

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SUZANA SMREKAR

**PROUČEVANJE RAZTAPLJANJA AMORFNE IN KRISTALNIH
OBLIK KLARITROMICINA**

**STUDY OF DISSOLUTION OF AMORPHOUS AND CRYSTALLINE
FORM OF CLARITHROMYCIN**

Ljubljana, 2011

Praktično delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri na farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Odonu Planinšku za vso strokovno pomoč in nasvete tekom izvajanja naloge.

Posebna zahvala gre mojim staršem za razumevanje in podporo med študijem.

Hvala vsem, da ste mi pomagali pri doseganju ciljev.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Suzana Smrekar

Vsebina

1. Uvod.....	1
1.1. Kristali.....	1
1.1.1. Polimorfne oblike.....	4
1.1.2. Pseudopolimorfne oblike	6
1.1.3. Kokristali.....	6
1.2. Amorfne snovi.....	7
1.3. Metode izdelave amorfne oblike	7
1.3.1. Mletje	8
1.3.2. Liofilizacija	9
1.3.3. Sušenje z razprševanjem	9
1.3.4. Desolvatacija.....	11
1.3.5. Hitra ohladitev taline.....	11
1.3.6. Obarjanje kislin ali baz s spremembo pH.....	12
1.4. Amorfne snovi in njihove lastnosti	12
1.5. Topnost	12
1.5.1. Delitev učinkovin po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu (BCB)	14
1.6. Proučevanje raztapljanja zdravilnih učinkovin.....	15
1.6.1. Medij za raztapljanje	15
1.6.2. Aparature za preizkus raztapljanja	17
1.7. Klaritromicin	20
1.7.1. Fizikalno-kemijske lastnosti.....	21
1.7.2. Farmakodinamika.....	21

1.7.3. Spekter delovanja in terapevtske indikacije	21
1.7.4. Farmakokinetika	22
1.7.5. Polimorfizem klaritromicina	22
2. Namen dela	24
3. Eksperimentalno delo	25
3.1. Materiali	25
3.1.1. Uporabljeni instrumenti	25
3.1.2. Reagenti	25
3.1.3. Raztopine	26
3.1.4. Steklovina in ostali materiali	27
3.2. Mediji za raztapljanje	27
3.3. Metode dela	29
3.3.1. Priprava vzorcev	29
3.3.2. Termična analiza	29
3.3.3. Morfologija delcev z optično in elektronsko vrstično mikroskopijo (SEM)	30
3.3.4. Določitev velikosti delcev z lasersko difrakcijo	30
3.3.5. Določanje topnosti in hitrosti raztapljanja vzorcev klaritromicina	30
4. Rezultati in razprava	34
4.1. Termična analiza vzorcev klaritromicina	34
4.1.1. Termična analiza vzorcev klaritromicina pred raztapljanjem	34
4.1.2. Termična analiza vzorcev klaritromicina po raztapljanju	35
4.2. Morfologija delcev	36
4.3. Velikost delcev	37
4.4. Topnost klaritromicina v vodi	38
4.5. Profil raztapljanja klaritromicina	40
5. Zaključek	51

6. Literatura..... 53**Povzetek**

Številne zdravilne učinkovine so v vodi slabo topne, kar omejuje njihovo biološko uporabnost. Med takšne učinkovine prištevamo tudi klaritromicin, ki je po svojem delovanju širokospektralni antibiotik. Njegova biološka uporabnost je 50%, topnost pa zelo omejena. Obstaja v več kristalnih in amorfni obliki. V magistrski nalogi smo pripravili dva kristalna in dva amorfna vzorca klaritromicina. S prekristalizacijo klaritromicina iz etanola smo pripravili kristalno obliko I. S prekristalizacijo iz acetona smo pripravili kristalno obliko II. Amorfna vzorca smo izdelali s hitro ohladitvijo taline (amorfna oblika Q) ter s sušenjem z razprševanjem (amorfna oblika SD).

Tako pridobljene vzorce smo analizirali z različnimi tehnikami. Za potrditev kristalne oblike oziroma amorfnosti ter zunanje oblike kristalov smo uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Nato smo proučevali hitrost raztapljanja in topnost praškastih vzorcev v različnih vodnih medijih. Ugotovili smo, da je najboljša topnost v vodi topnost kristalne oblike I, najslabša pa amorfne oblike SD. Merili smo tudi velikosti delcev in specifično površino z lasersko difrakcijo.

V nadaljevanju smo najprej izbrali optimalen medij za raztapljanje, ki je omogočal razlikovanje vzorcev. V ta namen smo uporabili naslednje pufre: fosfatni pufer pH 6,8, acetatni pufer pH 5,0 in pH 6,6, ter 0,1 M klorovodikovo kislino. Poleg tega smo za proučevanje raztapljanja uporabili tudi vodne raztopine površinsko aktivne snovi. Vzorci klaritromicina so se najpočasneje raztapljali v pufru s pH 6,8 ter zelo hitro v 0,1 M klorovodikovi kislini. Vzorce v obliki praškov smo raztapljali v acetatnem pufru s pH 6,6. Najhitreje se je raztapljal vzorec kristalne oblike I, najpočasneje pa amorfne oblike SD, pri katerem smo opazili lepljenje vzorca na košarico in tvorbo aglomeratov, pri čemer je bila omočena le njihova površina.

Za zmanjšanje vpliva močenja na raztapljanje smo izdelali tudi tablete, ki so poleg klaritromicina vsebovale silicizirano mikrokristalno celulozo. Tudi v tem primeru se je

najhitreje raztapljala kristalna oblika I. Ugotovili smo, da izdelava tablet ni najboljša metoda za primerjavo vzorcev, saj je bila njihova razpadnost različna.

V nadaljevanju smo proučevali tudi intrinzično hitrost raztapljanja. Hitrost raztapljanja smo za začetek izvedli v acetatnem pufru pH 6,6, ker pa pri tem nismo dobili zadovoljivih rezultatov smo omenjeno raztapljanje izvedli še v acetatnem pufru pH 3,7.

Izvedli smo tudi raztapljanje praškastih vzorcev v zmesi z nanodelci titanovega dioksida. Tudi v tem primeru se je najbolje raztapljala kristalna oblika I, poleg nje pa enako hitro še amorfna oblika pridobljena s hitrim ohlajanjem taline. Predpostavljamo, da so nanodelci obdali delce zdravilne učinkovine in tako izboljšali močenje, zaradi česar se je povečala površina učinkovine, ki je v stiku s topilom in tako tudi njeno raztapljanje.

Za interpretacijo rezultatov testov raztapljanja smo z lasersko difrakcijo izmerili velikosti delcev in specifično površino vzorcev klaritromicina. Kristalna oblika I ima najmanjše delce in prav tako se tudi najhitreje raztaplja, tako v primeru praškov, kot v primeru tablet. Neskladni pa so rezultati za klaritromicin Q, ki ima največje delce (majhno specifično površino), glede na študije hitrosti raztapljanja praškov pa je drugi najbolje topen vzorec klaritromicina.

Seznam okrajšav

DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
FO	farmacevtska oblika
GIT	gastrointestinalni trakt
HPMC	hidroksipropilmetil celuloza
IR	infrardeča spektroskopija
IDR	intrinzična hitrost raztapljanja
IVIVC	<i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> korelacija
KMC	klaritromicin
log P	porazdelitveni koeficient (oktanol/voda)
MM	molekulska masa
NaLS	natrijev lavril sulfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PVP	polivinilpirolidon
Ph.Eur	Evropska farmakopeja (European Pharmacopoeia)
pKa	negativni logaritem konstante disociacije (merilo za jakost kisline ali baze)
SEM	vrstični elektronski mikroskop
TG	termogravimetrija
USP	Ameriška farmakopeja (United States Pharmacopoeia)
vrt / min	vrtljajev na minuto
% m/v	masno - volumski odstotek

1. Uvod

1.1. Kristali

Farmakokinetične lastnosti zdravilne učinkovine so pogosto odvisne od njenih fizikalno-kemijskih lastnosti. Posamezna zdravilna učinkovina lahko obstaja v različnih oblikah kot so soli, različne pojavne oblike (polimorfne, psevdopolimorfne in amorfne oblike), katerih kemijske in fizikalne lastnosti se po navadi bistveno razlikujejo.

Večina trdnih snovi obstaja v kristalni obliki. Splošno lahko rečemo, da so v kristalih atomi, molekule in ioni prostorsko periodično razporejeni. V poljubni smeri kristala so enaki gradniki na enakih razmikih; vsak gradnik v kristalu ima identično okolico in identično razporeditev sosednjih gradnikov (1). Kristali izkazujejo globalno urejenost in sicer v dimenzijah, ki so mnogo večje od medatomske razdalje (2). V kristalu so atomi, ioni ali molekule geometrijsko urejeni po povsem določenih zakonitostih. Zunanje ploskve kristalov določene snovi oklepajo vselej enake kote, na velikost ploskev pa vplivajo pogoji, pri katerih kristal nastaja. Pravilna zunanja oblika kristalov je posledica pravilne notranje zgradbe. Ravne zunanje ploskve kristala nastanejo kot posledica počasnejše rasti kristala v smereh, ki so pravokotne na te ploskve (1,2). Za razliko od kristalov so v amorfni snovi gradniki razporejeni brez reda.

Nastanek kristalov

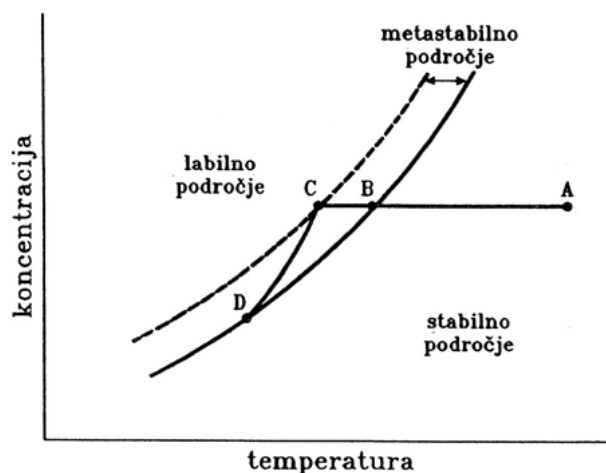
Za kristalizacijo je potrebno doseči tri osnovne pogoje:

- a) prenasíčenje sistema,
- b) nastanek kristalizacijskih jeder (nukleacija),
- c) rast kristalov.

Prenasičenje sistema

Gonilna sila nukleacije in rasti kristalov je razlika v kemijskem potencialu topljenca v prenasíčeni raztopini (μ_{neq}) in v nasičeni raztopini (μ_{eq}). Raztopina je prenasíčena takrat, ko je kemijski potencial (μ) trdne faze v raztopini nižji od kemijskega potenciala raztopljene komponente pri določenih pogojih (tlak, temperatura).

Prenasičenje lahko dosežemo na več načinov: z izparevanjem topila, ohlajevanjem, dodatkom tretje komponente, ki zmanjšuje topnost topljenca ali kemično reakcijo v topilu, katere rezultat je produkt z majhno topnostjo (3). Mierjev diagram (slika 1) prikazuje regije z različno termodinamsko stabilnostjo raztopine kot funkcijo temperature.



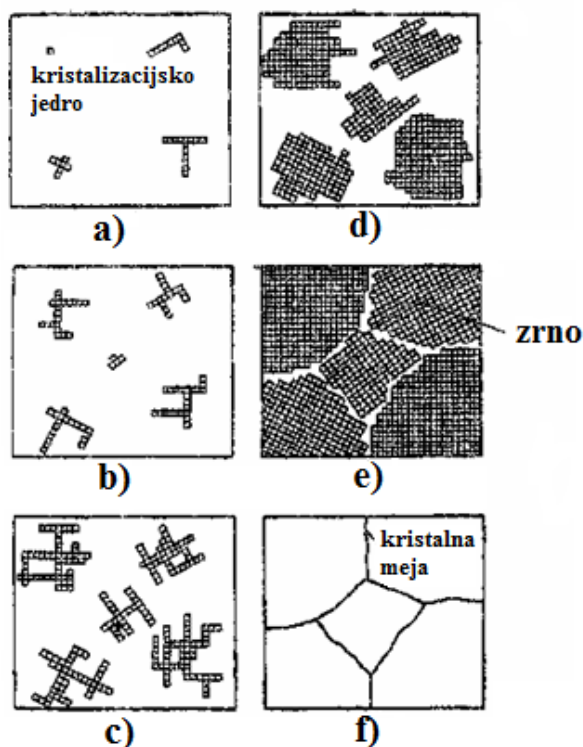
Slika 1: Mierjev diagram (3).

Sistem je v točki A nenasičen. Če raztopino ohlajamo, le-ta postane nasičena v točki B in preide v metastabilno tekočo fazo. Spontana kristalizacija se prične šele ko prečkamo metastabilno področje v točki C in poteka dokler se ne vzpostavi novo ravnotežno stanje (točka D). V raztopini v metastabilnem stanju hitreje poteka rast kristalov kot nukleacija (3).

Prenasičeno raztopino dobimo takrat, kadar je zračna vlažnost okoli nasičene raztopine manjša od kritične, tako da topilo iz raztopine lahko izhlapeva. Raztopina je nasičena tedaj, ko se pri dani temperaturi v njej ne more raztopiti nič več topljenca (4).

V talini imajo delci precejšnjo gibalno energijo. Pri ohlajanju taline je energija gibanja delcev vedno manjša. Zmanjšujejo se tudi medatomske razdalje. Delci z manjšo energijo se najprej približajo drug drugemu in to tako, da začnejo med njimi vladati sile, ki jih držijo v takšni razdalji, ki pomeni najmanjši energijski nivo, obenem pa je to razdalja med središči delcev elementarne celice. Tako nastane kristalizacijsko jedro. V tem redu, kot se je uredilo kristalizacijsko jedro, se začnejo urejati zdaj še ostali delci taline, ki se ohlaja. Dobimo kristal. Za nastanek kristala potrebujemo torej kristalizacijsko jedro. Ta nastane na najhladnejšem mestu. Smer rasti kristala je določena s postavitvijo jedra. Ker raste več kristalov naenkrat, se zadevajo drug v drugega, s čimer se nadaljnja rast kristalov ustavi.

Tako nastale kristale imenujemo kristalna zrna, ki so na splošno v prostoru različno orientirana (slika 2). Snov, ki je sestavljena iz kristalov, imenujemo kristalit ali polikristal. Kristalna zrna so med seboj ločena s kristalnimi mejami. Tu preide orientacija kristalne mreže enega kristala (zrna) v orientacijo kristalne mreže drugega zrna. Kristali v mejnih prostorih so deformirani. V teh prostorih so lahko odloženi tudi delci snovi, ki niso vključeni v osnovno kristalno mrežo. Velikost kristalov (zrn) v nekem aglomeratu je odvisna od števila kristalizacijskih jeder. Če nastane samo eno kristalizacijsko jedro in se iz njega razvije enako orientiran kristal v celotnem prostoru, govorimo o monokristalu. Če delec ohladimo počasi, potem je malo mest z nižjo temperaturo in tako ni veliko možnosti za nastanek kristalizacijskih jeder. Nastane majhno število kristalizacijskih jeder, aglomeriran kristal ima velike kristale. Rečemo, da je kristal grobozrnat. Pri veliki hitrosti ohlajanja nastane istočasno več kristalizacijskih jeder. Na ta način dobimo veliko število majhnih kristalov in je aglomeriran kristal fino zrnat. Seveda je velikost kristalov odvisna tudi od hitrosti rasti kristala. V talino lahko damo tudi dodatke (drobne kristale), ki pospešujejo nastanek kristalizacijskih jeder. Govorimo o "cepljenju" taline (2).



Slika 2: Prikaz rasti kristalov: a) kristalizacijsko jedro, b), c) in d) migracija delcev proti želeni lokaciji (jedru) ter združevanje, e) nastanek kristalov (kristalnih zrn), f) med sabo ločeni kristali s kristalnimi mejami (2).

S posebnimi postopki lahko spremenimo kristalno strukturo snovi: govorimo o prekrystalizaciji. Nadzor nad kristalizacijo je ključnega pomena v procesu pridobivanja farmacevtskih materialov. Velikost in oblika delcev zdravilne učinkovine in pomožnih snovi je bistvenega pomena za nadaljnje postopke pri razvoju in proizvodnji zdravil. Na njiju lahko vplivamo s spremembo pogojev (temperaturo, pH vsebnostjo ali dodatkom nečistot) (2). Hitrost ohlajanja raztopine v procesu kristalizacije, preko stopnje prenasičenja, vpliva na hitrost nukleacije in hitrost rasti kristalov, ter s tem na velikost kristalov. Če povečamo hitrost ohlajanja se zmanjša velikost kristalov zaradi nepopolne rasti večjega števila majhnih kristalov. Nižja temperatura povzroči večje prenasičenje, ki vodi do pospešene nukleacije in s tem nastanek večjega števila manjših kristalov (5). Nukleacija je v primerjavi z rastjo kristalov hitrejši proces (2).

Nasprotno pa se pri nizki stopnji prenasičenja zmanjša hitrost nukleacije, kar vodi do podaljšane in postopne rasti kristalov in posledično do večjih kristalov (5). Zaviranje procesa kristalizacije med prekrystalizacijo je učinkovito s stališča pridobivanja različnih oblik farmacevtskih učinkovin. Kristalizacijo lahko zaustavimo z spremembo temperature (zaustavimo hlajenje, saj je število nastalih kristalizacijskih jeder v sorazmerju s podhladitvijo materiala) (2).

1.1.1. Polimorfne oblike

Polimorfizem je sposobnost substance, da se v trdnem stanju nahaja v dveh ali več kristalnih oblikah, ki imajo različno ureditev in/ali konformacijo molekul v kristalni rešetki. Polimorfi izkazujejo enake lastnosti v raztopini in plinastem stanju, v trdni obliki pa se razlikujejo, čeprav so kemijsko identični. To lahko signifikantno vpliva tako na fizikalno-kemijske, formulacijske in procesne parametre kot tudi na rok uporabe (stabilnost) zdravilne učinkovine, pomožnih snovi in končnega izdelka.

Prvi, ki naj bi se zavedal polimorfizma, je bil Klaproth, ki je že leta 1788 ugotovil, da kalcijev karbonat kristalizira kot kalcit in kot argonit. Kasneje, leta 1809, je Davy opozoril, da sta diamant in grafit obliki ogljika, ki se razlikujeta le po ureditvi ogljikovih atomov v trdnem stanju. Mitscherlich pa je bil prvi, ki je leta 1822 uporabil pojem polimorfizem pri preučevanju sulfatov nekaterih kovin. Prva organska spojina, pri kateri so ugotovili polimorfizem, je bil benzamid (6). Pregled v »Cambridge Structural Database (CSD) iz

leta 2002 kaže na pojav več kot 250.000 znanih kristalnih struktur spojin s predvidevanjem, da bo do leta 2011 znanih že več kot 500.000 polimorfni struktur.

