

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA FORŠTNARIČ

**UPORABA MIKROKALORIMETRIJE IN DIFERENČNE
DINAMIČNE KALORIMETRIJE ZA PREVERJANJE
STABILNOSTI AMORFNEGA NIFEDIPINA**

**STABILITY EVALUATION OF AMORPHOUS NIFEDIPINE
BY MICROCALORIMETRY AND DIFFERENTIAL
SCANNING CALORIMETRY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko pod mentorstvomizr. prof. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom dr. Miha Vivoda, mag. farm.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorjuizr. prof. dr. Robertu Roškarju in somentorstvu dr. Mihi Vivoda za strokovno pomoč, nasvete, usmerjanje, dobro voljo ter prijetno vzdušje pri izvedbi diplomske naloge.

Vsem, ki ste mi tekom študija stali ob strani in verjeli v moj uspeh, iskreno hvala.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvomizr. prof. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom dr. Miha Vivoda, mag. farm.

Eva Forštnarič

Ljubljana, junij 2015

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

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

VSEBINA

POVZETEK.....	IV
SEZNAM OKRAJŠAV.....	V
1 UVOD	1
1.1 AMORFNOST	1
1.2 PRIMERJAVA AMORFNE IN KRISTALNE OBLIKE SNOVI	2
1.3 TESTIRANJE STABILNOSTI AMORFNIH SNOVI.....	3
1.3.1 Dolgoročni preizkusi stabilnosti.....	4
1.3.2 Pospešeni preizkusi stabilnosti.....	4
1.3.3 Stresni preizkusi stabilnosti.....	5
1.4 PRIDOBIVANJE AMORFNIH SNOVI	5
1.4.1 Hitri fazni prehodi iz tekočega v trdno stanje	5
1.4.2 Vpliv zunanje mehanske sile.....	6
1.5 METODE ZA UGOTAVLJANJE AMORFNOSTI.....	7
1.5.1 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)	7
1.5.2 Inverzna plinska kromatografija (IGC)	8
1.5.3 Infrardeča spektroskopija (IR)	8
1.5.4 Dinamična sorpcija pare (DVS)	9
1.5.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	9
1.5.6 Izotermna mikrokolorimetrija (I _μ C).....	12
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 MATERIALI.....	16
3.1.1 Učinkovine, pomožne snovi, topila.....	16
3.1.2 Naprave in pribor	18
3.2 METODE	19
3.2.1 Mikrokolorimetrične meritve	19

3.2.2 DSC meritve	21
3.2.3 Uporaba mikroskopa	21
3.2.4 XRPD meritve	21
3.3 OPTIMIZACIJA MIKROKALORIMETRIČNE METODE	22
3.3.1 Vpliv temperature na kristalizacijo amorfnega nifedipina.....	22
3.3.2 Vpliv vlažnosti na kristalizacijo amorfnega nifedipina.....	22
3.3.3 Vpliv mase amorfa na kvantifikacijo amorfnega nifedipina.....	22
3.3.4 Vpliv homogenosti vzorca	22
3.3.5 Vpliv binarnih zmesi na kvantifikacijo amorfnega nifedipina.....	23
3.4 PRIDOBIVANJE AMORFA.....	23
3.4.1 Taljenje in zamrzovanje	23
3.4.2 Mletje	24
3.4.3. Liofilizacija	24
3.5. TESTIRANJE STABILNOSTI AMORFA	24
3.5.1 Vpliv vlage na stabilnost.....	25
3.5.2 Vpliv temperature na stabilnost.....	26
3.5.3 Vpliv načina pridobivanja amorfa na stabilnost.....	26
3.6 OBDELAVA PODATKOV.....	26
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	27
4.1 OPTIMIZACIJA MIKROKALORIMETRIČNE METODE	27
4.1.1 Vpliv temperature na kristalizacijo amorfnega nifedipina.....	27
4.1.2 Vpliv vlažnosti na kristalizacijo amorfnega nifedipina.....	29
4.1.3 Vpliv mase amorfa na kvantifikacijo amorfnega nifedipina.....	30
4.1.4 Vpliv homogenosti vzorca	32
4.1.5 Vpliv binarnih zmesi na kvantifikacijo amorfnega nifedipina.....	33
4.2 PRIDOBIVANJE AMORFA.....	35
4.2.1 Taljenje in zamrzovanje	36
4.2.2 Mletje	37
4.2.3 Liofilizacija	38
4.3 TESTIRANJE STABILNOSTI AMORFA	39

4.3.1 Vpliv vlage na stabilnost.....	39
4.3.2 Vpliv temperature na stabilnost.....	40
4.3.3 Vpliv načina pridobivanja amorfa na stabilnost.....	42
5 SKLEP	43
6 LITERATURA	44

POVZETEK

Zagotavljanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravil načrtujemo in izvajamo že od vhodnih surovin pa vse do končnih produktov. Eden od pomembnih dejavnikov, ki določajo te tri osnovne parametre vsakega zdravila, je vsekakor stabilnost. Stabilnost je zlasti problematična pri amorfnih snoveh, kjer zaradi večje notranje energije prevladuje težnja do pretvorbe v urejeno kristalno strukturo, ki ima drugačne lastnosti (na primer biorazpoložljivost), kar pa posledično lahko vpliva na učinkovitost zdravila.

Namen diplomske naloge je vpeljava mikrokalorimetrije ob sočasni uporabi dinamične kalorimetrija za preverjanje stabilnosti amorfnih učinkovin na primeru nifedipina. S spreminjanjem temperature in relativne vlažnosti v mikrokalorimetričnih celicah smo optimalizirali pogoje mikrokalorimetričnih meritev. S pomočjo binarnih zmesi amorfne in kristalne oblike ter različnih mas amorfnega nifedipina smo potrdili uporabnost mikrokalorimetrije za predviden namen.

Sočasno smo poskušali pridobiti amorfen nifedipin z različnimi pristopi, ki smo ga nato ovrednotili z ustreznimi tehnikami. Amorfnu obliko učinkovine smo pridobivali s taljenjem in zamrzovanjem, mletjem ter liofilizacijo. Z metodo taljenja in zamrzovanja smo pridobili 100 %, z mletjem pa le 38 % amorfnega nifedipina, medtem ko z liofilizacijo nismo uspeli pridobiti amorfnih oblik nifedipina.

Pri vrednotenju stabilnosti amorfa smo, kljub dokazani primernosti mikrokalorimetrije, primarno uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo zaradi krajših časov analiz. Podatki, ki smo jih pridobili z meritvami, potrjujejo predvideno nestabilnost amorfnega nifedipina, saj višja temperatura in relativna vlažnost zelo pospešita proces kristalizacije. Ta sprememba je neizogibna, je pa čas, v katerem pride do te neželene nestabilnosti, odvisen od razmer, pri katerih amorfnu obliko shranjujemo. Prav tako smo opazili razlike v stabilnosti pri amorfnih oblikah nifedipina, pridobljenih z različnimi metodami. Amorf, pridobljen s taljenjem in zamrzovanjem, je bolj stabilen kot amorf, ki smo ga pridobili z mletjem.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da smo s tehniko taljenja in zamrzovanja pridobili čisti amorf nifedipina. Z mikrokalorimetrijo smo uspeli ugotoviti vsaj 1 %, amorfne oblike v binarni zmesi, delež amorfa pa lahko še dodatno znižamo v primeru analize večje mase vzorca. Najpomembnejša ugotovitev raziskovanja stabilnosti amorfnega nifedipina pa je, da ta oblika ni primerna za uporabo v terapevtske namene.

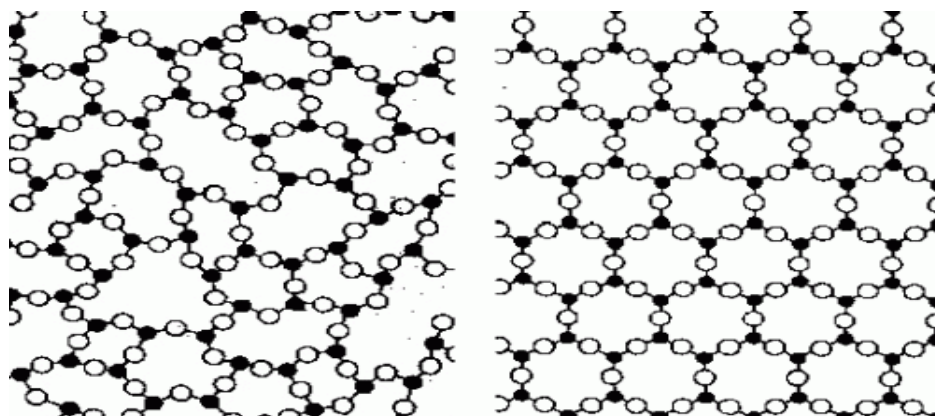
SEZNAM OKRAJŠAV

ACS	Ameriško kemijsko združenje (ang. American Chemical Society)
BP	Britanska farmakopeja (ang. British Pharmacopoeia)
dq/dt	toplotni tok (ang. heat flow)
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. differential scanning calorimetry)
DVS	dinamična sorpcija pare (ang. dynamic vapour sorption)
HDSC	visoko zmogljivostna diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. high speed or high performance differential scanning calorimetry)
I μ C	izotermna mikrokalorimetrija (ang. isothermal calorimetry)
ICH	Mednarodna konferenca za harmonizacijo (ang. <i>International Conference of Harmonisation</i>)
IGC	inverzna plinska kromatografija (ang. inverse gas chromatography)
IR	infrardeča spektroskopija (ang. infrared spectroscopy)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (ang. <i>International Organization for Standardization</i>)
JP	Japonska farmakopeja (ang. Japanese Pharmacopoeia)
μ C	mikrokalorimetrija (ang. microcalorimetry)
MKT	srednja kinetična temperatura (ang. mean kinetic temperature)
mtDSC	diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature (ang. modulated temperature differential scanning calorimetry)
p. a.	za analizo (ang. pro analysis)
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja (ang. <u>European Pharmacopoeia</u>)
Q	toplota (ang. heat)
QC	taljenje in zamrzovanje (ang. quench cooling)
RH	relativna vlažnosti (ang. relative humidity)
RT	sobna temperatura (ang. room temperature)
T	temperatura (ang. temperature)
T _g	temperatura steklastega prehoda (ang. glass transition temperature)
XRPD	rentgenska praškovna difrakcija (ang. X-ray powder diffraction)
ΔH	sprememba entalpije (ang. enthalpy)

1 UVOD

1.1 AMORFNOST

Amorfne snovi oziroma steklaste trdne snovi so neurejeni sistemi glede na strukturo. Za razliko od kristalne snovi, kjer so molekule razporejene enakomerno, je razporeditev molekul v amorfni snovi neenakomerna in neurejena (Slika 1). Vendar pri amorfni obliki ne gre za naključno razporeditev molekul tako kot pri plinastem agregatnem stanju, saj je določena stopnja urejenosti vseeno prisotna. Zaradi definiranih lastnosti je kristalna struktura prevladujoča v farmacevtskih pripravkih, ni pa nujno, da je vedno najboljša izbira. Ker je vodotopnost kristalnih snovi manjša, je lahko biološka uporabnost po peroralni aplikaciji zmanjšana ali nepredvidljiva. Kljub temu v farmacevtski industriji vedno več uporabljamo amorfne snovi, saj njihova večja hitrost raztapljanja in s tem povečana biorazpoložljivost pripomoreta k uporabi nižjih odmerkov. To pomeni, da je človeško telo manj obremenjeno in je tudi manjša možnost za pojav neželenih učinkov samega zdravila. Večja hitrost raztapljanja snovi je zaželena tudi pri farmacevtskih oblikah s prirejenim sproščanjem. Amorfne snovi imajo tudi večjo stisljivost, kar je pomembno pri tabletiranju končnih farmacevtskih oblik. Nastanek amorfa je v teh primerih zaželen in nadzorovan ter ustrezno kvantificiran. Med procesom izdelave končnih farmacevtskih oblik (mešanje, mletje, kompaktiranje, tabletiranje ...) pa se lahko zaradi mehanske deformacije na površini snovi pojavi nezaželena amorfnost. Takšen amorf lahko povzroči težave med izdelavo končne farmacevtske oblike in tudi neželene spremembe v delovanju (1, 2, 3).

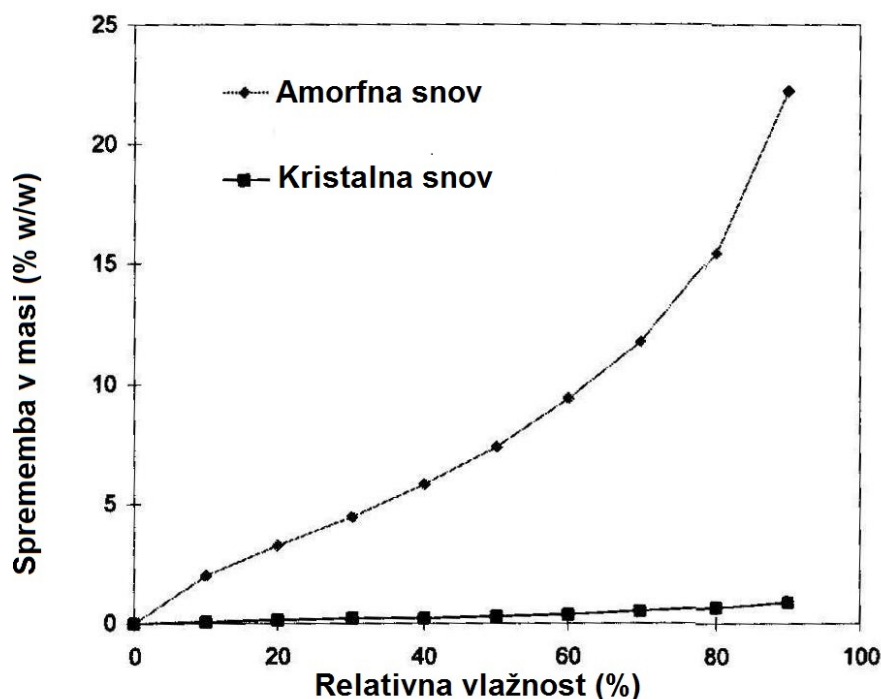


Slika 1: Primerjava strukture amorfne (levo) in kristalne snovi (desno), prirejeno po (4).

1.2 PRIMERJAVA AMORFNE IN KRISTALNE OBLIKE SNOVI

Amorfne snovi se od kristalnih razlikujejo v mnogih lastnostih. Pogosto se razlike kažejo v gostoti, viskoznosti, termodinamiki, sorpcijskih lastnostih, difuzijskih lastnostih, difrakciji rentgenskih žarkov ... Kristalne snovi so zelo predvidljive. Razdalja med atomi je majhna, zato je tudi njihova notranja energija minimalna. Pri amorfni obliki so razdalje med molekulami večje, kar pomeni, da ima amorfna snov večjo specifično površino. Posledično imajo amorfne snovi tudi večjo notranjo energijo. Iz tega vidika je amorfna snov termodinamsko nestabilna in je podvržena spontani pretvorbi v kristalno obliko. Zaradi daljših vezi med molekulami ima amorfna oblika tudi večji volumen ter manjšo gostoto kot kristalna oblika. Večji prosti volumen pomeni tudi, da imajo amorfne snovi boljše difuzijske lastnosti. Amorfna oblika snovi ima tudi večjo afiniteto do vezave vode kot kristalna (Slika 2).

Vse te razlike med amorfno in kristalno obliko so temelj različnih analiznih tehnik s katerimi identificiramo in/ali ugotavljamo amorfno snov v vzorcu (1, 3).



Slika 2: Sorpcijski profil vlage pri amorfni in kristalni snovi, prirejeno po (5).

