

Univerza *v Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



RENATA DRAB

PROUČEVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH LASTNOSTI AMORFNE IN
KRISTALNIH OBLIK KLARITROMICINA

STUDY OF THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF AMORPHOUS
AND CRYSTALLINE FORMS OF CLARITHROMYCIN

Ljubljana, 2012

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Odonu Planinška.

Renata Drab

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom izr. prof. dr. Odonu Planinška.

Zahvala

Mentorju izr. prof. dr. Odonu Planinšku se najlepše zahvaljujem za strokovno pomoč, izvirne ideje, potrpežljivost, praktične nasvete in za prijetno delovno vzdušje.

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Albin Kristl

Članica magistrske komisije: doc. dr. Janez Ilaš

Ljubljana, februar, 2012

KAZALO:

POVZETEK	2
SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV	3
1. UVOD	6
1.1 Kristalna in amorfna oblika snovi	6
1.2 Polimorfizem	11
1.2.1 Fizikalne lastnosti polimorfov	12
1.3 Priprava polimorfnih in amorfnih oblik učinkovine	13
1.4 Fizikalno-kemijske lastnosti kristalnih in amorfnih snovi, ki jih proučujemo v predformulacijskih raziskavah	19
1.4.1 Rentgenska praškovna difrakcija	20
1.4.2 Termična analiza	22
1.4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	22
1.4.4 Infrardeča spektroskopija	24
1.4.5 Inverzna plinska kromatografija	26
1.4.6 Močljivost površin	33
1.4.7 Vrstična elektronska mikroskopija	36
1.4.8 Merjenje prave gostote trdnih snovi	38
1.5 Klaritromicin	39
1.5.3 Klaritromicin oblika I	41
1.5.4 Klaritromicin oblika II	41
1.5.5 Klaritromicin oblika O	42
1.5.6 Amorfen klaritromicin	42
1.5.7 Spremembe, ki vplivajo na kristaliničnost klaritromicina	42
1.6 Primer proučevanja fizikalno-kemijskih lastnosti kristalnega in amorfnega simvastatina	45
2. NAMEN DELA	49
3. MATERIALI IN APARATURE:	50
3.1 Uporabljeni materiali in oprema	50
3.1.1 Materiali:	50
3.1.2 Oprema:	50
3.2 Eksperimentalno delo	51
3.2.1 Priprava vzorcev	51
3.2.2 Analizne metode	51
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	54
4.1 Vrstična elektronska mikroskopija	54
4.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija	56
4.3 ATR infrardeča spektroskopija	57
4.4 Določanje stičnega kota	60
4.5 Določanje prave gostote	62
4.6 Inverzna plinska kromatografija	63
5. ZAKLJUČEK:	65
6. LITERATURA:	66

POVZETEK

Zdravilna učinkovina je snov, ki že izkazuje želeni terapevtski učinek. Pogosto novejše zdravilne učinkovine nimajo ustreznih fizikalno-kemijskih lastnosti, da bi dosegle mesto delovanja. S pomočjo različnih tehnoloških postopkov spreminjamo fizikalno-kemijske lastnosti zdravilnih učinkovin in jih vgrajujemo v različne farmacevtske oblike. Z upoštevanjem fizikalno-kemijskih lastnosti pomožnih snovi omogočimo njeno uporabnost.

V magistrski nalogi smo med seboj primerjali dva kristalna in dva amorfna vzorca klaritromicina. Kristalno obliko I smo pripravili s prekristalizacijo klaritromicina iz tetrahidrofurana, kristalno obliko II pa s prekristalizacijo iz etanola. Amorfno učinkovino smo pridobili s hitro ohladitvijo taline (amorfna oblika Q), ter s sušenjem z razprševanjem (amorfna oblika SD).

Med delom smo uporabili naslednje analizne tehnike s katerimi smo želeli potrditi in okarakterizirati kristalno obliko oziroma amornost izdelanih delcev: vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM), diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), IR spektroskopijo s Furierjevo transformacijo, določitev močenja z metodo sedeče kapljice, piknometrično določitev gostote in inverzno plinsko kromatografijo.

Z vrstično elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da se delci posameznih vzorcev med seboj razlikujejo. S termično analizo smo potrdili uspešnost priprave obeh kristalnih oblik in dveh amornih vzorcev, ter njihovo prehajanje v najbolj stabilno obliko I tekom segrevanja, ATR (metoda oslajljene popolne odbojnosti, angl. Attenuated Total Reflectance) infrardeča spektroskopija je pokazala razliko med kristalnima vzorcema, ter med njima in amornima vzorcema. Amorfna vzorca se v IR spektru nista razlikovala. Z določitvijo prave gostote smo ugotovili da imata amorfna vzorca nižjo gostoto od kristalnih. Izmerjeni stični koti vode so nižji pri kristalinih oblikah klaritromicina, v primerjavi z amornima vzorcema, kar je nepričakovano, a se ujema z rezultati raztapljanja teh vzorcev v vodi. Z inverzno plinsko kromatografijo smo dokazali, da se vzorci med seboj razlikujejo tako v polarnih, kot v nepolarnih lastnostih.

SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV

Å...angstroms

a...površina adsorbirane molekule

AECB...(angl. acute exacerbation of chronic bronchitis) akutno poslabšanje kroničnega bronhitisa

AN, AN*...(angl.: acceptor number) elektron akceptorsko število

ATR IR...(angl.: attenuated total reflection) spektroskopska tehnika oslabiljenega popolnega odboja

C...konstanta odvisna od izbranega standardnega stanja

C_p...toplotna kapaciteta

d...razdalja med ravninami

DN...(angl.: donor number) elektron donorsko število

DRIFT (angl. Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform) kvantitativna metoda difuzijske refleksije

DSC...diferenčna dinamična kalorimetija

EMV...elektromagnetno valovanje

F...volumski pretok nosilnega plina

FT-RS...Fourierjeva transformacija Ramanske spektroskopije

FT-IR...infrardeča spektroskopije s Fourierjevo transformacijo

dG...Gibbsove proste energije

ΔG_a^0 ...prosta energija adsorpcije

ΔG_d^0 ...prosta energija desorpcije

ΔG_A^{SP} ...specifična oziroma polarna prosta energija adsorpcije

ΔG_A^D ...nespecifična oziroma nepolarna prosta energija adsorpcije

G_m...molska prosta entalpija oziroma molska Gibbsova prosta energija

dH...sprememba entalpije

HPLC...tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

IGC...inverzna plinska kromatografija

J...korekcijski parameter, ki upošteva stisljivost nosilnega plina

K_A ...parameter, ki označuje elektron akceptorske (kislinske) lastnosti trdne površine

K_D ...parameter, ki označuje elektron donorske (bazične) lastnosti trdne površine

KMC...klaritromicin

m...masa

n...naravno število

NMR...jedrska magnetna resonanca

PLM...polarizirana optična mikroskopija

P...tlak He v celici

P_{in} ...tlak na vhodu v kolono

P_{out} ...tlak na izhodu iz kolone

P_{sg} ...standardni tlak plina,

R...splošna plinska konstanta [8,314 J/mol K]

RTG...rentgenski žarki

S-entropija

S_m -molska entropija

SEM...vrstični elektronski mikroskop

T...temperatura v K

T_g ...temperatura steklastega prehoda

T_t ...temperatura tališča

T_{vz} ...temperatura vzorca

T_{ref} ...temperatura referenčnega vzorca

t_r ...retencijski čas injicirane parne faze standarda

t_0 ...retencijski čas plina, ki ne vstopa v interakcije z vzorcem (metan)

TGA...termogravimetrijska analiza

THF...tetrahidro furan

V...volumen, ki ga v celici zavzema He

V_m -molski volumen

V_n ...retencijski volumen

W_a ...adhezijsko delo

W_a^d ...nepolarno adhezijsko delo

XRPD...X-ray praškovna difrakcijska analiza

XRD...rentgenska praškovna difrakcija

γ ...medfazna napetost/energija

γ_l^d ...neolarni del površinske napetosti tekočine

$\gamma_{s,v}$...prosta površinska energija trdne snovi na meji s svojimi parami

$\gamma_{s,l}$...prosta površinska energija na mejni površini trdna snov/tekočina

$\gamma_{l,v}$...prosta površinska energija tekočine na mejni površini tekočina/para

γ^d ...nepolarni prispevek k prosti površinski energiji

γ^p ...polarni prispevek k prosti površinski energiji

γ_s^d ...nepolarni prispevek k prosti površinski energiji trdne snovi

γ_s^p ...polarni prispevek k prosti površinski energiji trdne snovi

γ_l^d ...nepolarni prispevek k prosti površinski energiji tekočine

γ_l^p ...polarni prispevek k prosti površinski energiji tekočine

θ ...kot uklona

λ ...valovna dolžina

μ ...kemijski potencial

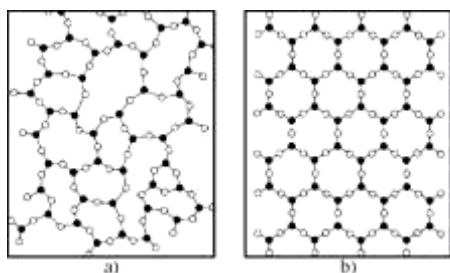
π_0 ...standardni površinski tlak

ρ ...gostota

1. UVOD

1.1 Kristalna in amorfna oblika snovi

Lastnosti vsake snovi so odvisne od njene strukture. Ločimo dve vrsti trdnih snovi: kristalne in amorfne. V kristalnih snoveh obstaja urejenost atomov v prostoru, medtem ko pri amorfni snovi te urejenosti ni. V amorfni snovi je pozicijski red zgradbe snovi kratkega dosega, ki je omejen le na najbližje sosede. Red kratkega dosega je prikazan na sliki 1, na primeru spojine A_3B_2 . Vsak atom vrste B (temni krožci) je obdan s tremi atomi vrste A (svetli krožci). Vsak istovrstni atom ima podobno okolico, ne pa enake, kajti razdalje in koti med vezmi se razlikujejo in zato ni reda dolgega dosega, ki je značilen za kristalno strukturo (1). Kristalna struktura je tako sestavljena iz urejenih skladov atomov v prostoru.



Slika 1: Shematični prikaz (a) amorfne in (b) kristalne snovi (1).

Amorfne snovi nimajo urejene zgradbe, vendar je ta v povprečju enako neurejena oziroma gre za določeno stopnjo urejenosti sosednjih molekul v vseh smereh. Zato so njihove lastnosti v vseh smereh enake – izotropne. Nasprotno pa so lastnosti kristalov anizotropne – neenake v različnih smereh. Neenake so zato, ker se razdalje med atomi v različnih smereh razlikujejo, ponavljajo pa se zato, ker ima vsak kristal določene simetrijske elemente (1).

Ker je amorfna oblika trdne snovi sestavljena iz neurejeno razporejenih molekul, ki ne sestavljajo značilne kristalne rešetke lahko rečemo, da imajo nično kristalnost (»zero-crystallinity«). Amorfna oblika je heterogena, ker se posamezna področja po stopnji urejenosti in gostoti med seboj razlikujejo (2).

Amorfnim snovem pravimo tudi stekla. Zaradi večje Gibbs-ove proste energije v primerjavi s kristali imajo amorfni težnjo po kristalizaciji v stabilno kristalno obliko in so tudi kemijsko bolj reaktivni (3).

S termodinamskega vidika je kristalizacija in tvorba novih polimorfov proces, pri katerem pride do fazne spremembe tekoče-trdno. Ker se molekulam zmanjša kinetična energija zaradi razvrščanja na določena mesta v kristalni mreži, se prebitek energije sprošča v obliki toplote v okolico-gre za eksotermni proces. Za opisovanje faznih sprememb v odprtih sistemih pri konstantni temperaturi in tlaku uporabljamo Gibbsovo prosto energijo (G).

Pri določeni temperaturi in tlaku je termodinamsko stabilna samo ena polimorfna oblika. Polimorf, ki je pri določenih pogojih (temperatura, tlak) najbolj stabilen, ima nižjo Gibbsovo prosto energijo (4, 5).

Oblike, ki so termodinamsko manj stabilne, z določeno kinetiko spontano prehajajo v stabilno (6).

Razlika v Gibbsovi prosti energiji (dG), je gonilna sila polimorfni prehodov pri konstantni temperaturi in tlaku. Pri določeni temperaturi in tlaku dG zapišemo s spremembo entalpije in entropije procesa (enačba 1):

$$dG=dH-TdS \quad [1]$$

dG-sprememba Gibbsove proste energije

dH-sprememba entalpije

T-temperatura

dS-sprememba entropije

Kadar imamo opravka s sistemi pri konstantni temperaturi in tlaku je Gibbsova prosta energija povezan z izrazom kemijski potencial (μ). Za čisto snov (komponento) je kemijski potencial enak molski prosti entalpiji oziroma molski Gibbsovi prosti energiji (G_m).