Znanstveniki predvidevajo, da je večina (če ne vsi) elementov in kemijskih spojin podvržena polimorfizmu. Pregled po posameznih terapevtskih skupinah farmacevtskih učinkovin kaže pojav polimorfizma pri 70 % barbituratov, pri 60 % sulfonamidov, 23 % steroidov itd. (8). Pregled zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi v Evropski farmakopeji (Ph.Eur.) pokaže, da več kot polovica (56 %) spojin v trdnem stanju obstaja v različnih polimorfni oblikah (polimorfi, hidrati ali solvati), 42 % le v eni kristalnih obliki (monomorfi), 2 % pa jih nastopa v amorfni obliki (9). O pogostnosti pojavljanja zdravilnih učinkovin v različnih kristalnih oblikah govori mnogokrat uporabljeni citat Walterja C. Mcroneja, Chicago 1965, ki se glasi: število kristalnih oblik je odvisno le od časa in denarja, porabljenega za njihovo iskanje. Lastnosti, po katerih se polimorfi lahko razlikujejo med sabo, so naslednje (8):

- lastnosti, ki so posledica notranje ureditve strukture: molski volumen in gostota, lomni količnik, električna in toplotna prevodnost, higroskopnost,
- termodinamske lastnosti: temperatura tališča in pogoji sublimacije, notranja energija, entalpija, toplotna kapaciteta, kemijski potencial, entropija, prosta energija, parni tlak nad trdno snovjo, topnost,
- spektroskopske lastnosti: elektronski prehodi, vibracijski prehodi, rotacijski prehodi...,
- kinetične lastnosti: hitrost raztapljanja, hitrost reakcije v trdnem stanju, stabilnost,
- površinske lastnosti: medfazna napetost – močljivost, površinska prosta energija, oblika kristalov,
- mehanske lastnosti: trdnost, natezna trdnost, stisljivost, pretočnost.

Polimorfne oblike proučujemo z uporabo različnih metod:

- termična analiza (DSC, TG, mikrokolorimetrija),
- mikroskopija (optična, SEM),
- rentgenska difrakcija,
- NMR v trdnem,
- IR spektroskopija,

- helijeva piknometrija,
- ramanska spektroskopija,
- merjenje topnosti (8).

1.1.2. Pseudopolimorfne oblike

Pojem pseudopolimorfizma je leta 1965 vpeljal Walter C. McCrone. Z njim je opisal pojave, kot so desolvatacija/dehidratacija, dinamični izomerizem, mezomorfizem, tj. pojave, za katere so prej mislili, da gre za pravi polimorfizem. Danes se pojem uporablja le za pojave, povezane s solvati in hidrati. V primerjavi s pravimi polimorfnimi oblikami, kjer gre za kemijsko identične spojine, se pseudopolimorfi med seboj razlikujejo v vrsti in količini topila, vezanega v kristalno rešetko. Tako polimorfi kot tudi pseudopolimorfi izkazujejo različne fizikalno-kemijske lastnosti, kot so gostota, topnost, hitrost raztapljanja, kristaliničnost, higroskopnost, stabilnost ter kot posledico zgoraj omenjenih lastnosti izkazujejo tudi različno biološko uporabnost (9).

Pri solvatih, kjer ima topilo izredno pomembno vlogo v izgradnji kristalne rešetke, lahko z mletjem le-to porušimo, kar povzroči desolvatacijo. Nastala oblika brez topila je lahko amorfná (npr. 17-p estradiol, indometacin) (10, 11). Po porušenju kristalne rešetke (odstranitev topila iz kristalne rešetke) pride do neobstoynosti kristala oziroma do nastanka amorfne oblike zdravile učinkovine (11). Nekateri solvati so zelo stabilni in jih z mletjem ne moremo pretvoriti v amorfnó obliko (npr. t-butanolni solvati indometacina) (11).

1.1.3. Kokristali

Kokristalizacija ponuja dodatne možnosti in ima velik potencial za pripravo novih, stabilnih struktur, s katerimi lahko izboljšamo lastnosti zdravilnih učinkovin. V nasprotju s polimorfi, ki imajo enako kemijsko strukturo, so kokristali spremenjene kemijske entitete, ki nastanejo z interakcijo dveh ali več različnih molekul. Kokristali spadajo v skupino t.i. večkomponentnih kristalov, kamor glede na naravo molekul v kristalni rešetki uvrščamo tudi solvate in inkluzijske komplekse ter soli. Izraz *kokristal* se je že leta 1968 pojavil v znanstveni literaturi, ko so avtorji opisali večkomponentni kristal, sestavljen iz pirimidina in purina. Za enkrat še ni enotne definicije pojma *kokristal*, saj v literaturi naletimo na različne opise (12).

Lastnosti, ki jih lahko prirejamo s tvorbo kokristalov, so temperatura tališča, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost, higroskopnost ter posledično biološka uporabnost (12).

1.2. Amorfne snovi

Amorfna oblika trdne snovi je sestavljena iz neurejeno razporejenih molekul, ki ne sestavljajo značilne kristalne rešetke in ima zato nično kristaličnost. Razporeditev molekul v trdni amorfni obliki ni povsem naključna, kot je to značilno za plinasto agregatno stanje, temveč gre za določeno stopnjo urejenosti sosednjih molekul. Zaradi neurejenosti in odsotnosti kristalne rešetke ima amorfna oblika v primerjavi s kristalno višjo entalpijo, entropijo in Gibbsovo prosto energijo. Zato je termodinamsko nestabilna in lahko spontano prehaja v stabilnejšo kristalno obliko (13).

Značilnost amorfne oblike je temperatura steklastega prehoda. Gre za temperaturni interval, v katerem med segrevanjem snov prehaja iz trdnega steklastega stanja v razmehčano stanje (14). Od tekočine se razlikuje po gibljivosti molekul. Stekla so tekočine, zamrznjene v času, ko izvajamo njihovo vrednotenje (eksperiment). Čeprav so s termodinamičnega stališča nestabilne, so lahko s kinetičnega stališča stabilne toliko časa, da lahko to izkoriščamo tudi v farmaciji (15). Steklo izdelamo z ohlajanjem taline pod temperaturo tališča z dovolj visoko hitrostjo, da preprečimo kristalizacijo. Proces imenujemo tudi vitrifikacija (14). Pod temperaturo steklastega prehoda je gibanje molekul zelo omejeno, govorimo o steklastem stanju. Amorfne snovi so pod temperaturo steklastega prehoda relativno stabilne, medtem ko so nad njo občutljive na mehanske in termične obremenitve. Pod omenjeno temperaturo se molekule upočasnjeno gibljejo, kar ima za posledico tudi spreminjanje lastnosti med staranjem amorfne vzorca (14).

Prednost amorfne substance je izboljšanje hitrosti raztapljanja glede na njeno kristalno obliko. Zdravilne učinkovine v amorfni obliki so v večini primerov bolj topne in se hitreje raztapljajo od kristalne oblike. Neravnotežna kinetična topnost amorfne oblike je v primerjavi s kristalno lahko do 1500-krat višja, medtem ko lahko npr. topnost z izdelavo polimorfne oblike povečamo le za faktor 2 do 15. Ta prednost je bistvena v primeru slabo topnih substanc in se kaže v višji biološki uporabnosti zdravilne učinkovine v amorfni obliki (16).

1.3. Metode izdelave amorfne oblike

Za pripravo amorfne oblike zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi lahko uporabljamo različne postopke:

- mletje,

- liofilizacijo,
- sušenje z razprševanjem,
- desolvatacijo solvatov (dehidracija hidratov),
- hitro ohladitev taline,
- obarjanje kislin (ali baz) s spremembo pH (17, 14, 18).

1.3.1. Mletje

Mletje je najpogostejša metoda za zmanjševanje velikosti delcev, kjer z mehanskimi obremenitvami povzročimo razpad aglomeriranih delcev, kot tudi posameznih kristalov (14). Nemleti delec ima lahko v svoji strukturi že nakazana mesta, kjer se bo razlomil ob delovanju mehanskih sil, ki nastopajo pri mletju in so večje od inter- in intakohezijskih sil v trdni snovi.

Učinkovitost mletja je odvisna od lastnosti spojine (19, 20), temperature mletja (21), morfologije delcev (22), časa mletja in vložene energije. Ustrezna kombinacija naštetih parametrov lahko povzroči poleg zmanjšanja velikosti delcev tudi amorfizacijo vzorca. Uporaba krajšega časa mletja povzroči le amorfizacijo površine (23, 24). Čas mletja lahko za pripravo popolno amorfnih delcev traja od manj kot 20 minut za indometacin pri temperaturi tekočega dušika (25) do več kot 100 ur za trehalozo pri sobni temperaturi (26). Zniževanje temperature pod temperaturo steklastega prehoda povečuje tendenco po amorfizaciji.

Amorfizacija z mletjem lahko poteka preko dveh mehanizmov. Po prvem mehanizmu mletje povzroči lokalno taljenje delov spojine, ki mu sledi hitra ohladitev (27). Po drugem mehanizmu je amorfizacija posledica akumulacije defektov v kristalu (28). Nekateri rezultati kažejo, da lahko z uporabo različnih metod izdelamo amorfne vzorce iste spojine z različnimi lastnostmi (29). Savolainen in sodelavci so dokazali, da mletje vodi v nastanek delcev amorfne oblike z večjo variabilnostjo kot v primeru nastanka amorfne oblike izdelane s hitro ohladitvijo taline (29, 30). Za vrednotenje mletih vzorcev so uporabljali diferenčno dinamično kalorimetrijo, rentgensko praškovo analizo, termično polarizacijo, inverzno plinsko kromatografijo in druge metode. Ugotovili so tudi, da lahko mletje zdravilne učinkovine raje kot pretvorbo v amorfno fazo, povzroči defekte kristalov. Pri termični analizi teh vzorcev niso zaznali temperature steklastega prehoda. Na osnovi tega trdijo, da amorfizacija vzorcev pri mletju iz kristalne oblike ne poteka neposredno.

Pozornost spremembam kristalne oblike zdravilne učinkovine moramo posvetiti tudi v drugih fazah tehnološkega procesa, kot so vlažno granuliranje, sušenje ter tudi pri načinu shranjevanja farmacevtskih oblik. Obseg pretvorbe zdravilne učinkovine v amorfno obliko pri mletju lahko povečamo z dodatkom različnih pomožnih snovi, npr. ciklodekstrinov ali snovi z veliko specifično površino (31).

Pri mletju se poveča površinska energija trdne snovi zaradi amorfizacije na površini delcev. V amorfno obliko se torej pri mletju lahko pretvori le manjši delež mase neke trdne snovi (primer: a-laktoza monohidrat), vendar ima ta lahko enako površinsko energijo kot popolnoma amorfen vzorec iste snovi, pridobljen z drugim postopkom (npr. s sušenjem z razprševanjem) (32).

1.3.2. Liofilizacija

Liofilizacija je način sušenja pri nizkih temperaturah. Gre za tehnološki postopek, ki ga uporabljamo predvsem za izdelavo pripravkov namenjenih parenteralni aplikaciji, kot so serumi, cepiva in liposomi. Prva faza liofilizacije je zamrzovanje vodne raztopine zdravile učinkovine, pri čemer pride do nastanka kristalov ledu, ki jih v naslednji fazi pri znižanem tlaku odstranimo s sublimacijo. Sledi faza sušenja pri nizkih temperaturah. Nastali liofilizat ima porozno strukturo, kar je osnova za uspešno rehidracijo pripravka pred parenteralno aplikacijo (33). Na samo amorfno zdravilno učinkovino v liofilizatu vpliva hitrost zamrzovanja ter dodatek pomožnih snovi (34).

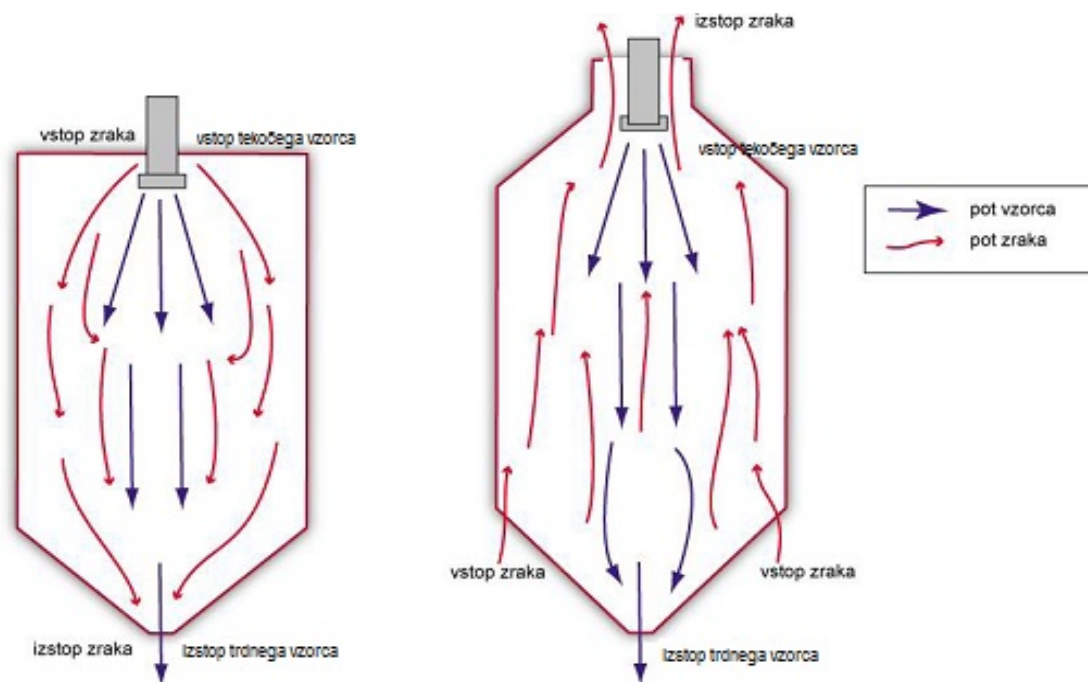
1.3.3. Sušenje z razprševanjem

Gre za način sušenja, s katerim raztopino, suspenzijo ali samo emulzijo pretvorimo v prahove. Postopek sušenja lahko razdelimo v več faz. Tekočino (raztopino, emulzijo) najprej razpršimo skozi šobo v obliki drobnih kapljic v sušilno komoro, kjer pridejo v stik z vročim suhim zrakom. Z razprševanjem ustvarimo veliko specifično površino in izparevanje topila se začne na površini vsake posamezne kapljice, kjer začne nastajati trdna plast topljencev. Ta preprečuje nadaljne izparevanje topila. Ker je izparevanje endotermen proces, se z upočasnjevanjem tega procesa zaradi nastanka trdne plasti zvišujeta temperatura kapljice in tlak v njeni notranjosti. Ko je dovolj visok, se stena kapljice predre in iztisne topilo, ki nato odpari (34, 35). Nastali prahovi imajo zaradi votlosti delcev nizko nasipno gostoto, zaradi pravilnih okroglih oblik delcev pa izkazujejo dobro pretočnost (35). Kadar razpršujemo in sušimo suspenzije, kjer delci niso raztopljeni,

so posušeni delci kristalinični in večinoma nepravilnih oblik. Sušenje z razprševanjem predstavlja primeren način sušenja termolabilnih snovi, ker traja izpostavitve posamezne kapljice visokim temperaturam zelo kratek čas (5-30s), zaradi hladilnega učinka izhlapevanja topila pa je najvišja temperatura, ki jo delci lahko dosežejo, še vedno 15-20 °C nižja od temperature vstopnega zraka (35). Sušenje z razprševanjem se široko uporablja za povečevanje hitrosti raztapljanja slabo topnih zdravilnih učinkovin. Povečana hitrost raztapljanja ni samo posledica zmanjšanja velikosti delcev ali tvorbe trdne disperzije s hidrofilno pomožno snovjo, temveč je običajno posledica pretvorbe zdravilne učinkovine iz kristalne v amorfno obliko. Mikronizirane zdravilne učinkovine lahko zaradi večje nagnjenosti k tvorbi agregatov izkazujejo nižjo hitrost raztapljanja kot učinkovine, pridobljene s sušenjem z razprševanjem, čeprav imajo slednje večje delce in nižjo specifično površino (35). Hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike povečamo tudi s tvorbo inkluzijskih kompleksov med zdravilno učinkovino (npr. paracetamol, indometacin, piroksikam, varfarin (36), ketokonazol (37)) in različnimi ciklodekstrini. V primerjavi z mikronizacijo je sušenje z razprševanjem lahko primernejši način izdelave prahov za inhalacijo. S sušenjem z razprševanjem namreč lahko dobimo manjše delce pravilnejših oblik, ki zato lažje dospejo do alveolov in se v večjem deležu absorbirajo (35, 38).

Način razprševanja ima signifikanten vpliv na lastnosti končnega produkta. Aparature za sušenje z razprševanjem so lahko glede na tok zraka in smer razprševanja dveh vrst: smer razprševanja enaka kot smer pretoka zraka (angl.: »co-current«, slika 3 - levo). Tovrstna zasnova je namenjena predvsem razprševanju termolabilnih zdravilnih učinkovin, saj pri teh napravah temperatura samega produkta le redko preseže temperaturo izhodnega zraka. Druga zasnova aparata je, da je smer toka zraka nasprotna smeri razprševanja (angl.: »counter-current«, slika 3 - desno). Ta zasnova se običajno uporablja za proizvodnjo delcev z visoko gostoto, ki imajo hkrati nizko zaostalo vsebnost topila ter posledično zelo malo intrapartikularnih prostorov (39).

Prednosti uporabe sušenja z razprševanjem v primerjavi z liofilizacijo predstavljajo predvsem širše možnosti nadaljne obdelave biološkega materiala (ker se ne nahaja v stekleničkah) in nekoliko nižja cena procesa izdelave. S sušenjem z razprševanjem izdelujemo tudi različne pomožne snovi. Najbolj znan primer je laktoza (35).



Slika 3: Shematski prikaz sušenja z razprševanjem glede na tok zraka in smer razprševanja: levo – »co-current« način; desno – »counter-current« način delovanja (35).

1.3.4. Desolvatacija

Z odstranitvijo molekul topil oz. vode iz kristalne rešetke porušimo kristalno strukturo solvatov oz. hidratov in pretvorimo trdno snov v amorfno obliko (18).

1.3.5. Hitra ohladitev taline

Ta način pretvorbe trdne snovi v amorfno obliko je bolj primeren za anorganske spojine, manj pa je uporaben za organske zdravilne učinkovine, ker jih je veliko podvrženih razpadu v temperaturnem območju blizu tališča (14). Amorfno obliko spojin lahko pogosto pripravimo s hitrim ohlajanjem raztopin, in sicer tako, da se kristalizacijska jedra ne tvorijo oz. ne rastejo, topilo pa ostaja v tekočem stanju pod točko zmrzišča. Običajno tekočina zmrzne (kristalizira), ko je ohlajena pod temperaturo zmrzišča. Amorfna oblika spojine nastane, če je hitrost ohlajanja taline višja od hitrosti kristalizacije spojine in če talino ohladimo do temperature, ki je nižja od temperature steklastega prehoda spojine. Da zagotovimo ustrezno hitrost ohlajanja, pogosto uporabimo tekoči dušik (18).