Fizikalna (ne)stabilnost je eden ključnih problemov amorfnih oblik učinkovin. Različne fizikalne oblike učinkovin (polimorfne, amorfne in solvatne oblike) so pogosto povezane z različnimi fizikalnimi lastnostmi snovi (topnost, hitrost raztapljanja, temperatura tališča ...), ki neposredno določajo tudi številne pomembne farmakokinetične parametre učinkovin. Te oblike snovi so pogosto v termodinamsko metastabilnem stanju, kar pomeni, da so podvržene pretvorbi v stabilnejšo kristalno obliko. Ker se s pretvorbo termodinamske oblike lahko spremenijo tudi farmakološke lastnosti farmacevtske oblike, je zelo pomembno, da pri testiranju stabilnosti opredelimo morebitne fizikalne spremembe. To je pomembno tudi pri zunanjem videzu farmacevtskih oblik, saj se fizikalna nestabilnost lahko kaže kot sprememba barve, motnost, obarjanje, sprememba vonja, spremenjena trdnost, rast kristalov, adsorpcija vlage. Fizikalni procesi, prav tako kot kemijske reakcije, lahko vodijo do spremenjene učinkovitosti in zmanjšane biološke uporabnosti (3, 6).

1.3 TESTIRANJE STABILNOSTI AMORFNIH SNOVI

Kljub pozitivnim lastnostim amorfnih snovi njihovo uporabnost omejuje fizikalna nestabilnost. Problem pri amorfnih učinkovinah je v njihovi višji notranji energiji, zato lahko pride hitreje do sprememb lastnosti, ki so ključne za učinkovitost, varnost in kakovost končnega izdelka. Zaradi tega je testiranje stabilnosti pri amorfnih učinkovinah zelo pomembno (3).

Stabilnost je definirana kot časovno obdobje, v katerem učinkovina ali zdravilo ohranja svoje kemične, fizikalne in mikrobiološke lastnosti znotraj specifikacijskih mej ter vsebnost razpadnih produktov ne predstavlja tveganja za uporabnika zdravila (7).

Nestabilnost pri amorfnih snoveh je posledica že prej omenjene velike notranje energije, ki povzroči postopno pretvorbo amorfnih snovi v termično stabilnejšo kristalno obliko. Prav zato ima testiranje stabilnosti amorfnih snovi zelo velik pomen, saj s tem opredelimo vpliv pretvorbe amorfnih oblik v kristalne med procesom proizvodnje zdravil, shranjevanja zdravil ter med samo uporabo amorfnih snovi kot učinkovin. Pri tem je pomembno, da upoštevamo smernice za testiranje stabilnosti. Smernice so del »International Conference of Harmonisation« (ICH), ki zajema področja kakovosti, varnosti, učinkovitosti in tehnične dokumentacije. Testiranje stabilnosti je natančneje opisano v sklopu pod oznako Q (Quality), in sicer v smernici Q1A(R2). Teste izvajamo na učinkovinah in končnih

farmacevtskih oblikah. Stabilnostne preizkuse v grobem delimo na dolgoročne, pospešene in stresne (8).

1.3.1 Dolgoročni preizkusi stabilnosti

Dolgoročni testi se izvajajo na končnih farmacevtskih oblikah in v ovojnini, ki je namenjena shranjevanju ter trgovanju. Z dolgoročnimi testi vrednotimo fizikalne, kemične, biološke ter mikrobiološke lastnosti farmacevtskih izdelkov pri predvidenih razmerah shranjevanja v časovnem obdobju, ki je definirano kot rok uporabnosti. Dolgoročne teste izvajamo do konca roka uporabnosti, ko so parametri kakovosti še v okviru specifikacijskih mej, oziroma največ pet let. Testiranje se tako izvaja prvo leto na tri mesece, drugo leto na šest mesecev in nato enkrat na leto. Razmere shranjevanja ter pogoji testiranja so odvisno od klimatske cone. Poznamo štiri klimatske cone: zmerna, mediteranska, vroča in suha ter vroča in vlažna cona. Posamezna cona je opredeljena s srednjo kinetično temperaturo (MKT) in relativno vlažnostjo (RH). MKT je definirana kot efektivna temperatura, ki ponazarja različne temperature skozi različna časovna obdobja. V Sloveniji, ki sodi v II. oziroma mediteransko cono so razmere shranjevanja in testiranja: $T = 25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{RH} = 60 \pm 5 \%$ oziroma vmesne razmere: $T = 30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{RH} = 65 \pm 5 \%$ (3, 9, 10).

1.3.2 Pospešeni preizkusi stabilnosti

Pospešeni preizkusi stabilnosti temeljijo na shranjevanju in testiranju učinkovin ali končne farmacevtske oblike pri temperaturnih razmerah, ki so višji kot tisti, predvideni za shranjevanje končnega zdravila. Z njimi skrajšamo čas in posledično stroške testiranja. S temi testi pospešimo fizikalne in kemijske procese razgradnje učinkovine ter interakcije s pomožnimi snovmi. Z uporabo Arrheniusove enačbe, ki podaja odnos med temperaturo in hitrostjo kemijske reakcije, lahko rezultate pospešenih preizkusov stabilnosti ekstrapoliramo na normalne razmere shranjevanja. Pri tem predpostavimo, da so procesi, ki potekajo pri povišani temperaturi, enaki tistim, ki potekajo pri nižjih temperaturah. ICH smernica Q1A(R2) predlaga, da se pospešeni testi izvajajo 6 mesecev pri temperaturi $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ in relativni vlažnosti $75 \pm 5 \%$. Pospešeni preizkusi stabilnosti so neuporabni za napovedovanje stabilnosti pri sobni temperaturi v primerih, ko gre za mikrobnost, prisotnost katalizatorjev, spremembo agregatnega stanja, fizikalni stres,

temperaturno pogojeno denaturacijo, fotolizni razpad ali ko se zaradi povišane temperature spremeni mehanizem reakcij (3, 9, 10).

1.3.3 Stresni preizkusi stabilnosti

Stresni preizkusi stabilnosti so pogosto del razvojne strategije in jih izvajamo pri ostrejših razmerah kot pospešene preizkuse stabilnosti. Z njimi testiramo stabilnost samih učinkovin ali posameznih farmacevtskih oblik. Cilj teh testiranj je ugotoviti morebitne mehanizme razpada kot tudi razpadne produkte, ki bi nastali med daljšim shranjevanjem pri normalnih razmerah ali med shranjevanjem v ekstremnih razmerah v času transporta učinkovine oziroma končnega izdelka. ICH smernice priporočajo spremljanje vpliva temperature, relativne vlažnosti, svetlobe, pH vrednosti in oksidacije učinkovine ali končnega izdelka (3, 9, 10).

1.4 PRIDOBIVANJE AMORFNIH SNOVI

Najpogostejši vzroki za nastanek amorfnega stanja so hitri fazni prehodi iz tekočega v trdno stanje ali delovanje zunanje mehanske sile. Pri hitrih faznih prehodih iz tekočega v trdno stanje amorf nastane zaradi nezmožnosti ureditve molekul v kristalno rešetko. Pri delovanju zunanje mehanske sile pa se delno prekine že obstoječa kristalna urejenost, ki je termodinamsko stabilnejša (3).

1.4.1 Hitri fazni prehodi iz tekočega v trdno stanje

V tekočem stanju imajo snovi najpogosteje neurejeno obliko, molekule imajo višjo energijo in težijo k urejenosti. Pri hitrih spremembah iz tekočega v trdno stanje pa molekule nimajo vedno na razpolago dovolj časa in razmer, da bi se razporedile v stabilno kristalno strukturo, pač pa ostanejo neurejene. To so amorfi, ki imajo višjo potencialno energijo in so manj stabilni v primerjavi s stabilno kristalno strukturo. Metode, s katerimi dosežemo hitre fazne prehode iz trdnega v tekoče stanje, so: taljenje in zmrzovanje, sušenje z razprševanjem in liofilizacija (3).

Taljenje in zamrzovanje

Pri tem postopku pridobivanja kristalno snov segrevamo do njenega tališča in počakamo, da se popolnoma raztali. V tem stanju je prisotna že neurejena struktura. Ker želimo to ohraniti, talino na hitro ohladimo. Velikokrat za to uporabimo tekoči dušik. Ker ima tako pripravljen amorf veliko afiniteto za vezavo vlage, je pomembno, da ga ohlajamo v odsotnosti vlage, na primer pod tlakom. S to metodo so med drugim pridobivali amorfen nifedipin (11).

Sušenje z razprševanjem

Pri tem postopku razpršujemo raztopino ali suspenzijo učinkovine v sušilno komoro, kjer vzdržujemo kontrolirane razmere. Kapljice imajo veliko specifično površino, kar omogoči hitro odparevanje topila. Posledično se učinkovine hitro pretvorijo iz tekočega v trdno stanje in povzročijo nastanek amorfa. Takšen pristop so med drugim uporabili za pridobivanje amorfnega atorvastatina (1,12).

Liofilizacija

Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem povzroči odstranjevanje topila s pomočjo sublimacije iz zamrznjenega vzorca pri znižanem tlaku. Pri tem postopku se ohrani struktura učinkovine, ki je prisotna v raztopini. Na tak način lahko pridobimo amorfnu obliko laktoze (13).

1.4.2 Vpliv zunanje mehanske sile

Možnost vpliva mehanske sile v farmacevtski proizvodnji končnih oblik je velika. Mletje, mešanje, tabletiranje so neizogibni dejavniki, ki z mehansko silo vplivajo na površini snovi. Zato pride najpogosteje do nastanka amorfa na stični površini snovi, to pomeni, da se pojavi delna amorfnu oblika. Mehanska sila namreč poruši termodinamsko stabilno kristalno strukturo snovi. Zaradi nižje stabilnosti in potencialno višje energije na površini imajo lahko takšne snovi pomemben vpliv na kakovost učinkovin in končnih farmacevtskih oblik (3, 14).

Mletje

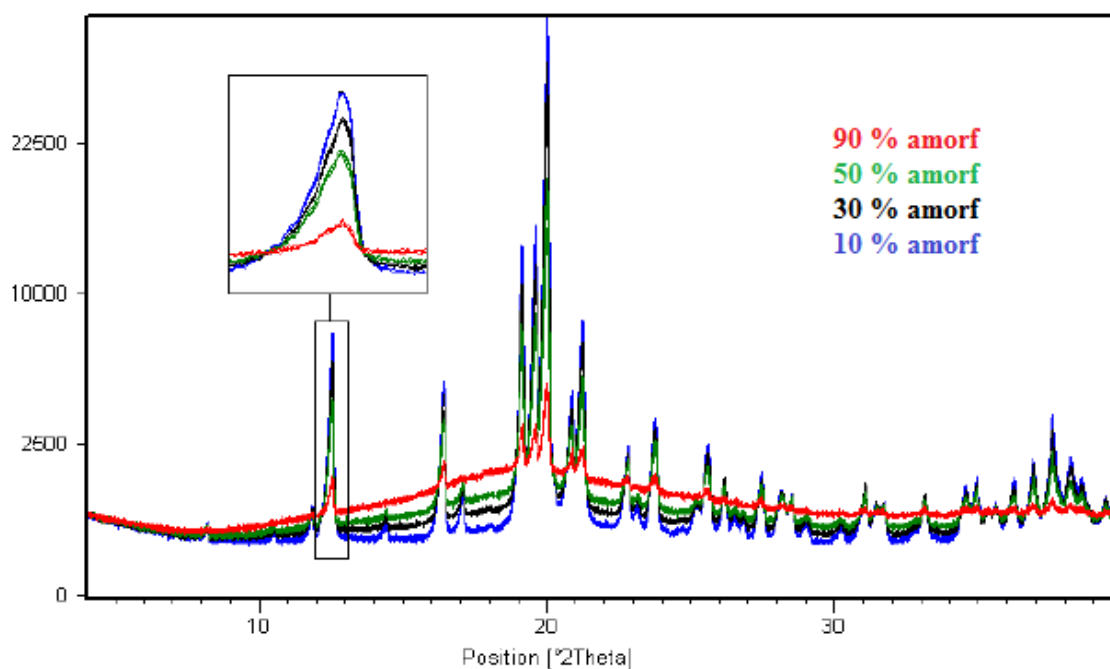
Mletje s svojo mehansko silo povzroči, da se prekine kristalna urejenost snovi. Pri mletju se delci kristala zmanjšujejo, s tem pa se poveča površina, ki je na voljo za amorfizacijo. S to metodo so raziskovalci uspešno pridobili amorfen grizeofulvin (15).

1.5 METODE ZA UGOTAVLJANJE AMORFNOSTI

Ugotavljanje stopnje kristalnosti oziroma amorfnosti je pomembno področje pri vrednotenju kakovosti učinkovin oziroma zdravil. Zato so tudi na razpolago številne analize metode za vrednotenju tovrstnih sprememb. Večina metod ugotavlja specifične lastnosti kristalnega stanja, le nekaj metod je takih, kjer zaznavamo amorfnost oblike.

1.5.1 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)

Ta metoda nam omogoča pridobitev podatkov o strukturi molekule na atomski ravni. Je zelo široko uporabljana nedestruktivna metoda. Omogoča nam delo s trdnimi, tekočimi ali praškastimi vzorci. Neurejenost strukture amorfnih snovi povzroči sipanje rentgenskih žarkov, kar vodi v razširitev in izgubo difrakcijskih vrhov, ki so značilni za posamezno snov. Z rentgensko difrakcijo torej ne moremo neposredno ugotavljati vsebnosti amorfnega deleža snovi. Delež amorfa v vzorcu lahko ocenimo le kot razliko med vsebnostjo kristalne oblike, ki jo ugotovimo s pomočjo rentgenske difrakcije in celotne količine učinkovine v vzorcu. Na sliki 3 lahko vidimo, kako se spreminja XRPD spekter glede na vsebnost amorfnega deleža v vzorcu. Z XRPD metodo lahko ugotovimo od 5 do 10 % amorfa v vzorcu (2, 14).



Slika 3: XRPD spektri vzorcev z različnimi deleži amorfa, prirejeno po (16).

1.5.2 Inverzna plinska kromatografija (IGC)

IGC je zelo občutljiva tehnika. Temelji na ugotavljanju karakterističnih razlik v retenciji molekul mobilne (plinske) faze pri prehodu skozi stacionarno fazo (različne oblike snovi, na primer kristalna in amorfna oblika). Glede na lastnosti snovi se torej na površino veže različna količina plina. Amorfnosti snovi vežejo na svojo površino večjo količino plina kot kristalne. Veliko fizikalno kemijskih procesov poteka na stičnih površinah, zato je izredno pomembno zaznavanje sprememb, ki se dogajajo na površini snovi. IGC nam omogoča takšno zaznavanje površinskih sprememb. Na ta način so med drugim ugotovili amorfnost cefditoren pivoksila (2, 17).

1.5.3 Infrardeča spektroskopija (IR)

IR je zelo pogosto uporabljena analizna metoda v farmaciji, zlasti zaradi kratkega časa meritev, nedestruktivnosti vzorca ter možnosti analize izredno velikega spektra učinkovin. IR zazna, glede na strukturne lastnosti, določene funkcionalne skupine, ki jim ustrezajo absorpcijski trakovi v točno določenem območju IR spektra. Na ta način zazna tudi razlike

med amorfno in kristalno obliko. IR je tako kvalitativna kot kvantitativna metoda. Kvantifikacijo vsebnosti ugotovimo s pomočjo Beer-Lambertovega zakona, ki povezuje delež absorbirane svetlobe in koncentracijo snovi v vzorcu. Ugotavljanje stopnje kristalnosti temelji na razliki intenzitete vrha, ki ga daje kristalni del vzorca in vrha, ki ga daje celotni vzorec. Z IR lahko ugotovimo kristalno ali amorfno obliko vzorca. S to metodo lahko ugotovimo delež amorfa pod 5 %. Z IR so določali tudi amorfno natrijeve soli cefazolina (2, 3, 14).