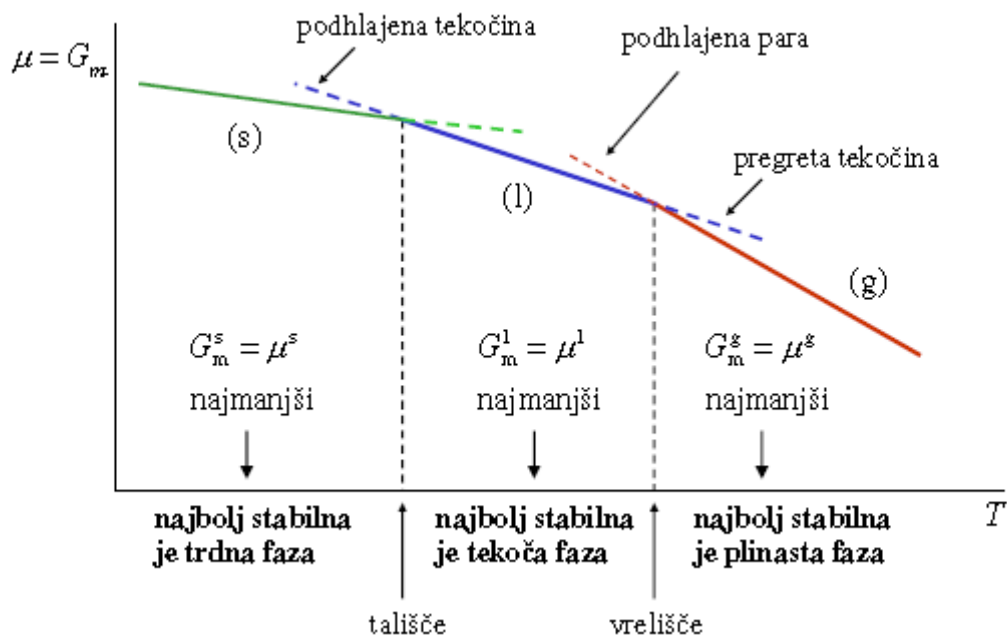
Čista snov: $\mu=G_m$

$$dG_m=-S_m dT+V_m dp$$

[2]

S_m -molska entropija

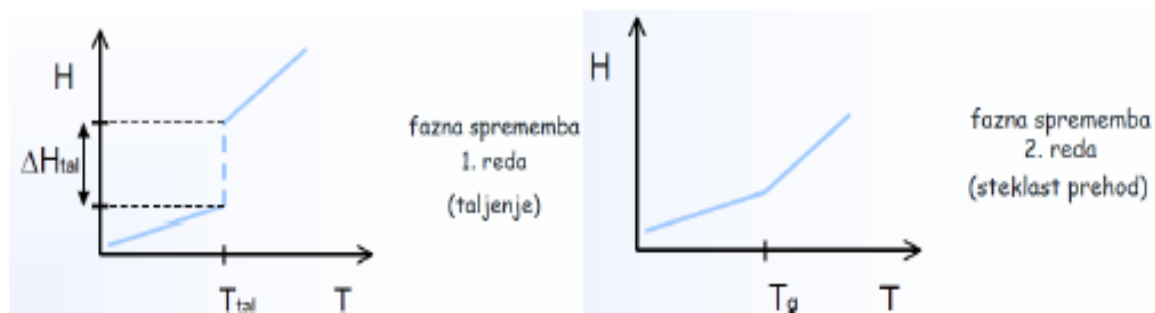
V_m -molski volumen



Slika 2: Fazni diagram odvisnost kemijskega potenciala od temperature pri konstantnem tlaku

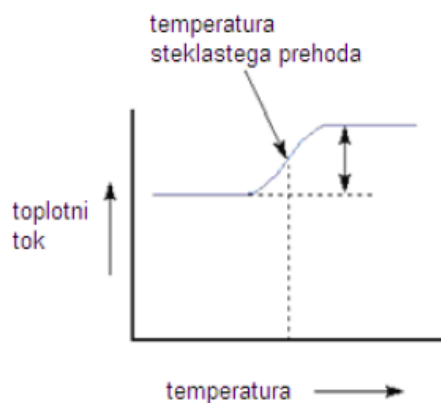
Če ni ravnotežja, potem snov spontano prehaja z mesta višjega kemijskega potenciala na mesto nižjega potenciala. Na primer, snov spontano difundira iz področja višje koncentracije (višjega kemijskega potenciala) v področje nižje koncentracije (nižjega kemijskega potenciala). Tudi fazni prehod poteka v smeri zmanjšanja kemijskega potenciala. Stabilna je tista faza, ki ima pri določenih pogojih najnižji kemijski potencial (slika 2) (7).

Amorfna oblika nima tališča, ki je fazna sprememba prvega reda in je značilna za kristalinične snovi, ampak temperaturni interval, v katerem trdna snov prehaja iz trdnega steklastega v zmečano stanje pri temperaturi steklastega prehoda, ki je fazna sprememba drugega reda (slika 3). Temperatura steklastega prehoda ni fiksna, odvisna je od hitrosti ohlajanja in segrevanja. (8, 9).



Slika 3: razlika med taljenjem, kot prehodom prvega reda in steklastim prehodom

Za določitev temperature steklastega prehoda najpogosteje uporabljamo metodo polovice dviga v temperaturnem območju, kjer pride do steklastega prehoda (slika 4).



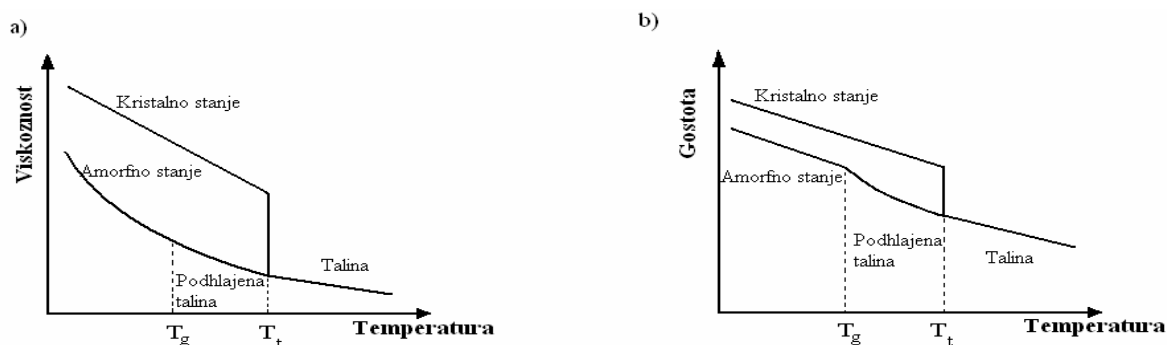
Slika 4: določitev temperature steklastega prehoda T_g/T_g' z metodo polovice dviga krivulje.

V območju steklastega prehoda se poveča toplotna kapaciteta (C_p) (10) in mobilnost molekul (10,11), s tem pa je višja tudi kemijska reaktivnost in sposobnost rekristalizacije (11).

Bistvena razlika med kristalno in amorfno obliko je v spreminjanju viskoznosti in gostote v odvisnosti od temperature (slika 5). Čista snov kristalizira pri določeni temperaturi – tališču T_t , pri čemer se viskoznost nenadoma močno poveča. V nasprotju s tem se pri amorfni snovi viskoznost zvezno povečuje ob zniževanju temperature. Talina pod tališčem T_t se imenuje podhlajena talina, ki nastane pod pogojem, da je hitrost hlajenja dovolj velika, da njena

struktura "zamrzne" preden se pojavi kristalizacija. Pri T_g se viskoznost toliko poveča, da se atomi v talini ne morejo več premikati drug glede na drugega in snov lahko prenaša strižne obremenitve. Tako dobimo podhlajeno talino, ki je amorfno stanje (1).

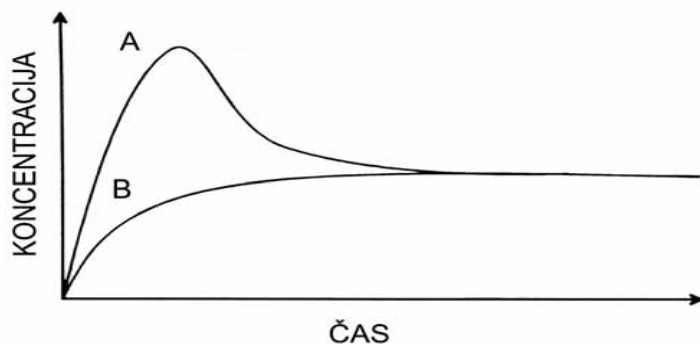
Pomen amorfne oblike izhaja predvsem iz njene višje (neravnotežne) topnosti v primerjavi s kristalno obliko in s tem tudi višje hitrosti raztapljanja iz farmacevtske oblike. V določenih primerih izkazuje amorfna oblika tudi boljšo stisljivost (2). Zaradi termodinamske nestabilnosti je potrebna stabilizacija amorfne oblike, za kar uporabljamo predvsem različne polimere, sladkorje in sladkorne alkohole. Slabost amorfne oblike je zaradi večje specifične površine in s tem višje površinske energije tudi višja higroskopsnost, hitrejši oksidacijski razpad ter večja možnost pojava interakcij s pomožnimi snovmi v farmacevtski obliki (12,11).



Slika 5: Spreminjanje a) viskoznosti in b) gostote amorfne in kristalne snovi v odvisnosti od temperature. T_g je temperatura steklastega prehoda, T_t pa temperatura tališča (1).

Uporabnost amorfne oblike spojin

S termodinamskega ali kemijskega stališča je topnost določene kristalne oblike pri določenem tlaku in temperaturi samo ena. Vrednost je definirana kot nasičena koncentracija spojine v raztopini, ko je v ravnovesju s trdno snovjo. V primeru, ko je ta koncentracija povišana, govorimo o metastabilni ali dinamični neravnotežni topnosti, ki po določenem času pade na ravnotežno vrednost (Slika 6) (13). Na odstopanje od termodinamične ravnotežne topnosti lahko vplivajo nečistote, dodatek ionov, velikost delcev in kristalna oblika (14).



Slika 6: Raztapljanje amorfnе (A) in kristalne oblike (B) učinkovine (13).

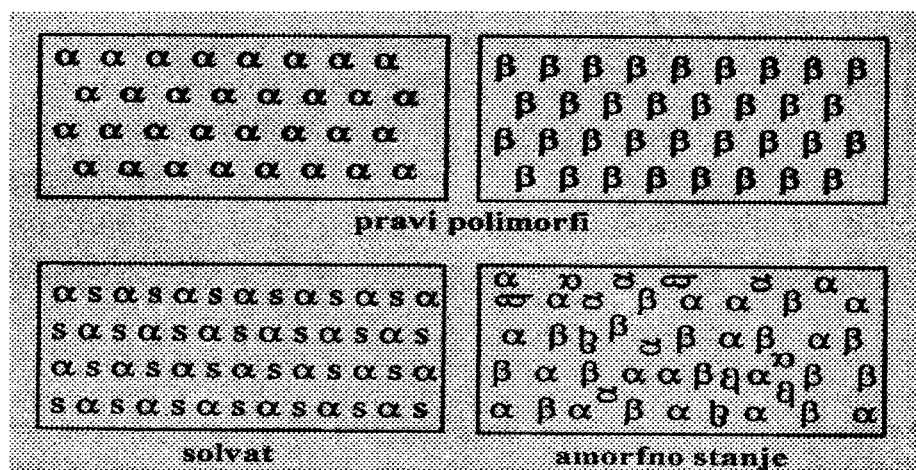
1.2 Polimorfizem

Polimorfizem (grško: polys-mnogo, morfe-postava, oblika) je pojav, pri katerem tvori kemijska spojina v trdnem agregatnem stanju različne kristalne oblike, na primer kalcijev karbonat, CaCO_3 , kristalizira v treh kristalnih oblikah: kalcit, aragonit in vaterit.

Pojav, ko tvori element različne polimorfne modifikacije, pa imenujemo alotropija. Primer za to je žveplo, ki lahko obstaja v ortorombski ali monoklinski obliki (15).

Glede na razlike v termodinamskih lastnostih delimo polimorfe na enantiotropne ali monotropne. Enantiotropni polimorfi imajo sposobnost reverzibilnega prehoda iz ene polimorfne modifikacije v drugo in sicer ta prehod poteka pri določeni temperaturi, ki je nižja od temperature tališča. V monotropnih sistemih reverzibilnega prehoda med polimorfnimi modifikacijami pod temperaturo tališča ne zaznamo (16).

Solvati, ki jih imenujemo tudi psevdopolimorfii, v svoji kristalni mreži vsebujejo molekule topila, običajno samo eno topilo, in sicer v določenem stehiometrijskem razmerju, največkrat v razmerju 1:1. Nekateri avtorji so ugotovili, tudi nestehiometrijsko razmerje med molekulami topila in trdne snovi v kristalu (17). Če je vključeno topilo voda, solvate imenujemo hidrati. Desolvatirani solvati nastanejo, kadar solvatu odstranimo topilo in se kristalna struktura solvata ohrani (16) (slika 7).



Slika 7: Shema ureditve gradnikov trdne snovi v različnih polimorfnih oblika : α , β -molekule iste spojine z različno orientacijo; s - molekule topila

1.2.1 Fizikalne lastnosti polimorfov

Polimorfne modifikacije se lahko med seboj razlikujejo po naslednjih fizikalnih lastnostih (18, 19):

- termodinamske lastnosti (temperatura tališča, temperatura sublimacije, notranja energija, entalpija, toplotna kapaciteta, entropija, prosta energija in kemijski potencial, termodinamska aktivnost, topnost),
- lastnosti, ki so posledica notranje ureditve (molarni volumen in gostota, lomni količnik, električna in toplotna prevodnost, higroskopnost),
- spektroskopske lastnosti (elektronski prehodi, vibracijski prehodi, rotacijski prehodi, prehodi magnetnih momentov jeder),
- kinetične lastnosti (hitrost raztapljanja, hitrost reakcij v trdnem stanju, stabilnost),
- površinske lastnosti (površinska prosta energija, medfazna napetost, zunanja oblika kristalov),
- mehanske lastnosti (trdnost, natezna napetost, pretočnost).

Zelo pomembno je, da se tekom razvoja zdravila, vseskozi nadzira kristalna struktura učinkovine, saj razni farmacevtski procesi, kot so mletje, drobljenje, sušenje, vlažno

granuliranje, tabletiranje, odločilno vplivajo na končno kristalno obliko učinkovine in s tem na njene fizikalno-kemijske lastnosti.