1.3.6. Obarjanje kislin ali baz s spremembo pH

Pogosto se je kristalizaciji mogoče izogniti z dodatkom baze v raztopino vodotopne soli šibke kisline, ali z dodatkom kisline v raztopino vodotopne soli šibke baze. Pri tem nastane amorfna oborina. Tak primer je npr. amorfni kalcijev karbonat, ki nastane po dodatku raztopine kalcijevega klorida v raztopino natrijevega karbonata (18).

1.4. Amorfne snovi in njihove lastnosti

Pomen amorfne oblike zdravilne učinkovine izhaja predvsem iz njene višje topnosti v primerjavi s kristalinično obliko in s tem tudi višje hitrosti raztapljanja iz farmacevtske oblike. V določenih primerih izkazuje amorfna oblika tudi boljšo stisljivost. Zaradi termodinamske nestabilnosti je potrebna stabilizacija amorfne oblike, za kar uporabljamo različne pristope (17).

Slabost amorfne oblike je večja specifična površina in s tem višja površinska energija ter posledično višja higroskopnost in manjša stabilnost (npr. hitrejša oksidacijska razgradnja) (14,40).

1.5. Topnost

Topnost opredelimo kot največjo količino topljenca, ki z danim volumnom topila pri določeni temperaturi tvori homogeno molekularno disperzijo. Raztopina, ki vsebuje največjo količino topljenca, se imenuje nasičena raztopina. Za nasičene raztopine velja termodinamsko ravnotežje med raztopljenim in neraztopljenim topljencem. Na topnost močno vpliva temperatura, zato se praviloma ob podatku za topnost (ponavadi podan kot g topljenca/100 ml topila) poda še ta vrednost.

Učinkovina s povprečnim odmerkom 1 mg/kg telesne mase naj bi bila topna vsaj 0,1 g/l, pri čemer govorimo o topni učinkovini, če je ta ista učinkovina topna manj kot 0,01 g/l govorimo o slabo topni učinkovini (41). V skladu z Ph. Eur. in USP delimo topljence glede na topnost oziroma glede na volumen topila (ml) potrebnega za raztopitev 1 g topljenca na več razredov, in sicer na: zelo lahko topne, lahko topne, topne, zmerno topne, zelo slabo topne in skoraj netopne (preglednica 1) (42,43).

Preglednica 1: Prikaz stopenj topnosti.

Stopnja topnosti	V topila za 1g vzorca (ml)
Zelo lahko topno	< 1
Lahko topno	1 – 10
Topno	10 – 30
Zmerno topno	30 – 100
Težko topno	100 – 1000
Zelo težko topno	1000 – 10000
Praktično netopno	> 10000

Podatek o topnosti pri različnih pH vrednostih je nujno potreben pri razvoju novih farmacevtskih oblik in nam omogoča predstavo, kako hitro se bo učinkovina raztopila v gastrointestinalnem traktu (GIT). Vrednosti pH se vzdolž GIT spreminjajo. Nizka topnost v vodi se v kombinaciji z drugimi dejavniki (fosfolipidi, pH vrednost) poveča, kar pomeni, da se njihovo obnašanje v *in vivo* pogojih spremeni in pozitivno vpliva na raztapljanje (44). pH v želodcu na tešče je v območju 1-2. Rahlo povišano pH vrednost opazimo pri starejših osebah. Po zaužitju hrane se pH vrednost v želodcu poviša in doseže v začetni fazi vrednosti do 5,5 (odvisno od sestave obroka). Nato sledi prehod v tanko črevo in sicer jejunum, katerega pH je okrog 6-7 ter nato ileum, katerega pH je 7-7,5. Temu sledi debelo črevo s pH 6,5-7,5. Absorpcija poteka predvsem v proksimalnem delu tankega črevesja, to je v jejunumu.

Širok razpon pH vrednosti je povezan z možnostjo obarjanja učinkovine v prebavnem traktu in posledično vpliva na učinkovitost absorpcije. Ugotovili so, da najboljša absorpcija učinkovine iz GIT poteka med samim prebavljanjem hrane. Za večino učinkovin to pomeni, da se hitreje absorbirajo, če jih zaužijemo s hrano (45). Vendar ne smemo pozabiti, da lahko sam obrok deluje tudi negativno na topnost, saj lahko učinkovina s sestavinami hrane tvori netopen kompleks. Primer je kompleksacija bifosfatov in tetraciklinov s kalcijem (46).

Spojine (šibke baze), ki so dobro topne v želodčnem pH, se popolnoma raztopijo že v želodcu, vendar tam ni prave absorpcije. To pomeni, da želimo dobro raztapljanje učinkovine predvsem v proksimalnem delu tankega črevesja. Črevesje je z višjim pH veliko ugodnejše okolje za raztapljanje kislin kot baz. Slabo topne nevtralne spojine se raztapljajo počasi, raztapljanje v želodcu ni popolno in se nadaljuje v tankem črevesju, kjer je prav tako lahko nepopolno. Nepopolno raztapljanje v prebavnem traktu močno zmanjša peroralno biološko uporabnost zdravilne učinkovine (45).

1.5.1 Delitev učinkovin po biofarmaceutskem klasifikacijskem sistemu (BCB)

Učinkovine delimo glede na njihovo topnost in permeabilnost v 4 razrede (preglednica 2). Delitev služi kot pomoč pri razlagi oziroma napovedi dejavnikov, ki vplivajo tako na hitrost kot tudi na obseg absorpcije. Pomembni dejavniki biofarmaceutskega klasifikacijskega sistema (BCB) so topnost in permeabilnost učinkovine skozi biološke membrane. Pomankljivosti BCB sistema je, da ne upošteva metabolizma učinkovine. Dobra permeabilnost pomeni, da se po peroralni aplikaciji absorbira več kot 90 % odmerka. Dobra topnost pomeni, da se v 250 ml vodnega medija raztopi najvišji odmerek zdravila v pH območju 1-7,5. Uporabnost BCS klasifikacije se je do danes razširila, saj predstavlja smernico pri proučevanju novih učinkovin, pri predkliničnem in kliničnem razvoju zdravil, pri načrtovanju in razvoju različnih generičnih zdravil ter orodje za zmanjševanje števila bioekvivalenčnih študij (47).

Preglednica 2: Biofarmaceutski klasifikacijski sistem (BCB, angl. Biopharmaceutics Classification Scheme).

Razred I	Razred II	Razred III	Razred IV
dobra topnost	slaba topnost	dobra topnost	slaba topnost
dobra permeabilnost	dobra permeabilnost	slaba permeabilnost	slaba permeabilnost
dobra <i>IVIVC</i> (in <i>vitro-in vivo</i> korelacija)	dobra <i>IVIVC</i>	omejena <i>IVIVC</i>	omejena <i>IVIVC</i>

1.6. Proučevanje raztapljanja zdravilnih učinkovin

Obstajajo številni dejavniki, ki vplivajo na raztapljanje učinkovin. Pomebni so tisti, ki se nanašajo na medij za raztapljanje, dejavniki, ki se nanašajo na farmacevtsko obliko in dejavniki aparatov za preskus raztapljanja ter fizikalno-kemijske lastnosti same zdravilne učinkovine.

1.6.1. Medij za raztapljanje

➤ Temperatura

Farmakopeja (Ph. Eur. 6thEd, poglavje 2.9.3) predpisuje temperaturo medija $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Če je temperatura višja, je topnost boljša in tudi raztapljanje je hitrejše.

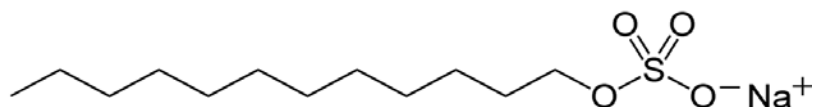
➤ Volumen medija za raztapljanje

Premajhen volumen medija za raztapljanje ustavi raztapljanje učinkovine. Najpogosteje želimo doseči tako imenovane *sink* pogoje, ki so zagotovljeni takrat, ko je volumen medija vsaj 3-10x večji od volumna nasičenja. Le ti zagotavljajo, da delež raztopljene zdravilne učinkovine odseva dejansko hitrost raztapljanja vzorca.

➤ Površinsko aktivne snovi (PAS)

V to skupino uvrščamo emulgatorje, močljivce in solubilizatorje. Gre večinoma za organske amfifilne molekule. Uporabljajo se za izboljšanje topnosti in hitrost raztapljanja slabo topnih zdravilnih učinkovin (s topnostjo v vodi, ki je nižja od 0,01 g/l). Le ti povečajo močljivost površine zdravilne učinkovine in povzročijo solubilizacijo z vključevanjem učinkovine v micelle. Porazdelijo se na mejnih površinah med dvema nemešajočima se fazama in znižujejo površinsko napetost. Združevanje v micelle lahko pospešimo s povečanjem koncentracije PAS in/ali z zniževanjem temperature, pri čemer zmanjšamo kinetično energijo molekul ter preprečimo razpad micelov. V farmaciji se PAS uporabljajo predvsem za povečevanje hitrosti raztapljanja slabo topnih učinkovin, *in vivo* z vključevanjem PAS v farmacevtsko obliko, ali *in vitro* z dodajanjem le tega mediju za raztapljanje. Medij z dodano PAS bolje simulira pogoje v GIT. Površinska napetost vode je namreč višja od tekočin v GIT, ki prav tako vsebujejo PAS (49).

Natrijev lavril sulfat, $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na})$, je anionski sintezni emulgator in solubilizator. Rep molekule sestoji iz 12 ogljikovih atomov in je pripet na sulfatno skupino. Nepogrešljiv je pri *in vitro* študijah v laboratorijih, saj ga dodajamo k medijem za raztapljanje ter tako simuliramo fiziološke pogoje (49).



Slika 4: Natrijev lavril (dodecil) sulfat (49).

➤ pH medija

pH medija vpliva na raztapljanje zdravilnih učinkovin s kislimi in bazičnimi lastnostmi. Bazične zdravilne učinkovine se hitreje raztapljajo pri nizkih pH vrednostih in počasneje pri pH vrednostih medija nad 7 (50).

➤ Viskoznost

Večja kot je viskoznost medija za raztapljanje, počasneje se zdravilne učinkovine raztapljajo. V bolj viskoznih medijih nastane okrog delca topljenca debelejša difuzna plast. Tako penetracija topljenca poteka dalj časa, da le ta doseže območje z nižjo koncentracijo (50).

➤ Ionska moč medija

Ionska moč naj ne bi vplivala na hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine (51).

➤ Raztopljeni plini v mediju

Mehurčki, ki se dvigajo proti površju, lahko spremenijo hidrodinamske pogoje medija v posodi za raztapljanje. Mehurčki se lahko zberejo na površini košaric in zmanjšajo učinkovito poroznost košaric. Farmacevtske oblike (FO), ki se obdajo s prisotnimi mehurčki v mediju, razpadejo počasneje. Študije so pokazale, da prisotnost plinov (mehurčkov) v medijih zmanjša topnost in hitrost raztapljanja zdravilnih učinkovin. Da se le tem izognemo, je potrebno medij pred preskusom raztapljanja razpliniti (50).

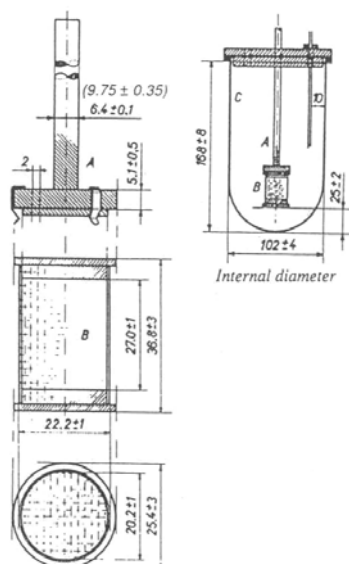
1.6.2. Aparature za preizkus raztapljanja

1.6.2.1. Aparature

Vsi deli aparature, ki pridejo v stik s preiskovano FO ali z medijem za raztapljanje, morajo biti kemijsko inertni in ne smejo ne absorbirati niti ne reagirati s priskovano učinkovino. Izdelani morajo biti iz nerjavečega jekla ali obloženi z nereaktivnim materialom. Deli aparature ne smejo biti podvrženi znatnim vibracijam ali treslajem. Farmakopejske aparature za raztapljanje so:

- Aparatura s košaricami (Ph.Eur.) = aparatura 1 (USP),
- Aparatura z vesli (Ph.Eur.) = aparatura 2 (USP),
- Aparatura z recipročnimi cilindri (Ph.Eur.) = aparatura 3 (USP),
- Pretočna celica = aparatura 4 (USP),
- Aparatura z vesli na disk (Ph.Eur.) = aparatura 5 (USP),
- Aparatura s cilindri = aparatura 6 (USP),
- Aparatura z recipročnimi držali = aparatura 7 (USP) (43, 51).

Aparaturi 1 in 2 sta najpogosteje uporabljeni. Aparatura 2 se uporablja za določevanje deleža raztopljenih učinkovin iz tablet, medtem ko aparatura 1 za določevanje deleža raztopljene učinkovine iz tablet, ki se lepijo na steno posode ali pa plavajo. Kadar uporabljamo ti dve aparaturi so zahtevani *sink* pogoji (zagotavljanje *sink pogojev* pomeni, da končna koncentracija učinkovine v mediju za sproščanje ne presega 1/3 nasičene topnosti v tem mediju) (50).

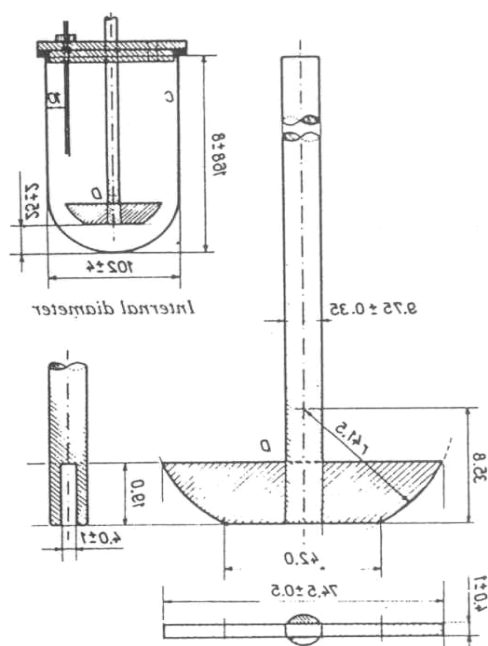


➤ APARATURA 1 po USP:

- steklena posoda s pokrovom (namesto stekla je lahko tudi kak drug inerten, prozoren material),
- cilindrične oblike z okroglim dnom (višina 160 – 175 mm, notranji premer 98-106 mm; $V \approx 1000$ mL),
- motor,
- kovinsko držalo,
- cilindrična košarica (jeklena) z določenimi dimenzijami.

Slika 5: košarica, mešalni element aparature 1 (43).

Razdalja med dnom košarice in notranjim dnom posode mora biti nastavljena ter ves čas trajanja analize vzdrževana na 25 ± 2 mm (42,43, 51).



➤ APARATURA 2 po USP:

- podobno, kot pri aparatu 1 pri aparatu 2, namesto košarice uporabljamo mešalo, ki je v osi (centru) posode ($\Delta x < 2$ mm) in 25 ± 2 mm od (notranjega) dna posode,
- hitrost vrtenja 25-150 obr/min,
- držalo oziroma mešalo mora biti točno v sredini, ne sme odstopati (nihati) v kroženju,
- košarica kot tudi mešalo imata definirane mere in oblike (slika 6).

Slika 6: Veslo, mešalni element aparature 2 (43).

Aparatura 2 se razlikuje glede na aparaturo 1 samo v mešalnem elementu, medtem ko so uporabljene posode popolnoma enake. FO oziroma praškasto zdravilno učinkovino položimo v posodo za raztapljanje pred vklopom aparature.

1.6.2.2. Hitrost vrtenja mešalnega elementa

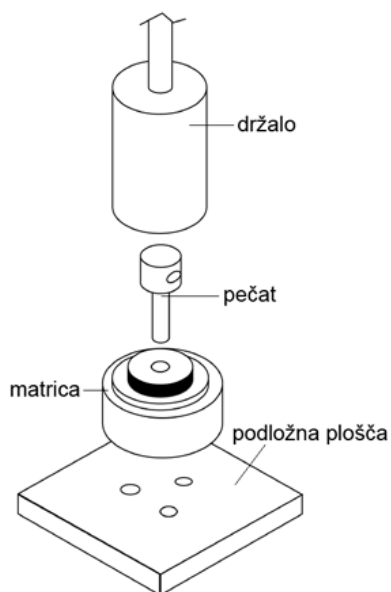
Hitrost vrtenja vpliva na hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine. Hitrejše, ko je mešanje, tanjša je difuzna plast in hitreje se učinkovina raztaplja (Noyes-Whitneyeva enačba) (51,53).

1.6.2.3. Intrinzična hitrost raztapljanja

Intrinzična hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine (IDR – angl. intrinsic dissolution rate) je definirana kot hitrost raztapljanja čiste zdravilne učinkovine s konstantne površine pri konstantnih pogojih (temperatura, hitrost mešanja, pH in ionska moč medija za raztapljanje). Ker gre za preizkuse na čistih substancah (zdravilnih učinkovinah), se metoda uporablja tudi za preizkušanje biološke uporabnosti učinkovin, ki so bile sintetizirane po različnih postopkih. Naprava za določanje IDR sestoji iz pečata in matrice, ki ima na spodnji strani tri navoje, ki omogočajo pritrditev gladke podložne plošče (slika 8) (53).