1.5.4 Dinamična sorpcija pare (DVS)

DVS je gravimetrijska metoda. Meri količino vlage, ki se adsorbira na vzorec. Vzorec posušimo na 0 % RH, nato pa povečujemo relativno vlažnost do 95 %. Amorfna oblika snovi sprejme veliko večjo količino vlage kot kristalna oblika (Slika 2). Metoda ugotavlja amorfni del snovi. DVS nam omogoči, da ugotovimo delež amorfa med 1 in 5 % (2, 14).

1.5.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

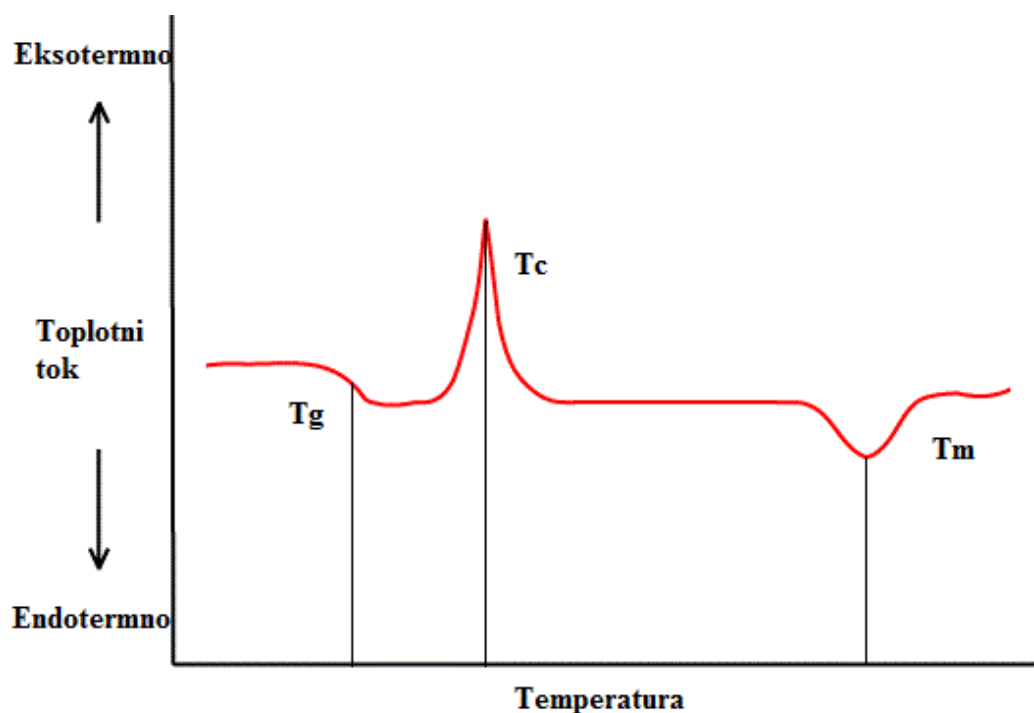
S kalorimetrijo merimo toplotne spremembe, ki se dogajajo v vzorcu. Ovrednotimo lahko obseg spremembe, hitrost spremembe ali pa spremembe sploh detektiramo. Vse fizikalno-kemijske spremembe so povezane s spremembo entalpije, se pravi s sprejemanjem ali oddajanjem toplote. Pri kalorimetriji merimo spremembo toplote kot funkcijo časa ali temperature. Kalorimetrija nam poda dva tipa podatkov: toploto (Q) v joulih (J) in toplotni tok (dq/dt) v vatih (W).

DSC je ena izmed najpogosteje uporabljenih analiznih metod v farmaciji. Omogoča nam kvantitativno in kvalitativno vrednotenje fizikalnih in kemijskih procesov v trdnih, poltrdnih in tekočih sistemih. S pomočjo DSC ugotavljamo endotermne in eksotermne reakcije, ter mnoge lastnosti proučevanih snovi, ki nam služijo za identifikacijo ali kontrolo kakovost. Rezultat analize je termoanalizna krivulja, ki podaja toplotni tok v odvisnosti od temperature. Kot analizne tehnike omenjajo tri vrste DSC meritev: klasično DSC, DSC z modulacijo temperature in visoko zmogljivostno DSC (2).

Klasična diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Klasična DSC temelji na linearnem segrevanju vzorca nad njegovo tališče. Tipična DSC krivulja amorfne ali amorfno-kristalne snovi nam prikaže steklasti prehod (T_g) in taljenje (T_m) kot endotermna procesa, kristalizacijo (T_c) pa kot eksotermni proces (Slika 4). Pri endotermnem procesu pride do porabe toplote. Preiskovani vzorec toploto sprejema, posledično se okolica ohlaja. Pri eksotermnem procesu pa je stanje ravno obratno, pride namreč do oddajanja toplote v okolico, pri čemer se le-ta segreva, preiskovani vzorec pa se ohlaja (2, 10, 18).

Steklasta oblika je neurejena konformacija molekul in nastane, ko tekočo fazo dovolj hitro ohladimo pod temperaturo tališča. Tekočine, ki ne kristalizirajo, ampak se samo strdijo, izkazujejo pri segrevanju steklasti prehod (T_g). Pod T_g gibanja molekul ni več in snov je v rigidnem steklastem stanju, nad T_g pa je snov mehka in lahko v realnem času steče (18).



Slika 4: Termogram DSC analize trdne snovi z najpogostejšimi signali, prirejeno po (19).

DSC je zelo pomembna tehnika pri ugotavljanju amorfности. Poleg tega jo uporabljamo še za ugotavljanje polimorfizma, temperature tališča in temperaturno območje taljenja,

temperature steklastega prehoda, termične stabilnosti, entalpije taljenja, vsebnost nečistot, izparevanja, desorpcije, kinetiko reakcij razpada in drugih reakcij, toplotne kapacitete (18). Analizirani vzorec je zelo preprosto pripraviti, analize pa so tudi zelo hitre. Z DSC imamo možnost analiziranja poltrdnih, trdnih in tekočih snovi. Analize lahko potekajo v zelo širokem temperaturnem območju. Metoda je destruktivna, ugotovimo pa lahko tako amorfnost kot kristalno obliko snovi v vzorcu. Površina pod vrhom kristalizacije je sorazmerna z maso amorfa. V primeru popolne kristalizacije je površina kristalizacijskega vrha identična površini talilnega vrha. Če povečamo hitrost segrevanja in maso vzorca, se poveča občutljivost, vendar se zmanjša ločljivost. Obratno z zmanjšanjem hitrosti segrevanja in maso vzorca ločljivost povečamo, vendar se občutljivost meritve zmanjša. Kadar v vzorcu poteka več toplotnih sprememb hkrati, je toplotni tok težko opredeliti. V večkomponentnem sistemu se lahko prekrivajo termični pojavi različnih komponent, v enokomponentnem sistemu pa se lahko prekrivata taljenje in rekristalizacija. Z DSC metodo lahko ugotovimo od 1 do 5 % amorfnega deleža v vzorcu (2, 18).

Diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature (mtDSC)

Princip delovanja mtDSC je podoben klasičnemu DSC, le da je pri mtDSC dinamičnemu (linearnemu) in izotermnemu temperaturnemu programu dodano še sinusoidno temperaturno nihanje. Posledično sinusoidno niha tudi toplotni tok. Prednosti te metode so večja ločljivost med procesi, ki se pojavljajo pri istih temperaturnih spremembah, večja občutljivost, mejenje toplotne kapacitete, ugotavljanje toplotne prevodnosti ... Z mtDSC lahko ugotovimo začetni delež kristalnosti snovi. Snov, ki ima visok kristalni delež, daje ožji talilni interval, kot snov z manjšo vsebnostjo kristalne oblike. Kvantifikacija amorfnega vzorca temelji na merjenju toplotne kapacitete v povezavi s steklastim prehodom amorfnosti. Umeritvena krivulja v tem primeru predstavlja toplotni kapaciteto vzorca z znano kristalnostjo (2, 3, 20).

Visoko zmogljivostna diferenčna dinamična kalorimetrija (HDSC)

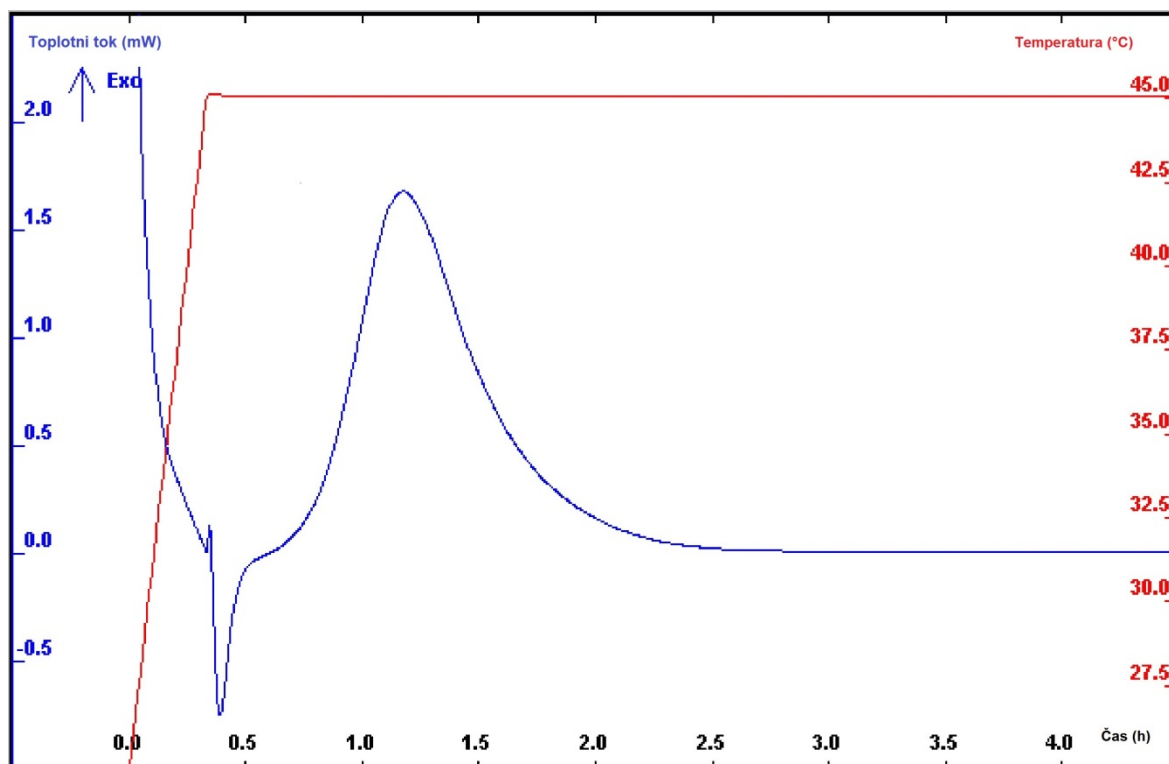
Pri HDSC metodi, imenovani tudi hyper-DSC, sta vzorec in referenca izpostavljena hitrejšemu porastu temperature kot pri klasični DSC. Hitrost segrevanja je lahko tudi od 100 do 500 °C/min, kar omogoča, da temperaturnemu programu sledi večja količina

vzorca. Posledično je HDSC veliko občutljivejša metoda kot klasična DSC, kar nam pomaga pri identifikaciji zelo majhnih količin amorfa v vzorcu, prav tako pa lažje ugotovimo T_g. Metoda nam omogoča uporabo zelo majhne mase vzorca (1 mg). Pri tej metodi termodinamska nestabilnost amorfa ne predstavlja ovire, saj je detekcija amorfa zelo hitra in je amorf v času detekcije še obstojen. Kombinacija hitrosti, majhne mase vzorca in občutljivosti metode so pri proučevanju amorfov zelo dragoceni (2, 21).

1.5.6 Izotermna mikrokalorimetrija (I_μC)

I_μC je nespecifična termoanalitična metoda, ki jo uporabljamo v farmacevtski industriji zlasti za ugotavljanje stabilnosti, kompatibilnosti in amorfnosti.

Razlika med DSC in I_μC je, kot je že nakazano v imenih metod, v temperaturnem programu. Če je za DSC značilno segrevanje vzorca preko njegovega tališča, je za I_μC značilno, da se vzorec ves čas analize vzdržuje pri določeni konstantni temperaturi. Klasični izotermni mikrokalorimeter vsebuje termostatisirano vodno kopel, ki obdaja kalorimetrijski kanal. V tem kanalu sta vzorčna in referenčna celica. Za I_μC je značilno, da se vsa toplota, ki jo vzorec absorbira ali sprosti, popolnoma izmenja z obdajajočo termostatisirano vodno kopeljo. Ta način delovanja vzdržuje vzorec pri konstantni temperaturi. Kot referenco uporabljamo inertni material s podobno toplotno kapaciteto in maso, kot jo ima vzorec. Rezultat teh meritev je krivulja toplotnega toka v odvisnosti od časa (Slika 5). Z I_μC ugotovimo amorfno obliko v vzorcu tako, da izmerimo površino pod vrhom kristalizacijskega vrha. Tako ugotovljena entalpija kristalizacije je premosorazmerna z maso analiziranega amorfa. Lahko zaznamo celo do 0,5 % amorfa v vzorcu. Na tak način so na primer ugotovili amorfno laktozo, nifedipino, fenobarbitala ... (2, 3, 12, 22).



Slika 5: Termogram izotermne analize amorfne nifedipina, prirejeno po (13).

Poleg ugotavljanja in kvantifikacije amorfnosti znotraj kristalne učinkovine je I μ C uporabna tudi za ugotavljanje higroskopnosti učinkovine, ugotavljanje interakcij med polimeri, raziskovanje interakcij med zdravilnimi učinkovinami in hrano ter mikroorganizmi, ugotavljanje vpliva temperature in koncentracije na spremembe konformacij lipidov (1).

Analize so relativno hitre, zlasti glede na tradicionalne teste, kjer analize lahko trajajo mesece ali leta preden so spremembe dovolj velike, da jih zaznamo s klasičnimi metodami, glede na DSC pa so I μ C analize počasnejše. I μ C je zelo občutljiva metoda, saj zaznava sprememb že pri sobni temperaturi. Vzorec je lahko v katerem koli agregatnem stanju, možna pa je tudi kombinacija vseh treh agregatnih stanj. Količina proučevanega vzorca je odvisna od velikosti aparature in merilnih celic, vendar je navadno večja kot pri drugih termičnih metodah (na primer DSC), kar poveča občutljivost metode. Metoda je nespecifična in torej primerna za proučevanje raznih interakcij. Vendar lahko nespecifičnost povzroči tudi merjenje napačnih fizikalnih ali kemijskih reakcij. I μ C je v

primeru ugotavljanja amorfa destruktivna metoda, pri drugih analizah pa se vzorec lahko ohrani v prvotni obliki (2).

2 NAMEN DELA

Iskanje potencialnih učinkovin z amorfno strukturo je pomembno zlasti pri spojinah s slabo vodotopnostjo, saj se z amorfno strukturo poveča hitrost raztapljanja, posledično se v in vivo pogojih sprosti več učinkovine na enoto časa, kar pomeni povečano biorazpoložljivost učinkovine. Prav tako pride do hitrejšega farmakološkega delovanja. Ker pa je obstojnost amorfne oblike vprašljiva, je nujno njihovo preverjanje z ustreznimi metodami. V tem kontekstu je velikega pomena uveljavljanje novih in izboljševanje že uveljavljenih analiznih tehnik. V ta namen poleg že znane in široko uporabljane dinamične kalorimetrije v zadnjem času uporabljamo tudi manj uveljavljeno mikrokolorimetrijo.

