; 437 (1 – 2); 162 – 171.
33. Dhumal R, Kelly A, York P, Coates P, Paradkar A. Cocrystalization and Simultaneous Agglomeration Using Hot Melt Extrusion. *Pharm Res.* 2010; 27; 2725 – 2733.
34. Brittain H. Cocrystal systems of pharmaceutical interest 2010. *CrystGrowth Des.* 2012; 12 (2): 1046 – 1054.

35. Alhalaweh A, Velaga S. Formation of cocrystals from stoichiometric solutions of incongruently saturating systems by spray drying. *Cryst Growth Des.* 2010; 10 (8); 3302 – 3305.
36. Aher S, Dhumal R, Mahadik K, Paradkar A, York P. Ultrasound assisted cocrystallization from solution (USSC) containing a non-congruently soluble cocrystal component pair: caffeine/maleic acid. *Eur J Pharm Sci.* 2010; 41 (5); 597 – 602.
37. Padrela L, Rodrigues M. Formation of indomethacin – saccharin cocrystals using supercritical fluid technology. *Eur J Pharm Sci*; 38 (1); 2009; 9 – 17.
38. Patel A, Venkateswara RA. Crystal growth in gel media. *Bull Mat. Sci.* 1982; 4(5); 527 - 548
39. <http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/41/4/chapter%201.pdf> (datum dostopa: 30.11.2012)
40. http://en.wikipedia.org/wiki/Crystal_growth (datum dostopa 13.10.2012)
41. Izmailov A, Myerson A. Momentum and mass transfer in supersaturated solutions and crystal growth from solution. *J Cryst Growth.* 1997; 174 (1); 362 – 368.
Growth. 2012; 360; 146 – 154.
42. Sangwai K. Recent development in understanding of the metastable zone width of different solute – solvent systems. *J Cryst Growth.* 2011; 318 (1); 103 – 109.
43. http://iepoi.uni-mb.si/hribersek/Stud_gradivo/Procesna%20tehnika%201/procesna%20I%20-%20kristalizacija.pdf (datum dostopa: 4.12.2013)
44. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/Biofarmacija_s_farmakokinetiko_IF/_Vaje/Topnost_hitrost_raztapljanja.pdf (datum dostopa 4.12.2013)
45. Savjani K, Gajjar A, Savjani J. Drug solubility: Importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* 2012; ID 195727.
46. Vemula VR, Lingala S. Solubility enhancement techniques. *Int J Pharm Sci.* 2010; 41-51.
47. Good D, Rodriguez – Hornedo N. Solubility Advantage of Pharmaceutical Cocrystals. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (5); 2252 – 2264.
48. Schultheiss N, Newmann A. Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (6); 1950 – 1067.
49. Almarsson O. Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines? *Chem. Commun.* 2004; 17; 1889 – 1896.
50. Jayasankar A, Reddy S, Bethune J, Rodrigues – Hornedo N. Role of Cocrystal and Solution Chemistry on the Formation and Stability of Cocrystals with Different Stoichiometry. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (2); 889 – 897.

51. Padrela L, de Azevedo EG, Velaga SP. Powder X-ray diffraction method for the quantification of cocrystals in the crystallization mixture. *Drug Dev Ind Pharm.* 2012; 38 (8); 923 – 929.
52. Structure determination from X – ray powder diffraction
53. Lim G, Fujii K, Harris DM, Apperley D. Structure Determination from Powder X-ray Diffraction Data of a New Polymorph of a High-Density Organic Hydrate Material, with an Assessment of Hydrogen-Bond Disorder by Rietveld Refinement. *Cryst Growth Des.* 2011; 11 (12); 5192 – 5199.
54. Patel J, Carlton R, Needham T, Chichester C, Vogt F. Preparation, structural analysis and properties of tenoxicam cocrystals. *Int J Pharm.* 2012; 436 (1 – 2); 685 – 706.
55. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC): Coryol, Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net/> (datum dostopa: 20.3.2013)
56. www.google.com/patents/US7268156 (datum dostopa: 20.5. 2013)
57. <http://www.sepor.com/products-page/crushing-and-grinding-equipment/pulverisette-0/> (datum dostopa: 5.12.2013)
58. <http://www.biopolymersolutions.co.uk/Facilities/Calorimeters/> (datum dostopa: 5.12.2013)
59. Agilent, 2011. CrysAlis PRO. Agilent Technologies. Yarnton, England.
60. Altomare A, Burla MC, Camalli M, Cascarano GL, Giacovazzo C, Guagliardi A, Moliterni AGG, Polidori G, Spagna RJ. *Appl. Cryst.* 1999; 32; 115 - 119.
61. Čurič M. Poskus izdelave kokristala karvedilola z aminokislinami, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011.
62. Bethune S, Huang H, Jayasankar A, Rodriguez – Hornedo N. Understanding and predicting the effect of cocrystal components and pH on solubility. *Cryst Growth Des.* 2009; 9 (9); 3976 – 3988.
63. Jayasankar A, Somwangthanaroj A, Shao Z, Rodrigues – Hornedo N. Cocrystal formation during cogrinding and storage is mediated by amorphous phase. *Pharm Research.* 2006; 23 (10); 2381 – 2388.