Priprava vzorca za intrinzično hitrost raztapljanja

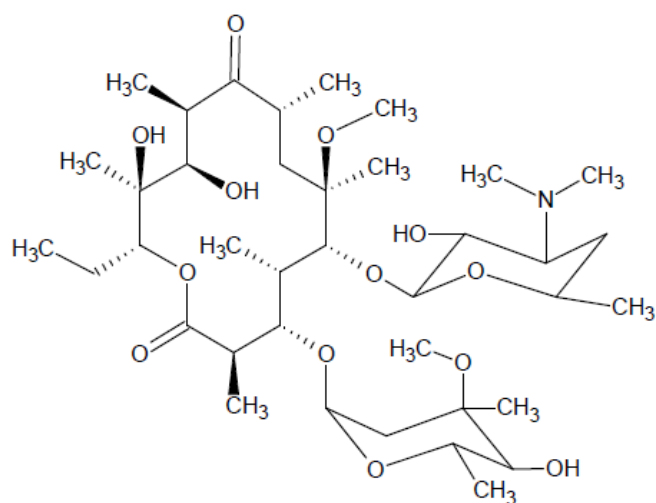
Pritrdimo gladko spodnjo ploščo in jo vpnemo s pomočjo sile z uporabo ustreznega vpenjalnega sistema. Natančno zatehtamo količino materiala, ki je potreben za doseg sprejemljive kompaktne površine, in ga prenesemo v vdoblino diska (matrico). Zgornji del (pečat) namestimo v vdolbino v katerem je natehtan prašek in le tega stisnemo s pomočjo hidravlične stiskalnice. Pri tem dobimo kompaktno stisnjen prah, premera 0,2 cm do 1,5 cm, le ta mora ostati v vdolbini diska ves čas preskusa raztapljanja. Siskamo 1 minuto pri 15 Mpa, to običajno zadostuje za mnoge kristale organskih spojin. Pri stiskanju lahko pride do spremembe kristalne oblike praška, zato je potrebno predhodno preveriti stabilnost trdnega stanja kristala z rentgensko analizo ali katero drugo ustrezno metodo. Priporočeno je vrtenje diska s hitrostjo 300 obratov / min, je. Hitrost raztapljanja je odvisna od hitrosti vrtenja. Potrebno je vsaj 5-kratano vzorčenje med poskusom raztapljanja, da dobimo ustrezno linearnost koncentracij raztopljenе učinkovine (54).



Slika 8: Disk za intrinzično hitrost raztapljanja (53).

1.7. Klaritromicin

Klaritromicin, 6-O-metileritromicin A, je polsintezni derivat eritromicina s protimikrobnim delovanjem in ga uvrščamo v skupino makrolidnih antibiotikov. Zanje je značilen makrociklični laktonski obroč, na katerega so z glikozidnimi vezmi vezane sladkorne komponente (55). Klaritromicin uporabljamo peroralno za sistemsko zdravljenje bakterijskih infekcij (56).



Slika 9: Strukturna formula klaritromicina (57).

1.7.1. Fizikalno-kemijske lastnosti

Klaritromicin je šibka baza z molekulsko formulo $C_{38}H_{69}NO_{13}$ in molekulsko maso 747,95g/mol (55). pKa vrednost znaša 8,99 ter log P 1,7 (64). Je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek, praktično netopen v vodi, topen v acetonu in etilenkloridu ter slabo topen v metanolu in etanolu. Njegova topnost se povečuje z nižanjem pH vodnih raztopin. Zaradi dobre permeabilnosti in slabe topnosti v vodi ga uvrščamo v razred II po biofarmacevtski klasifikaciji (57).

1.7.2. Farmakodinamika

Preko vezave na P-mesto 50S podenote ribosomov zavira sintezo bakterijskih beljakovin in tako onemogoča normalno delovanje bakterijskih celic. Nizka toksičnost pri človeku je verjetno posledica bistveno drugačne strukture ribosomov humanih celic, zaradi česar ne pride do vezave učinkovine na njihovo 60S podenoto. Klaritromicin deluje bakteriostatično še preko zaviranja delovanja ribosomalne peptidiltransferaze, na nekatere bakterije pa deluje tudi baktericidno. Pri nekaterih bakterijah pride do antagonističnega delovanja makrolidov, kloramfenikola in linkozamidov, saj se vsi vežejo na isto tarčno mesto (56).

1.7.3. Spekter delovanja in terapevtske indikacije

Klaritromicin je močan, učinkovit antibiotik s širokim spektrom delovanja na po Grammu pozitivne in negativne aerobne, anaerobne ali fakultativno anaerobne bakterije, deluje pa tudi na druge bakterije (klamidije, mikoplazme, ureaplazme, mikobakterije) in atipične mikobakterije. Makrolidni antibiotiki so splošno indicirani pri infekcijah s po Grammu pozitivnimi bakterijami pri bolnikih, ki so odporni na penicilinske antibiotike ali tetracikline in pri pacientih, ki so alergični na penicilinske antibiotike. Klaritromicin je indiciran pri okužbah zgornjih (tonzilofaringitis, sinusitis) in spodnjih (bronhitis, pljučnica) dihal, pri okužbah z mikobakterijami, uporabljamo pa ga tudi pri zmernih okužbah kože in podkožja (58).

1.7.4. Farmakokinetika

Klaritromicin je stabilen v prisotnosti želodčne kisline po peroralni aplikaciji ter se hitro in dobro absorbira iz prebavil (predvsem iz jejunuma). Zaradi velikega predsystemskega metabolizma, ki je predvsem posledica metabolizma v jetrih, je njegova biološka uporabnost približno 50 %. Hrana ne vpliva na obseg absorpcije, jo pa nekoliko upočasni. Zaradi majhne stopnje ionizacije se klaritromicin dobro porazdeljuje v tkiva, približno 80 % pa se ga reverzibilno veže na plazemske beljakovine. Klaritromicin se v večji meri izloča iz telesa s sečem, nekaj pa se ga izloči tudi z blatom (59).

1.7.5. Polimorfizem klaritromicina

Klaritromicin obstaja v trdni obliki v treh znanih kristalnih (polimorfni) oblikah; I, II ter O. Farmacevtske oblike na tržišču vsebujejo klaritromicin v polimorfni obliki II, ker je leta termodinamsko najbolj stabilna (60).

1.7.5.1. Klaritromicin oblika I

Kinetično stabilnejšo kristalinično obliko klaritromicina I, pripravimo tako, da klaritromicin prekristaliziramo iz topila (npr. etanol) ter produkt sušimo pri znižanim tlaku (60).

1.7.5.2. Klaritromicin oblika II

Termodinamsko stabilno kristalinično obliko klaritromicina II lahko pripravimo na več načinov:

- a) Kristalinično obliko klaritromicina I pretvorimo v obliko II s segrevanjem v vakuumskem sušilniku pri temperaturi višji od 80°C (60).
- b) Suspenzijo klaritromicina v nepolarnem topilu (npr. aceton, heptan) segrevamo pri refluxu 15 minut, še vročo raztopino filtriramo ter ponovno segrevamo pri refluxu, nato pa raztopino ohlajamo pri sobni temperaturi ter kasneje še na ledeni kopeli, tako da se oborijo kristali klaritromicina v obliki II. Nastalo suspenzijo prefiltriramo in kristale učinkovine sušimo v vakuumskem sušilniku (60).
- c) Klaritromicin I lahko pri sobni temperaturi pretvorimo v polimorfno obliko II z močnim mešanjem suspenzije učinkovine v vodi ali v zmesi vode in organskega topila, ki se ne meša z vodo in v katerem je klaritromicin praktično netopen (služi le za raztapljanje morebitnih organskih nečistot v izhodnem materialu), nato pa

suspenzijo prefiltriramo in kristale učinkovine čez noč sušimo v vakuumskem sušilniku pri 60°C. Tako lahko na enostaven način in po nizki ceni učinkovito pridobivamo zelo čist produkt brez ostanka organskih topil (61).

Jih-Hua in sodelavci so odkrili, da imata oblika I in oblika II povsem enake antibakterijske sposobnosti, vendar se oblika I kar trikrat hitreje raztaplja od oblike II. Oblika I je nestabila in zanjo je značilen kristalni prehod pri temperaturi 132,2°C (63).

1.7.5.3. Klaritromicin oblika O

Klaritromicin v obliki O združuje vse solvate učinkovine, ko molekulo klaritromicina solvatirajo molekule naslednjih topil: etanol, izopropilacetat, izopropanol ali tetrahidrofuran (60). Pri solvatih gre za polimorfizem, to pomeni, da so molekule topila del kristalne rešetke, in ne za pravi polimorfizem. V okviru naše naloge nismo proučevali fizikalno-kemijskih lastnosti te oblike klaritromicina.

1.7.5.4. Amorfen klaritromicin

Z namenom izboljšanja raztapljanja in biološke uporabnosti v vodi praktično netopnega klaritromicina so se lotili tudi priprave amorfne oblike zdravilne učinkovine po različnih postopkih:

- a) Klaritromicin so z mletjem pretvorili v amorfno obliko (62),
- b) Klaritromicin so raztopili v topilu (npr. metanol ali aceton), nato pa topilo odstranili s sušenjem z razprševanjem ter tako dobili amorfne delce zdravilne učinkovine (62).

2. Namen dela

Pogoji kristalizacije ter kristalizacijsko topilo vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti nastalih kristalov. V magistrski nalogi bomo najprej pripravili obe znani polimorfni obliki klaritromicina. Kristalno obliko I bomo pripravili s prekrystalizacijo klaritromicina iz etanola, kristalno obliko II pa s prekrystalizacijo klaritromicina iz acetona.

Poskušali bomo pripraviti amorfno obliko klaritromicina na dva načina in sicer s hitro ohladitvijo taline ter s sušenjem z razprševanjem. Tako pridobljene vzorce bomo analizirali z različnimi tehnikami. Za začetek se bomo poslužili vrstične elektronske mikroskopije (SEM) in diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC) pri čemer bomo z merjenjem temperature tališča, entalpije, steklastega prehoda in določitvijo polimorfnih prehodov posledično pridobili podatek o karakterizaciji notranje strukture in zunanje oblike kristalov. Merili bomo tudi velikosti delcev z lasersko difrakcijo. Proučevali bomo predvsem hitrost raztapljanja in kinetično topnost praškastih vzorcev. Naš namen je poiskati vodno raztopino oziroma medij v katerem se vzorci klaritromicina najbolj optimalno raztapljajo. Najti želimo pufer z ustrežno pH vrednostjo, ki bo ustrezen medij za raztapljanje tako kristalne, kot tudi amorfne oblike klaritromicina. V nalogi želimo primerjati hitrosti raztapljanja in kinetično topnost posameznih oblik klaritromicina ter ugotoviti katera oblika klaritromicina se najhitreje raztaplja. Pričakujemo, da se bo amorfni vzorec raztapljal hitreje, kot kristalni. Ker pa vemo, da je zdravilna učinkovina hidrofobna želimo raztapljanje proučiti z različnimi metodami in ugotoviti ali lahko z uporabo različnih metod oziroma z različno pripravo vzorcev dosežemo ustrezno omočenje delcev. Raztapljanje vzorcev bomo izvedeli z uporabo različnih aparaturnih naprav za raztapljanje in z različno pripravo vzorcev. Določali bomo topnost vzorcev v obliki praška, proučevali hitrost raztapljanja vzorcev v obliki praška in proučevali hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine z izdelavo tablet, ki v mediju hitro razpadejo in tako poskušali zagotoviti dobro omočenje delcev zdravilne učinkovine. Proučevali bomo tudi intrinzično hitrost raztapljanja, hitrost raztapljanja delcev zdravilne učinkovine v zmesi z nanodelci ter na

podlagi dobljenih rezultatov ugotovili kakšne so prednosti in slabosti posamezne uporabljene metode.

3. Eksperimentalno delo

3.1. Materiali

3.1.1. Uporabljeni instrumenti

- sistem za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC): Agilent 1100 Series
- aparat za raztapljanje: ERWEKA DT6
- pH meter: Mettler Toledo, InLab^R Expert pro pH, Švica
- magnetno mešalo: Rota mix 560 MMH, Železniki, Slovenija
- tabletirka na eksenter KILIAN SP 300, Nemčija
- tehtnica: Exacet 300 EB, Železniki, Slovenija
- ultrazvočna kadička: Sonis 4, Iskra, Slovenija
- diferenčni dinamični kalorimeter: Mettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30, Švica
- vrstični elektronski mikroskop (SEM): Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija
- aparat za odparevanje topila pri znižanem tlaku: Büchi R-114, Švica
- aparat za merjenje velikosti delcev z lasersko difrakcijo: Mastersizer S, Malvern Instruments, Velika Britanija

3.1.2. Reagenti

- prečiščena voda
- natrijev hidroksid; Na OH (Merck, Nemčija)
- natrijev acetat; NaC₂H₃O₂ (Merck, Nemčija)

- kalijev dihidrogenfosfat; KH_2PO_4 (Merck, Nemčija)
- klorovodikova kislina; 37% HCl (Merck, Nemčija)
- očetna kislina; CH_3COOH (Merck, Nemčija)
- acetonitril; CH_3CN (Panreac)
- metanol; CH_3OH (Panreac)
- etanol 96%; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Riedel de Häen)
- aceton 100%; CH_3COCH_3 (Riedel de Häen, Nemčija)
- fosforjeva kislina; H_3PO_4 min 85% (Merck, Nemčija)
- natrijev lavrilsulfat, natrijev dodecil sulfat; NaLS (Merck, Nemčija)
- mikrokristalna celuloza + koloidni silicijev dioksid, NF (SMCC PROSOLV HD90), JRS Pharma
- titanium (IV) oxide, anataste, nanopowder \square 25nm (Aldrich, Nemčija)
- heksan; C_6H_{14} (Panreac)
- vzorci:
 - klaritromicin prekristaliziran iz etanola (klaritromicin kristalna oblika I);
 - klaritromicin prekristaliziran iz acetona (klaritromicin kristalna oblika II);
 - klaritromicin pripravljen s hitro ohladitvijo taline (amorfn oblika Q);
 - klaritromicin pripravljen z sušenjem z razprševanjem (amorfn oblika SD).

3.1.3. Raztopine

- 0,1 M očetna kislina: 8,5 ml koncentrirane očetne kisline zlijemo v 1000 ml bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake;
- 0,2 M KH_2PO_4 : 27,22 g KH_2PO_4 natehtamo v 1000 ml merilno bučko in dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake;

- 0,2 M NaOH: 8 g NaOH natehtamo v 1000 ml merilno bučko in dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake;
- 2 M NaOH: 40 g NaOH natehtamo v 500 ml merilno bučko in dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake;
- 2 M HCl: z ustreznim merilnim valjem prenesemo 58 g koncentrirane HCl v 500 ml merilno bučko in dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake volumna.

3.1.4. Steklovina in ostali materiali

- čaše: 50 ml, 100 ml, 500 ml;
- merilne bučke: 10 ml, 100 ml, 200 ml, 1000 ml;
- pipete: 1 ml, 2 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml;
- injekcijske brizge 5 ml (BD Discardit, Bectan, Dickinson and Company, USA);
- membranski filtri: RC 0,45 μm : Minisart RC 25, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija;
- vialne (Agilent Technologies);
- HPLC kolona: Nucleosil 125mm x 4mm, 5 μm delci (Phenomenex, št. kolone 520608-7).
- HPLC Predkolona: Security Guard (Phenomenex)

3.2. Mediji za raztapljanje

- a) prečiščena voda: Millipore, Milli-Q
- b) 0,5% vodna raztopina Na lavrilsulfata (NaLS)

Natehtamo 5 g NaLS in ga kvantitativno prenesemo v 1000 ml merilno bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake volumna.

- c) 1,0% vodna raztopina NaLS

Natehtamo 10 g NaLS in ga kvantitativno prenesemo v 1000 ml merilno bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake volumna.

d) 3,6% vodna raztopina NaLS

Natehtamo 18 g NaLS in ga kvantitativno prenesemo v 500 ml merilno bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake volumna.

e) acetatna puferna raztopina s pH 5,0

Natehtamo 13,6 g natrijevega acetata ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) v 1000 ml bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake ter pH raztopine uravnamo na 5,0 z 0,1 M očetno kislino (CH_3COOH).

f) acetatna puferska raztopina s pH 5,0 in 0,5% koncentracijo NaLS

Natehtamo 5 g NaLS in ga kvantitativno prenesemo v 1000 ml merilno bučko ter dopolnimo z acetatno pufersko raztopino pH 5,0 do oznake volumna.

g) acetatna puferska raztopina s pH 5,0 in z dodatkom 1,0% NaLS

Natehtamo 10 g NaLS in ga kvantitativno prenesemo v 1000 ml merilno bučko ter dopolnimo z acetatno pufersko raztopino pH 5,0 do oznake volumna.

h) 0,1 M klorovodikova kislina (pH 1,0)

V 1000 ml merilno bučko odpipetiramo 8,5 ml koncentrirane klorovodikove kisline (HCl) ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake volumna.

i) fosfatna puferska raztopina pH 6,8

250 ml 0,2 M kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) in 112 ml 0,2 M natrijevega hidroksida (NaOH) odmerimo v 1000 ml bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake volumna. pH raztopine umerimo na 6,8 z 2 M klorovodikovo kislino (HCl) ali 2 M natrijevem hidroksidom (NaOH).

j) acetatna puferska raztopina pH 6,6

Natehtamo 13,6 g natrijevega acetata ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) v 1000 ml bučko ter dopolnimo s prečiščeno vodo do oznake ter pH raztopine uravnamo na 6,6 z 0,1 M očetno kislino (CH_3COOH).

3.3. Metode dela

3.3.1. Priprava vzorcev

- Priprava klaritromicina kristalne oblike I

Izvedli smo prekrizalizacijo KMC iz 100% etanola. V 500 ml bučki smo raztopili 5g KMC (Sigma) v 100% etanola, pri znižanem tlaku odparili topilo ter produkt sušili tri ure pri 50°C.

- Priprava klaritromicina kristalne oblike II

Izvedli smo prekrizalizacijo KMC iz 100% acetona. V 500 ml bučki smo raztopili 5g KMC (Sigma) v 200 g 100% acetona, pri znižanem tlaku odparili topilo, preostanek topila pa odfiltrirali pri znižanem tlaku ter sušili tri ure pri 50°C.

- Priprava amorfnega klaritromicina s hitro ohladitvijo taline

Klaritromicin oblike II smo na plošči grelnika IKA segreli do 230°C. Ko se je tanka plast praška v aluminijasti posodi stalila, kar smo vizualno opazovali, smo tekoči vzorec potopili v posodo s tekočim dušikom, da je prišlo do hitre ohladitve.

- Priprava amorfnega klaritromicina s sušenjem z razprševanjem

4g klaritromicina smo raztopili v 100 ml acetona. Raztopino smo razprševali pri pretoku raztopine 1 ml/min v aparat Büchi pri temperaturi 70°C ter pri tlaku razprševanja 50 mbar v zaprti zanki z inertno atmosfero (N₂). Temperatura hladilnika v katerem je kondenziralo topilo je bila -20°C.

3.3.2. Termična analiza

Termično analizo vzorcev smo izvedli z diferenčno dinamičnim kalorimetrom Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30. 3-5 mg vzorca smo zatehtali in zaprli v aluminijast lonček ter ga segrevali od 0 do 240°C. Hitrost segrevanja je bila 20 K/min. Meritve pa so bile izvedene v dušikovi atmosferi s pretokom dušika 40 ml/min. Kalorimeter je bil kalibriran z indijem.

3.3.3. Morfologija delcev z optično in elektronsko vrstično mikroskopijo (SEM)

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali morfologijo delcev. Posušene vzorce smo nanесли na dvostranski ogljikov lepilni trak in jih nato analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom SEM Supra 35 VP (Carl Zeiss, Nemčija).