1.3 Priprava polimorfnih in amorfnih oblik učinkovine

Priprava polimorfnih modifikacij je možna na več načinov:

- mletje,
- kristalizacija iz čistega (prenasičenega) topila, iz taline, iz plinaste faze,
- kristalizacija z difuzijo,
- preobarjalne reakcije,
- sublimacija,
- izparevanje topila iz raztopin z enim ali več topili,
- termični postopki,
- hitra sprememba pH,
- spreminjanje tlaka,
- kristalizacija v prisotnosti aditivov,
- desolvatacija solvatov z višanjem temperature

Zaradi majhnih razlik med polimorfi v vezani energiji v kristalni rešetki, lahko minimalna sprememba v pripravi vodi do napačnega polimorfa. Pazljivi moramo biti predvsem pri izbiri topila, morebitnih nečistotah, tlaku, temperaturi, stopnji prenasičenja, hitrosti mešanja, pH medija in hitrosti ohlajanja (20).

Priprava amorfne oblike

Najbolj znani načini priprave amorfnih oblik spojin so: hitra ohladitev taline, hitro obarjanje z dodatkom netopila, sušenje z zamrzovanjem (liofilizacija), sušenje z razprševanjem in dodatek nečistot. V procesih, pri katerih prihaja do mehanske ali kemijske aktivacije (mletje, vlažno granuliranje), lahko pride do popolne ali delne amorfizacije vzorca. Amorfnosti lahko nastanejo tudi v trdnih disperzijah. Dehidracija kristalnih hidratov je lahko eleganten način priprave amorfnih oblik spojin (Saleki-Gerhardt in sodelavci so pokazali, da segrevanje rafinoze pentahidrata pri 60°C v vakuumu povzroči nastanek amorfne oblike, identične tisti, ki jo dobimo s sušenjem z zamrzovanjem (21)). Li je ugotovil, da postane karbamazepin dihidrat amorfen ob sušenju pri 45°C v dušikovi atmosferi (22, 14). Dehidracija je uspešna, ko vodo ki stabilizira kristalno strukturo odstranimo, strukturo porušimo, ter s tem tvorimo amorfnost. To dosežemo tako s cepitvijo vezi (vodikove vezi) med molekulo in topilom ali s sprostitvijo molekule. Če pa je voda močnejše vezana, ujeta v kristalu, pa je potrebno vložiti več energije in je dehidracija možna šele pri zelo visokih temperaturah.

1. Hitra ohladitev taline

Ta način pretvorbe trdne snovi v amorfnost 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 (11).

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. Z ohlajanjem se mobilnost molekul taline zmanjšuje - talina najprej postane sirupasta, nato viskoelastična, pod temperaturo steklastega prehoda pa nastane trdna krhka steklasta struktura, ki v smislu urejenosti molekul ohrani lastnosti tekočine (23).

Eksperimentalni rezultati kažejo, da znaša razmerje med temperaturo steklastega prehoda in temperaturo tališča pri večini spojin približno dve tretjini. Nečistote, ki so lahko razpadni produkti, nastali pri taljenju, pogosto povišajo to razmerje, ker zvišajo temperaturo steklastega prehoda ali znižajo temperaturo tališča (12).

2. Mletje

Z mletjem zmanjšamo velikost delcev trdnih snovi, vendar le to lahko dosežemo tudi s drugimi postopki. Izdelamo lahko trdne disperzije, uporabimo superkritične tekočine, liofilizacijo ali sušenje z razprševanjem. Najpogosteje pa uporabljamo mletje, pri katerem z mehanskimi obremenitvami lahko povzročimo razpad aglomeriranih delcev kot tudi posameznih kristalov.

Znotraj iste trdne snovi in med različnimi trdnimi snovmi se nemleti delci razlikujejo v mehanski odpornosti, kar je odvisno od narave trdne snovi, procesa njihove izdelave in njihove predhodne obdelave v tehnološkem procesu (23).

Pri mletju ločimo različne mehanizme, ki povzročijo zmanjševanje velikosti delcev (24):

- Udarjanje - zmanjšanje velikosti delcev dosežemo z uporabo sile, ki deluje pravokotno na površino delca. Pride do trkov med delci ali do trkov med delci in steno komore mlina.
- Obraba - zmanjšanje velikosti delcev dosežemo z uporabo sile, ki je vzporedna s površino delca. Kadar se delci v procesu mletja le površinsko obrabljajo, ima mleta trdna snov neenakomerno porazdelitev velikosti delcev.
- Stiskanje - zmanjšanje velikosti delcev dosežemo z uporabo sile, ki deluje proti sredini delca.
- Rezanje - zmanjšanje velikosti delcev dosežemo z uporabo strižne sile.

Učinkovitost mletja je poleg časa izpostavljenosti delcev mehanskim obremenitvam odvisna tudi od trdote delcev trdne snovi, njihove začetne velikosti in oblike, hitrosti polnjenja mlina in tipa mlina. Za pridobivanje amorfnе oblike trdne snovi se največkrat uporabljajo naslednji tipi mlinov (25):

- mlin na zračni tok,
- mlin kladivar,
- kroglični mlin.

Obseg pretvorbe zdravilne učinkovine v amorfno obliko pri mletju lahko povečamo z dodatkom različnih pomožnih snovi, npr. ciklodekstrinov, pomožnih snovi z veliko specifično površino in različnih polimerov (23).

Ena prvih raziskav o vplivu mletja na kristalnost učinkovin je bila objavljena leta 1977 (26). Nakai in sodelavci so ugotovili, da pri mletju modelne učinkovine (benzojska kislina, salicilna kislina, acetilsalicilna kislina) v kombinaciji z mikrokristalno celulozo prihaja do interakcij med obema komponentama v zmesi, zaradi česar se poveča stopnja amorfizacije in stabilizacije amorfne oblike učinkovine. Mikrokristalna celuloza je za amorfizacijo primerna, ker ima veliko specifično površino. Zaradi močno izraženih interakcij med amorfno obliko učinkovine in pomožno snovjo lahko s to metodo pripravimo stabilnejšo amorfno obliko kot pa z drugimi metodami (npr. s hitro ohladitvijo taline) (27). Amorfnost učinkovine so dokazovali z diferenčno dinamično kalorimetrijo in rentgensko praškovo analizo (26). Predpostavili so, da mletje povzroči nastanek molekulske disperzije učinkovine v nosilcu ali nastanek drobnih kristalov. Isti avtorji so v naslednji raziskavi ugotovili, da tudi mletje lahko hlapnih modelnih učinkovin (naftalen, kafa, krezol) v kombinaciji z mikrokristalno celulozo povzroči njihovo amorfizacijo (28).

V literaturi lahko najdemo veliko primerov mehanske aktivacije čistih učinkovin in porušenje urejene kristalne strukture (29, 30, 31). Spremembe večinoma vplivajo na fizikalno in kemijsko reaktivnost ter tako na hitrost raztapljanja (32). Tudi ti primeri kažejo, da so učinkovine v takšnih vzorcih nestabilne in da pri povišani temperaturi ali vlagi prehajajo v stabilno obliko. Absorbirana vlaga deluje kot mehčalo in poveča mobilnost molekul, kar povzroči rekristalizacijo. Med mletjem prihaja najprej do amorfizacije površine vzorca, medtem ko lahko sredica ostane kristalna (33).

3. Liofilizacija

Liofilizacija (angl. freeze-drying) je tehnološki postopek, ki ga uporabljamo za izdelavo pripravkov namenjenih parenteralni aplikaciji. Gre za način sušenja pri nizkih temperaturah, katerega pomembnost v zadnjem času narašča, predvsem zaradi potrebe po pripravi stabilnih oblik zdravilnih učinkovin, kot so peptidi in proteini. Uporabljamo ga pri izdelavi serumov, cepiv, liposomov in farmacevtskih oblik za peroralno uporabo (angl. rapidly dissolving oral

dosage forms). Prva faza liofilizacije je zamrzovanje vodne raztopine 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. Zaradi sušenja pri dovolj nizkih temperaturah in odsotnosti vode so zdravilne učinkovine v obliki liofilizata običajno kemijsko in fizikalno stabilnejše kot njihove raztopine ali suspenzije. Ali bo zdravilna učinkovina v liofilizatu v amorfni ali kristalni obliki, vplivajo številni dejavniki. Poleg hitrosti zamrzovanja ima zelo velik vpliv na to narava zdravilne učinkovine. Izkušnje kažejo, da če le-ta rada kristalizira iz vodne raztopine pri sobni temperaturi, potem lahko pričakujemo pojav kristalizacije tudi pri liofilizaciji (23).

4. Sušenje z razprševanjem

Sušenje z razprševanjem (angl. spray drying) je način sušenja, s katerim raztopino, suspenzijo ali emulzijo pretvorimo v prahove. Postopek sušenja lahko razdelimo na več faz. Tekočino (raztopino, emulzijo) najprej razpršimo skozi šobo v obliki drobnih kapljic v sušilno komoro, kjer pridejo kapljice v stik z vročim suhim zrakom. Z razprševanjem ustvarimo veliko specifično površino in izparevanje topila se lahko 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 zvišuje temperatura kapljice, tlak v njeni notranjosti pa narašča. Ko je dovolj visok, se stena kapljice predre in iztisne topilo, ki nato odpari. Glede na izvedbo aparature se posušeni delci naberejo na dnu zbiralne komore ali pa jih odstranimo z znižanim tlakom. Iz raztopin ali emulzij pridobljeni trdni delci s postopkom sušenja z razprševanjem, kjer se kapljice osušijo s procesom izhlapevanja, nastanejo običajno sferični delci, ki so polni ali votli, okroglih oblik in enakomernih velikosti. Prahovi imajo zaradi votlosti delcev nizko nasipno gostoto, zaradi pravih okroglih oblik delcev pa izkazujejo dobro pretočnost. Kadar razpršujemo in sušimo suspenzije, kjer delci niso raztopljeni, so posušeni delci kristalinični in večinoma nepravilnih oblik (23).

Sušenje z razprševanjem predstavlja primeren način sušenja za termolabilne 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 15-20 °C nižja od temperature vstopnega zraka (23).

Sušenje z razprševanjem se široko uporablja za povečanje hitrosti raztapljanja slabo topnih zdravilnih učinkovin iz farmacevtskih oblik. 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 (22).

Prednosti uporabe sušenja z razprševanjem v primerjavi z liofilizacijo predstavljajo predvsem širše možnosti nadaljne obdelave posušenih delcev (ker se ne nahajajo v stekleničkah) in nekoliko nižja cena procesa izdelave (23).

S sušenjem z razprševanjem izdelujemo tudi različne pomožne snovi. Najbolj znan primer je laktoza, ki ji na ta način izboljšamo pretočne lastnosti in stisljivost, tako da jo lahko uporabljamo pri direktnem tabletiranju. Pri izdelavi razpršujemo disperzijo kristalne laktoze v nasičeni raztopini laktoze. Le raztopljena laktoza se s sušenjem pretvori v amorfno obliko, tako da dobimo zmes kristalne in amorfne oblike. Ker amorfna oblika prekrije površino kristalne oblike, deluje kot vezivo med kristali in na ta način izboljša stisljivost tako pridobljene laktoze. Če razpršujemo raztopino laktoze, pridobimo samo amorfno obliko laktoze (23).

5. Obarjanje kislin ali baz s spremembo pH

Pogosto se je možno izogniti kristalizaciji 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 (12).

6. Dehidracija in desolvatacija

Molekule vode oz. drugega topila so lahko različno močno vezane v kristalni strukturi hidratov oz. solvatov. Zato z odstranitvijo tistih molekul vode ali topila, ki so močno vezane v

kristalni rešetki in odločilno prispevajo k stabilnosti hidratne oz. solvatne strukture, lahko le-to porušimo in pretvorimo trdno snov v amorfno obliko (12).

Tak primer je npr. trisaharid rafinoza v obliki pentahidrata. Molekule vode so različno razporejene in zato tvorijo z rafinozo različno število vodikovih vezi. Po odstranitvi dveh molekul vode, ki tvorita z rafinozo najmanjše število vodikovih vezi, se kristalna struktura še ne poruši. S 24 urnim sušenjem v vakuumskem sušilniku pri 100°C odstranimo še preostale tri molekule vode, pri čemer pride do porušitve kristalne rešetke in nastanka amorfne oblike (23).

Spontana amorfizacija učinkovine v fizikalni zmesi ali trdni disperziji

Konno in sodelavci so ugotovili, da se lahko učinkovina v fizikalni zmesi z ustrežno pomožno snovjo spontano pretvori v amorfno obliko (34-37). Tako lahko npr. acetilsalicilna kislina, fenacetin ali flufenaminska kislina v kombinaciji z magnezijevim aluminijevim silikatom ali aktivnim ogljem postanejo amorfne v nekaj dneh. Ugotovili so, da se z znižanjem tlaka hitrost amorfizacije poveča, medtem ko povišana relativna vlaga negativno vpliva na ta proces (37). Predpostavljajo, da proces prehoda učinkovine v amorfno stanje poteka preko parne faze in je odvisen od njenega parnega tlaka. Učinkovina sublimira ter s kristalnih delcev prehaja na površino in v pore pomožne snovi z veliko specifično površino. Hipotezo so potrjevali z izdelavo fizikalnih zmesi spojine z nizkim parnim tlakom (p-hidroksibenzojska kislina) in z visokim parnim tlakom (benzojska kislina) ter z merjenjem hitrosti amorfizacije (34).

1.4 Fizikalno-kemijske lastnosti kristalnih in amorfni snovi, ki jih proučujemo v predformulacijskih raziskavah

Z različnimi analiznimi metodami lahko pridobimo različne informacije o amorfni obliki, predvsem o njeni strukturi urejenosti, termodinamskih lastnostih in kinetiki rekristalizacije. Spremljamo pa lahko tudi vplive različnih pomožnih snovi na temperaturo steklastega prehoda in stabilnost amorfne oblike zdravilne učinkovine (23).

Metode s katerimi proučujemo razlike med kristalnimi in amorfni vzorci praškov so: rentgenska praškovna analiza, diferenčna dinamična kalorimetrija, infrardeča spektroskopija,

inverzna plinska kromatografija, močljivost površin, vrstična elektronska mikroskopija, merjenje prave gostote trdnih snovi.