Namen dela je vpeljati izotermno mikrokolorimetrijo ob sočasni uporabi diferencialne dinamične kalorimetrije za preverjanje stabilnosti amorfne učinkovine na primeru nifedipina. Pred začetkom izvajanja analiz bomo izbrani analizni metodi ustrezno ovrednotili in s tem potrdili ustreznost delovanja aparature in verodostojnost rezultatov. S pomočjo amorfne učinkovine bomo ugotovili optimalne pogoje za izvajanje meritev na mikrokolorimetru (temperatura in relativna vlažnost v mikrokolorimetrični celici, vpliv mase vzorca, vpliv homogenosti binarnih vzorcev). Z različnimi metodami (taljenje in zamrzovanje, mletje, liofilizacija) bomo poskušali pridobiti amorfno učinkovino ter z ustreznimi metodami (μ C, DSC, XRPD, mikroskop) ovrednotili amorfno v pridobljenih vzorcih.

V zadnji fazi analiz bomo ovrednotili stabilnost amorfne učinkovine. Preverili bomo vpliv temperature in vlage na shranjevanje amorfne oblike ter vpliv načina pridobivanja amorfa na stabilnost. S tem bomo ocenili potencialno uporabnost amorfne oblike nifedipina v terapevtske namene.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Učinkovine, pomožne snovi, topila

Nifedipin

Kemijsko ime: 4-(2-nitrofenil)-2,6-dimetil-3,5-dikarbometoksi-1,4-dihidropiridin

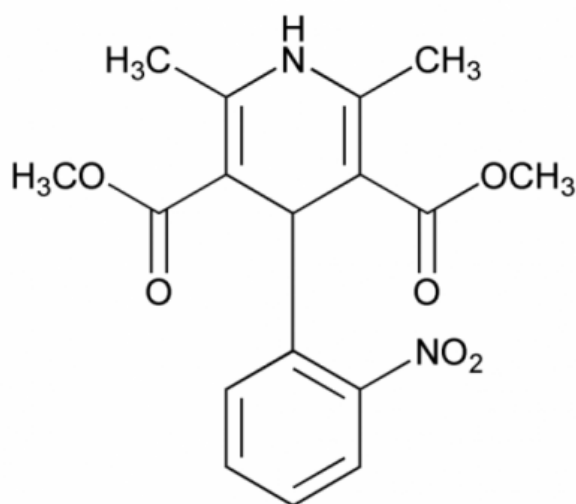
CAS številka: 21829-25-4

Empirična formula: $C_{17}H_{18}N_2O_6$

Molska masa: 346,335 g/mol

Kvaliteta: Ph. Eur., BP, USP

Proizvajalec: Sigma-Aldrich®



Slika 6: Strukturna formula nifedipina, prirejeno po (23).

Nifedipin je selektivni zaviralec kalcijevih kanalov. Deluje na L tip kalcijevih kanalčkov, ki so napetostno odvisni. Zaviralci kalcijevih kanalčkov blokirajo vstop kalcija v celice ter s tem preprečijo odpiranje napetostno odvisnih kalcijevih kanalov tipa L. Nifedipin deluje zlasti na celice srčne mišice ter gladke mišice koronarnih arterij in perifernih žil. V koronarnih arterijah povzroča dilatacijo. V arteriolah zmanjšuje tonus gladkih mišic, kar znižuje zvečan periferni upor in zvišan krvni tlak. Uporabljamo ga zlasti za zdravljenje

hipertenzije ter koronarne srčne bolezni (angina pectoris). Kot neželeni učinek se pogosto pojavita otekanje gležnjev ter glavobol. Glede na kemijsko strukturo sodi nifedipin med 1,4-dihidropiridine (Slika 6) (24).

Preglednica I: Seznam pomožnih snovi/topil in njihove lastnosti

Ime pomožne snovi/topila	Molekulska formula	CAS številka	Molekulska masa (g/mol)	Kvaliteta	Proizvajalec
Kalijev nitrat	KNO_3	7757-79-1	101,1	p.a., ISO, Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Natrijev klorid, kristalohidrat	NaCl	7647-14-5	58,4	p.a., ISO, ACS Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Natrijev jodid	NaI	7681-82-5	149,9	p.a., Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Natrijev bromid	NaBr	7647-15-6	102,9	Ph. Eur., BP, JP	Merck KGaA
Magnezijev nitrat kristalohidrat	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	13446-18-9	256,4	p.a., ISO, Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Amonijev sulfat brezvodni	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7783-20-2	132,1	p.a., ISO, ACS Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Amonijev klorid	NH_4Cl	12125-02-9	53,5	p.a., ISO, ACS Reag. Ph. Eur.	Merck KGaA
Tekoči dušik	N_2	7727-37-9	28,0	Ni podatka	Messer Slovenija, d.o.o.
MilliQ voda	H_2O	7732-18-5	18,0	Odpornost: $> 18.2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ TOC: $< 10\text{ppb}$	Fakulteta za farmacijo
Etanol, 96%	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	64-17-5	46,1	p.a., Reag. Ph. Eur.	Sigma-Aldrich
Aceton	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	67-64-1	58,1	p.a., ACS, ISO Reag. Ph. Eur.	Panreac

3.1.2 Naprave in pribor

- Mikrokalorimeter Micro DSCIII (Setaram)



Slika 7: Mikrokalorimeter Micro DSCIII (Setaram), prirejeno po (25).

- Diferenčni dinamični kalorimeter (DSC) Mettler Toledo DSC 1, STAR^e System



Slika 8: Diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo DSC 1, STAR^e System.

- Stereo mikroskop – Olympus, SZX12
- Sušilnik z razprševanjem – Büchi
- Vibracijski kroglični mlin – Fritsch, Pulverisette 0



Slika 9: Vibracijski kroglični mlin – Fritsch, Pulverisette 0, prirejeno po (26).

- Ultrazvočna kadička Sonis 4 (Iskra)
- Tehnica – Mettler Toledo, AG245
- Klimatska komora – Votsch, VC 4034
- Avtomatske pipete (Eppendorf), nastavki za pipete
- Ahatna terilnica
- Termoizolacijska posoda
- Steklene posode za uravnavanje želene RH
- Vodna črpalka
- Silikagel
- Steklene vialne
- Drugi inventar: spatule, aluminijasta folija, Parafilm M, kapalke, aluminijasti tehtiči, steklene čaše, epruvete, stojalo za epruvete, sušilnik za lase, laboratorijski grelnik

3.2 METODE

3.2.1 Mikrokolorimetrične meritve

Mikrokolorimetrične meritve smo izvajali v mikrokolorimetru Micro DSC III (Setaram). Mikrokolorimeter smo pred uporabo kalibrirali z referenčno spojino (naftalen), in sicer po navodilih proizvajalca. Pri merjenju smo uporabljali standardne celice (*Hastelloy 1 mL*). Pred vsako meritvijo smo vzorčno in referenčno celico temeljito očistili in sprali z

destilirano vodo, nato pa še s 96-odstotnim etanolom. Celice smo posušili s sušilnikom za lase in pustili, da se ohladijo na sobno temperaturo. Vzorčno celico smo napolnili z ustrežno količino vzorca, v referenčno celico pa smo dali aluminijasto folijo, ki je po masi ustrezala vzorcu v vzorčni celici. V celici smo vstavili še stekleni viali volumna približno 100 μL . Viali smo po potrebi napolnili z ustreznimi nasičenimi raztopinami ali z destilirano vodo. S tem smo dosegli željeno relativno vlažnost (Preglednica II). S pomočjo ustreznega ključa smo celici z ustreznimi zaporkami dobro zaprli. S pinceto smo v mikrokalorimetrični sistem najprej vstavili referenčno in nato še vzorčno celico ter ju pokrili s pozlačenim pokrovom, vstavkom iz umetne mase ter zunanjim pokrovom. Počakali smo približno 10 minut, da se je vzpostavilo toplotno ravnotežje (toplotni tok je dosegel vrednost 0,00 mW) in šele nato začeli z meritvami. Dobljene rezultate smo pregledali in ovrednotili s programsko opremo SETSOFT 2000. Po koncu meritve smo celice vzeli iz sistema, odprli in jih dobro očistili.

Priprava nasičenih raztopin

Ustrezne soli za doseg razmer shranjevanja smo izbrali s pomočjo podatkov iz literature. Za potrebe stabilnostne študije in izvedbe μC meritev smo nasičene raztopine pripravljali z raztapljanjem ustrezne soli v prečiščeni vodi do nasičenja (Preglednica II). Nasičene raztopine KNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in NaCl smo za μC meritve pripravili v 10 ml epruveh, medtem ko smo za stabilnostno študijo pripravljali ustrezne raztopine neposredno v posodah, v katerih smo shranjevali vzorce (27).

Preglednica II: Relativne vlažnosti, ki jih dajejo nasičene raztopine pri 45°C, prirejeno po (27).

Nasičena raztopina	RH (%) pri 45 °C
Mg(NO₃)₂	47
NaCl	75
(NH₄)₂SO₄	80
KNO₃	87
H₂O	100

3.2.2 DSC meritve

DSC meritve smo izvajali na instrumentu DSC1 proizvajalca Mettler Toledo. Meritve smo izvajali v dušikovi atmosferi s pretokom dušika 50 ml/min. V standardno aluminijasto ponvico smo natehtali približno 20 mg vzorca in jo zaprli z aluminijastim pokrovčkom z luknjico. Vzorec smo segrevali v območju 0-190 °C, s hitrostjo 10 K/min. Meritve smo ovrednotili s pomočjo programske opreme STARe Software v9.30.

3.2.3 Uporaba mikroskopa

Videz vzorcev smo spremljali s pomočjo stereo mikroskopa Olympus SZX12 z uporabo 40000-kratne povečave. Opazovali smo kristalen nifedipin, amorf pridobljen samo z taljenjem nifedipina, amorf pridobljen s QC in amorf pridobljen z mletjem po 1, 2 in 3 h.

3.2.4 XRPD meritve

XRPD meritve so izvajali na Kemijskem inštitutu v Ljubljani z rentgenskim praškovnim difraktometrom PANalytical X'Pert PRO. Pri tem so uporabili sevanje $\text{CuK}\alpha_1 = 1,5406 \text{ \AA}$ in α_1 konfiguracijo z Johannsonovim monokromatorjem. Snemali so v območju od $2-37^\circ$ 2θ s koraki po $0,034^\circ$. Integracijski čas je bil 100 sekund. Tik pred meritvijo smo

približno 500 mg vzorca strli v ahatni terilnici in ga nato prenesli v merilno celico. Celica o pred meritvijo vstavili v difraktometer.

3.3 OPTIMIZACIJA MIKROKALORIMETRIČNE METODE

V teh eksperimentih smo uporabili mikrokalorimeter v skladu s proceduro iz točke 3.2.1. Amorfen nifedipin, ki smo ga pri teh meritvah uporabljali, je bil pripravljen z QC metodo. Optimizirali smo temperaturo in relativno vlažnost v celici mikrokalorimetra ter maso vzorca, ki je nujna za kristalizacijo nifedipina. Dodatno smo preverjali homogenost vzorca ter obnašanje amorfa v binarni zmesi vzorca.

Vse μC meritve smo izvajali pri 45 °C in 80 % RH, razen v točkah 3.3.1 in 3.3.2.

3.3.1 Vpliv temperature na kristalizacijo amorfnega nifedipina

Meritve smo izvedli pri temperaturah 42, 43, 44, 45, 46, 47 in 55 °C. Povprečna masa amorfnega nifedipina je bila 11,0 mg. Eksperimenti so potekali pri 87 % RH.

3.3.2 Vpliv vlažnosti na kristalizacijo amorfnega nifedipina

Pri meritvah smo uporabili različne nasičene raztopine, ki dajejo pri izbrani temperaturi (v našem primeru 45 °C) določeno relativno vlažnost. Uporabili smo 100, 87, 80, 75 in 47 % RH (Preglednica II). Eksperimenti so potekali pri 45 °C s povprečno maso amorfa 50,9 mg.

3.3.3 Vpliv mase amorfa na kvantifikacijo amorfnega nifedipina

Pri teh meritvah smo kot optimalne pogoje za kristalizacijo uporabili temperaturo 45 °C in 80 % RH. Mase amorfa, ki smo jih uporabili pri teh meritvah, so bile: 1,3; 2,6; 5,9; 11,2; 21,5; 40,4; 52,1; 61,2; 82,0; 101,6 in 202,6 mg.

3.3.4 Vpliv homogenosti vzorca

Proučevali smo tri različno homogene vzorce amorfnega nifedipina: nemlet amorf (nekaj večjih kosov), grobo mlet amorf (s spatulo) in fino mlet amorf v ahatni terilnici. Dodatno

smo testirali tudi položaj amorfa v zmesi s kristalnim nifedipinom. Testirali so binarno zmes amorf/kristal v masnem razmerju 40/60. Masa zmesi, ki smo jo analizirali, je bila 50 mg. V prvem primeru smo najprej natehtali kristalen nifedipin, nato amorf (zgoraj), v drugem primeru smo natehtali enako kot v prvem, le da smo zmes dobro premešali s spatulo (pomešan). V tretjem primeru pa smo v mikrokolorimetrično celico najprej natehtali amorfen nifedipin, nato pa kristalen (spodaj) (Preglednica VII) .

3.3.5 Vpliv binarnih zmesi na kvantifikacijo amorfnega nifedipina

Za potrebe posameznih meritev smo pripravljali različne binarne zmesi z znano sestavo. Pripravljali smo jih s tehtanjem kristalnega in amorfnega nifedipina. Delež in količino celotnega vzorca smo prilagajali glede na potrebe posamezne meritve ali raziskave. Binarne zmesi smo pripravljali direktno s tehtanjem v merilne celice tik pred izvedbo meritev. V mikrokolorimetrično celico smo najprej natehtali kristalen in nato amorfen nifedipin. Izmerili smo kristalizacijsko entalpijo zmesem, ki so vsebovale približno 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 in 80 % amorfnega nifedipina, drugi del vzorca je bil kristalen nifedipin.

3.4 PRIDOBIVANJE AMORFA

3.4.1 Taljenje in zamrzovanje

Približno 1 g kristalnega nifedipina smo natehtali na aluminijasti tehtič in ga nato previdno raztalili s segrevanjem na laboratorijskem grelniku. S pomočjo pincete smo raztaljen nifedipin previdno zlili v čašo s tekočim dušikom. Čašo smo takoj postavili v eksikator, ga zaprli in priključili na vodno črpalko. Na tak način smo vzorec v vakuumu segreti na sobno temperaturo, ne da bi na njem kondenzirala atmosferska vlaga. Tako pripravljen amorf smo pustili v eksikatorju, dokler ni dosegel sobne temperature. Ta postopek priprave amorfnega nifedipina smo opravljali v bombažnih rokavicah. Zaradi zelo nizke temperature tekočega dušika (vrelišče ima pri $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) bi ob stiku le-tega s kožo lahko prišlo do ozeblin. Amorf smo vzeli iz eksikatorja tik pred izvedbo meritve.

3.4.2 Mletje

Mletje kristalnega nifedipina smo izvajali v vibracijskem mlinu Pulverisette 0 proizvajalca Fritsch. Da bi se izognili segrevanju vzorca, ki bi lahko nastalo zaradi trenja med možnarjem in kroglo, smo mletje izvajali v *Hladni sobi* na Fakulteti za farmacijo pri temperaturi približno 5 °C.