3.3.4. Določitev velikosti delcev z lasersko difrakcijo

Vzorce smo suspendirali v heksanu, tako da smo vedno imeli približno enako sipanje svetlobe skozi suspenzijo delcev (*angl. obscuration*). Hitrost mešala v suspenziji, ki je krožila skozi merilno celico, je bila za vse meritve konstantna. Ker algoritmi instrumenta za lasersko difrakcijo temeljijo na predpostavki, da so delci sferični, dobimo tem večjo napako, čim bolj se oblika delcev razlikuje od oblike krogle. Rezultat, ki ga dobimo je podan volumsko oz. velikost delca je izražena kot povprečni premer krogle, ki bi imela enak volumen kot analiziran delec ($D[4,3]$) in S.S.A (*angl. Specific Surface Area*), specifična površina izračunana glede na volumsko porazdelitev velikosti delcev oblike krogel.

Pri pripravi vzorca moramo biti pozorni na koncentracijo vzorca in na morebitne aglomerate, saj lahko zaradi tega dobimo napačne rezultate.

Pogoji merjenja:

- prepustnost svetlobe (*ang. obscuration*): okoli 20%
- hitrost mešala: 1500 obratov/minuto

3.3.5. Določanje topnosti in hitrosti raztapljanja vzorcev klaritromicina

Topnost in raztapljanje dveh kristalnih oblik klaritromicina in dveh amorfnih vzorcev smo določali na različne načine:

- A. določanje topnosti vzorcev v obliki praška,
- B. proučevanje intrinzične hitrosti raztapljanja vzorcev,
- C. proučevanje hitrosti raztapljanja vzorcev v obliki praška,
- D. proučevanje hitrosti raztapljanja zdravilne učinkovine z izdelavo tablet,

- E. proučevanje hitrosti raztapljanja praškastih vzorcev v zmesi z nanodelci titanovega dioksida.

A. Določanje topnosti klaritromicina v vodi

V 100 ml merilno bučko smo natehtali približno 50 mg vzorca klaritromicina (klaritromicin kristalne oblike I, klaritromicin kristalne oblike II, amorfni klaritromicin SD in amorfni klaritromicin Q). Vsak vzorec smo tehtali v dveh paralelkah. Natehtane vzorce smo redčili z vodo do oznake in nato mešali na magnetnem mešalu 24 ur. Po 24 urah smo izveli filtracijo suspenzije skozi filter RC 0,45 μ m, pri čemer smo uporabili 5 ml injekcijsko brizgo. Koncentracijo učinkovine v filtratu smo določili s HPLC metodo (opis sledi v nadaljevanju). Preostanek vzorcev smo filtrirali skozi nučo in posušene delce analizirali z DSC metodo.

HPLC analizo smo izvedli pri pretoku mobilne faze 1,0 ml/min, valovni dolžini 210 nm ter pri temperaturi kolone 50°C. Volumen injiciranih vzorcev je bil 50 μ l. Temperatura pri kateri smo izvajali analizo je bila 20°C. Za mobilno fazo smo uprabili zmes metanola in 0,067 M puferne raztopine KH₂PO₄ (9,1 g KH₂PO₄ smo natehtali v 1000 ml merilno bučko in dopolnili s prečiščeno vodo do oznake) v razmerju 60 : 40 (v/v) ter pH tako pripravljene mobilne faze umerili na 4,0 s koncentrirano H₃PO₄. Mobilno fazo smo na koncu filtrirali skozi filter Millipore, HVLP, 0,45 μ m.

Ustreznost kromatografskega sistema smo dokazali z injiciranjem 50 μ l topila in nato še petkrat pripravljeni vzorec ter posneli kromatograme. Iz njih smo razbrali, da je ponovljivost retencijskega časa in površine pika klaritromicina znotraj zahtevanih meja (RSD ne več kot 2,0%).

B. Proučevanje intrinzične hitrosti raztapljanja vzorcev

Natehtali smo maso vzorca, ki je potrebna za doseg sprejemljive kompaktne površine, in jo prenesli v vdolbino diska. Zgornji del smo namestili v vdolbino v katerem je bil natehtan prašek in smo le tega stisnili s pomočjo hidravlične stiskalnice. Pri tem smo dobili kompaktno stisnjen prah, ki mora ostati v vdolbini diska za čas preskusa raztapljanja. Tako pripravljen disk smo uporabili kot mešalni element ter izvedli raztapljanje, kjer upoštevamo konstantnost površine raztapljajoče zdravilne učinkovine. Raztapljanje smo izvedli v acetatnem pufru pH 3,7, saj so bile koncentracije, ki smo jih pomerili v acetatnem

pufri pH 6,6 prenizke. Pogoji raztapljanja opisani pod točko C1. Koncentracijo zdravilne učinkovine v mediju za raztapljanje smo določali s HPLC, kot je opisano pod točko A.

C. Proučevanje hitrosti raztapljanja vzorcev v obliki praška

C1. Raztapljanje z uporabo aparature 2 (USP)

V kadico za raztapljanje z 900 ml medija smo kvantitativno prenesli približno 350 mg vzorca klaritromicina. Preizkus raztapljanja smo izvedli po Ph. Eur. 6thEd, poglavje 2.9.3, izvedli smo ga s pomočjo aparature za raztapljanje ERWEKA DT6 in sicer pri temperaturi medija $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ter z uporabo vesla, kot mešalnega elementa. Hitrost vrtenja mešalnega elementa je bila 100 obratov / minuto. Kot medije za raztapljanje smo uporabili tako prečiščeno vodo brez dodatkov pomožnih snovi, kot z dodatkom le teh v različnih koncentracijah (0,5%, 1% in 3,6% NaLS). Kot medij za raztapljanje smo uporabili tudi acetatni pufer s pH 5,0 (brez dodatkov NaLS in z dodatki 0,5%, 1% in 3,6% NaLS) ter 0,1 M HCl, fosfatni pufer s pH 6,8 in acetatni pufer s pH 6,6. Časi vzorčenja raztopin vzorcev so bili 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 in 120 min po začetku raztapljanja. Vzorce smo ročno odvzeli s pomočjo 5 ml injekcijske brizge z iglo ter jih filtrirali skozi membranski filter RC 0,45 μm . Odvzeti volumen smo nadomeščali z medijem, ki je bil temperiran na temperaturo $37^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Koncentracijo zdravilne učinkovine v odvzetih vzorcih smo določili s HPLC metodo, ki je opisana pod točko A. Vse študije raztapljanja smo izvedli v dveh paralelkah.

C2. Raztapljanje z uporabo aparature 1 (USP)

Glede na rezultate raztapljanja, ki smo jih pridobili pri raztapljanju KMC v različnih medijih in z uporabo aparature 2 (USP) smo vse oblike KMC raztopili še v acetatnem pufri pH 6,6, kot mediju za raztapljanje, z uporabo aparature 1 (USP). V košarico, ki smo jo modificirali tako, da smo na dno dali plastični krog, nanj natehtali 350 mg praška posameznega vzorca in ga raztapljali v 900 ml acetatnega pufra pH 6,6. Pogoji raztapljanja so opisani pod točko C1. Vzorce smo ročno odvzeli s pomočjo 5 ml injekcijske brizge in jih filtrirali skozi membranski filter 0,45 μm . Koncentracijo zdravilne učinkovine v odvzetih vzorcih smo določili s HPLC tehniko, ki je opisana pod točko A.

D. Proučevanje hitrosti raztapljanja zdravilne učinkovine iz tablet

Profil raztapljanja vzorcev klaritromicina smo izvedli tudi tako, da smo prašku KMC dodali pomožno snov in izdelali tablete. Natančno smo natehtali 2,0 g pomožne snovi Prosolv HD90 in 2 g vzorca KMC. Sledilo je homogeno mešanje s pomočjo kartice. Na pet posameznih kartic smo natehtali po 700 mg tako pripravljene zmesi. Za tabletiranje smo uporabili tabletirko na ekscenter, proizvajalca KILIAN SP 300. Za doseg ustreze mase tablete smo spreminjali položaj spodnjega pečata, za ustrezno trdnost tablet pa položaj zgornjega pečata. Zgornji pečat smo tako nastavili na 9,30 mm, spodnjega pa na 16,00 mm. Sila stiskanja je bila med 1-1,5 KN.

V kadico z ustreznim medijem (acetatni pufer pH 6,6) smo dali tableto KMC ter jo raztapljali s pomočjo vesla, kot mešalnega elementa (aparatura 2 po USP). Pogoji raztapljanja so opisani pod točko C1. Koncentracijo zdravilne učinkovine v mediju za raztapljanje smo določali s HPLC, kot je opisano pod točko A.

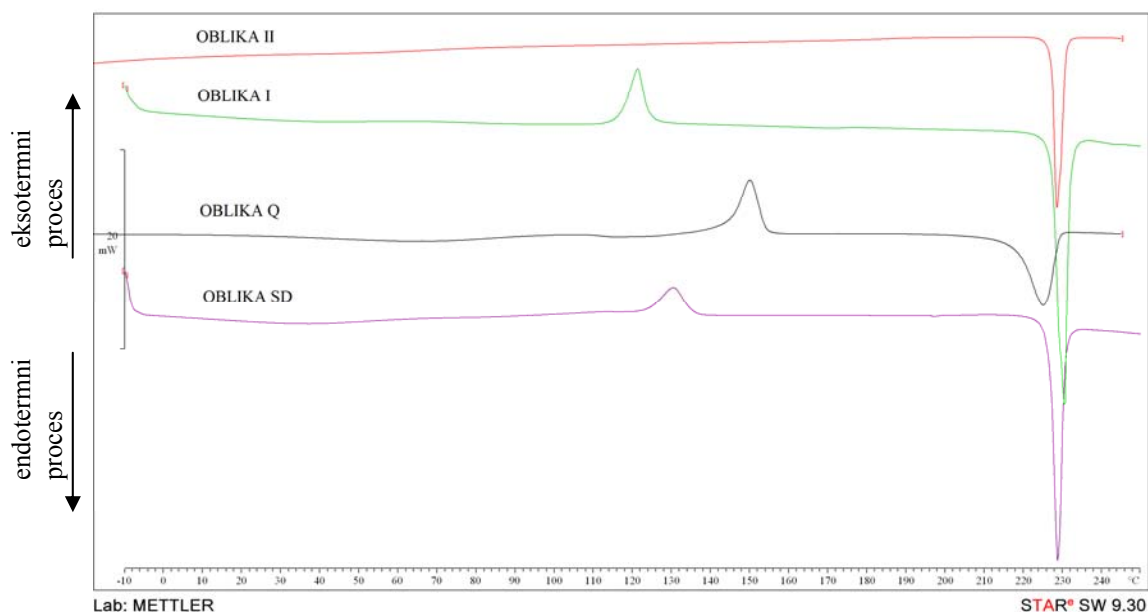
E. Proučevanje hitrosti raztapljanja praškastih vzorcev iz zmesi z nanodelci

V posamezno čašo smo natehtali 350 mg praška amorfnega klaritromicina SD, amorfnega klaritromicina Q ter kristalno obliko I in obliko II klaritromicina ter v vsako čašo tako natehtanega vzorca dodali še 350 mg praška titanovega dioksida ter vse skupaj premešali s spatulo ter zmes prenesli v košarico za raztapljanje. Kot medij za raztapljanje smo uporabili 900 ml acetatnega pufra pH 6,6. Pogoji raztapljanja so opisani pod točko C1. Vzorce smo ročno odvzeli s pomočjo 5 ml injekcijske brizge ter jih po odvzemu filtrirali skozi membranski filter 0,45 μ m. Koncentracijo zdravilne učinkovine v odvzetih vzorcih smo določili s HPLC, ki je opisana pod točko A.

4. Rezultati in razprava

4.1. Termična analiza vzorcev klaritromicina

4.1.1. Termična analiza vzorcev klaritromicina pred raztapljanjem

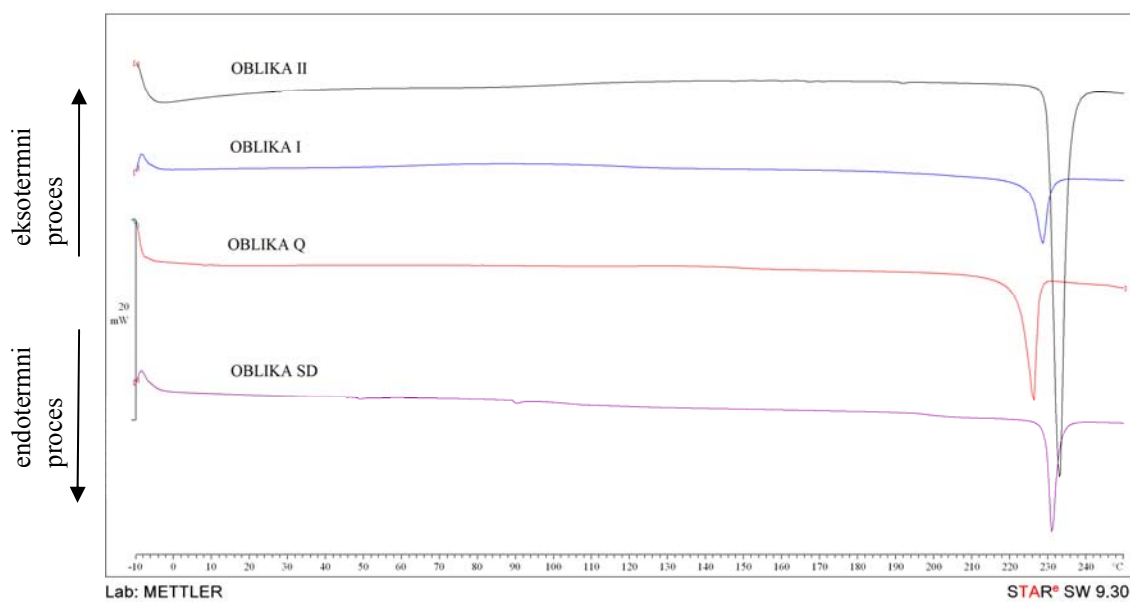


Slika 10: Diagrami termične analize vzorcev klaritromicina.

Diferenčna dinamična kalorimetrija je v farmaciji najbolj uporabljena metoda termične analize. DSC krivulje analiziranih vzorcev (slika 10) kažejo da se oblika II stali pri temperaturi 225°C. Pri oblika I opazimo širok eksotermen vrh pri temperaturi 115 °C, ki predstavlja polimorfno transformacijo trdno-trdno, pri kateri pride do pretvorbe te oblike v termodinamsko bolj ugodno obliko II. Amorfna vzorca Q (pridobljen s hitro ohladitvijo taline) in SD (pridobljen s sušenjem z razprševanjem) pa med 120-140°C kristalizirata. Pri obliki Q opazimo širok endotermen vrh pri nižji temepraturi napram ostalim oblikam klaritromicina. Glede na sledeči vrh sklepamo na možnost prisotnih nečistot oziroma večjo distribucijo delcev v vzorcu. Oster eksotermni vrh kristalne oblike II pa nam govori o dobri kristaličnosti vzorca. Glede na termične krivulje lahko sklepamo, da se klaritromicin stali pri temperaturi 225°C. Temperature steklastega prehoda pri amorfni vzorcih nismo zaznali.

Termično analizirali smo tudi vzorce po koncu 24 urnega raztapljanja. Neraztopljene delce klaritromicina smo prefiltrirali in posušili ter ponovno posneli DSC krivulje.

4.1.2. Termična analiza vzorcev klaritromicina po raztapljanju

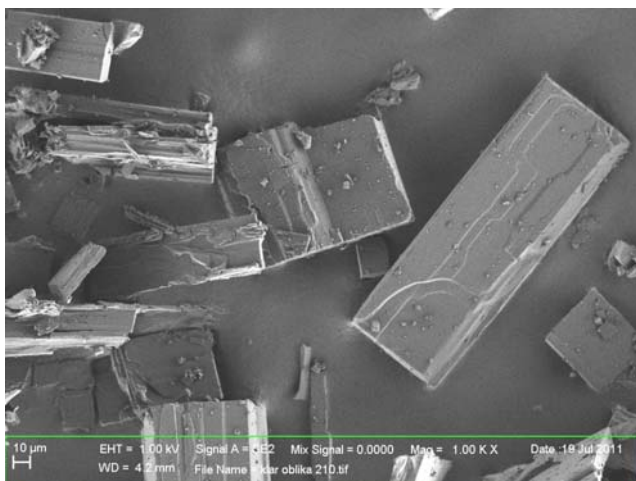


Slika 11: Diagrami termične analize klaritromicina po raztapljanju.

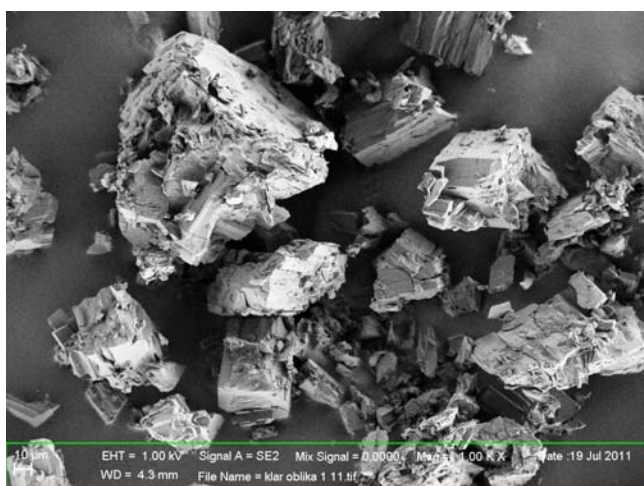
Glede na profil DSC krivulj lahko sklepamo, da so se vsi vzorci klaritromicina tekom raztapljanja pretvorili v najbolj stabilno kristalno obliko II. Pride do rekristalizacije. Ti rezultati bi lahko bili povezani z padcem koncentracije učinkovine v raztopini po določenem času raztapljanja.

4.2. Morfologija delcev

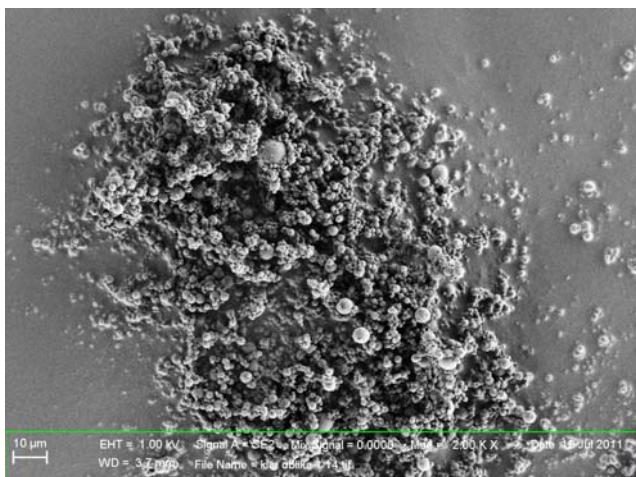
Slika 12 prikazuje delce kristalne oblike II, ki smo jih pridobili s prekristalizacijo iz acetona, slika 13 delce kristalne oblike I, ki smo jih pridobili s prekristalizacijo iz etanola, slika 14 delce amorfne oblike klaritromicina pridobljene s sušenjem z razprševanjem in slika 15 delce oblike amorfne klaritromicina, ki smo jih pridobili z hitro ohladitvijo taline. Vse slike so posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom.