Samo z rentgensko praškovno analizo še ne moremo dokazati amorfnih oblik. Pri mletju se namreč kristalna snov lahko pretvori v mikrokristalno, ki daje difraktogram karakterističen za amorfnost. Rentgenska praškovna difrakcija ne zazna mikrokristalnega stanja snovi, ki vsebuje kristale, saj so le ti premajhni za detekcijo. Pri obsevanju kristalov z rentgenskimi (žarki x) žarki pride do njihovega uklona in sipanja na površini kristalov. To je posledica dejstva, da imajo rentgenski žarki zelo kratko valovno dolžino, ki je primerljiva z razdaljami med molekulami in atomi v kristalih (38, 39). Zato rentgensko praškovno analizo kombiniramo z diferenčno dinamično kalorimetrijo, s katero lahko detektiramo steklast prehod, ki je lastnost amorfnih snovi za razliko od mikrokristalnih.

Pri karakterizaciji amorfnih snovi veliko uporabljamo tudi infrardečo spektroskopijo. Spektroskopske metode, med katere štejemo tudi Ramansko in NMR spektroskopijo, so bolj občutljive na urejenost kristalne mreže v ožjem območju, za razliko od rentgenske praškovne analize.

1.4.1 Rentgenska praškovna difrakcija

Rentgenska praškovna difrakcija (XRD-angl. x-ray diffraction) je zelo uporabna analizna metoda za proučevanje kristalov, saj dve različni kemijski substanci ne moreta tvoriti kristalov, ki bi imeli identično prostorsko razporeditev ravnin v vseh smereh.

Rentgenska praškovna analiza omogoča fazno identifikacijo, karakterizacijo materialov z metodo »prstnega odtisa«, meritve dimenzij osnovne celice, indeksiranje in določitev velikosti delcev v praškastem vzorcu s pomočjo oblike uklonskih maksimumov (višina in širina) na podlagi rentgenskega praškovnega difraktograma (40).

Osnove strukturne analize z rentgensko difrakcijo temeljijo na koherentnem sipanju elektromagnetnega valovanja (najpogosteje rentgenskih žarkov) na elektronih v atomih. Do sipanja pride, ko elektromagnetno valovanje z valovno dolžino reda velikosti atomskega radija interagira z elektroni. Ker je elektron električno nabit delec, ga elektromagnetno valovanje zaniha z lastno frekvenco, pri čemer nabit delec postane vir valovanja z enako frekvenco, ki pa se širi v vse strani. Vsak od elektronov tako postane izvor rentgenskega

valovanja (sipanje). Sipanje elektronov iz istega atoma lahko aproksimativno združimo in tako lahko vzamemo, da center sipanja sovpade z atomskim jedrom vsakega atoma (41).

Rentgenski žarki (angl. x-rays) imajo valovno dolžino $100-0,1 \cdot 10^{-10}$ m (Å). Ko rentgenski žarki določene valovne dolžine (monokromatsko rentgensko sevanje) potujejo skozi kristal, pride do razpršitve žarkov v vseh smereh (42).

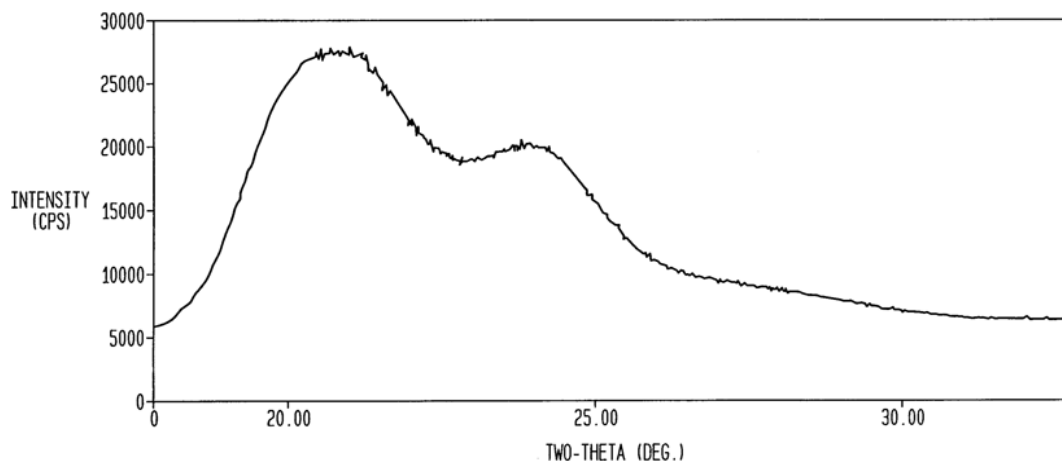
Rentgenski žarki zadenejo ob atome kristala, ki se sipajo na plasteh atomov ali ionov v kristalu in če je zadovoljeno geometrijskim pogojem (braggov zakon) nastane uklonski žarek, katerega zazna detektor.

Osnovna enačba 3 za uklon rentgenskih žarkov je Braggova enačba, ki podaja odnos med kotom uklona θ in razdaljo med plastmi d :

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad [3]$$

pri katerem je λ valovna dolžina rentgenskih žarkov, n je naravno število (1, 2, 3,...) in d je razdalja med ravninami v kristalni mreži (Å) (43).

Rezultat rentgenske praškovne difrakcije je difraktogram, ki podaja serijo uklonskih (difrakcijskih) črt, ki jih izmerimo pri določenih kotih. Ukloni žarkov na monokristalu nam dajejo podatke o osnovni celici (značilna razporeditev najmanjše ponovljive skupine atomov v prostorski mreži kristalne mreže in ima vse značilnosti kristala), ukloni na praškastih vzorcih pa omogočajo identifikacijo fizikalne (kristalne oz. amorfne) oblike substance (44). Oblika difraktograma nam že na prvi pogled razkrije, ali je snov amorfna, kristalinična ali delno kristalinična. V amorfni snovi so gradniki razporejeni brez reda (neurejeno stanje), zato prihaja pri teh vzorcih v vseh smereh do približno enakega sipanja žarkov, na difraktogramu pa vidimo le enega ali več zelo razširjenih vrhov ali ravno črto in fazna identifikacija takšnih vzorcev ni mogoča (slika 8) (45).



Slika 8: X-ray praškovni difraktogram patentiranega amorfnega klaritromicina (46).

1.4.2 Termična analiza

Termična analiza je ime za skupino tehnik, pri katerih merimo spreminjanje določene kemične oziroma fizikalne lastnosti vzorca v odvisnosti od temperature oz. časa, medtem ko je vzorec izpostavljen kontroliranemu temperaturnemu programu.

1.4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

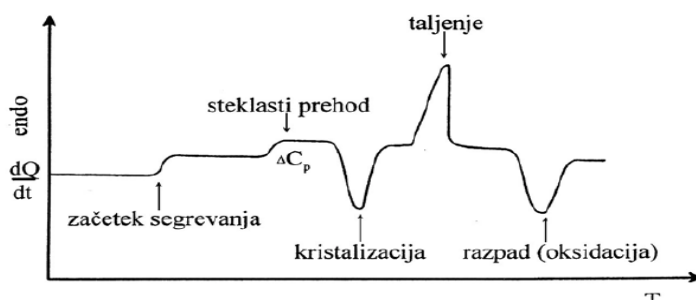
Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC angl. differential scanning calorimetry) je sodobna termična metoda tako v znanstveni kot tudi tehnološki praksi. Pri DSC merimo razliko dovedenih toplotnih tokov do vzorčnega in referenčnega lončka, da je njuna temperatura kljub spremembam, ki potekajo v vzorcu med segrevanjem, vedno enaka. DSC se uporablja za določanje faznih sprememb (fazni prehodi, taljenje, steklast prehod) in kemičnih reakcij (razpad, redukcija, oksidacija).

Z elektronskim krmiljenjem segrevanja se kompenzira povzročena razlika temperature oziroma se z regulacijo in meritvijo toplotnih tokov (v vzorcu in primerjalni snovi) vzdržuje konstantna temperatura sistema (42).

V peči poleg vzorčnega lončka analiziramo še nameščen referenčni lonček. Ta se v preiskovanem temperaturnem območju ne sme spreminjati. Vzorec (vz.) in referenčno (ref.) snov segrevamo po enakem in točno določenem temperaturnem programu. Pri konstantnem

segrevanju merimo toplotni tok, ki gre v vzorec ali iz njega. Določena temperatura v nekem vzorcu povzroči spremembe v sestavi in strukturi. Pri tem zaznamo različne energijske prehode, ki se beležijo kot razlika v vnosu energije v snov in referenčni material v odvisnosti od temperature. Ko gre vzorec skozi fazni prehod, se sprememba pokaže kot endotermni ali eksotermni odmik od bazne črte zapisa toplotnega toka v odvisnosti od temperature. Če v vzorcu pride do endotermnih faznih sprememb (npr.: taljenje, steklast prehod...), vzorec dovedeno toploto porablja za fazno spremembo, njegova temperatura pa ostaja enaka, medtem ko se referenčni vzorec greje. To povzroči med njima temperaturno razliko: $T_{vz.} - T_{ref.}$ je negativna, kar ima za posledico negativen vrh. Podobno se eksotermne reakcije v vzorcu kažejo kot eksotermni vrhovi. Površina pod vrhom je kvantitativno merilo za količino porabljene ali oddane toplote pri fizikalni oziroma kemični spremembi.

Z DSC določamo tališče, talilno toploto, specifično toplotno kapaciteto, temperaturo steklastega prehoda, hitrost reakcije, oksidativno stabilnost, kristalnost, čistoto. Vzorce segrevamo ali ohlajamo do določene temperature v aluminijastih, bakrenih, zlatih, ... lončkih. Material lončka izberemo glede na sestavo vzorca, saj se lahko zgodi, da pride do reakcije med vzorcem in lončkom. Spreminjanje vzorca med segrevanjem spremljamo z ustreznim računalniškim programom, ki nam sproti podaja DSC krivuljo (slika 9), ta nam pokaže količino energije, ki jo vzorec porabi ali sprosti med segrevanjem (42).



Slika 9: DSC krivulja odvisnost toplotnega toka od temperature z najpogostejšimi prehodi, ki jih lahko opazimo pri analizi trdnega vzorca.

1.4.4 Infrardeča spektroskopija

Pri absorpcijskih spektroskopskih analiznih metodah gre za vzbujanje molekul s svetlobnim sevanjem določene valovne dolžine oz. energije. Infrardeča svetloba ustreza valovanju z valovnimi dolžinami med 0,78 in 1000 mikrometrov.

IR spekter razdelimo na območja: bližnje (angl. *near*), srednje (angl. *middle*) in daljno (angl. *far*) (preglednica 1) (47).

Preglednica 1: Infrardeča območja spektra svetlobe

Območje	Valovna dolžina $\lambda/\mu\text{m}$	Valovno število $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$
bližnje	0,78 – 2,5	12 800 – 4 000
srednje	2,5 – 50	4 000 – 200
daljno	50 – 1000	200 – 10
najbolj uporabno	2,5 – 15	4 000 – 760

Energija fotonov IR-svetlobe je primerna za vzbujanje nihanj vezi v molekulah, toda premajhna, da bi povzročila prehod elektronov na višji energijski nivo. Molekula absorbira elektromagnetno valovanje (EMV) v IR-območju le takrat, ko se spremeni dipolni moment molekule pri vibraciji. To pomeni, da molekule s centrom simetrije in homonuklearne molekule, pri katerih se dipolni moment med nihanjem vezi ne spreminja (npr. N_2 , O_2), ne absorbirajo v IR-območju EMV in niso IR aktivne. IR-vibracije so močnejše, kadar so spremembe pri nihanju povezane z veliko spremembo dipolnega momenta.

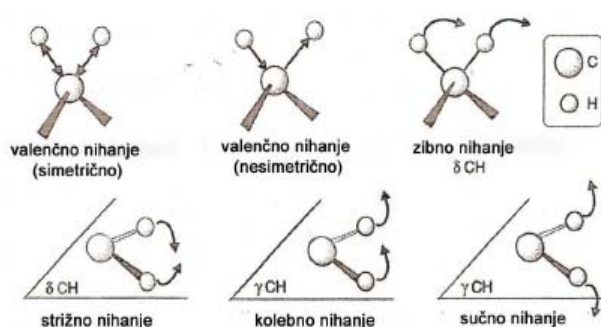
Atomi v molekuli lahko nihajo na več načinov, število možnih nihanj pa narašča z velikostjo molekule. Relativne lege atomov v molekuli niso fiksne, ampak se spreminjajo (nihajo) okrog ravnovesne lege. Vibracije lahko razdelimo v dve osnovni kategoriji (slika 10) (47, 48):

1. Vzdolžna valenčna nihanja (angl. *stretching*) – razdalja med atomoma v molekuli se spreminja. Tako ločimo:

- simetrično vzdolžno valenčno nihanje ν_s ,
- asimetrično vzdolžno valenčno nihanje ν_{as} .