V možnar smo natehtali približno 1 g kristalnega nifedipin in ga nato mleli 5 ur v 15 minutnih intervalih pri 3500 nihajev/min. Med posameznimi intervali smo mlin ustavili za nekaj minut, kar nam je omogočilo, da smo nifedipin vzorčili za analize ter da smo iz krogle in možnarja postrgali vzorec ter poskrbeli za čim bolj enakomerno mletje. Intenziteta mletja je bila celotni proces enaka. Vzorce smo odvzeli v intervalih 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 in 300 minut. Za meritev kristalizacijske entalpije smo uporabili DSC, zlasti zaradi kratkega časa analize.

3.4.3. Liofilizacija

Pri postopku liofilizacije smo najprej raztopili kristalen nifedipin (5 g) v acetonu (30 g), nato pa smo to raztopino s pomočjo brizge dodajali v posodo s tekočim dušikom. Podobno kot pri QC metodi, smo tudi tukaj poskušali doseči, da bi se vzorec takoj zamrznil in s tem ohranil svojo neurejeno strukturo. Posodo smo nato zaprli in priklopili na vodno črpalko, jo še dodatno ohlajali s tekočim dušikom ter s tem omogočili sublimacijo acetona in sušenje amorfa. Vzorec smo sušili približno 5 ur.

3.5. TESTIRANJE STABILNOSTI AMORFA

Vzorce za stabilnostne študije smo shranjevali v klimatski komori Votsch in v steklenih posodah, kjer smo zelene razmere dosegli z nasičenimi raztopinami različnih soli. Za doseglo RH smo uporabili naslednje nasičene raztopine: NaI, NaBr, NH₄Cl in vodo (Preglednica III). Vzorci, ki smo jih shranjevali v klimatski komori, so bili izpostavljeni 40 °C in 60 % RH, medtem ko so bili vzorci v posodah shranjeni pri sobni temperaturi ali v hladilni omari pri 5 °C, ter pri različnih relativnih vlažnostih. Na dnu zaprtih steklenih posod so bile nasičene raztopine ustreznih soli, vzorci pa so bili shranjeni nad raztopinami v odprtih steklenih petrijevkah.

Preglednica III: Relativne vlažnosti, ki jih dajejo nasičene raztopine pri 25 °C, prirejeno po (27).

Nasičena raztopina	RH (%) pri 25 °C
NaI	38
NaBr	58
NH ₄ Cl	79
H ₂ O	100

Pri testiranju stabilnosti amorfa smo upoštevali dva najpomembnejša dejavnika, ki vplivata na pretvorbo oblike. To sta relativna vlažnost in temperatura.

3.5.1 Vpliv vlage na stabilnost

Vzorci amorfa smo shranjevali pri različnih vlažnostih pri 25 °C.

- a) **13 % RH (eksikator):** amorfno smo preverjali z μC v času 1, 7, 24, 32 in 48 h ter 6, 13 in 21 dni.
- b) **38 % RH:** meritve smo izvajali na DSC, in sicer v času 2, 4, 6, 8, 25 in 32 h ter 2, 4, 7, 10, 14 in 21 dni. Za DSC smo se odločili zaradi preprostosti in hitrosti izvedbe meritev.
- c) **58 % RH:** meritve smo izvajali na DSC v času 2, 4, 6, 7, 25 in 32 h ter 2, 4, 7, 10, 14 in 21 dni.
- d) **79 % RH:** Meritve smo izvajali na DSC, in sicer v času 1, 3, 5, 7, 24 in 31 h ter 2, 4, 7, 10, 14 in 21 dni.

- e) **100 % RH:** meritve smo izvajali na mikrokalorimetru in na DSC. Na mikrokalorimetru smo izvedli meritve samo pri časih 1, 3 in 6 h. Meritve na DSC pa smo izvedli v času 1, 3, 5, 7, 9, 24 in 30 h ter 2, 4, 7 in 10 dni.

3.5.2 Vpliv temperature na stabilnost

Vzorci amorfne nifedipina smo shranjevali pri 60 % RH pri različnih temperaturah.

- a) **5 °C:** meritve smo izvajali na DSC, in sicer v času 2, 4, 5, 8, 24 in 30 h ter 2, 3, 7, 10 in 14 dni.
- b) **25 °C:** meritve smo izvajali na DSC v času 2, 4, 6, 7, 25 in 32 h ter 2, 4, 7, 10, 14 in 21 dni.
- c) **40 °C:** meritve smo izvajali na DSC, in sicer v času 1, 3, 5, 7, 24 in 30 h ter 2, 3, 7, 10 in 14 dni.

3.5.3 Vpliv načina pridobivanja amorfa na stabilnost

Primerjali smo stabilnost amorfa pridobljenega po dveh različnih postopkih, in sicer: z QC ter z mletjem. Vzorci smo shranjevali pri 25 °C in 60 %RH. Meritve smo izvajali na DSC v času približno 1, 3, 5 in 24 h.

3.6 OBDELAVA PODATKOV

Rezultate meritev smo obdelali s pomočjo programske opreme Excel. Tako smo lahko izdelali grafe in tabele, izračunali enačbe umeritvenih premic, izračunali povprečja meritev in standardne odklone. Vse naštetu je prikazano v naslednjem poglavju.

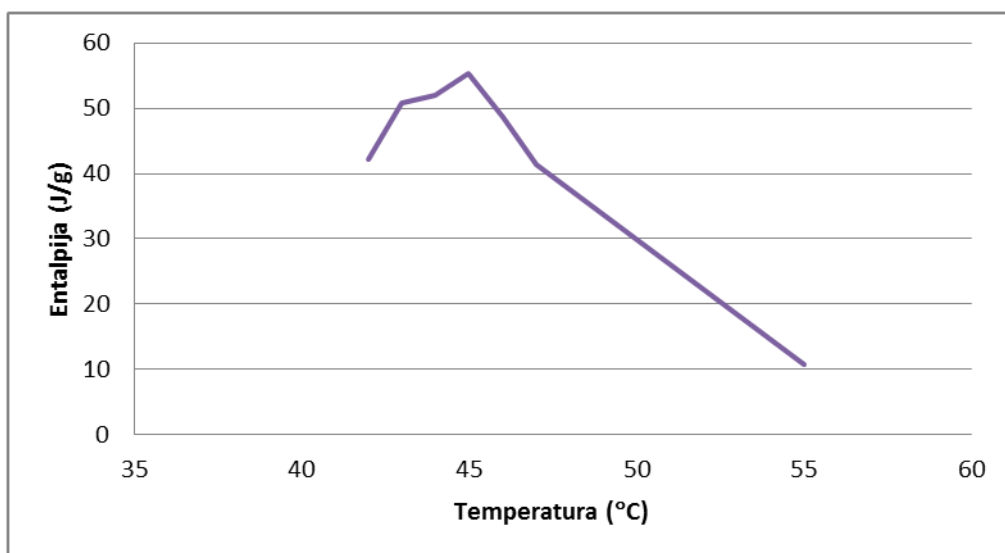
4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OPTIMIZACIJA MIKROKALORIMETRIČNE METODE

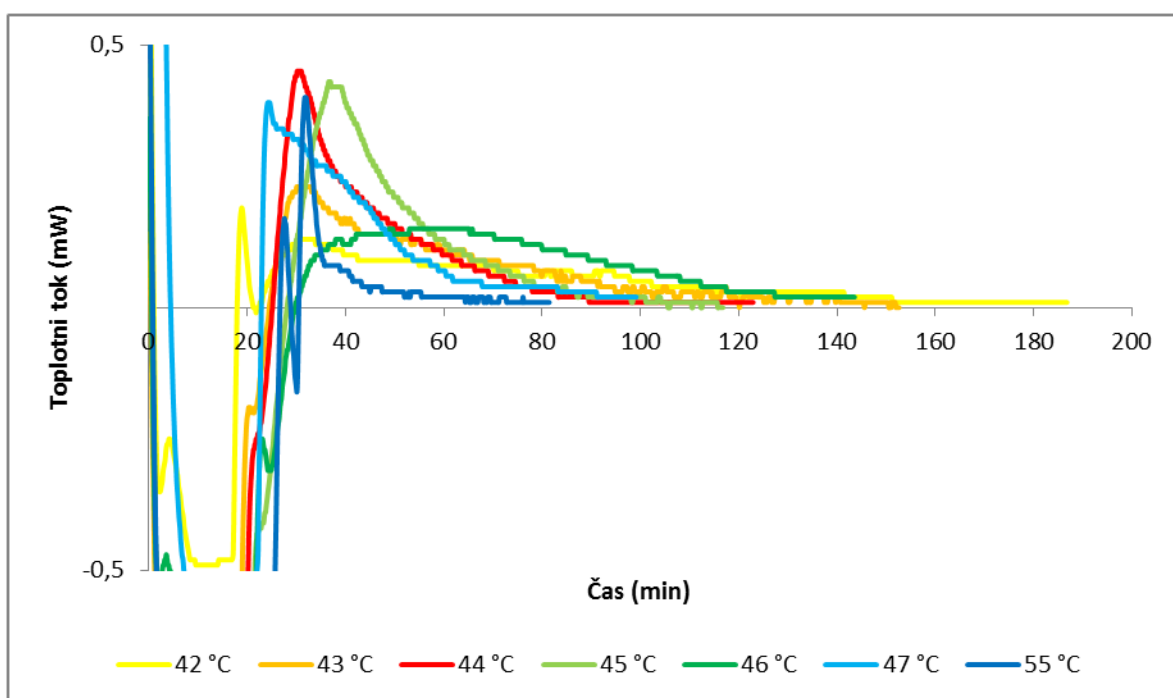
Za ugotavljanje amorfности uporabljamo različne metode (glej 1.5). Ker je bil naš namen vpeljava μC v prakso, smo to metodo najprej optimizirali. Ugotovili smo optimalno temperaturo in vlažnost, pri kateri bomo izvajali vse nadaljnje meritve. Hkrati pa smo preverili tudi vpliv mase vzorca ter vpliv binarnih zmesi na kvantifikacijo amorfnega nifedipina.

4.1.1 Vpliv temperature na kristalizacijo amorfnega nifedipina

Preverjali smo vpliv temperature na kristalizacijo od 42 do 55 °C. Za te temperature smo se odločili na podlagi T_g , ki je za nifedipin približno 45 °C (22). Želeli smo preveriti temperature nad in pod T_g . Kristalizacijsko entalpijo, ki je najbolj primerljiva z literaturnim podatkom o kristalizacijski entalpiji (58-62 J/g), smo dobili pri temperaturi 45 °C, in sicer 55,3 J/g (Slika 10). Razlike med literaturnimi in eksperimentalnimi podatki so lahko posledica: vpliva mikrokolorimetra, zunanjega vpliva (odpiranje vrat v laboratoriju, mešanje zraka zaradi drugih ljudi v laboratoriju, mogoče tudi vpliv drugih aparatov), (ne)čistote nifedipina in tekočega dušika, s katerim smo pripravljali amorf (22). Z višanjem temperature je kristalizacija potekala hitreje, kar je neugodno, saj je bil začetek kristalizacije prehitel in je bil kristalizacijski vrh na začetku slabo ločljiv. Proces kristalizacije se namreč začne hitreje, kot se mikrokolorimetrični sistem sploh stabilizira (Slika 11). To je tudi vzrok, da je kristalizacijska entalpija manjša pri višjih temperaturah. Za nadaljnje meritve smo izbrali temperaturo 45 °C, saj je pri dani relativni vlažnosti kristalizacija nifedipina potekla v največjem obsegu.



Slika 10: Vpliv temperature na kristalizacijo nifedipina (μC).



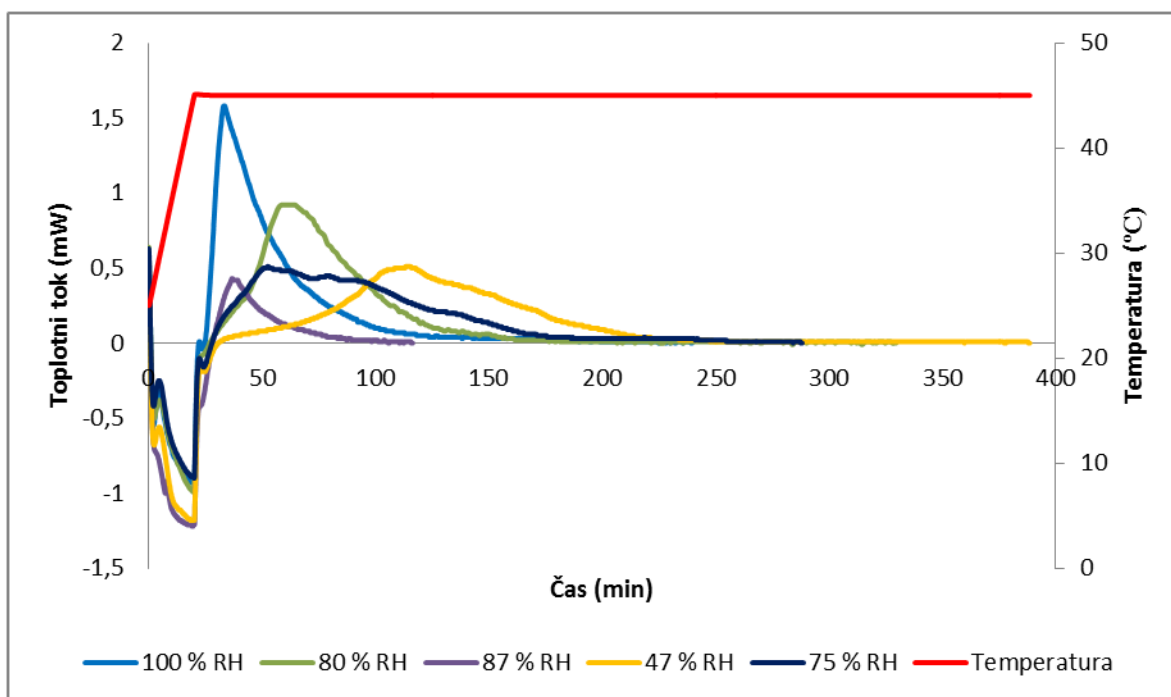
Slika 11: Termogrami kristalizacije amorfne nifedipina pri relativni vlažnosti 87 % in pri različnih temperaturah.

4.1.2 Vpliv vlažnosti na kristalizacijo amornega nifedipina

Vlaga pomembno vpliva na obstoj amorfne oblike snovi. Voda namreč zmanjša T_g , s tem deluje kot mehčalo, ki pospeši kristalizacijo amorfa. Z višanjem RH se T_g zmanjšuje in zato kristalizacija poteče prej, kot pri nižji RH (11). V praksi je pomembno, da so meritve čim krajše in hkrati, da je ločljivost ustrezna ter občutljivost čim večja. Reguliranje vlage omogoča krmarjenje med temi parametri. Največjo kristalizacijsko entalpijo smo dobili v primeru prisotnosti 100 % RH (Preglednica IV), vendar je kristalizacija potekla prehitro (Slika 12). V prisotnosti 87 % RH je bila entalpija dokaj visoka (56,3 J/g), vendar se je izkazalo, da proces kristalizacije traja dlje časa. Pri 45 °C in 75 % RH pa je čas analize trajal predolgo. Pri 80 % RH je kristalizacijska entalpija primerljiva z literaturnimi podatki, prav tako pa je začetek kristalizacije dovolj zakasnen, da se je mikrokalorimetrični sistem stabiliziral (Slika 12). Ker se spreminja čas začetka kristalizacije, je pomembno tudi integriranje. Integracija je tako odvisna od ocene vsakega posameznika in zato lahko pride do subjektivnih napak oziroma razlik v rezultatih. Glede na začetek kristalizacije in trajanje smo se odločili, da pri nadaljnjih poskusih za uravnavanje relativne vlažnosti v mikrokalorimetričnih celicah uporabimo raztopino amonijevega sulfata, ki daje pri temperaturi 45 °C 80 % RH (27).

Preglednica IV: Kristalizacijska entalpija amornega nifedipina pri 45 °C ugotovljena z μ C.