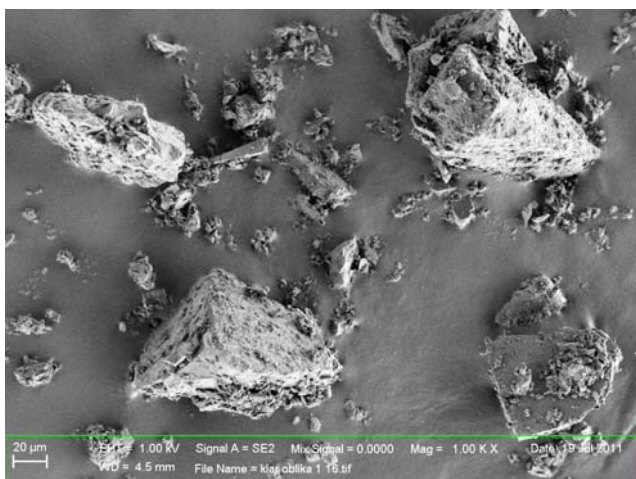
Slika12: Elektronsko mikroskopska slika delcev klaritromicina kristalne oblika II; povečava 1000 X (Vir: Fakulteta za farmacijo).



Slika13: Elektronsko mikroskopska slika delcev klaritromicina kristalne oblika I; povečava 1000X (Vir: Fakulteta za farmacijo).



Slika 14: Elektronsko mikroskopska slika amorfnega klaritromicin sušen z razprševanjem (SD); povečava 2000X (Vir: Fakulteta za farmacijo).



Slika 15: Elektronsko mikroskopska slika amorfnega klaritromicin pridobljenega z hitro ohlavitvijo taline (Q); povečava 1000X (Vir: Fakulteta za farmacijo).

4.3. Velikost delcev

Vzorce smo suspendirali v heksanu, tako da smo vedno imeli približno enako sipanje svetlobe. Rezultati so podani volumsko oziroma povprečna velikost delcev je izražena kot premer krogle, ki bi imela enak volumen kot analiziran delec, imenovan $D[4,3]$ in kot

specifična površina v m^2 , podana na gram vzorca. V preglednici 3 so podane srednje vrednosti dveh paralelnih meritev.

Preglednica 3: Rezultati velikosti delcev izmerjeni z lasersko difrakcijo.

	Klaritromicin kristalne oblike I	Klaritromicin kristalne oblike II	Klaritromicin amorfne oblike SD	Klaritromicin amorfne oblike Q
D [4,3] (μm)	166,56	382,61	380,45	472,78
S.S.A (m^2/g)	0,8862	0,7340	1,3590	0,2546

Največje delce smo izmerili pri klaritromicinu oblike II in vzorcu Q. Največje delce in hkrati najmanjšo specifično površino ima vzorec Q. Največjo specifično površino ima vzorec SD in je dvakrat večja kot pri kristalnih vzorcih. Kristalna oblika I ima najmanjše delce in drugo največjo specifično površino. Iz elektronske mikroskopske slike je razvidno, da bi morali biti delci SD najmanjši iz tega sklepamo, da smo z merjenjem z lasersko difrakcijo izmerili velik delež aglomeratov.

Iz rezultatov določanja velikosti delcev in specifične površine bi lahko predpostavili najboljše raztapljanje vzorca SD in najslabše raztapljanje vzorca Q.

4.4. Topnost klaritromicina v vodi

Ker prihaja med raztapljanjem metastabilne oblike klaritromicina (oblika I) in amorfnih oblik do njihove pretvorbe v stabilno obliko II, kar smo dokazali z DSC analizo trdnega preostanka po raztapljanju, podatki o topnosti omenjenih oblik niso absolutno točni oziroma realni. Pomagali bi si lahko s primerjavo topnosti omenjenih vzorcev v topilih, kjer bi bil prehod metastabilnih oblik v stabilno počasnejši oziroma z določitvijo kinetične topnosti v pogojih, ko bi bil prehod še zanemarljiv.

Diagram 1 prikazuje topnost vzorcev klaritromicina v vodi po 24 urah.

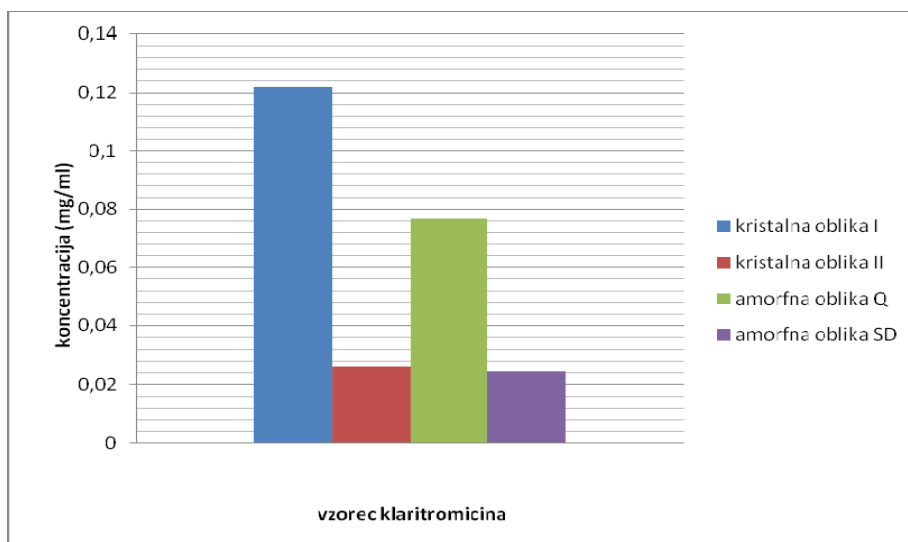


Diagram 1: Koncentracije vzorcev klaritromicina v vodi po 24 urnem mešanju na magnetnem mešalu.

Najboljša topnost v vodi je topnost kristalne oblike I. Sledi topnost amorfne oblike Q ter kristalne oblike II in amorfne oblike SD, ki pa sta glede na velikostni razred koncentracij zelo blizu skupaj. Topnost kristalne oblike je boljša od topnosti amorfne oblike. Predvidevamo, da so ti rezultati posledica različnega močenja vzorcev in s tem povezana velikost »učinkovite« površina delcev, ki je v stiku s topilom.

Rezultati topnosti niso povezani z rezultati določanja velikosti delcev posameznih vzorcev in njihovo specifično površino. Čeprav je povprečna velikost delcev oblike I najmanjša in specifična površina ni največja, je topnost tega vzorca najboljše. Velikost delcev smo merili v topilu, ki dobro moči delce, zato lahko predpostavimo, da je dispergirano delcev v vodi drugačna kot v heksanu in s tem tudi drugačna površina, ki je na voljo za raztapljanje.

Glede na rezultate termične analize imamo po 24 urah raztapljanja obliko II. Če je to res, bi morale biti tudi koncentracije pri določanju topnosti pri vseh oblikah enake, vendar niso. Ne vemo tudi podatka pri katerem času je prišlo do prehoda kinetične topnosti v termodinamsko topnost, kjer imamo stanje ravnotežja tekoče / trdno. Z našim delom tega nismo uspeli raziskati, zato so na tem področju potrebne še dodatne raziskave.

4.5. Profil raztapljanja klaritromicina

4.5.1. Hitrost raztapljanja vzorcev klaritromicina v vodi

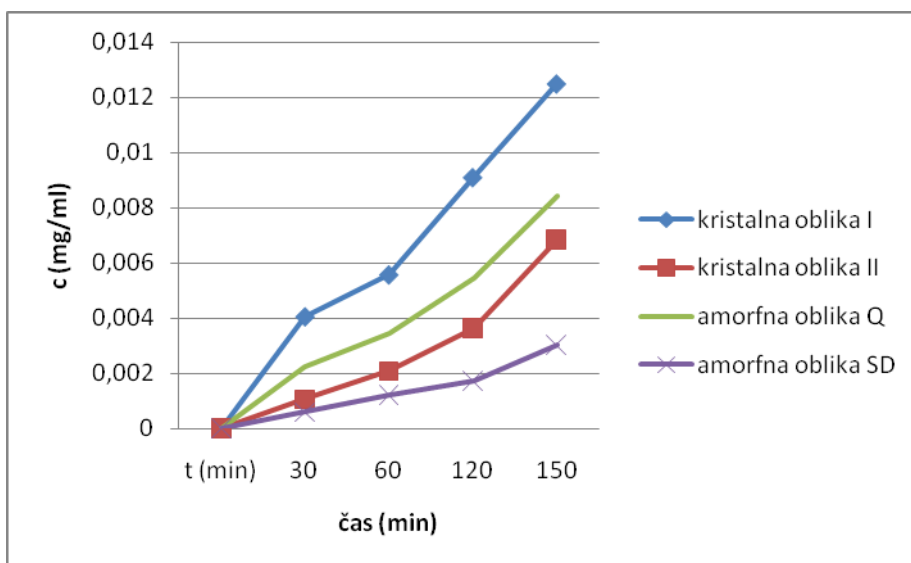


Diagram 2: Hitrost raztapljanja KMC kristalne oblike I, kristalne oblike II, amorfne oblike Q in amorfne oblike SD v vodnem mediju.

Primerjava hitrosti raztapljanja vzorcev klaritromicina v vodi daje podobne ugotovitve kot določanje topnosti po 24 urah. Tudi v tem primeru se najhitreje raztaplja kristalna oblika I, sledi ji amorfna oblika Q. Najslabše se raztaplja amorfna oblika SD. Pričakovali bi, da se bo amorfna oblika vzorca klaritromicina raztapljala najhitreje, vendar temu ni tako. Po 120 min raztapljanja se je sprostilo 2,3% zdravilne učinkovine kristalne oblike I, medtem ko je se v istem časovnem obdobju sprostilo samo 0,4% zdravilne učinkovine amorfne oblike SD glede na odmerek 350 mg. Spet lahko rezultate razložimo s tvorbo aglomeratov med SD delci, ki so dugače najmanjši in imajo največjo specifično površino vendar jih voda slabo moči.

4.5.2. Hitrost raztapljanja klaritromicina kristalne oblike II v raztopinah površinsko aktivnih snovi različnih koncentracij

Kot smo že omenili smo želeli najti ustrezen vodni medij, ki bi omogočil detekcijo razlik v raztapljanju med različnimi vzorci klaritromicina. V ta namen smo uporabili vodne raztopine natrijevega lavrilsulfata z različnimi koncentracijami.

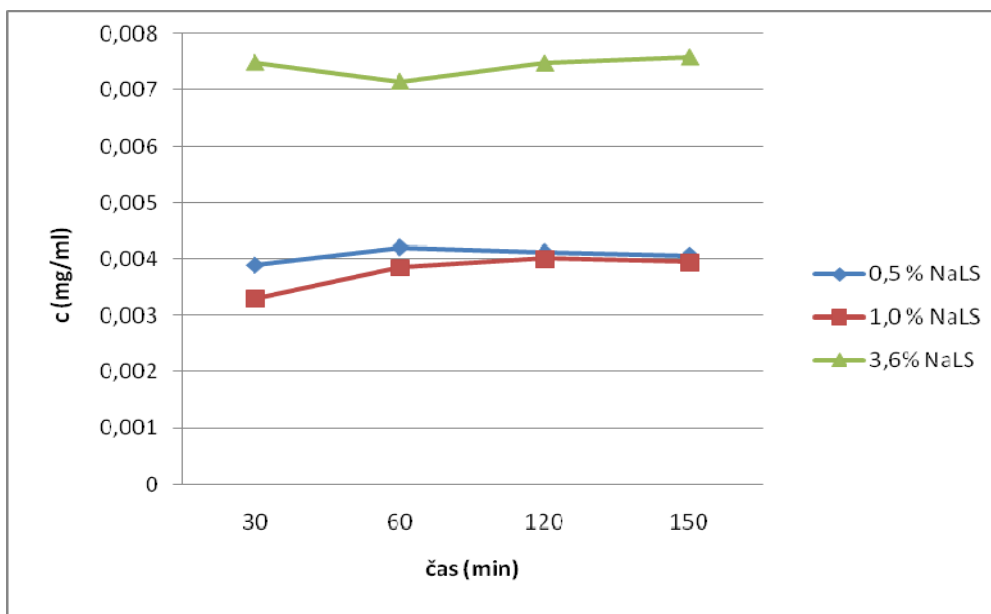


Diagram 3: Hitrost raztapljanja KMC kristalne oblike II v vodnem mediju ob dodatku različnih koncentracij površinsko aktivnih snovi.

Iz diagrama 3 opazimo, da je dodani NaLS sicer izboljšal raztapljanje klaritromicina, vendar so dobljene koncentracije še vedno zelo nizke. Poleg tega po 30 minutah koncentracija zdravilne učinkovine v mediju za raztapljanje ne narašča več. Po dveh urah se v vodni raztopini z 0,5% NaLS raztopi samo 1,06% zdravilne učinkovine, v mediju z 1% NaLS 1,03% učinkovine ter pri dodatku 3,6% NaLS 1,92% zdravilne učinkovine glede na odmerek 350 mg.

4.5.3. Hitrost raztapljanja klaritromicina kristalne oblike II v acetatnem pufru pH 5,0 brez in z dodatki površinsko aktivne snovi

Rezultati hitrosti raztapljanja klaritromicina v vodnih raztopinah površinsko aktivne snovi niso bili zadovoljivi, zato smo v nadaljevanju uporabili acetatni pufer pH 5,0 prav tako ob dodatku natrijevega lavrilsulfata.

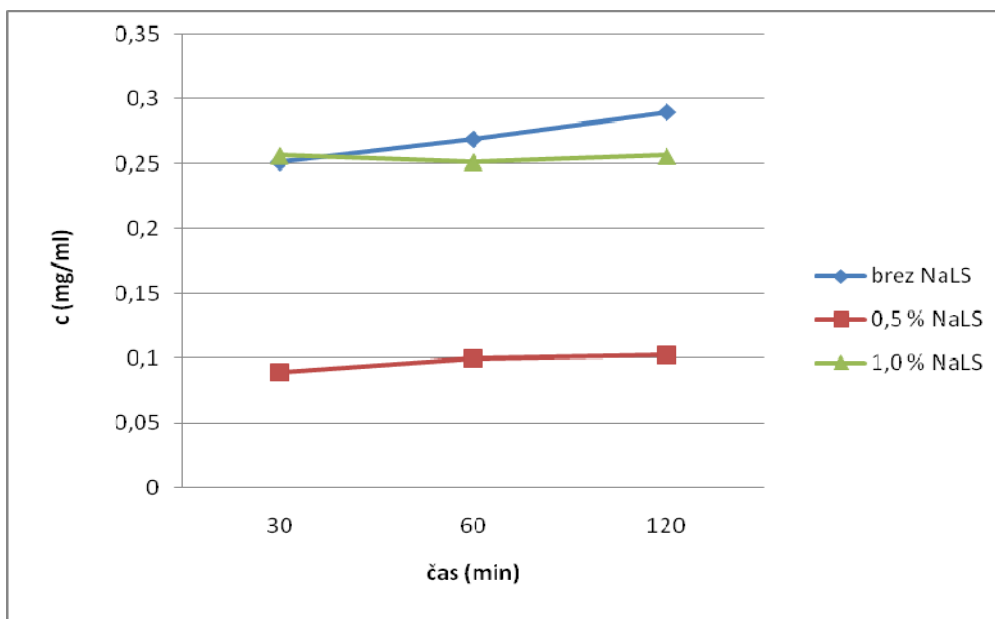


Diagram 4: Hitrost raztapljanja KMC kristalne oblike II v acetatnem pufru pH 5,0 ob dodatku različnih koncentracij površinsko aktivnih snovi.

Iz diagrama 4 je razvidno, da 0,5% koncentracija (koncentracija pod kritično micelsko koncentracijo) površinsko aktivne snovi ne prispeva bistveno k izboljšanju raztapljanja. Po končanem merjenju smo na dnu posode opazili aglomerirane delce. Predvidevamo, da natrijev lavrilsulfat pri nizki koncentraciji nezadostno izboljša močenje delcev učinkovine. V primeru raztapljanja v acetatnem pufru pH 5,0 pri dodatku 0,5% NaLS se po 30 minutah sproščanja raztopi 23,0% zdravilne učinkovine, po 120 minutah pa 26,4% zdravilne učinkovine. Pri dodatku 1% NaLS se po 30 minutah raztapljanja sprosti kar 66,0% zdravilne učinkovine, prav toliko se je raztopi tudi po 60 in 120 minutah raztapljanja. Opazimo tudi da dodatek površinsko aktivne snovi v koncentraciji nad kritično micelsko koncentracijo ni izboljšal raztapljanja čiste zdravilne učinkovine v pufru s pH 5,0, saj se v primeru, ko ni dodatka NaLS po 120 minutah raztopi 74,4% zdravilne učinkovine glede na maksimalno koncentracijo 0,3889 mg/ml.

4.5.4. Hitrost raztapljanja klaritromicina kristalne oblike II v medijih z različnimi pH

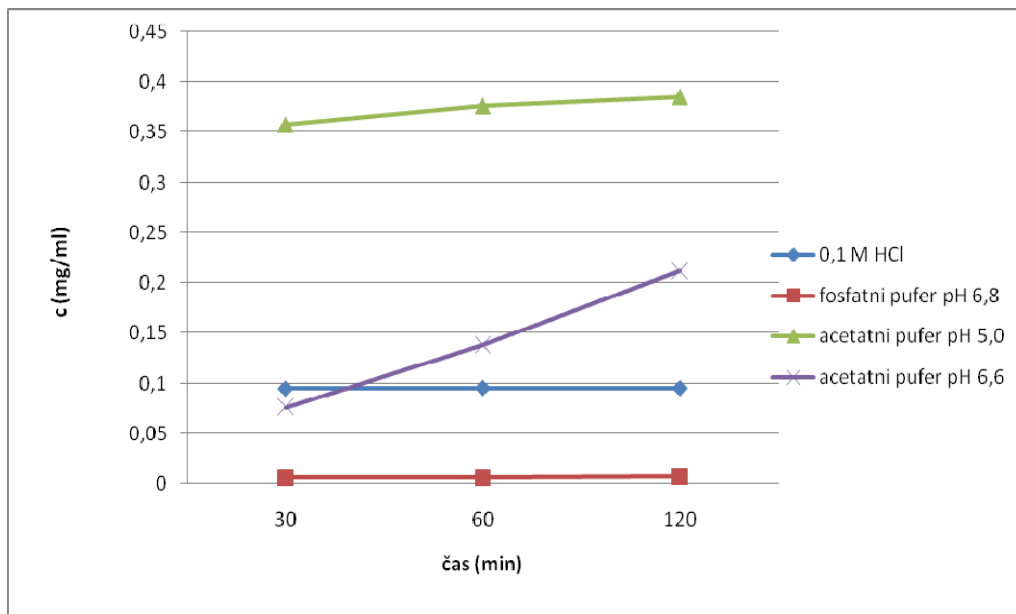


Diagram 5: Hitrost raztapljanja KMC kristalne oblike II v različnih medijih.