2. Upogibna nihanja (angl. bending) – kot med dvema vezema se spreminja in glede na smer gibanja ločimo (49):

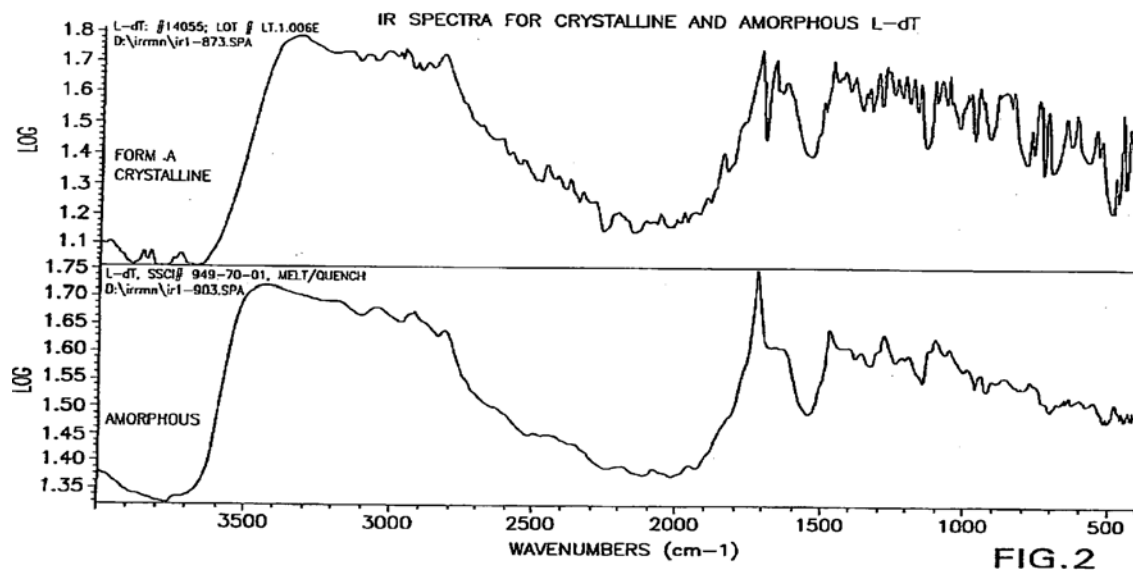
- kolebanje (angl. rocking),
- striženje (angl. scissoring),
- zibanje (angl. wagging),
- zvijanje (angl. twisting).



Slika 10: Različne deformacijska nihanja v molekuli CH_2 (47).

Metoda je še posebej uporabna za identifikacijo različnih polimorfov in psevdopolimorfov, kjer vzorce analiziramo v trdnem stanju; najpogosteje tablete, kjer spojino, ki jo želimo analizirati, razredčimo s KBr, včasih tudi drugimi alkalijskimi halidi (NaCl, KCl), ter stisnemo v tanko ploščico. Pod vplivom trenja in stiskanja tablet lahko pride do spremembe v strukturi vzorca, čemur se lahko izognemo z uporabo metode difuzne refleksije (DRIFT) in tehnike oslabiljene popolne odbojnosti (ATR, angl. Attenuated Total Reflectance) (50).

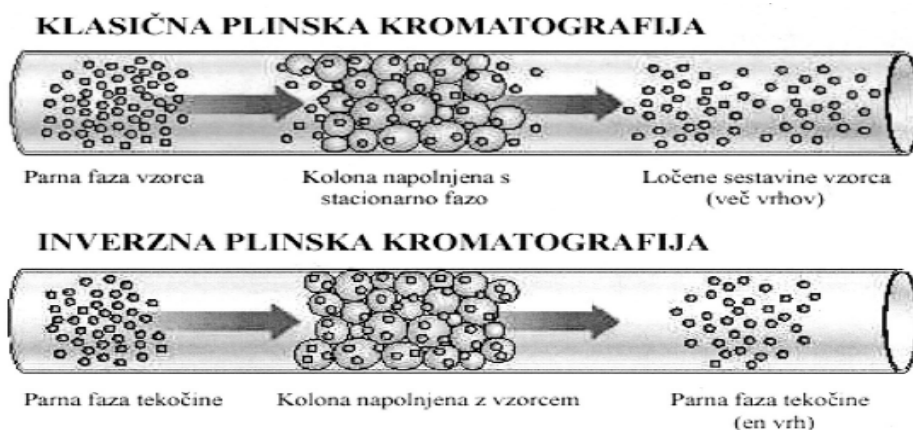
Da imata kristalna in amorfna oblika različne lastnosti oziroma nihanje atomov v IR območju vidimo na primeru beta-L-deoksitimidin (slika 11).



Slika 11: IR spekter kristalne in amorfne oblike beta-L-deoksitimidin (51).

1.4.5 Inverzna plinska kromatografija

Inverzna plinska kromatografija temelji na obratnem principu kot klasična plinska kromatografija. Pri klasični metodi uplinjen vzorec injiciramo v kolono, napolnjeno s standardnim polnilom, pri inverzni plinski kromatografiji pa ravno obratno, kolono napolnimo s praškastim vzorcem, kot mobilno fazo uporabimo inertni nosilni plin, najpogosteje dušik ali helij, ki ne vstopa v interakcije s stacionarno fazo, nato pa injiciramo v kolono parne faze standardnih tekočin z znanimi lastnostmi (slika 12) (52).



Slika 12: Shema klasične in inverzne plinske kromatografije (Farmaceutski Vestnik 2003; 54: 207-218)

Na osnovi izmerjenih retencijskih časov injiciranih standardov lahko določimo lastnosti površine vzorca, saj je retencijski čas merilo obsega interakcij med vzorcem in injicirano parno fazo standarda. Merjenje retencijskih časov poteka s pomočjo detektorja (FID – angl. Flame Ionization Detector ali TCD – angl. Termal Conductivity Detector), ki zazna kapljevino (adsorptiv), ko ta zapusti kolono. Iz dobljenih retencijskih časov izračunamo retencijski volumen (V_n) nosilnega plina za posamezen adsorptiv, ki predstavlja volumen mobilne faze, potreben za elucijo plina iz kolone. Izračunamo ga po enačbi 4:

$$V_n = JF (t_r - t_0) \quad [4]$$

V_n = retencijski volumen

J = korekcijski parameter, ki upošteva stisljivost nosilnega plina

F = volumski pretok nosilnega plina

t_r = retencijski čas injicirane parne faze standarda

t_0 = retencijski čas plina, ki ne vstopa v interakcije z vzorcem (metan)

Zaradi stisljivosti nosilnega plina moramo upoštevati korekcijski parameter, ki smo ga uporabili v zgornji enačbi in katerega lahko izračunamo, če poznamo tlak na vhodu v kolono (P_{in}) in tlak na izhodu iz kolone (P_{out}), za katerega predpostavimo, da je enak atmosferskemu tlaku (enačba 5).

$$J = \frac{(3/2)((P_{in}/P_{out})^2 - 1)}{((P_{in}/P_{out})^3 - 1)} \quad [5]$$

Pri tehniki neskončnega redčenja termodinamsko opišemo naslednje ravnotežje (enačba 6):

$$\Delta G_a^0 = -\Delta G_d^0 = RT \ln \left(\frac{(V_n P_{sg})}{(S m \pi_o)} \right) \quad [6]$$

kjer je ΔG_a^0 prosta energija adsorpcije, ΔG_d^0 prosta energija desorpcije, P_{sg} standardni tlak plina, π_o standardni površinski tlak adsorbiranega filma, ko so razdalje med molekulami adsorbiranega plina enake razdaljam med molekulami v plinski fazi, S specifična površina preiskovane snovi in m masa preiskovane snovi.

Ker sta P_{sg} in π_o konstanti, lahko zapišemo (enačba 7):

$$\Delta G_a^0 = RT \ln V_n + C \quad [7]$$

V_n = retencijski volumen

C = konstanta odvisna od izbranega standardnega stanja

Sprememba standardne proste energije adsorpcije pa je v sorazmerju z adhezijskim delom ter površino adsorbiranih molekul (enačba 8):

$$\Delta G_a^0 = N_a a W_a \quad [8]$$

N_a = Avogadrovo število

a = površina adsorbirane molekule

W_a = adhezijsko delo

Adhezijsko delo je sicer definirano kot delo, potrebno za ločitev enote površine dveh tekočin.

Ko v kolono uvedemo polarne adsorptive, se med njimi in praškastim vzorcem vzpostavijo tako specifične (polarne) kot tudi disperzijske (nepolarne) interakcije. Prosta energija adsorpcije ΔG_a^0 je zanje podana kot (enačba 9):

$$\Delta G_A^0 = \Delta G_A^{SP} + \Delta G_A^D$$

[9]

kjer predstavlja ΔG_A^{SP} specifično komponento in ΔG_A^D nespecifično komponento proste energije adsorpcije.

Določanje nepolarnih lastnosti trdne površine

Nepolarni prispevek k adhezijskemu delu W_a^d med dvema površinama lahko izrazimo kot dvakratnik korena produkta nepolarnih prispevkov k površinski energiji tekočine in trdne snovi (enačba 10):

$$W_a^d = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d}$$

[10]

kjer je γ_s^d nepolarni prispevek k površinski energiji trdne snovi in γ_l^d nepolarni prispevek k površinski napetosti tekočine.

Nepolarne lastnosti trdnih površin določamo tako, da v kolono, v kateri je vzorec v obliki prahu injiciramo alkane (npr. pentan, heksan, oktan, nonan, dekan), ki vstopajo v interakcije s trdno površino vzorca le z Londonovimi disperzijskimi silami. Te vrste sil spadajo med van der Waalove sile, in sicer gre za fizikalne in ne kemijske vezi (ni stehiometrije). Pri tem računalniško podprt sistem meri retencijske volumne posameznih nepolarnih tekočin, kar omogoča izračun nepolarnega dela površinske energije trdne snovi (γ_s^d). V tem primeru je $W_a = W_a^d$ in s kombinacijo enačb (7,8 in 10) lahko izpeljemo (enačba 11):

$$RT \ln V_n = 2N_a \sqrt{\gamma_s^d} a \sqrt{\gamma_l^d} + C$$

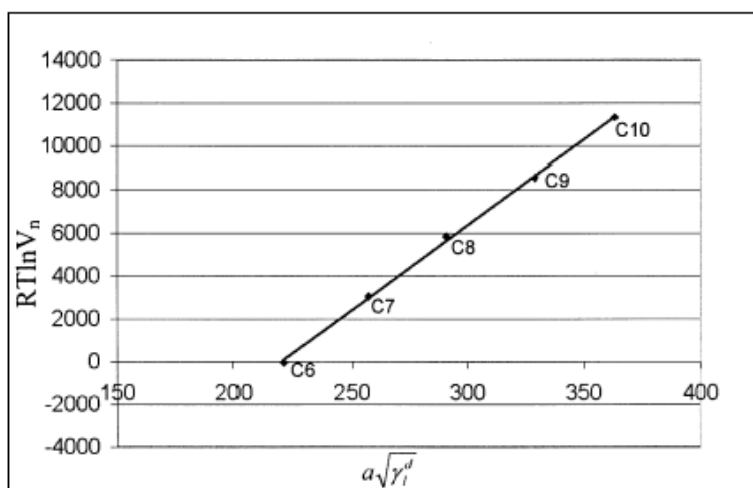
[11]

V_n – retencijski volumen,

γ_l^d - nepolarni del površinske napetosti tekočine,

a- površina molekule adsorbirane kapljevine-alkana

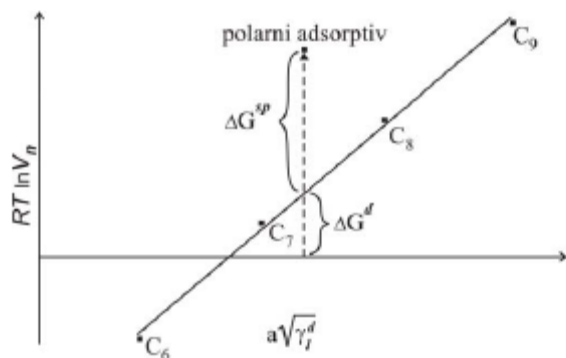
Grafično nam nepolarni del površinske energije trdne snovi (γ_1^d) predstavlja naklon premice v diagramu $RT \ln V_n = f(a \sqrt{\gamma_1^d})$ (slika 13).



Slika 13: Diagram linearne odvisnosti $RT \ln V_n$ od $a \sqrt{\gamma_1^d}$

Določanje polarnih lastnosti trdne površine

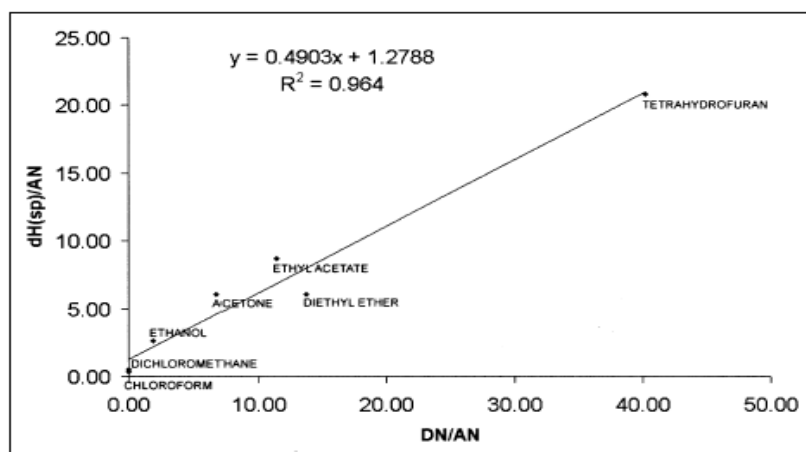
Polarne lastnosti trdnih snovi imenujemo specifične lastnosti. Skupine, ki so polarne in so na površini trdnega delca, vstopajo v interakcije z injiciranim plinom kot Lewisove kisline ali baze. Gre za elektron - donor elektron – akceptor interakcije. Po Gutmannu lahko tekočine opredelimo glede na donorsko in akceptorsko število. Donorsko število (DN) opredeljuje bazičnost, akceptorsko število (AN) pa kislost oziroma elektron – akceptorske lastnosti. Eksperimentalne točke v diagramu $RT \ln V_n = f(a \sqrt{\gamma_1^d})$ (slika 14) za polarne kapljevine, ki jih injiciramo v kolono z vzorcem v praškasti obliki, ležijo nad referenčno premico za alkane. Pri določeni vrednosti $a \sqrt{\gamma_1^d}$ predstavlja razdalja med točko, ki ustreza polarni kapljevini (acetone, kloroform, THF, etilacetat, nitrometan, acetonitril) specifični oz. polarni del energije adsorpcije (ΔG_A^{SP}) (52).