RH (%) pri 45 °C	Entalpija (J/g)
47	51,4
75	52,6
80	53,7
87	56,3
100	58,2

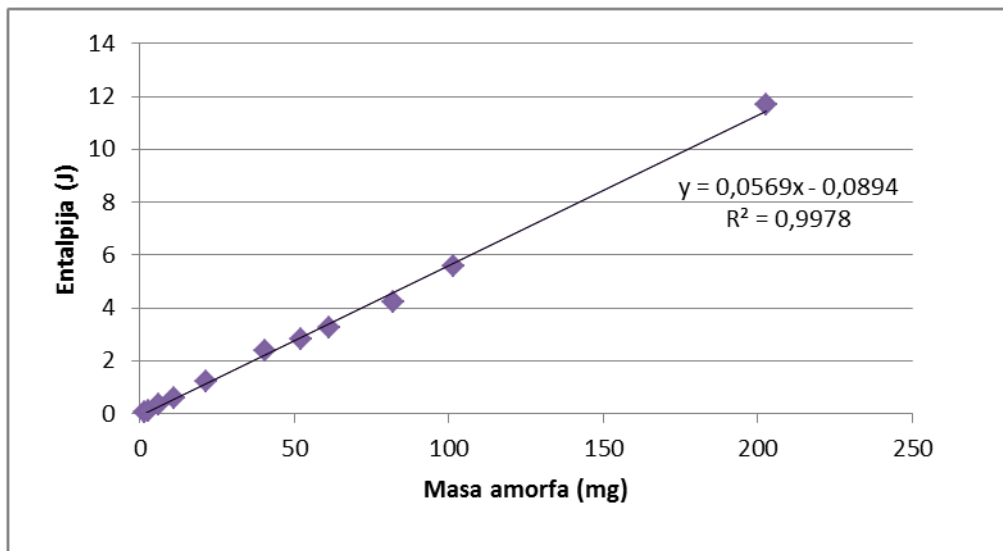


Slika 12: Termogrami kristalizacije amorfnega nifedipina pri 45 °C in pri različnih relativnih vlažnostih.

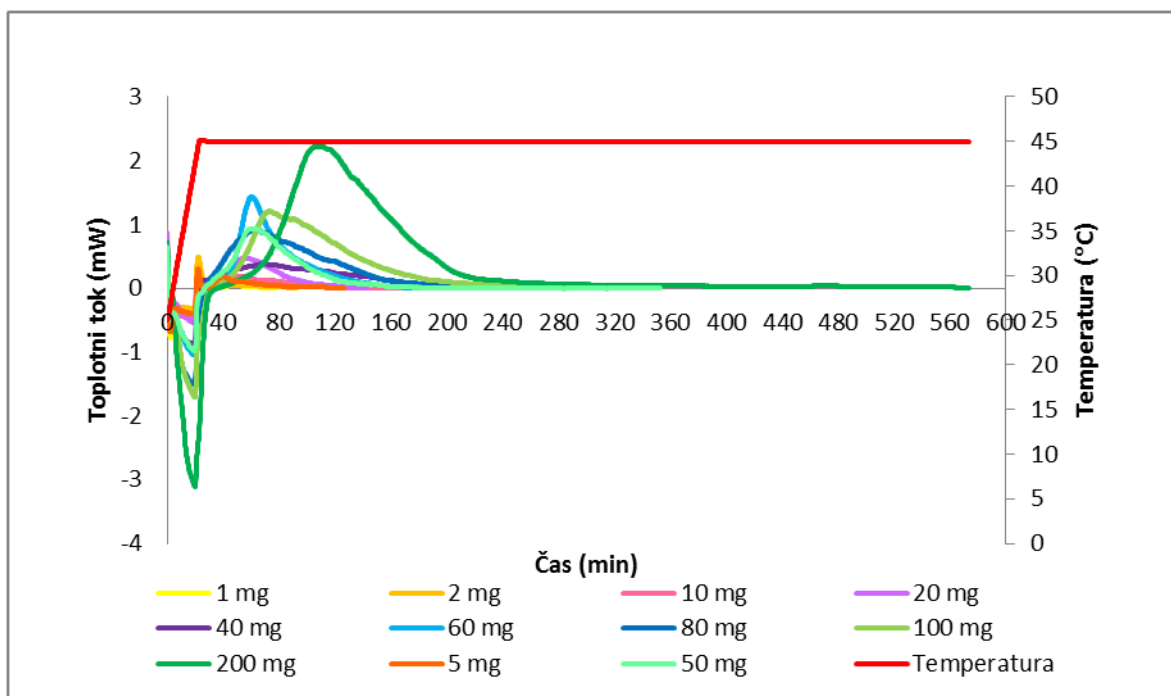
4.1.3 Vpliv mase amorfa na kvantifikacijo amorfnega nifedipina

Z različnimi masami amorfa smo želeli preveriti linearnost odziva μC ter ugotoviti minimalno količino vzorca, ki ga lahko detektiramo. Ugotovili smo, da masa amorfa vpliva na začetek in trajanje kristalizacije. Z večanjem mase amorfa se podaljša čas do začetka kristalizacije in sam čas poteka kristalizacije. Čas kristalizacije je pri največji testirani masi (200 mg) za približno 8 ur daljši kot čas kristalizacije pri najmanjši masi (1 mg). Kljub temu so pogoji meritev ustrezni, saj je pri vseh testiranih vzorcih začetek procesa kristalizacije dovolj zakasnen (Slika 14). Iz slike 13 lahko vidimo, da je korelacija med maso vzorca in entalpijo kristalizacije zelo dobra ($R^2 = 0,9978$). Iz naklona premice lahko razberemo tudi kristalizacijsko entalpijo (56,9 J/g), ki je primerljiva s podatki o kristalizacijski entalpiji iz literature (22). Ugotovljena je čez celotno območje mas, kar prispeva k večji zanesljivosti dobljenih rezultatov. Na osnovi meritev smo s pomočjo umeritvene premice izračunali tudi točnost, ki smo jo podali kot ujemanje med izračunano in dejansko maso vzorca izraženo v odstotkih. Najmanjšo maso analiziranega amorfa smo detektirali (1,33 mg) ter izračunali točnost meritve, ki je 98,2-odstotna, kar pomeni, da je

ujemanje zelo dobro (Preglednica V) in s tem tudi metoda primerna za ugotavljanje vsaj 1,33 mg amorfnosti v vzorcu.



Slika 13: Vpliv mase amorfa na kristalizacijo nifedipina



Slika 14: Termogram spreminjanja toplotnega toka pri kristalizaciji različnih mas amorfnega nifedipina.

Preglednica V: Točnost meritev pri analizi različnih mas amorfnega nifedipina.

Dejanska masa (mg)	Entalpija (J)	Izračunana masa (mg)	Točnost (%)
1,33	0,0636	1,31	98,2
2,60	0,1212	2,39	92,0
5,90	0,3278	6,29	106,6
11,16	0,5780	11,01	98,7
21,45	1,1919	22,59	105,3
40,43	2,3599	43,05	106,5
52,09	2,7978	50,74	97,4
61,17	3,2650	58,95	96,4
81,95	4,2129	75,61	92,3
101,60	5,5858	99,74	98,2
202,60	11,6661	206,60	102,0

4.1.4 Vpliv homogenosti vzorca

Ker smo želeli preveriti vpliv priprave vzorca na rezultate analize, smo izvedli poskus, v katerem smo proučevali tri različno homogene vzorce amorfa, in sicer nemlet amorf (nekaj večjih kosov), grobo mlet amorf (s spatulo) in fino mlet amorf v ahatni terilnici. Entalpija kristalizacije je pri nemlem amorfu večja kot pri mlem amorfu. Zmanjšana entalpija pri mlem amorfu je lahko posledica pretvorbe amorfne oblike v kristalno. Zlasti je to opazno pri fino mlem amorfu, kjer je entalpija najmanjša, kar kaže na to, da je del amorfa že kristaliziral (Preglednica VI).

Preverjali smo tudi položaj amorfa v binarnih zmesih in ugotovili, da pride do razlik med vzorci z različnimi položaji amorfa (zgoraj, spodaj, pomešan). Pri vzorcu, kjer je amorf zgoraj v celici (spodaj je kristalen nifedipin) je entalpija največja (24,8 J/g), pri binarni zmesi, kjer je amorf spodaj v celici, kristalen nifedipin pa zgoraj, je entalpija najmanjša (21,6 J/g). V primeru, ko sta amorfen in kristalen nifedipin pomešana je entalpija sicer manjša kot v prvem primeru, vendar razlika ni velika oziroma je znotraj eksperimentalne napake. To dejstvo smo pri nadaljnjem delu uporabili za lažjo pripravo vzorca. Vzorce smo

pripravljali tako, da smo neposredno v mikrokalorimetrično celico najprej natehtali kristalen in nato amorfen nifedipin. Vzorca ni bilo treba pripravljati posebej v posodici, ga mešati in nato prenesti v celico (Preglednica VII).

Preglednica VI: Vpliv homogenosti vzorca na kristalizacijo (μC).

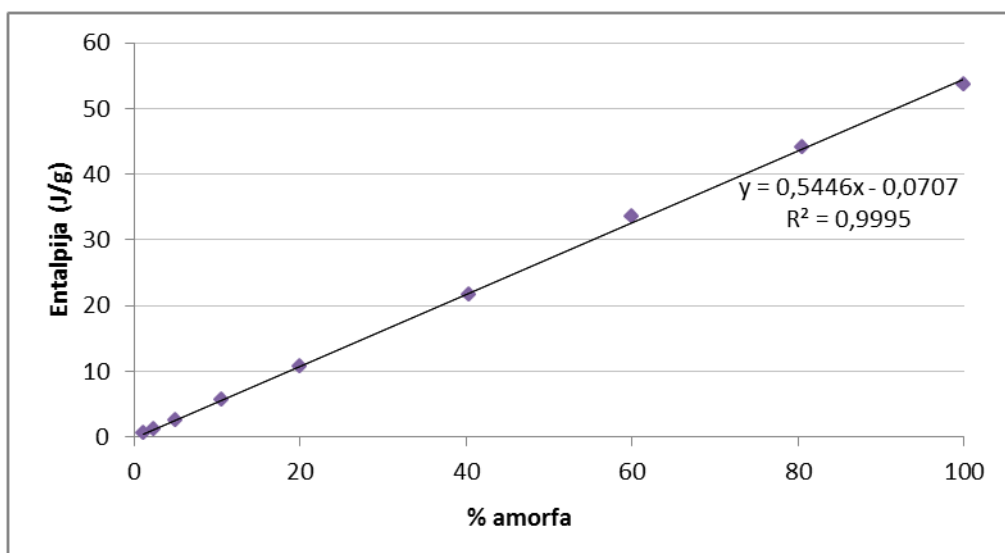
Amorf	Kristalizacijska entalpija (J/g)
Nemlet	56,2
Grobo mlet	53,7
Fino mlet	49,7

Preglednica VII: Vpliv položaja amorfa v celici na kristalizacijo (μC).

Položaj amorfa	Kristalizacijska entalpija (J/g)
Zgoraj	24,8
Pomešan	23,6
Spodaj	21,6

4.1.5 Vpliv binarnih zmesi na kvantifikacijo amorfnega nifedipina

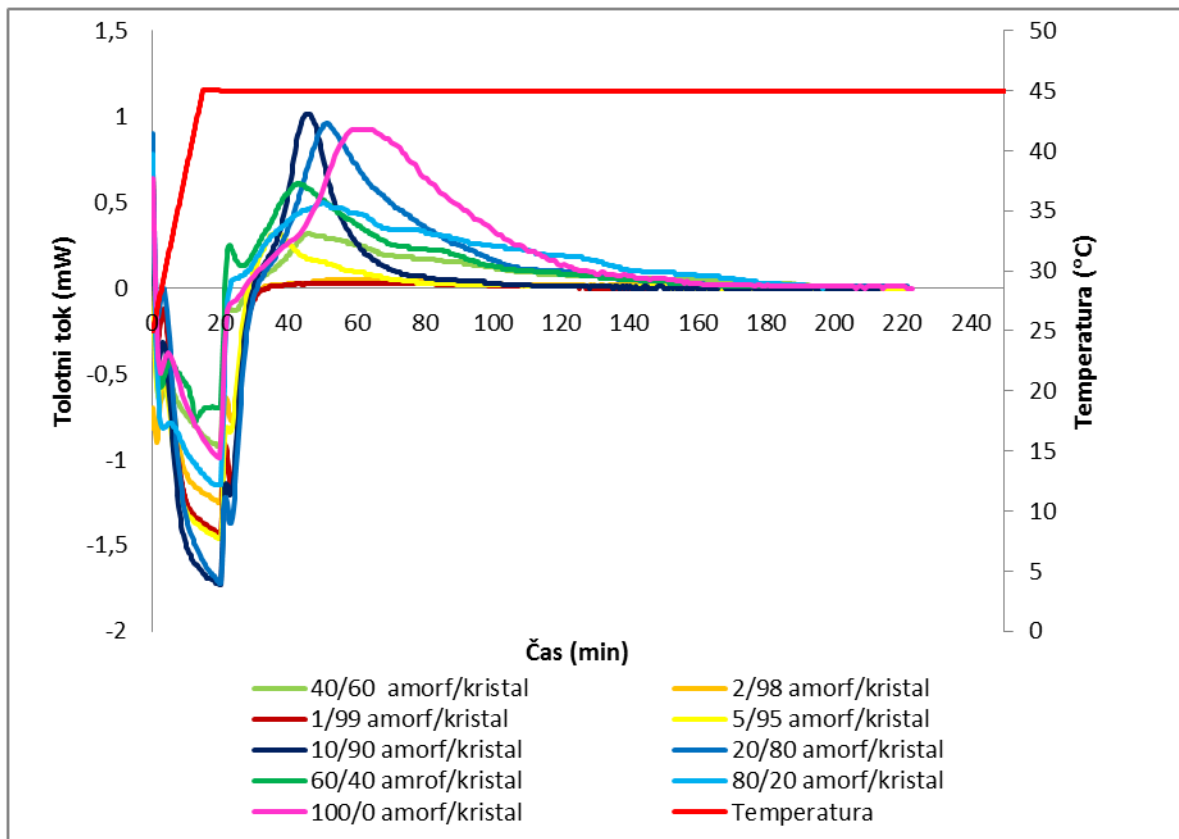
Ker smo želeli preveriti tudi, kako se obnaša amorfen nifedipin v prisotnosti kristalnega, smo izmerili kristalizacijske entalpije binarnim zmesem amorf/kristal. Kot je razvidno iz grafa (Slika 15), nam binarne zmesi podajo zelo linearno odvisnost ($R^2 = 0,9995$). Entalpije kristalizacije amorfa v binarni zmesi so primerljive z entalpijo kristalizacije samega amorfa, kar je razvidno iz primerjave naklona premic (Sliki 13 in 15).



Slika 15: Linearnost entalpije kristalizacije v odvisnosti od deleža amorfa v binarni zmesi.

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da v vzorcu lahko ugotovimo vsaj 1 % amorfnega nifedipina. Glede na vpliv mase amorfa na kvantifikacijo amorfnega nifedipina (glej 4.1.3 Vpliv mase amorfa na kvantifikacijo amorfnega nifedipina), kjer smo kot najnižjo maso vzorca ugotovili 1,33 mg, lahko hipotetično trdimo, da bi v primeru analize večje mase vzorca (na primer 250 mg) ugotovili približno 0,5 % amorfa v binarni zmesi. Ta meja je lahko še nižja, če povečamo maso analiziranega vzorca. Ti podatki nam dokazujejo, da je μ C metoda zelo občutljiva metoda za ugotavljanje amorfnosti.