Diagram 5 prikazuje hitrost raztapljanja kristalne oblike II KMC v različnih medijih za raztapljanje pri čemer je iz rezultatov razvidno, da se v 0,1 M HCl raztapljanje skozi merjeni časovni interval ne spreminja. % zdravilne učinkovine (24% glede na maksimalno koncentracijo 350 mg odmerka - 0,3889 mg/ml), po 30 minutah je enak % zdravilne učinkovine po 120 minutah. Za primerjavo raztapljanja različnih vzorcev ta medij ni ustrezen. Podobno je neustrezen tudi pufer s pH 6,8, v katerem se zdravilna učinkovina prepočasi raztaplja, saj so vse izmerjene koncentracije zelo nizke (po 120 min se je sprostil samo 1,8% klaritromicina glede na maksimalno koncentracijo). Pri acetatnem pufru pH 5,0 pa se je po 30 minutah raztapljanja raztopilo 92,1% zdravilne učinkovine glede na maksimalno koncentracijo 350 mg odmerka. % sproščene zdravilne učinkovine je skozi merjen časovni interval samo še naraščal in po 60 minutah raztapljanja dosegel 96,8% ter po 120 minutah 99,1% zdravilne učinkovine glede na maksimalno koncentracijo 0,3889 mg/ml. Ker se je učinkovina prehitro raztapljala skozi časovni interval, omenjenega pufra nismo uporabili za nadaljne študije. Predpostavili smo, da je za proučevanje hitrosti raztapljanja najprimernejši acetatni pufer s pH 6,6, pri katerem je bilo raztapljanje po 30 minutah 19,6% ter po 120 minutah 54,4% maksimalne koncentracije.

Ionska moč se v prebavnem traktu spreminja od 0,01 do 0,2; odvisno od tega ali jo merimo na tešče ali po obroku. Z večanjem ionske moči medija (pufri), se zdravilna učinkovina lahko hitreje sprošča, raztaplja. Tako si lahko razlagamo slabo raztapljanje klaritromicina, ki je šibka baza, v kisli 0,1M HCl, ki vsebuje veliko manj ionov napram acetatnim puffrom pH 5,0, ki je zelo dobro topilo za bazični klaritromicin. Dobro raztapljanje v acetatnem puffru ima za posledico tudi dodan delež očetne kisline (umerjanje pH vrednosti) v medij acetatnega puffra, kar poveča nepolarnost medija.

4.5.5. Hitrost raztapljanja vzorcev klaritromicina z uporabo aparature 1 (USP)

Na osnovi raztapljanja klaritromicina oblike II v puffrih z različnimi pH-ji smo se odločili, da bomo za nadaljne študije uporabljali **acetatni pufer s pH 6,6**.

Meritve smo izvedli z uporabo aparature 1 (USP) (košarica). Pri delu z aparaturom z vesli smo namreč imeli težave glede močenja in adhezije delcev na stene posode. Metodo s košaricami smo priredili tako, da smo na dno košarice postavili plastični krog, ki je omogočal neposredno tehtanje vzorca v košarico. Predpostavljali smo, da bomo na ta način omogočili ponovljivo omočenje delcev v mediju za raztapljanje.

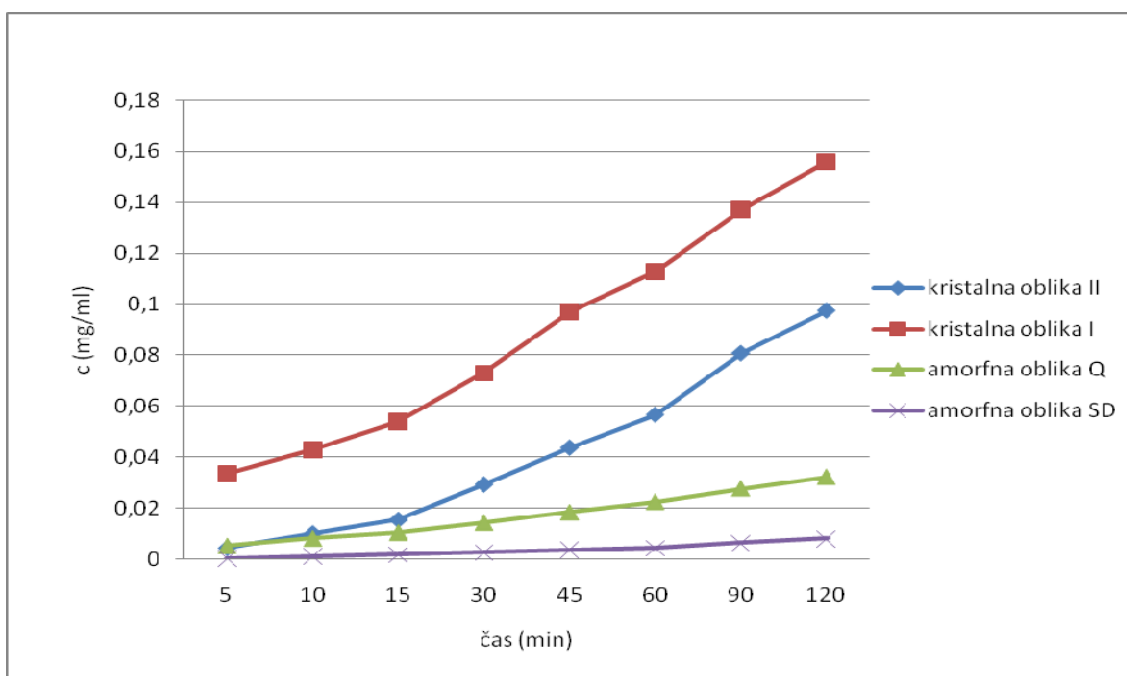


Diagram 6: Hitrost raztapljanja različnih oblik KMC v acetatnem puffru pH 6,6 z uporabo aparature 1.

Iz diagrama 6 je razvidno, da se v pufru s pH 6,6 najbolje raztaplja kristalna oblika I (po 120 minutah se je raztopilo 40,1% maksimalne koncentracije 0,3889 mg/ml), nato ji sledi kristalna oblika II ter amorfna oblika Q (8,3% učinkovine po 120 minutah raztapljanja). Amorfna oblika SD se najslabše raztaplja (po 120 minutah se je sprostil 1,6% zdravilne učinkovine glede na maksimalno koncentracijo). Opažanja pri izvajanju študije so bila sledeča: obnašanje praškov kristalne oblike I in II je podobno. Ni bilo lepljenja na posodo oziroma na košarico, prav tako delci niso plavali na površini. Amorfni obliki sta se obnašali drugače. Amorfna oblika SD je skoraj v celoti tvorila aglomerat, ki je po koncu raztapljanja še vedno imel povsem suho sredico. Omočenje delcev je bilo zelo slabo. Na podlagi zgoraj navedenih opažanj lahko sklepamo, da so bile nizke koncentracije KMC pri raztapljanju amorfne oblike SD rezultat neustrezne dispergiranosti delcev v mediju za raztapljanje.

V nadaljevanju smo primerjali raztapljanje klaritromicina SD z uporabo različnih mešalnih elementov.

4.5.6. Hitrost raztapljanja amorfne oblike klaritromicina sušene z razprševanjem z uporabo različnih mešal (aparatur)

Vzorec klaritromicina SD smo raztapljali z uporabo aparature 2 po USP, intrinzične hitrosti raztapljanja in raztapljanja v zmesi z nanodelci z uporabo aparature 1 (USP).

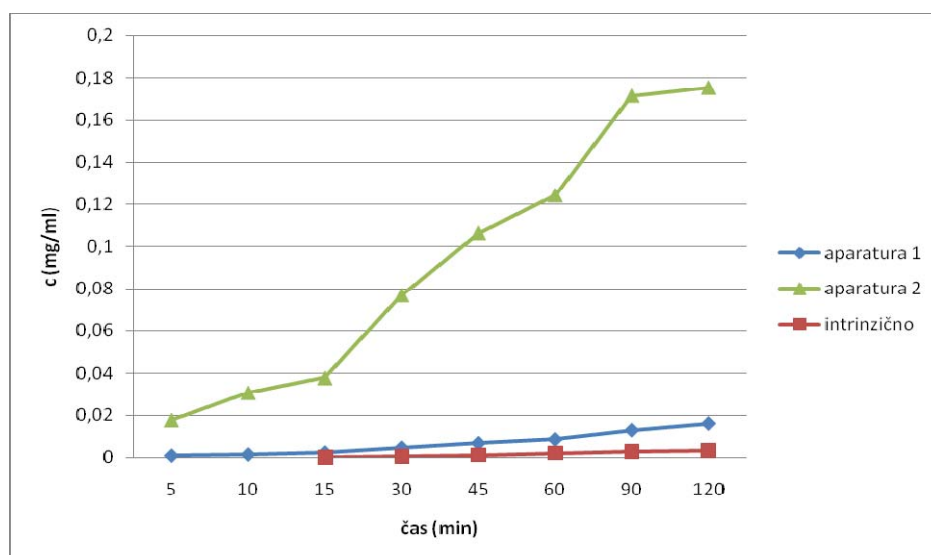


Diagram 7: Hitrost raztapljanja KMC amorfne oblike SD v acetatnem pufru pH 6,6 z uporabo različnih aparaturn za raztapljanje.

Iz diagrama 7 je razvidno, da je raztapljanje zdravilne učinkovine najhitrejše pri uporabi aparature 2 (USP), pri čemer se je po 120 minutah raztopilo 45% zdravilne učinkovine glede na maksimalno koncentracijo 0,3889 mg/ml. Pri uporabi aparature 1 (USP) in pri intrinzični hitrosti raztapljanja je raztapljanje mnogo počasnejše, saj se je po 120 minutah raztapljanja z uporabo aparature 1 raztopilo zgolj 4,1% zdravilne učinkovine in pri intrinzični hitrosti raztapljanja samo 0,85% klaritromicina. Pri intrinzični hitrosti raztapljanja je nizek delež sproščene zdravilne učinkovine rezultat raztapljanja majhne površine vzorca. Pri uporabi aparature 1 in aparature 2 po USP pa je kot smo že opisali prišlo do aglomeracije delcev in lepljenja praška vzorca na steno posode ter na mešalni element.

Glede na zgoraj navedene rezultate smo se odločili, da bomo v nadaljevanju iz praškastih vzorcev klaritromicina ter z uporabo hidrofilne pomožne snovi izdelali tablete, ki v mediju za raztapljanje hitro razpadejo.

4.5.7. Hitrost raztapljanja vzorcev klaritromicina z izdelavo tablet in uporabo aparature 2 (USP)

Odločili smo se, da bomo hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine iz tablet proučevali z aparaturo 2 (USP). Iz praška KMC in mikrokristalne celuloze smo naredili tablete in s tem zagotovili, da bodo delci po njihovem razpadu dobro dispergirani v mediju za raztapljanje in ne bo lepljenja na posodo za raztapljanje.

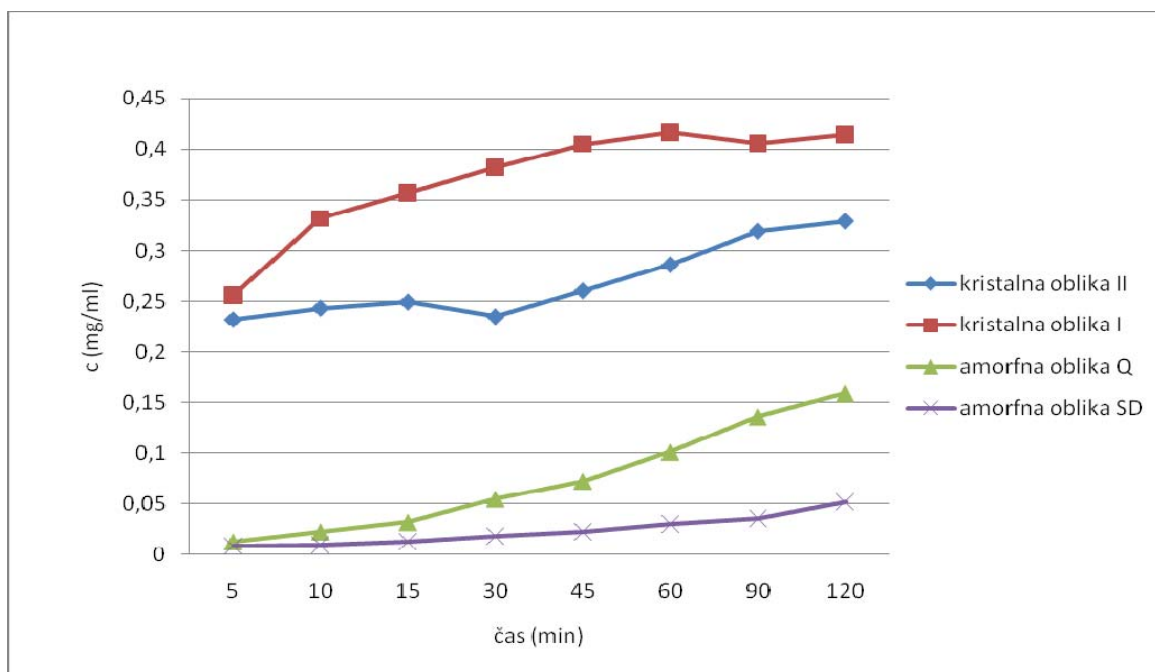


Diagram 8: Hitrost raztapljanja tablet različnih oblik KMC v mediju acetatnega pufra pH 6,6 z uporabo aparature 2 (USP).

Iz diagrama 8 je razvidno, da se najhitreje raztapljajo tablete s klaritromicinom kristalne oblike I, kjer se je raztopilo 100% zdravilne učinkovine glede na odmerek 350 mg. Sledijo tablete s klaritromicinom kristalne oblike II (85,1% sproščene zdravilne učinkovine), kar je povsem enako, kot v primeru raztapljanja praškov. Tablete amorfne oblike Q se slabše raztapljajo (41,0% raztopljene zdravilne učinkovine), vendar vseeno boljše kot v primeru raztapljanja praškov, kjer se po 120 minutah raztopi 5,8% zdravilne učinkovine (glede na maksimalno koncentracijo 0,3889 mg/ml). Najslabše se raztapljajo tablete amorfne oblike SD, pri katerih se je po 120 minutah raztopilo 13,0% zdravilne učinkovine glede na odmerek 350 mg.

4.5.8. Intrinzična hitrost raztapljanja vzorcev klaritromicina različnih oblik

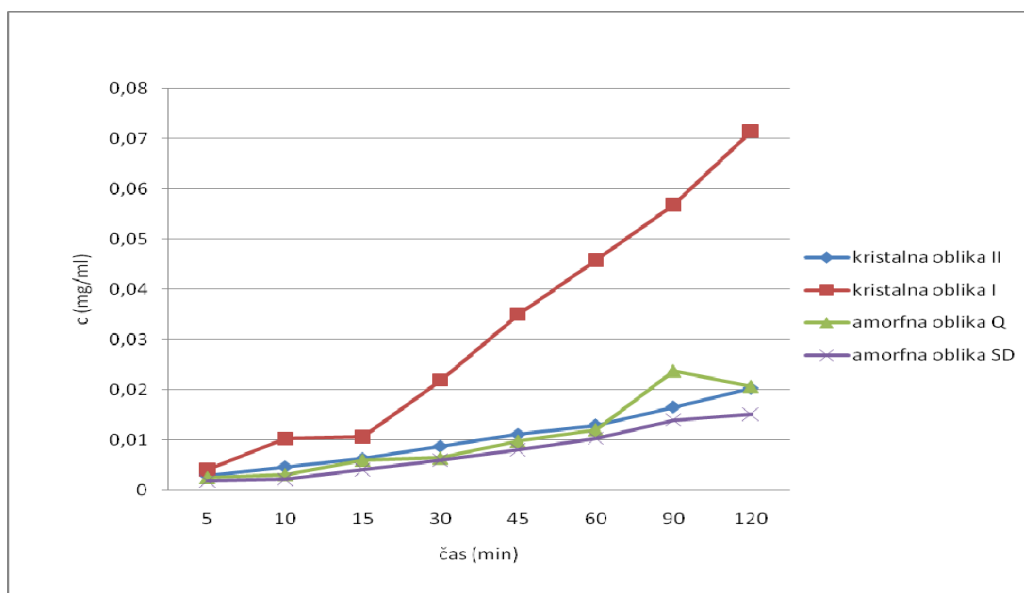


Diagram 9: Intrinzična hitrost raztapljanja vzorcev klaritromicina v acetatnem pufru s pH 3,7

Diagram 9 prikazuje koncentracije zdravilne učinkovine pri intrinzični hitrosti raztapljanja vzorcev klaritromicina v acetatnem pufru s pH 3,7. Ker z uporabo acetatnega puha pH 6,6 nismo dobili ustreznega profila raztapljanja (zdravilna učinkovina se je prepočasi raztapljala) smo se odločili, da omenjenemu pufru znižamo pH na 3,7. Iz diagrama je razvidno, da se najbolje raztaplja kristalna oblika I (18,0% raztopljenе zdravilne učinkovine glede na odmerek 350 mg). Vrednosti kristalne oblike II, amorfne oblike Q in amorfne oblike SD so nižje, raztapljanje le teh je slabše, saj se pri amorfni obliki SD po 120 minutah raztopi samo 3,9% klaritromicina.

4.5.9. Primerjava hitrosti raztapljanja vzorcev klaritromicina v obliki praška in tablet

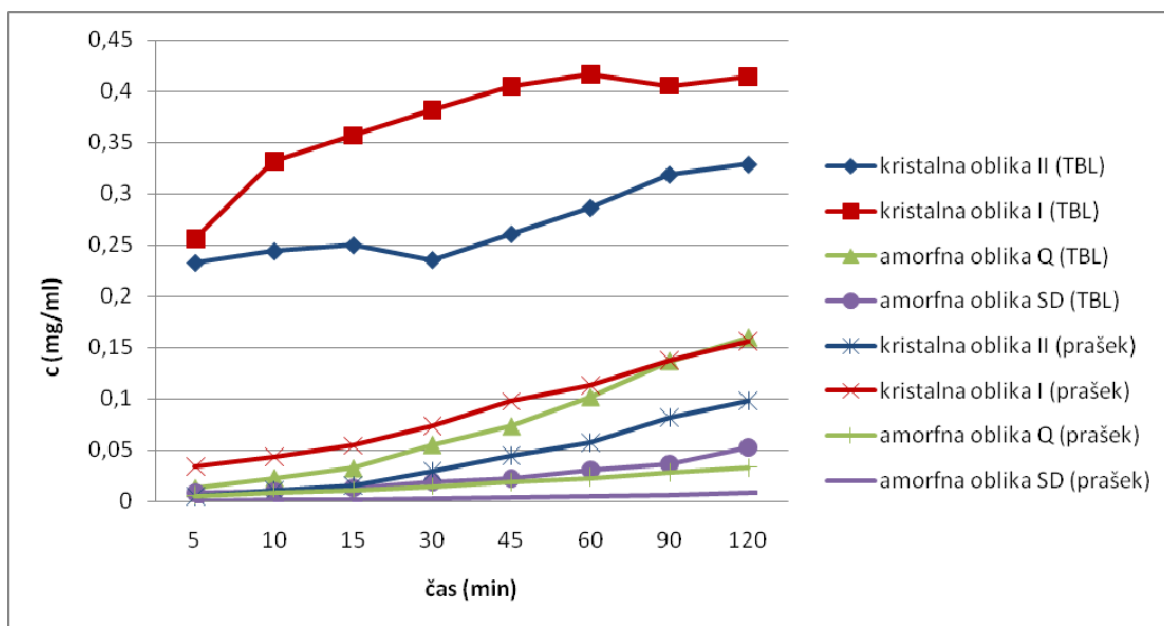


Diagram 10: Primerjava hitrosti raztapljanja vzorcev klaritromicina iz tablet in v obliki praška v acetatnem pufru s pH 6,6.