Slika 14: Grafični prikaz določitve polarne komponente proste površinske energije

Polarni del energije adsorpcije je premosorazmeren specifičnim interakcijam med kislimi in bazičnimi skupinami. Vrednost kislno-bazičnih interakcij različnih polarnih tekočin s trdno površino vzorca v koloni omogoča izračun kislinskih (K_A) in bazičnih parametrov (K_D) te površine po enačbi 12:

$$\frac{\Delta G_A^{SP}}{AN^*} = K_A \left(\frac{DN}{AN^*} \right) + K_D \quad [12]$$



Slika 15: Primer grafične določitve kislne in bazične komponente površinske energije vzorca. Naklon premice nam predstavlja vrednost K_A (0,490), odsek na ordinati pa vrednost K_D (1,279).

Uporabnost metode IGC:

- prvič je bila uporabljena v 70-ih letih 20. stoletja za fizikalno – kemijsko vrednotenje polimerov

- v farmaciji: določevanje topnostnih in kohezijskih parametrov laktoze, kofeina, teofilina, mikrokristalne celuloze
- razlike med serijami (pojavljajo se razlike med različnimi proizvajalci, kljub temu, da snov proizvajajo pri identičnih pogojih in so povezane z različno obnašanje v tehnoloških procesih)
- razlike v površinski energiji pred in po mletju (z IGC so ugotovili, da se z mletjem acetaminofena povečuje bazičnost in nepolarnost, kislost pa pada. Rezultati so v sorazmerju s pretočnimi lastnostmi).
- primerjava optičnih izomerov
- vpliv vlažnosti na energijo površin (sorpcija vode vpliva na: spremembe hitrosti kemijske razgradnje, rasti kristalov, raztapljanja, na močljivost, disperznost, pretočne lastnosti, mazljivost, stisljivost in trdnost farmacevtske oblike)
- uporaba pri pripravi praškov, ki jih pripravimo z mešanjem več praškov (izračun najprimernejše sestave)
- proučevanje različnih oblik kristalov (glede na način kristalizacije se vzorci med seboj razlikujejo v površinski energiji)

Prednosti:

- vzorec polnimo direktno v kolono brez predhodne obdelave, ki bi lahko spremenila površino vzorca, katere lastnosti določamo
- komplementarna metoda, s katero uspešno in ponovljivo proučujemo lastnosti površine snovi pri različnih pogojih (temperatura, relativna vlažnost), s katerimi lahko simuliramo realne razmere v tehnoloških procesih.
- masa polnjenja kolone ne vpliva na končni rezultat

Slabosti:

- potrebna je pazljivost, da je v koloni čim manj praznih prostorov ali da pri merjenju ne pride do spremembe vzorca (kristalizacija amorfnega vzorca zaradi z vlago znižane temperature steklastega prehoda)

- čas analize je dolg (vzorec pred pričetkom meritve prepihujemo s suhim nosilnim plinom vsaj 12 ur)
- če injiciramo prevelike količine standarda, lahko pride do prenasičenja kolone
- v primeru, da imamo močno kisel vzorec in parno fazo bazične tekočine, lahko molekule premočno reagirajo z vzorcem in se zelo počasi desorbirajo lahko pride tudi do kemisorpcije (v tem primeru ni elucije in posledično na detektorju ne dobimo odziva (52).

1.4.6 Močljivost površin

Atom na prosti površini trdnine ima večjo energijo kot atom v notranjosti kristala zaradi šibkejših vezi. Iz tega izhaja, da je energijsko neugodno prenesti molekulo (atom) iz notranjosti na površino. Tudi ustvarjanje nove površine s spreminjanjem geometrije faze je energijsko neugodno. Prilagodljivi objekti (npr. kapljice tekočine) zato pridobijo obliko z najmanjšo površinsko energijo. Vsota vseh presežnih energij atomov na površini glede na atome znotraj kristala je enaka površinski energiji γ . Najuporabnejši zapis površinske energije je na osnovi Gibbsove proste energije (dG) (enačba 13):

$$dG = -SdT + Vdp + \gamma dA \quad [13]$$

S-entropija

T-temperatura

V-volumen

p-tlak

γ -površinska energija

A-površina

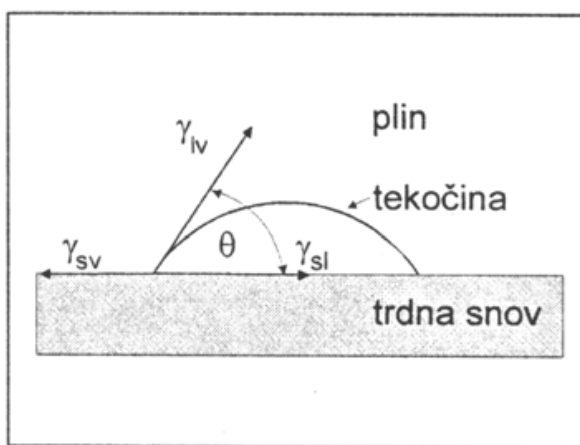
Pri konstantnem tlaku in temperaturi je (enačba 14):

$$\gamma = (dG/dA)_{T,p} \quad [14]$$

Močljivost površin trdnih snovi je definirana kot sposobnost tekočine, da se razprostira po površini trdne ali tekoče snovi, ki v njej ni topna oz. se z njo ne meša. Stični kot (θ) je mera za močljivost trdnih snovi. Kapljica tekočine se na trdni površini pri določenih pogojih oblikuje v lečo, pri čemer je stični kot tisti, ki ga z osnovno ploskvijo tvori tangenta na površino leče ob stiku kapljice s trdno površino. Ravnovesje sil prikazuje slika 16, opisuje pa jih Youngova enačba 15:

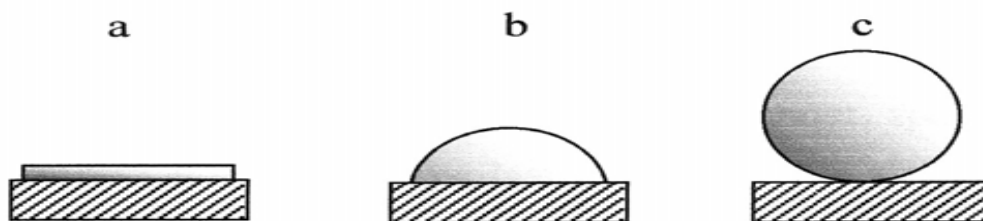
$$\cos\theta = (\gamma_{s,v} - \gamma_{s,l}) / \gamma_{l,v} \quad [15]$$

kjer je $\gamma_{s,v}$ prosta površinska energija trdne snovi na meji s svojimi pari, $\gamma_{s,l}$ medfazna energija na mejni površini trdna snov/tekočina in $\gamma_{l,v}$ prosta površinska energija tekočine na mejni površini tekočina/para.



Slika 16: Ravnovesje sil, ki jim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino (53).

Stični kot lahko zavzame vrednost od 0° do 180° . Če je vrednost manjša od 90° , tekočina moči trdno snov (slika 17a in b). V tem primeru je kosinus stičnega kota pozitiven. Tekočina popolnoma moči trdno snov, če se razlije po površini, tako da je $\theta = 0^\circ$ in $\cos\theta = 1$ (slika 17a). Podoben mejni primer je popolno nemočenje, ko je $\theta = 180^\circ$, ker se med trdno površino in tekočino vrine zrak (slika 17c).



Slika 17: Shematski prikaz različnih stopenj močenja: a - popolno močenje, b - delno močenje, c - popolno nemočenje (53).

Fowkes je razvil metodo, s katero iz podatkov močenja izračunamo površinsko energijo trdnih snovi kot vsoto polarnega in nepolarnega prispevka (enačba 16):

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p \quad [16]$$

kjer je γ^d delež nepolarnih (disperzijskih) sil k prosti površinski energiji tekoče ali trdne snovi, γ^p pa delež polarnih sil prosti površinski energiji tekoče ali trdne snovi.

Za izračun γ_s^d in γ_s^p določene trdne snovi moramo na trdni snovi izmeriti stični kot z najmanj dvema različnima tekočinama z znanima γ_1^d in γ_1^p .

Pri računanju uporabljamo naslednjo enačbo 17:

$$\gamma_1 (1 + \cos\theta) = \frac{4\gamma_s^d \gamma_1^d}{\gamma_s^d + \gamma_1^d} + \frac{4\gamma_s^p \gamma_1^p}{\gamma_s^p + \gamma_1^p} \quad [17]$$

kjer sta γ_1^p in γ_1^d polarni in nepolarni prispevek k prosti površinski energiji tekočine, γ_s^p in γ_s^d pa polarni in nepolarni prispevek k prosti površinski energiji trdne snovi.

Bolj kompleksno razčlenitev proste površinske energije prinaša teorija neaditivnih komponent – van Ossova metoda. Prosto površinsko energijo tudi pri tej metodi delimo na nepolarne in polarne prispevke. Polarni prispevki k prosti površinski energiji so razčlenjeni na kislinsko in bazično komponento (54).

1.4.7 Vrstična elektronska mikroskopija

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom (angl. Scanning Electron Microscope-SEM) opazujemo topografijo in strukturo površine vzorcev. Shema delovanja mikroskopa je prikazana na sliki 18.



Slika 18: Shema delovanja SEM

Vir elektronov je elektronska puška, v kateri je katoda (*filament*), ki emitira elektrone. Katoda je lahko izdelana iz različnih materialov; v konvencionalnem SEM je narejena iz volframa ali LaB_6 . V FEGSEM (angl. *field emission gun SEM*), ki deluje po principu emisije polja, je katoda narejena iz izredno fine volframove monokristalne igle ali npr. iz monokristala ZrO_2 , pritrjenega na volframovi žici. Pri segrevanju katode nastane termoionska emisija elektronov. Primarne elektrone pospešujemo z napetostjo na anodi, ki je navadno od 500 do 40000 V. Sistem elektromagnetnih leč in zaslonk usmerja in fokusira elektronski curek na vzorec. Premikanje (vrstičenje) elektronskega curka po površini vzorca je izvedeno s posebnimi tuljavami v spodnjem delu kolone mikroskopa. Z objektno lečo fokusiramo elektronski curek v zelo tanko konico. Premer takšnega elektronskega curka je v konvencionalnem SEM z volframovo katodo od 50 do 500 nm in je odvisen od izbire objektne zaslonke in gostote toka elektronov. Elektroni, ki trčijo v trdno snov in pri tem nastanejo številni signali, ki so posledica elastičnega in neelastičnega sipanja primarnih elektronov na atomih snovi se zberejo v *Everhart-Thornleyjev* detektorju. Ojačan signal se prenaša na zaslon, na katerem opazujemo sliko. Svetloba na zaslonu je proporcionalna intenziteti signala elektronov, ki nastane v posameznih točkah pri vrstičenju po površini vzorca. Vakuumski sistem mikroskopa ima v prvi stopnji rotacijsko črpalko in v drugi stopnji difuzijsko ali turbomolekularno črpalko. Pri črpalnih sistemih z difuzijsko črpalko je koristno dodatno hlajenje s pastjo s tekočim dušikom, kar izboljša hitrost črpanja in končni vakuum ter zniža kontaminacijo kolone mikroskopa in vzorcev z oljnimi parami. Vakuum v SEM je velikostnega reda 10^{-6} mbar (10^{-4} Pa). Nekatere različice mikroskopov delujejo tudi v grobem vakuumu (LVSEM-*low vacuum SEM*) ali pri kontroliranem nizkem tlaku določenih plinov (ESEM – *enviromental SEM*) ter so tudi primerne za preiskave vzorcev, ki niso prevodni in ki vsebujejo vodo, olja, organska topila itd. (55).

Poleg različnih vrst materialov in različnih oblik vzorcev, ki jih lahko analiziramo s SEM, so bistvene prednosti metode naslednje (55):

- velik razpon povečav za slikanje vzorcev od 20-krat do 300000-krat,
- zelo dobra ločljivost: pri konvencionalnem SEM z volframovo katodo $\geq 3,5$ nm; pri FEGSEM ≥ 1 nm
- izredna globinska ostrina – primerna za slikanje vzorcev z izrazito topografijo

- posnetki s sekundarnimi elektroni za opazovanje topografskih detajlov na vzorcih: površine, mikrostrukture, velikost in oblika zrn ali delcev (morfologija), porazdelitve poroznosti ali velikosti delcev od milimetrskih do submikrometrskih dimenzij
- posnetki s povratno sipanimi elektroni omogočajo raziskave fazne strukture v večfaznih vzorcih na osnovi *Z*-kontrasta (*atomic number contrast*) kot tudi posnetke na osnovi topografskega kontrasta ali kombinacije obeh načinov
- analiza posnetkov SE (sekundarni elektroni) in BSE (povratno sipani elektroni) omogoča določanje porazdelitve in kvantitativno stereološko analizo faz v večfaznih vzorcih; analizo in porazdelitev velikosti praškastih delcev oz. zrn v mikrostrukturah masivnih vzorcev
- sodobni SEM je opremljen z zajemanjem slik v digitalni obliki in/ali fotografiranjem na klasični film.

1.4.8 Merjenje prave gostote trdnih snovi

Gostota neke snovi (ρ) je definirana kot razmerje med njeno maso (m) in volumnom (V) (enačba 18):

$$\rho = m / V \quad [18]$$

in je pomemben parameter pri napovedovanju obnašanja praškastih trdnih snovi v različnih tehnoloških procesih. Določevanje gostote je tudi preprost pristop za ugotavljanje vrste snovi in njihove čistote, kot tudi za ugotavljanje sprememb strukture vzorcev.

Določevanje gostote trdnih snovi je problematično predvsem z vidika ugotavljanja volumna le-teh, saj so med oz. v delcih samih prisotni prazni prostori (3):

- odprti intrapartikularni prostori (pore),
- zaprti intrapartikularni prostori (pore) in
- interpartikularni prostori.

Merjenje s helijevim piknometrom da podatek o pravi gostoti, saj so atomi helija dovolj majhni, da prodrejo tudi v najmanjše pore. Dodatna prednost helija je njegova inertnost, ki

izključuje adsorpcijo na trdne površine. Metoda je nedestruktivna in je uporabna pri vseh trdnih snoveh.