V primerjavi z drugimi metodami je μ C metoda najbolj občutljiva. Z XRPD lahko v vzorcu ugotovimo med 5 in 10 %, z IR metodo približno 1 do 2 %, z DSC pa prav tako približno 5 % amorfa (2).



Slika 16: Termogram kristalizacije amorfnega nifedipina v binarni zmesi.

Iz slike 16 je razvidno, da je začetek kristalizacije pri vseh testiranih binarnih zmesih dovolj zakasnen in da so pogoji, pri katerih smo izvajali meritev, ustrezni. Trajanje kristalizacije se daljša z večanjem deleža amorfa v zmesi.

Iz prikazanih rezultatov je razvidno, da je optimizirana mikrokalorimetrična metoda primerna za vrednotenje amorfnosti nifedipina, tudi v binarnih zmesih.

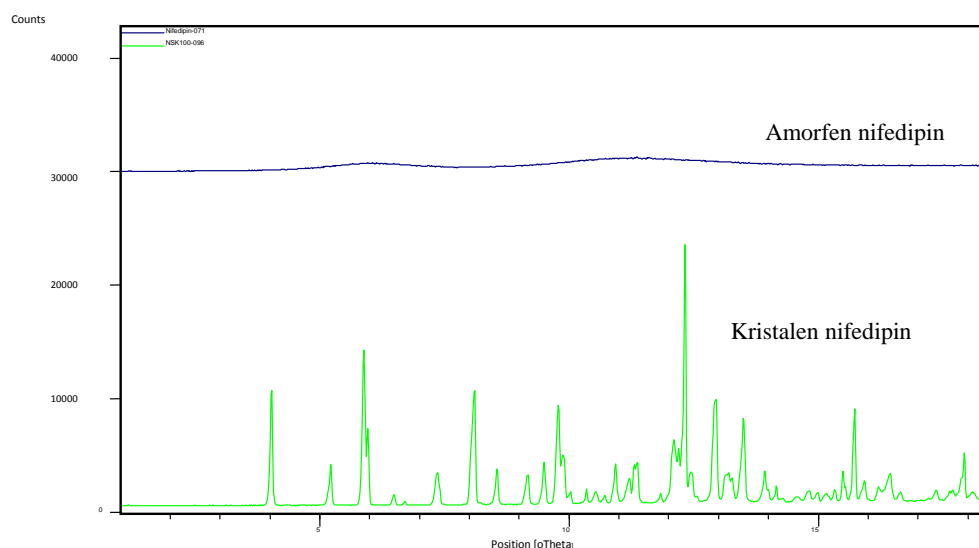
4.2 PRIDOBIVANJE AMORFA

V okviru diplomske naloge smo za proučevanje amorfnosti nifedipina izbrali tri načine pridobivanja amorfnih oblik spojin (taljenje in zamrzovanje, mletje, liofilizacija).

Največkrat v te namene uporabljamo taljenje in zamrzovanje. Zato smo sprva izbrali ta način in ga dodatno ovrednotili z XRPD in opazovanjem pod mikroskopom.

4.2.1 Taljenje in zamrzovanje

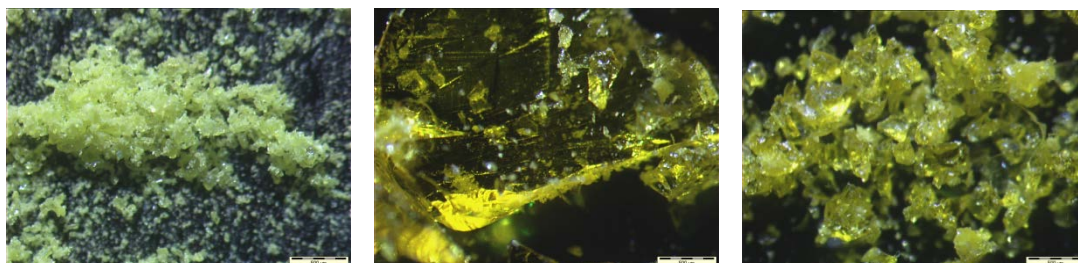
Amorf, pridobljen s QC, smo mikrokolorimetrično ovrednotili (55,3 J/g) ter rezultate primerjali z literaturnimi podatki (58–62 J/g) (22). Glede na rezultate smo sklepali, da smo najverjetneje s QC pridobili zelo čist amorf. To smo želeli preveriti še z XRPD metodo, s katero smo potrdili, da je amorf, ki smo ga pridobili s QC metodo, v celoti v amorfni obliki oziroma da ne vsebuje kristalnega deleža. Iz slike 17 je razvidno, da je nifedipin v amorfni obliki, saj vzorec ne da nobenega uklonskega maksimuma, ki so sicer značilni za kristalne strukture.



Slika 17: XRPD analiza kristalnega in amorfnega nifedipina.

Dodatno smo vizualno z mikroskopom preverili razliko med amorfnim in kristalnim nifedipinom. Na sliki 18 je med njima opazna značilna razlika. Opazi pa se podobnost med raztaljenim in amorfnim nifedipinom. Preverili smo namreč tudi možnost pridobivanja amorfa brez uporabe tekočega dušika. Tako pripravljen nifedipin smo dali v eksikator, priklopljen na vodno črpalko, da se je ohladil na sobno temperaturo. Preverili smo

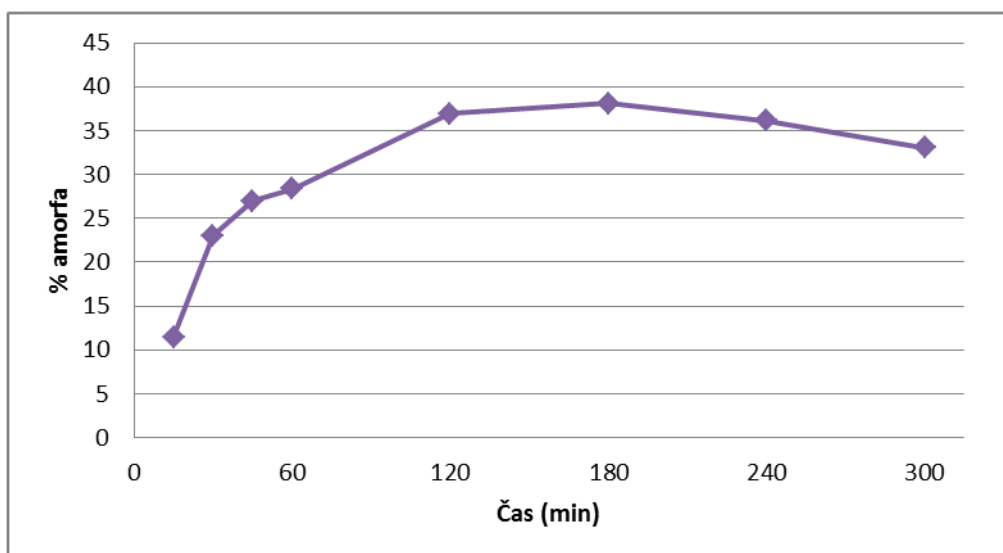
kristalizacijsko entalpijo tako pripravljenega nifedipina in dobili primerljive vrednosti (53,4 J/g) kot pri klasičnem QC postopku. Vseeno smo se odločili, da v nadaljevanju uporabljamo tehniko QC, saj večina dostopne literature opisuje ravno to tehniko (13).



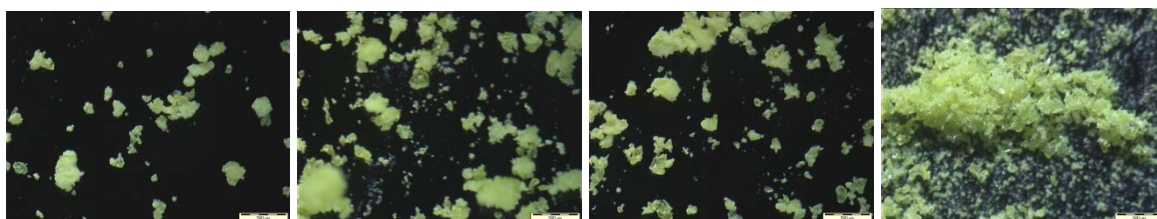
Slika 18: Pogled na različne oblike nifedipina skozi mikroskop, pri povečavi 40000 (levo: kristalen nifedipin, sredina: raztaljen nifedipin, desno: amorf, pridobljen s QC).

4.2.2 Mletje

Rezultati vrednotenja amorfa, pridobljenega z mletjem, so pokazali približno tri krat nižjo kristalizacijsko entalpijo v primerjavi z amorfom, pridobljenim s QC. To kaže na slabšo uspešnost pridobivanja amorfa s tem načinom. Kristalizacijska entalpija je med mletjem naraščala do časa 180 min, nato pa je začela padati (Slika 19). Pri mletju gre za mehansko silo, ki povzroči nastanek amorfa zlasti na površini snovi. Bolj, ko se z mletjem zmanjšujejo delci, bolj se povečuje površina, ki je na voljo za amorfizacijo. Vendar se je v našem primeru izkazalo, da se po določenem času amorfizacija konča. Razlog je lahko ta, da se manjšanje delcev ustavi. Amorfna oblika se je očitno začela pretvarjati v kristalno. Kot najbolj primeren čas mletja smo zato izbrali 180 min. Tako pripravljen amorf smo kasneje vrednotili v stabilnostni študiji. Z mletjem pridobljen amorf smo tudi preverili pod mikroskopom in opazili podobnost med amorfom, ki je nastajal med mletjem in kristalnim nifedipinom. Vzrok za to je najverjetneje nizek delež amorfa, ki nastane z mletjem (Slika 20).



Slika 19: Vpliv časa mletja na nastanek amorfa.



Slika 20: Primerjava kristalnega in amorfnega nifedipina pridobljenega z mletjem, pri povečavi 40000 (od leve proti desni: mletje 1h, mletje 2 h, mletje 3 h, kristalen nifedipin).

4.2.3 Liofilizacija

S tem postopkom nam pri izbranih pogojih ni uspelo pridobiti amorfnega nifedipina. Z bolj poglobljenim pristopom, na primer s spremembo pogojev (topilo, T), bi morda lahko dosegli amorfnost nifedipina, vendar to ni bil ključen namen te naloge.

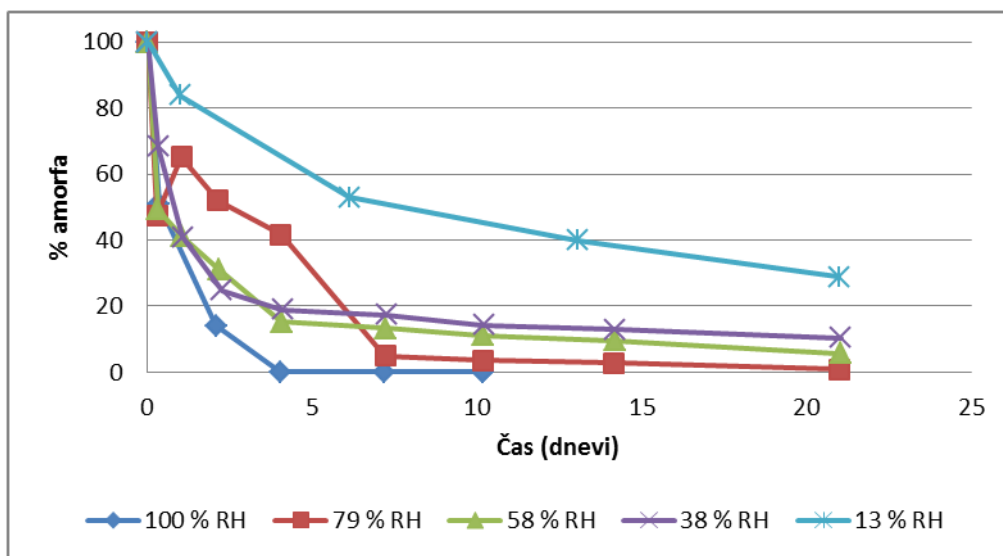
Glede na dobljene rezultate pridobivanja amorfnega nifedipina smo se odločili, da kot izbrano metodo uporabimo taljenje in zamrzovanje. Ta metoda se je izkazala za najbolj učinkovito, preprosto in časovno ugodno. Vsebnost amorfa, pridobljenega po QC metodi je 100 % in nekajkrat večja kot pri mletju.

4.3 TESTIRANJE STABILNOSTI AMORFA

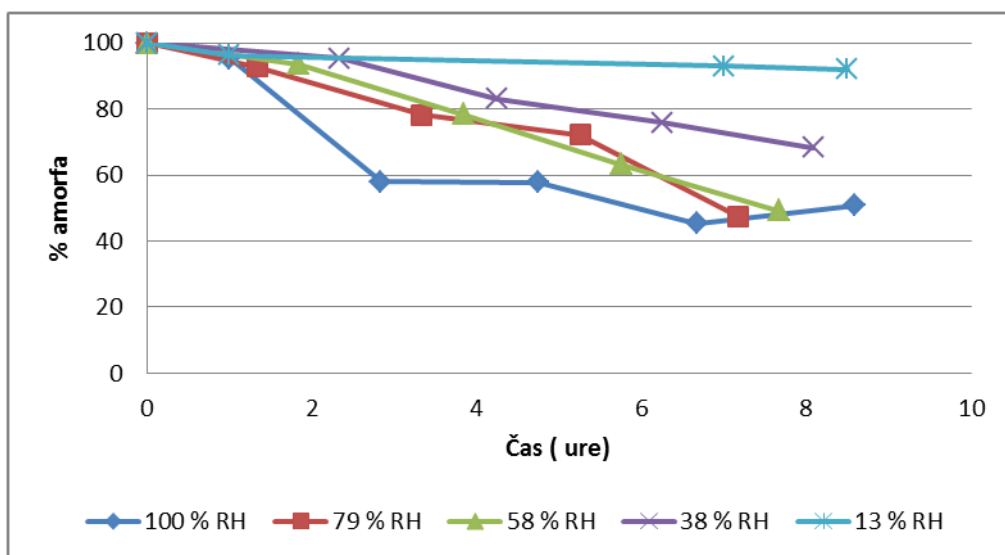
Stabilnost je pomemben parameter v vseh fazah pridobivanja končne farmacevtske oblike, tako pri vhodnih surovinah kot pri končnem izdelku. S testiranjem stabilnosti lahko ugotovimo, po kolikem času bo snov ostala nespremenjena, oziroma po kolikem času nastajajo spremembe, ki pa še ustrezajo predpisom. Amorfna oblika ima večjo notranjo energijo kot kristalna, kar pomeni, da lahko različni fizikalni procesi povzročijo spremembe v stabilnosti, ki pa vplivajo na razvoj izdelkov, proizvodnjo in rok uporabnosti. Ravno zaradi tega v praksi več uporabljamo kristalne snovi, ki so bolj stabilne in bolj predvidljive. Pri naših testiranjih je bil glavni namen ugotoviti ali se amorfnost nifedipina ohrani skozi določeno časovno območje. S potencialno ohranitvijo amorfности bi bila takšna oblika učinkovine primerna za terapevtsko uporabo (13).

4.3.1 Vpliv vlage na stabilnost

Vlaga, kot eden ključnih dejavnikov pretvorbe amorfa v kristalno obliko, se je tudi v primeru nifedipina izkazala kot zelo pomembna. Rezultati stabilnostne študije pri različnih relativnih vlažnostih pri sobni temperaturi so predstavljeni na slikah 21 in 22.



Slika 21: Upad amorfnega nifedipina v 21 dneh pri različnih RH shranjevanja in 25 °C.