Če primerjamo prašek klaritromicina kristalne oblike I in tableto omenjenega klaritromicina opazimo, da so koncentracije raztopljene zdravilne učinkovine pri tableti veliko višje (po 120 minutah raztapljanja imamo pri tableti 100% delež raztopljene zdravilne učinkovine, pri prašku pa 40% maksimalne koncentracije (0,3889 mg/ml)). Razlogi so številni. Pri prašku smo opazili po končanem raztapljanju skupek neomočenega natehtanega praška v košarici. Pri uporabi tablet ne opazimo zgoraj navedenih problemov. Tableta je relativno hitro razpadla in delci so bili dobro dispergirani v mediju za raztapljanje. Pri tabletah opazimo, da se je vsa zdravilna učinkovina sprostil že v 45 min raztapljanja, medtem ko pri prašku raztapljanje ni končano niti po 120 minutah raztapljanja. Iz diagrama 10 je razvidno, da je raztapljanje KMC amorfne oblike Q slabše kot KMC kristalne oblike I in II. Pri tabletah (gledamo 120 minuto raztapljanja) spet opazimo višje koncentracije klaritromicina amorfne oblike Q (40,9 %), glede na prašek (8,3%), saj tableta v mediju razpade, vendar moramo poudariti, da je razpad tablete pri tem vzorcu klaritromicina veliko počasnejši v primerjavi z razpadom tablete klaritromicin kristalne oblike I in II. Pri razpadu te tablete ne opazimo dispergiranih delcev, saj tableta

razpada počasi (ne razpade takoj ko pride v stik z medijem). Pri praških pa so koncentracije nižje, saj se je prašek v košarici zlepil v aglomerat.

Najslabše se raztapljajo vzorci klaritromicina amorfne oblike SD. Iz diagrama 10 je razvidno, da so sproščene koncentracije amorfne klaritromicina nižje (po 120 minuti raztapljanja se je sprostil zgolj 2,1% zdravilne učinkovine praškastega vzorca).

4.5.10. Hitrost raztapljanja vzorcev klaritromicina v zmesi s titanovim dioksidom

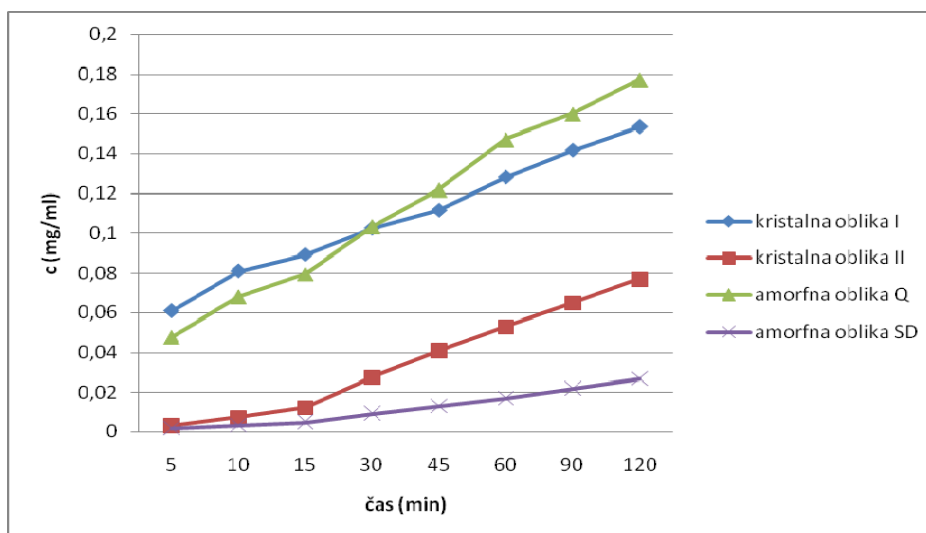


Diagram 11: Hitrost raztapljanje praškov v kombinaciji z nanodelci v mediju acetatnega pufra pH 6,6.

Podobno kot z izdelavo tablet smo z izdelavo zmesi z nanodelci TiO_2 želeli izboljšati močenje delcev klaritromicina. Rezultati kažejo, da se v zmesi z nanodelci najbolje raztapljata kristalna oblika I in amorfna oblika Q. Kristalna oblika I se najbolje raztaplja tudi v primeru, ko pri raztapljanju nismo uporabili nanodelcev. Medtem, pa se amorfna oblika v primeru kjer nismo uporabili nanodelce raztaplja veliko slabše, kot pa v primeru uporabe nanodelcev v zmesi s praškom 1:1. Glede na koncentracije raztopljenega klaritromicina je razvidno, da se po 30 minutah amorfna oblika Q (45,6% maksimalne koncentracije 0,3889 mg/ml) raztaplja celo bolje od kristalne oblike I (39,4% maksimalne koncentracije), ki je najbolje topna oblika klaritromicina pri vseh testih raztapljanja, ki smo jih izvedli. Tudi tokrat najslabše raztapljanje pripišemo amorfni obliki SD (6,9% glede na maksimalno koncentracijo), ki se najslabše raztaplja tudi v primeru klasičnega raztapljanja (brez uporabe nanodelcev).

5. Zaključek

V magistrski nalogi smo proučevali lastnosti dveh kristalnih in dveh amorfni vzorcev klaritromicina. Kristalno obliko I smo pripravili s prekrizalizacijo iz etanola ter kristalno obliko II s prekrizalizacijo iz acetona. Pripravo amorfne oblike klaritromicina smo izvedli s hitro ohladitvijo taline (amorfna oblika Q) ter s sušenjem z razprševanjem (amorfna oblika SD).

Izdelane vzorce smo vrednotili z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM). Z lasersko difrakcijo smo izmerili tudi velikosti in specifično površino delcev, nato smo z različnimi metodami vrednotili raztapljanje vzorcev klaritromicina.

- Z DSC metodo smo dokazali kristalne oblike in amornost vzorcev. Največje delce in najmanjšo specifično površino je imel vzorec pridobljen s hitro ohladitvijo taline. Najmanjše delce je imela kristalna oblika I, največjo specifično površino pa amorfni vzorec pridobljen s sušenjem z razprševanjem.

- Določili smo topnost v vodi pri sobni temperaturi, pri čemer smo ugotovili najboljšo topnost kristalne oblike I. Rezultati topnosti in termične analize se ne ujemajo, zato bi bile na tem področju potrebne še dodatne raziskave.

- Dodatek NaLS v medij za raztapljanje ni bistveno prispeval na rezultate raztapljanja klaritromicina.

- Bistveni parameter, ki vpiva na raztapljanje klaritromicina je pH medija. Ker je klaritromicin šibka baza lahko z zniževanjem pH vplivamo na izboljšanje raztapljanja, vendar bi bilo potrebno raziskati še vzroke slabega raztapljanja v 0,1 M HCl.

V nadaljevanju smo z različnimi metodami želeli ugotoviti kako je velikost delcev, njihova specifična površina in kristalnost povezana z raztapljanjem. V ta namen smo uporabili različne metode:

- a.) metodo intrinzičnega raztapljanja,
- b.) raztapljanje praškov in praškov v hitrorazpadajočih tabletah v aparaturi z vesli,
- c.) praškov in praškastih zmesi z nanodelci TiO_2 v aparaturi s košaricami.

Z izdelavo hitro razpadajočih tablet in zmesi z nanodelci TiO_2 smo želeli zmanjšati vpliv slabega omočenja na raztapljanje učinkovine. V vseh primerih se je najbolje raztapljala kristalna oblika I, najslabše pa amorfna oblika SD. Nepričakovano slabo raztapljanje amorfni vzorcev v primerjavi s kristalnimi je lahko posledica različne velikosti delcev ter

tvorbe aglomeratov. Razen v primeru izdelave zmesi nanodelcev TiO_2 z amorfnim vzorcem pridobljen s hitrim ohlajanjem taline, v ostalih primerih nismo uspeli izboljšati raztapljanje klaritromicina. Tako nismo dobli enoznačnega odgovora, da amorfizacija izboljša raztapljanje klaritromicina.

6. Literatura

1. Pavlica Egon. Časovna odvisnost tokov fotovzbujenih nosilcev naboja v organskih polprevodniških plasteh. Diplomsko delo, Ljubljana, 2001.
2. http://bsnet.eu.org/me/studij/3l/snovi-in-gradiva/Predavanje_2del.pdf.
3. Nair R.-H., Ron C. K., Brent D. S., Jonathan M. M.: Crystalization: General principles and significance on product development. V: Swarbrick J., Encyclopedia of pharmaceutical technology, 3rd Ed 2007, vol. 2: 834-857.
4. Rast kristalov iz taline Čabric, 1989, št. 36, stran 172-180.
5. Banga S., Chawla G., Varandani D., Mehta B.R., Bansal A.K.: Modification of the crystal habit of celecoxib for improved processability, J Pharm Pharmacol. 2007 Jan; 59(1):29-39.
6. K. R. Jetti Ram, U. Griesser, *EU 1674468 A1*, 2006; Chem. Abstr. 2006, 145, 90009.
7. L. Dähne, B. Baude, G. Ferreira, *WO 2007/068495*, 2007; Chem. Abstr. 2007, 149, 386628.
8. Grant D.J.W., Theory and origin of polymorphism, v: Polymorphism in Pharmaceutical Solids, Vol. 95, Marcel Dekker, New York (1999), str. 1-33.
9. Gullory J. K. Generation of polymorphs, hydrates, solvates and amorphous solids. In: Brittain HG. Polymorphism in pharmaceutical solids. 1sted. New York: Marcel Dekker, 1999: 183-226.
10. Jerslev B, Frokjaer S, Thorbek P. Organic solid phase analysis. Part 2. Arch Pharm Chemi Sci Ed. 1981; 9: 123-130.
11. Crowley KJ, Zogafi G. Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: Assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. J Pharm Sci. 2002; 91: 492-507.
12. Farm Vestn 2010; 61: Kokristali zdravilnih učinkovin: Borut Kovačič, Odon Planinšek, Franc Vrečer, 30.
13. Craig DQM, Royall PG, Kett VL, Hopton ML. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. Int J Pharm 1999; 179:179-207.
14. Byrn SR, Pfeiffer RR, Stowell JG: Solid-state chemistry of drugs. 2nd ed. Indiana: SSCI, 1999:22-25,249-258.

15. Farm Vestn 2007; 58: Nekatere metode stabilizacije amorfnih učinkovin: Odon Planinšek, 8.
16. Bastarda A., M. Salobir, R. Grahek. Stable pharmaceutical product and formulation. EP20030770970, datum prijave: 10. 10. 2003.
17. Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterisation and stabilization. Adv Drug Deliver Rev 2001; 48: 27-42.
18. Brittain HG: Polymorphism in pharmaceutical solids. New York, Basel: Marcel Dekker, 1999, 183-226,395-420.
19. Clement, S.; Purutyan, H. Narrowing down equipment choices for particle-size reduction. Chem. Eng. Progress 2002; June: 50-54.
20. Kwan CC, Chen JQ, Ding YL, Papadopoulo DG, Craig Bentham A, Ghadiri M. Development of a novel approach towards predicting the milling.
21. Deschmps M, Willart JF, Dudognon E, Caron V. Transformation of pharmaceutical compounds upon milling and comilling. The role of T_g . J Pharm Sci 2007; 96:398-1407.
22. Chikhalia V, Forbes RT, Storey RA, Ticehurst M. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. Eur J Pharm Sci. 2006; 27:19-26.
23. Ward. GH, Shultz RK. Process-induced crystallinity changes in albuterol sulphate and its effect on powder physical stability. Pharm res. 1995; 12:773-779.
24. Begat P, Young PM, Edge S, Kaeger JS, Price R. The effect of mechanical processing on surface stability of pharmaceutical powders: Visualization by atomic force microscopy. J Pharm Sci. 2003; 92:611-620.
25. Crowley K, Zografí G. Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: Assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. JPharm Sci. 2002; 91: 492-507.
26. Willart JF, Descamps M. Solid state amorphization of pharmaceuticals. Mol Pharm 2008; 5:905-920.
27. Okamoto PR, Lam NQ, Rehn LE. Physics of crystal-to-glass transformations. Solid State Phys. 1999; 52:1-135.
28. 29. Fecht HJ. Defect-induced melting and solid state amorphization. Nature. 1992; 356:133-135.
29. Sheth AR, Bates S, Muller FX, Grant DJW. Local structure in amorphous phases of piroxicam from powder X-ray diffractometry. Cryst Growth Des. 2005; 5:51-578.

30. Savolainen M, Jouppila K, Pajamo O, Christiansen L, Strachan C, Karjalainen M, Ratanen J. Determination of amorphous content in the pharmaceutical process environment. *JPharm Pharmacol.* 2007; 59:161-170.
31. Bauer-Brandl A. Polymorphic transitions of cimetidine during manufacture of solid dosage forms. *Int J Pharm* 1996; 140: 195 – 206.
32. Newell He, Buckton G. The use of inverse phase gas chromatography to measure the surface energy of crystalline, amorphous and recently milled lactose. *Pharm Res.* 2001; 18: 662-666.
33. Formulation of parenteral protein products. APV seminar. Berlin 3. - 4. februar 2003.
34. Swarbrick J, Boylan CJ: *Encyclopedia of pharmaceutical technology.* 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2002: 1299-1326, 1534-1535, 2425-2429.
35. Broadhead SK, Rouan E, Rhodes CT: The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev Ind Pharm.* 1992; 18: 1169-1206.
36. Lin SY, Kao YH. Solid particulates of drug beta cyclodekstrin inclusion complexes directly prepared by spray drying technique. *Int J Pharm.* 1989; 56; 249-259.
37. Esclusa DMT, Guimaraens MM, Perez MMB. Characterisation and in vitro dissolution behaviour of ketokonazole/beta and 2-hidroxypropyl beta cyclodextrin inclusion compounds. *Int J Pharm.* 1996; 143: 203-210.
38. Vidgren P, Paronen P. Physical stability and inhalation behaviour of mechanically micronized and spray dried disodium cromoglycate in different humidities. *Acta Pharm Fenn.* 1989; 98; 71-78.
39. Kileen M.J., The process of spray drying and spray congealing. *Pharm. Eng.* 1993, 13, 56–64.
40. Lieberman HA, Lachman L, Schwartz J B: *Pharmaceutical dosage forms: Tablets.* 2nd ed. New York, Basel: Marcel Dekker, 1990, 107-145.
41. Jochem Alsenz, Manfred Kansy., High throughput solubility measurement in drug discovery and development *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 546-567.
42. *European Pharmacopoeia. Supplement 5.5 to the 4th Edition.* Council of Europe. Strasbourg 2005.
43. *The united states Pharmacopoeia (USP 29, NF24). National Formulary Supplement 20.* Unted States Pharmacopoeia Convention, Inc. Rockville 2005.
44. CA Lipinski, F. Lombardo, BW Dominy, PJ Feeney, *Experimental and*

- computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, 23 (1-3) (1997) 3-25.
45. Baumgartner S: Vpliv gibanja prebavnega trakta na potovanje farmacevtskih oblik in absorpcija učinkovine. Farmaceutski vestnik 2003; 54: 573-581.
46. Alendronic Acid, Martindale: The Complete Drug Reference, 34th edition, Pharmaceutical Press, London, 2005, 765-766.
47. Uroš Klančar, Igor Legen, Albin Kristl, Aleš Mrhar: »*In vitro-in vivo*« korelacija (IVIVC) za učinkovine v pripravkih s podaljšanim sprošoeanjem, ki se intenzivno metabolizirajo ali absorbirajo s prenašalci v prebavilih: Farmaceutski Vestnik 2010; 61: 162–170.
48. Planinšek O. Nekatere metode za povečanje topnosti in hitrost raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin-1.del. Strokovni članek. Farmaceutski vestnik. 2001, 52: 221-230.
49. http://en.wikipedia.org/wiki/Sodium_lauryl_sulfate.
50. Hanson WA. Handbook of dissolution testing. 2nd Edition, Revised. Aster Publishing Corporation. Evgenene. Oregon. USA.1990.
51. Kincl M. Hitrost sproščanja diklofenak natrijeve soli iz tablet z lipofilnim ogrodnim sistemom. Doktorsko delo. Ljubljana 2003, 38-42.
52. Banaker UV. Pharmaceutical dissolution testing. Marcel Dekker, New York (1991) 1-187.
53. Monografija (1087) Intrinsic dissolution iz USP.
54. http://www.drugfuture.com/Pharmacopoeia/USP32/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c1087.html.
55. The Merck Index, 13th Edition. Merck & Company Incorporated, Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2001.
56. SmPC CLAROGEN 500 mg tablete. Baza podatkov o zdravilih, 2007: <http://www.zdravila.net/>.
57. Zhang X, Wang Y, Wang J, Wang Y, Li S: Effect of Pore Former on the Properties of Coated Film Prepared from Blends of Eudragit® NE 30 D and Eudragit® L 30 D-55.Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2007; 55: 1261-1263.
58. www.merck.com/mmpe/lexicomp/clarithromycin.html.
59. dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm%3Farchiveid%3D6134.

60. Sohn Y T, Rhee J K, Im W B: Polymorphism of Clarithromycin. Archives of Pharmacal Research, 2000; 23: 381-384.
61. Lee T S, Lee J C, Lee K I, Lee G S, Kim W J: Method of Preparing Form II Crystals of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/14099 A1, Mar. 16, 2000.
62. Yonemochi E, Kitahara S, Maeda S, Yamamura S, Oguchi T, Yamamoto K: Physicochemical Properties of Amorphous Clarithromycin Obtained by Grinding and Spray Drying. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999; 7: 331-338.
63. Crystal form I of clarithromycin. United States Patent. Patent Number: 5,858,986. Jan.12,1999.
64. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01211>.