Naprava deluje tako, da napolni celico z znanim volumnom, v kateri je vzorec, z znano množino helija. S tem tlak v celici naraste na vrednost P . Iz znanega tlaka in množine helija je mogoče z uporabo splošne plinske enačbe (enačba 19):

$$P V = n R T \quad [19]$$

Ptlak He v celici

Vvolumen, ki ga v celici zavzema He (predstavlja razliko med celotnim volumnom celice in volumnom vzorca)

nmnožina plina

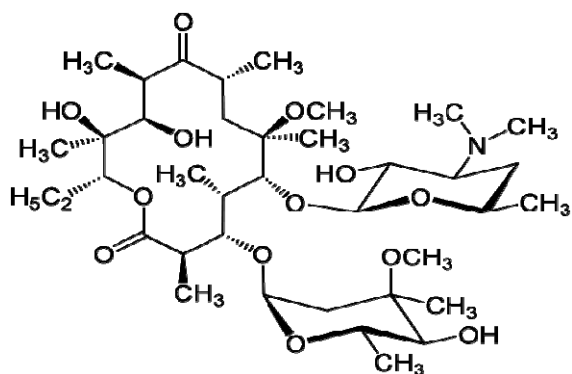
Rsplošna plinska konstanta [8,314 J/mol K]

Ttemperatura v K

določiti volumen vzorca. Če poznamo še maso vzorca, lahko izračunamo njegovo pravo gostoto (56).

1.5 Klaritromicin

Klaritromicin (slika 19) je polsintezni derivat eritromicina s protimikrobnim delovanjem, kar ga uvršča v skupino makrolidnih antibiotikov za zdravljenje okužb dihal (vnetje žrela, mandljev, obnosnih votlin, bronhijev, pljuč) in kože ter podkožja. Klaritromicin zavira bakterijsko rast, ker moti tvorbo bakterijskih beljakovin. Veže se na podenoto 50S bakterijskih ribosomov in zavre prevajanje (translacija) peptidov. Na nekatere bakterije ima tudi baktericidni učinek npr. pri *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* in *Neisseria gonorrhoeae* (57). Zanj je značilna makrociklični laktonski obroč, na katerega so z glikozidnimi vezmi vezane sladkorne enote.



Slika 19: Strukturna formula klaritromicina

Klaritromicin, makrolidna protimikrobna spojina ima povečano aktivnost proti *Haemophilus influenzae* in *M. catarrhalis* v primerjavi s starejšimi derivati, kot je eritromicin-(E-Mycin, Eryc, Ery-Tab, PCE, Pediazole, Ilosone). Dokazano je bilo, da je varen in učinkovit pri zdravljenju okužbe spodnjih dihal, vključno AECEB-akutno poslabšanje kroničnega bronhitisa (ang. acute exacerbation of chronic bronchitis), v odmerkih med 250 in 500 mg dvakrat na dan. Vendar je njegova učinkovitost odvisna od zadostne koncentracije v plazemskih tkivih in od urnika jemanja zdravila.

Eden od načinov za povečanje učinkovitosti in olajšati bolniku zdravljenje je zmanjšati potrebno število odmerkov na dan. Trenutno je na voljo klaritromicin s takojšnjim sproščanjem (IR) v obliki 250-mg ali 500-mg tablet (peroralno zdravljenje z antibiotikom). Običajno odmerjene je dvakrat na dan za zdravljenje okužb spodnjih dihal. V zadnjih letih, je na voljo formulacija s podaljšanim sproščanjem z odmerjenjem le enkrat dnevno, kar zagotavlja dovoljšno koncentracijo klaritromicina v plazmi v celotnem dnevu za učinkovito zdravljenje. Temelji na polimeru, ki nadzoruje sproščanje učinkovine skozi čas. Glede na enak odmerek klaritromicina s takojšnjim sproščanjem filmsko obloženih tablet in tablet klaritromicina s podaljšanim sproščanjem, slednje zagotavljajo nižje in kasnejše stanje dinamičnega ravnovesja vrha plazemske koncentracije, vendar ekvivalentno 24-urno površino pod krivuljo plazemske koncentracije (58).

Študije so pokazale, da je čas povprečnega zdravljenja od aplikacije prvega odmerka do zadnjega daljši pri bolnikih, zdravljenih s klaritromicinom s takojšnjim sproščanjem kot pri bolnikih, zdravljenih s klaritromicinom s podaljšanim sproščanjem (6,21 dni na 5,97 dni). Klaritromicin s takojšnjim sproščanjem je bil na trgu več let in se je izkazal kot učinkovit in varen. Čeprav rezultati te študije kažejo, da je klaritromicin s podaljšanim sproščanjem 500

mg enkrat na dan za 7 dni lahko prav tako učinkovit kot klaritromicinom s takojšnjim sproščanjem 250 mg dvakrat na dan, 7 dni pri zdravljenju okužbe dihal (58).

Klaritromicin je šibka baza z molekulsko formulo $C_{38}H_{69}NO_{13}$ in molekulsko maso 747,95 g/mol (59). Je bel ali skoraj bel kristaliničen prašek, praktično netopen v vodi, topen v acetonu in etilenkloridu ter slabo topen v metanolu in etanolu (60). Njegova topnost se povečuje z nižanjem pH vodnih raztopin. Zaradi dobre permeabilnosti in slabe topnosti v vodi ga uvrščamo v razred II po biofarmaceutski klasifikaciji (61). S prekristalizacijo klaritromicina iz etanola dobimo kristale s temperaturo tališča 222-225°C (62).

Klaritromicin obstaja v trdni obliki v treh znanih kristalnih (polimorfni) oblikah: I, II ter O. Farmaceutske oblike na tržišču vsebujejo klaritromicin v polimorfni obliki II, ki je termodinamsko najbolj stabilna (63).

1.5.3 Klaritromicin oblika I

Kinetično stabilnejšo obliko klaritromicina I pripravimo tako, da klaritromicin rekristaliziramo iz topila (npr. etanol) ter produkt sušimo pri nižanim tlakom (63).

1.5.4 Klaritromicin oblika II

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

1. kristalno obliko klaritromicina I pretvorimo v obliko II s segrevanjem v vakuumskem sušilniku pri temperaturi višji od 80°C (63).
2. 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 (63).
3. 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 sišimo v vakuumskem sušilniku pri 60°C. Tako lahko na enostaven način in po nizki ceni učinkovito pridobivamo zelo čist produkt brez ostanka organskih topil (64).

1.5.5 Klaritromicin oblika O

Klaritromicin v obliki O združuje vse solvate učinkovine, ko molekule klaritromicina solvatirajo molekule naslednjih topil: etanol, izopropilacetat, izopropanol ali tetrahidrofuran. Ker gre pri solvatih za psevdopolimorfizem, to pomeni, da so molekule topila del kristalne rešetke (63).

1.5.6 Amorfen klaritromicin

Z namenom izboljšati fizikalno kemijske rezultate kristalnega klaritromicina, so se lotili tudi priprave amorfne oblike učinkovine po različnih postopkih.

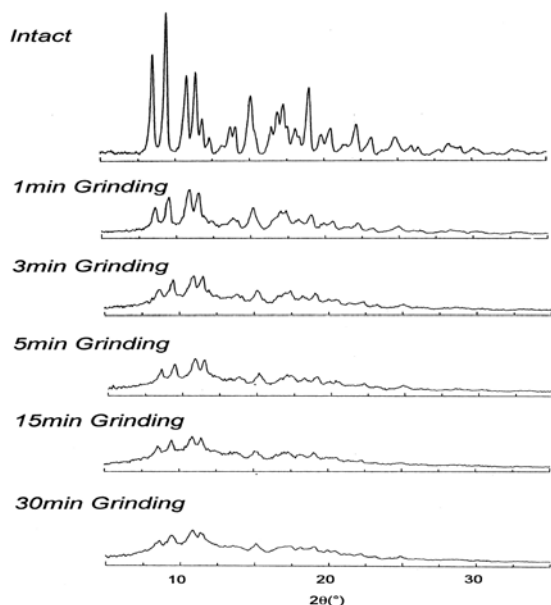
1. klaritromicin z mletjem pretvorimo v amorfno obliko (65, 66).
2. klaritromicin raztopimo v topilu (npr. metanol (65) ali aceton (66)), nato pa topilo odstranimo s sušenjem z razprševanjem ter tako dobimo amorfne delce učinkovine.

1.5.7 Spremembe, ki vplivajo na kristaliničnost klaritromicina

V študiji, kjer so določali fizikalno-kemijske lastnosti klaritromicina, ki je komaj topen v vodi (0,33 mg/l H₂O (67)), so proučevali lastnosti klaritromicina mletega s krogličnim mlinom in pripravljenega s sušenjem z razprševanjem iz metanolne raztopine. Metode, ki so jih uporabljali so bile praškovna rentgenska difrakcija, DSC, raztapljanje in stabilnostni test. Parametre za topnost pa so ocenili tudi z inverzno plinsko kromatografijo s katero so izmerili spremembe v površinskih energijah (68).

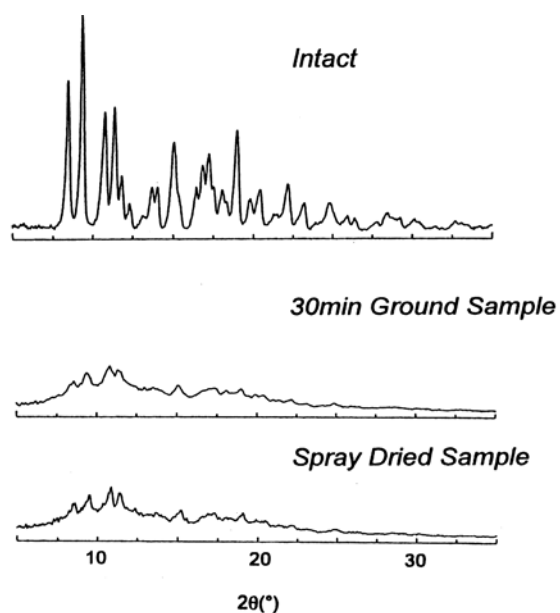
S praškovno X-ray difrakcijo so spremljali spremembe osnovnega vzorca, ki se kažejo pri mletju od 1 do 30 minute in ugotovili da se intenziteta pikov pri X-ray difrakciji manjša s

časom mletja. Iz praškovne X-ray difrakcije osnovnega vzorca klaritromicina je po mnenju avtorja razvidno, da se po 30 minutah mletja vzorec pretvori v amorfno obliko (slika 20), vendar menimo, da je v vzorcu tudi še prisotna kristalna oblika, saj so na difraktogramu vidni majhni ostri vrhovi.



Slika.20: Difraktogrami rentgenske praškovne difrakcije klaritromicina po različnih intervalih mletja

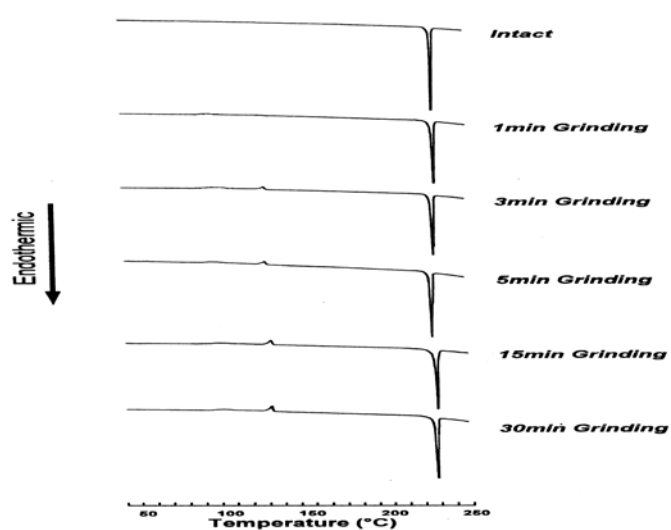
Na sliki 21, je vidno kako se vzorec klaritromicina pripravljen s sušenjem z razprševanjem in analiziran s praškovno X-ray difrakcijo spremeni glede na kristalno obliko in da podobno spremembo dobimo tudi pri vzorcu klaritromicina po 30 minutnem mletju. S tem naj bi dokazali, da se vzorec pripravljen s sušenjem z razprševanjem in vzorec, ki so ga 30 minut mleli, spremeni v amorfno stanje.



Slika 21: Difraktogrami klaritromicina čistega, 30 minut mletega in pripravljenega s sušenjem z razprševanjem

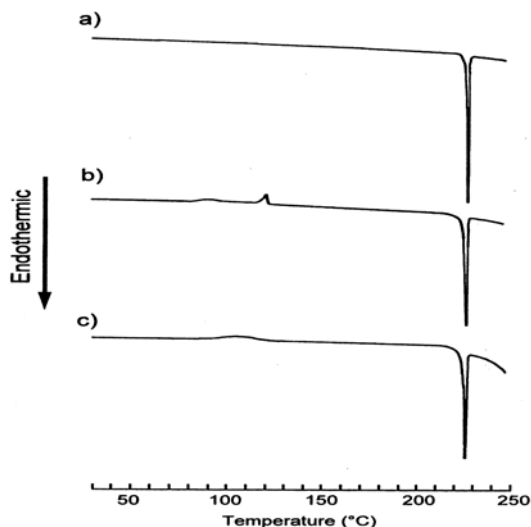
Tudi z DSC metodo so dokazali spremembe klaritromicina pred obdelavo po različnih časih mletja (slika 22). Širok eksotermen vrh se pojavi v temperaturnem območju od 75-120°C pri vzorcu mletem 1 minuto. Poleg širokega eksotermnega vrha se pojavlja še oster eksotermen vrh v območju 110-120°C v vzorcih mletih več kot 3 minute. Povsod se pojavlja endotermen vrh pri 226°C, kjer se kristalna struktura stali.

Bilo je ugotovljeno, da višja energijska stanja pridobljena s časom mletja spremenijo kristalno strukturo klaritromicina v amorfno stanje, saj je bil eksotermen pik vse bolj jasen (68).