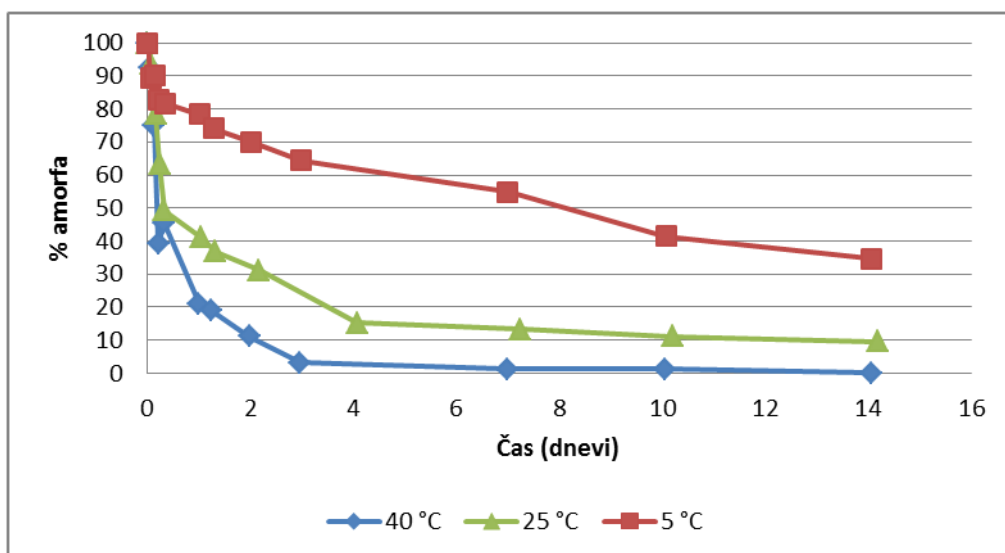
Slika 22: Upad amorfnega nifedipina v prvih 9 urah pri različnih RH shranjevanja in 25 °C.

Iz grafov je razvidno, da se je največji delež amorfa ohranil pri shranjevanju pri najnižji RH, saj je v prvih 9 urah delež amorfa še vedno nad 90 %, po 21 dneh pa je prisotnega še približno 30 % amorfa. Pri drugih razmerah shranjevanja je delež amorfa zelo upadel. Najbolj seveda pri shranjevanju pri 100 % RH. Pri teh razmerah je delež amorfa že v prvih 9 urah padel pod 50 %, po samo 4 dneh shranjevanja pri teh razmerah pa amorfa ni bilo več prisotnega. Na približno 50 % amorfa je v prvih 9 urah padla vsebnost tudi pri shranjevanju pri 79 % in 58 % RH. Pri 79 % RH po 21 dneh amorfa ni bilo več prisotnega, pri 58 % RH pa ga je ostalo le še okrog 5 %. Pri 38 % RH je bilo po 9 urah prisotnega nekaj manj kot 70 % amorfa, po 21 dneh pa približno 10 % amorfa.

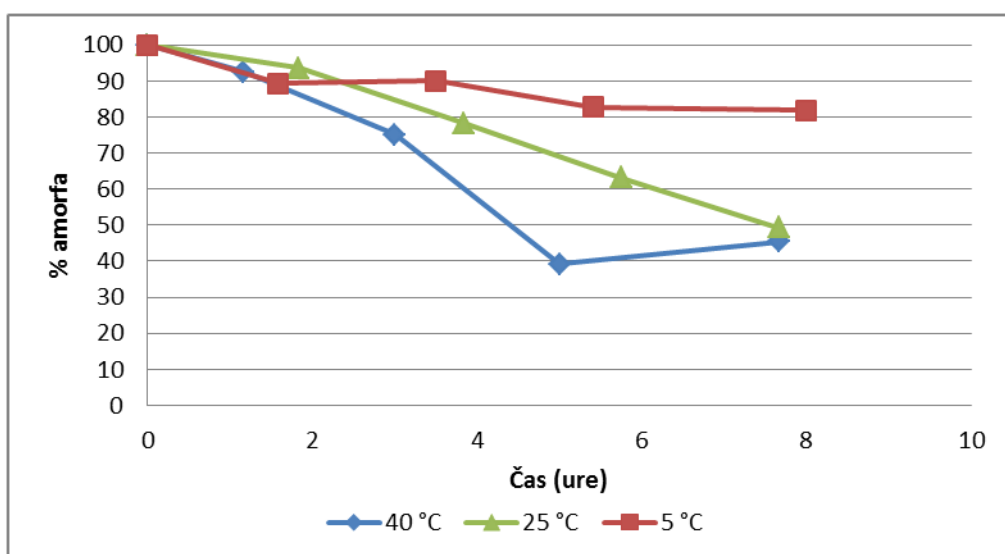
Delež amorfnega nifedipina se torej zmanjšuje sorazmerno z višanjem RH, pri kateri smo shranjevali amorf. Pri normalnih razmerah shranjevanja ($T = 25 \text{ °C}$, $RH = 60 \text{ %}$) je amorfnega oblika nifedipina nestabilna.

4.3.2 Vpliv temperature na stabilnost

Poleg vlage ima tudi temperatura pomemben vpliv na obstoj amorfa. Vpliv temperature smo proučevali pri relevantnih razmerah shranjevanja (28). Rezultati stabilnostne študije shranjevanja pri različnih temperaturah so vidni na slikah 23 in 24.



Slika 23: Upad amorfnega nifedipina v 14 dneh pri različnih temperaturah shranjevanja in RH = 60 %.



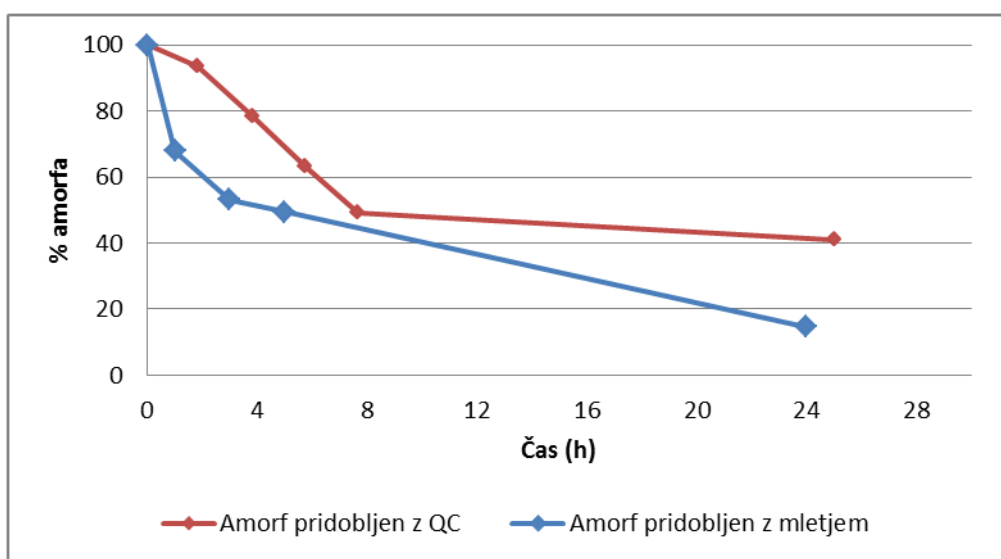
Slika 24: Upad amorfnega nifedipina v prvih 8 urah pri različnih temperaturah shranjevanja in RH = 60 %.

Delež amorfa v vzorcu je padal sorazmerno z višanjem temperature shranjevanja vzorcev. Pri temperaturi 5 °C je delež amorfa v prvih 8 urah padel na približno 80 %, po dveh tednih pa je bil še vedno nad 30 %. Pri 25 °C in pri 40 °C je bil delež amorfa v prvih 8 urah okrog

50 %. Po 14 dneh je vsebnost amorfa pri sobni temperaturi padla na okrog 10 %, pri 40 °C pa po dveh tednih amorfa ni bilo več prisotnega.

4.3.3 Vpliv načina pridobivanja amorfa na stabilnost

Primerjali smo stabilnost amorfa, pridobljenega s QC in mletjem. Amorf smo shranjevali pri definiranih dolgoročnih razmerah testiranja stabilnosti (60 % RH in 25 °C).



Slika 25: Upad deleža amorfnega nifedipina, pridobljenega z mletjem in QC, v prvih 24 urah (60 % RH in 25 °C).

Rezultati nam kažejo, da je po približno 7 urah delež amorfa pri obeh načinih priprave padel na približno 50 % (Slika 25). Vsebnost amorfa pridobljenega z mletjem, se je zmanjševala hitreje kot vsebnost amorfa, pridobljenega s QC. Ugotovili smo, da je amorf, pridobljen s QC, bolj stabilen od amorfa pridobljenega z mletjem.

Vsi podatki o stabilnosti, ki smo jih pridobili z našim testiranjem, kažejo na to, da je amorfen nifedipin nestabilen. Največja stabilnost se pokaže pri zelo nizkih T ali nizki RH (na primer 30 % nespremenjene amorfnе oblike po 3 tednih pri 13 % RH in 25 °C), ampak tudi ta obstojnost ni zadovoljiva za končno farmacevtsko obliko, posebno pa ne pri učinkovini, ki služi za kronično terapijo.

5 SKLEP

- Vpeljali smo mikrokalorimetrijo kot metodo za vrednotenje amorfности nifedipina:
 - Optimizirali smo pogoje, pri katerih smo izvajali meritve na mikrokalorimetru. Optimizirani pogoji so: $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{RH} = 80\text{ }%$.
 - Masa amorfa v vzorcu ne vpliva na rezultat meritve, kristalizacijska entalpija (J) narašča sorazmerno z maso amorfa ($R^2 = 0,9978$).
 - Z mikrokalorimetrom smo ugotovili od 1 do 200 mg amorfa v vzorcu.
 - Meja določitve je vsaj 1,33 mg.
 - Delež ugotovljenega amorfa v binarni zmesi je lahko 1 % ali celo pod 0,5 % pri analizi večje mase vzorca.
 - Položaj amorfne in kristalne oblike v binarnem vzorcu ne vpliva na rezultat.
 - Dodatna manipulacija vzorca pred meritvijo (zmanjševanje velikosti delcev amorfa) zmanjšuje entalpijo kristalizacije.
- Z metodo taljenja in zamrzovanja smo pridobili 100 % amorf. Z mletjem smo pridobili le 38 % amorfne nifedipina, z liofilizacijo pa nismo uspeli pridobiti amorfne nifedipina.
- Pri testiranju stabilnosti amorfne nifedipina smo ugotovili, da:
 - Vlaga vpliva na stabilnost amorfa. Pri nižji vlagi (13 % RH) se amorfno stanje deloma ohrani tudi do 45 dni, pri 100 % RH pa amorf kristalizira že v enem dnevu.
 - Temperatura ima vpliv na obstoj amorfa, in sicer se z višanjem temperature shranjevanja obstojnost amorfa zmanjšuje.
 - Način priprave amorfa vpliva na stabilnost le tega. Delež amorfa, pridobljenega z mletjem, se je v prvih 24 urah zmanjšal za več, kot pa delež amorfa, pridobljen s taljenjem in zamrzovanjem.
- Amorfni nifedipin ni stabilen tudi pri shranjevanju pri zelo nizki relativni vlažnosti in temperaturi in torej ni primeren za uporabo v terapevtske namene.

6 LITERATURA

1. Hancock B.C., Zografi G., Characteristics and Significance of the Amorphous State in Pharmaceutical Systems, *J. Pharm. Sci.* 86, 1997, 1-12.
2. Shah B., Kumar Kakumanu V., Bansal K. A., Analytical Techniques for Quantification of Amorphous/Crystalline Phases in Pharmaceutical Solids, *J. Pharm. Sci.*, 95 (8), 2006, 1641-1665.
3. Vivoda M., Kvantifikacija amorfnosti substanc za farmacevtsko rabo na primeru nifedipina, Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2011.
4. <http://www.askwillonline.com/2013/10/the-structure-of-materials.html> (dostopano april 2012).
5. Mackin L., Zanon R., Park J. M., Foster K., Opalenik H., Demonte M., Quantification of low levels (< 10 %) of amorphous content in micronised active batches using dynamic vapour sorption and isothermal microcalorimetry, *Int. J. Pharm.* 23, 2002, 141-158.
6. Kralj S., Uporaba mikrokolorimetrije in tekočinske kromatografije v predformulacijskih študijah stabilnosti ramiprila, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2007.
7. Loftsonn T., *Drug Stability for Pharmaceutical Scientists*, 1st Ed, 2013, 1.
8. Carstensen J.T., Rhodes C.T., *Drug Stability* 3rd Ed, 2000, 3-7.
9. Turk A., Proučevanje kinetičnega vidika stabilnosti modelnih spojin z uporabo mikrokolorimetrije, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2005.
10. Vivoda M., Primerjalno testiranje stabilnosti izbranih modelnih spojin s HPLC metodo in mikrokolorimetrijo, Diplomaska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2004.
11. Aso Y., Yoshioka S., Otsuka T., Kojima S., The Physical Stability of Amorphous Nifedipine Determined by Isothermal Microcalorimetry, *Chem. Pharm. Bull.* 43, 1995, 300-303.
12. Kim J., Kim M., Park H., Jin S., Lee S., Hwang S., Physicochemical properties and oral bioavailability of amorphous atorvastatin hemi-calcium using spray-drying and SAS process, *Int. J. Pharm.*, 359, 1-2, 2008, 211-219.

13. Vivoda M., Roškar R., Kmetec V., The development of a quick method for amorphicity determination by isothermal microcalorimetry, *J. Therm. Anal. Calorim.* 105, 2011, 1023-1030.
14. Nagapudi K., Jona J., Amorphous Active Pharmaceutical Ingredients in Preclinical Studies: Preparation, Characterization, and Formulation, *Curr. Bioact. Compd.* 4, 2008, 213-224.
15. Trasi NS, Boerrigter SX, Byrn SR, Investigation of the milling-induced thermal behavior of crystalline and amorphous griseofulvin, *Pharm. Res.* 27(7), 2010, 1377-1389.
16. <http://www.xrpd.eu/> (dostopano maj 2015).
17. Buckton G., Darcy P., Assesment of disorder in crystalline powders – a review of analytical techniques and their application, *Int. J. Pharm.* 179, 1999, 141-158.
18. Planinšek O., Zajc N., Srčič S., Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji, *Farm. Vestn.* 52, 2001, 173-185.
19. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteindynamik/kalorimetrie.vlu/Page/vsc/de/ch/9/mac/polymere_werkstoff/molekulare_ordnung/glastemperatur/dsc.vscml.html (dostopano maj 2015).
20. Zajc N., Planinšek O., Srčič S., Diferenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature, *Farm. Vestn.* 52, 2001, 187-195.
21. Saunders M., Podluii K., Shergill S., Buckton G., Royall P., The potential of high speed DSC (Hyper-DSC) for the detection and quantification of small amounts of amorphous content in predominantly crystalline samples, *Int. J. Pharm.*, 274 (1–2), 2004, 35–40.
22. Aso Y., Yoshioka S., Kojima S., Feasibility of using isothermal microcalorimetry to evaluate the physical stability of amorphous nifedipine and phenobarbital, *Thermochim. Acta* 380, 2001, 199-204.
23. <http://de.wikipedia.org/wiki/Nifedipin> (dostopano maj 2015).
24. <http://si.draagle.com/#!/source/kya/?drug=kyb> (dostopano marec 2015).
25. http://moblog.whmsoft.net/related_search.php?keyword=Setaram+Micro+Dsc&language=english&depth=3 (dostopano maj 2015).
26. <http://profilab24.com/FRITSCH-PULVERISETTE-0-Vibratory-Micro-Mill> (dostopano maj 2015).

27. Greenspan L., Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solution, Journal of Research of the National Bureau of Standards – A, Physics and Chemistry, 81A, 1977.
28. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drug substance and products Q1A (R2), Current Step 4 version, dated 6 February 2003.