Slika 22: Diagrami vzorcev klaritromicina v odvisnosti od časa mletja pridobljeni z DSC metodo

Na sliki (slika 23) vidimo, da vzorec pripravljen s sušenjem z razprševanjem nima vrha pri 110-120°C, kot je to vidno pri vzorcu mletem 30 minut.



Slika.23: DSC diagrami klaritromicina (Instrument: TA 9900). a), neobdelan; b), mlet 30 min; c), sušen z razprševanjem

Avtorji predpostavljajo, da klaritromicin z daljšanjem časa mletja preide iz amorfne oblike v kristalno obliko oziroma spremenjeno amorfno obliko. Z metodo sušenja z razprševanjem klaritromicin postane amorfen (68).

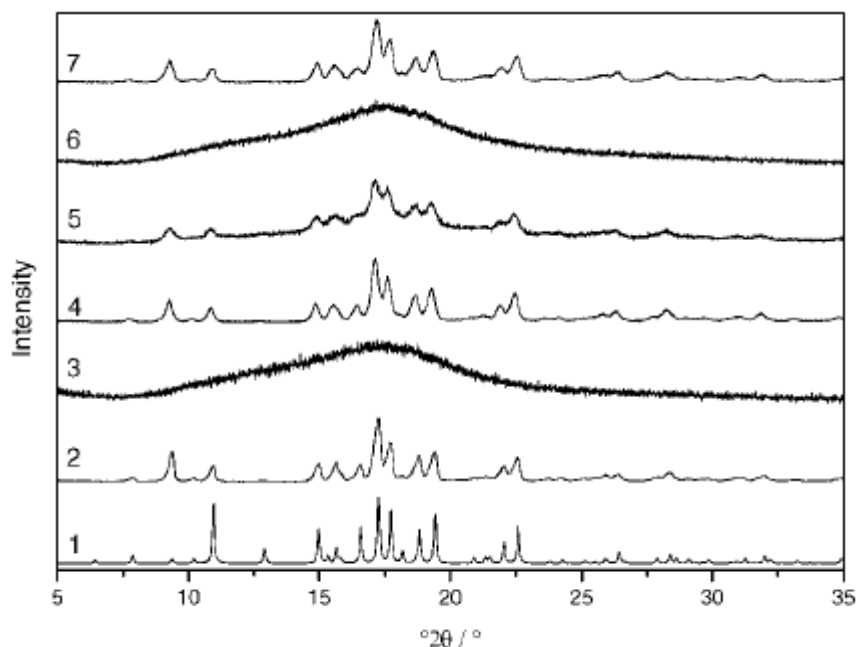
1.6 Primer proučevanja fizikalno-kemijskih lastnosti kristalnega in amornega simvastatina

Podatke o drugih lastnosti, kot je morfologija ali porazdelitev velikosti delcev v vzorcu lahko pridobimo z uporabo mikroskopskih tehnike, kot sta polarizirana optična mikroskopija (PLM angl. optical polarizing microscopy) in vrstičnima elektronska mikroskopija.

Te metode uporabljamo za pomoč pri odkrivanju morebitnih razlik v različno pripravljenih amornih oblik vzorca (69).

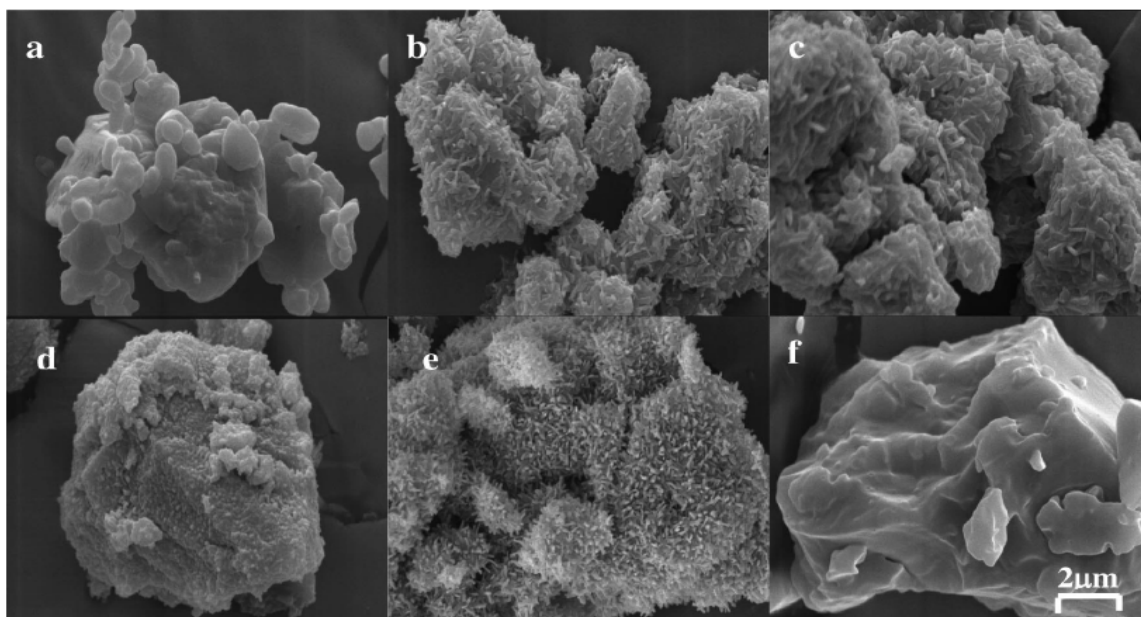
V primeru priprave amornega simvastatina mletega s krogličnim mlinom in simvastatina pripravljen s hitro ohladitvijo taline so z uporabo različnih metod proučevali morebitne razlike. Rezultati XRPD metode niso pokazali razlik med simvastatinom mletim s krogličnim mlinom pri znižani temperaturi, ki je niso mogli natančno kontrolirati in ob prisotnosti tekočega dušika, da se je zagotovila dovolj nizka temperatura mletja in simvastatinom

pripravljenim s hitro ohladitvijo taline. S krogličnim mletjem pri 4°C pa, kot rezultat na difraktogramu dobijo kristalno obliko simvastatina (slika 24) (69).



Slika 24: XRPD difraktogrami simvastatina: (1) teoretični spekter kristalnega simvastatina (refcode EJEQAL), (2) izhodni simvastatin, (3) simvastatin pripravljen s hitro ohladitvijo taline, (4) pri sobni temperaturi mlet simvastatin, (5) pri 4°C mleti simvastatin, (6) pri nižani temperaturi mlet simvastatin, ob prisotnosti N₂ (7) pri nižani temperaturi mlet rekristaliziran simvastatin.

Z uporabo metode SEM so želeli pridobiti več informacij o površini in morfologiji simvastatina tako pred kot po obdelavi vzorca (slika 25). Kristalni simvastatin je bil videti kot zmes staljenih aglomeratov velikosti približno 5-10 mikrometrov in mikrodolcev v velikosti 1-2 mikrometrov (slika 25a). Mleti simvastatin, kjer temperature ni bilo mogoče kontrolirati je imel delce, ki so bili nepravilnih oblik in značilne iglaste strukture na površini (slika 25b). Takšne lastnosti so bile ugotovljene tudi pri vzorcu mletem pri 4°C (slika 25c). Medtem ko pri sobni temperaturi mletem vzorcu je bila vidna gladka površina, ki ne kaže iglic (slika 25d) (69).



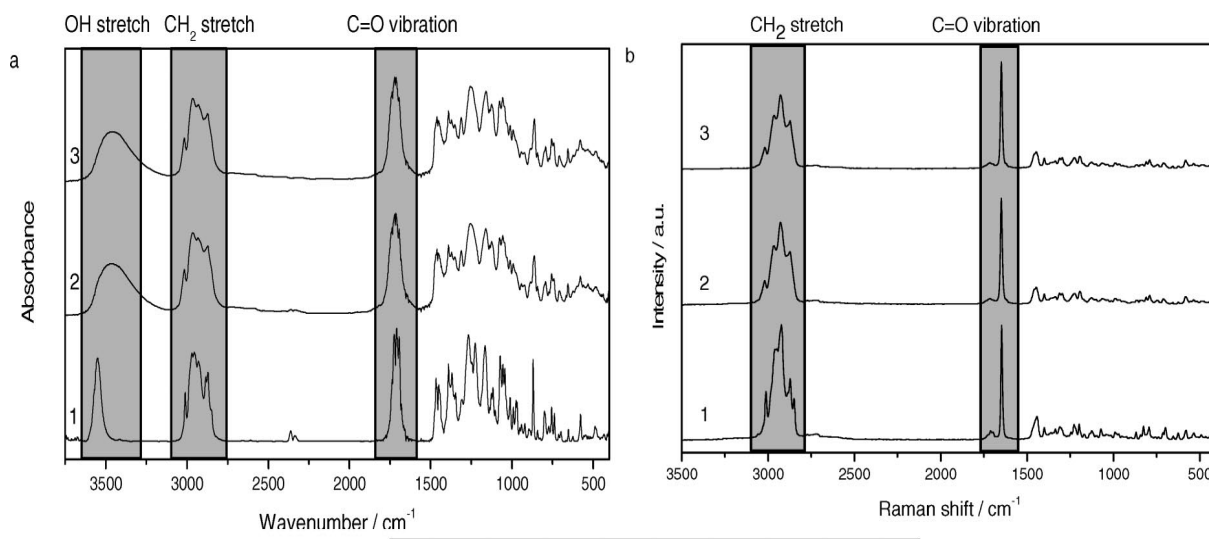
Slika 25: SEM slike simvastatina (a) kristaliziran, (b) pri nižani temperaturi mlet, (c) 4°C mlet, (d) pri sobni temperaturi mlet, (e) rekristaliziran in pri nižani temperaturi mlet, (f) pripravljen s hitro ohladitvijo taline.

Ob rekristalizaciji po 3 dneh pri 20°C, se površinska struktura mletega vzorca ni spremenila, tako da so iglice na površini še vedno prisotne (slika 25e). Hitro hlajen amorfni delci imajo gladko površino (slika 25f) (69).

TGA (termo gravimetrična analiza) analiza simvastatina mletega s krogličnim mlinom in simvastatina pripravljen s hitro ohladitvijo taline ni pokazala izgub mase po pripravi, kar kaže, da simvastatin med obdelavo ni vezal vlage. Ta ugotovitev je ključnega pomena za razlago Tg vzorca, ker lahko absorbirana voda deluje kot mehčalo, kar zniža Tg in zato lahko le-ta prej preide v stabilno kristalno obliko (69).

Pri spektrih posnetih s DRIFT (ang. Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform) tehniko, v območju med 400 cm^{-1} in 4000 cm^{-1} je mogoče videti razliko med kristalno obliko in dvema amorfni vzorcema (slika 26a). V kristalni obliki simvastatina, kjer hidroksilna skupina tvori intermolekularno vodikovo vez z estsko skupino, kar se kaže kot oster vrh pri 3550 cm^{-1} . Spekter amorfni stanj pa kažejo spremembe v združenju hidroksilne skupine preko medmolekulskih vodikovih vezi, ki povzročajo širok raztegnjen vrha od 3550 cm^{-1} - 3465 cm^{-1} . Spekter ni pokazal nekih značilnih razlik med simvastatinom mletim s krogličnim mlinom in simvastatinom pripravljenim s hitro ohladitvijo taline. Razlike se vidijo le med kristalnimi ali amorfni oblikami. Razlike med kristalno obliko in amorfno obliko simvastatina so bile ugotovljene tudi s pomočjo ramanske spektroskopije (slika 26b). Glavne razlike so bile

ugotovljene pri $3200\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ in 1650 cm^{-1} , ki se nanašajo na CH in ester. Ramanski spekter kristalnega vzorca kaže ostrejšje vrhove CH od obeh spektrov amorfne vzorcev (69).



Slika 26: Spekter kristaliziranega in amorfnega simvastatina: (a) DRIFTS spekter in (b) Raman spekter ((1) kristaliziran simvastatin, (2) simvastatin pripravljen s hitro ohladitvijo taline, (3) pri nižani temperaturi mlet simvastatin).

2. NAMEN DELA

Z različnimi metodami kristalizacije bomo pripravili dve kristalni obliki klaritromicina. Klaritromicin obliko II bomo kristalizirali iz etanola, obliko I pa iz tetrahidrofurana. Z metodo hitre ohladitve taline in s sušenjem z razprševanjem klaritromicina iz acetona bomo izdelali dva amorfnata vzorca te zdravilne učinkovine.

Vsem pripravljenim vzorcem klaritromicina bomo določali fizikalno-kemijske lastnosti z naslednjimi analiznimi tehnikami:

- Vrstična elektronska mikroskopija
- IR spektroskopija s Furierjevo transformacijo
- Diferenčna dinamična kalorimetrija
- Inverzna plinska kromatografija
- Merjenje stičnega kota
- Določanje prave gostote

Zanimajo nas predvsem razlike med kristalnimi in amorfnimi vzorci ter razlike med amorfnim klaritromicinom izdelanim z različnima postopkoma. Rezultate izmerjenih fizikalno-kemijskih lastnosti bomo primerjali z že znanimi rezultati raztapljanja na enak način pripravljenih vzorcev v različnih vodnih medijih.

3. MATERIALI IN APARATURE:

3.1 Uporabljeni materiali in oprema

3.1.1 Materiali:

Klaritromicin, C₃₈H₆₉NO₁₃, C9742 ≥95% (HPLC), Sigma,

Acetonitril, J.T.Baker, Nizozemska,

Tetrahidrofuran, Fluka, Švica,

Etanol, Riedel de Haën, Nemčija,

Metanol, J.T.Baker, Nizozemska,

Aceton, Merck, Nemčija,

Etilacetat, J.T.Baker, Nizozemska,

Kloroform,

3.1.2 Oprema:

Tehtnica Mettler Toledo PG6002-S Delta Range, Švica.

Sušilnik z razprševanjem Buchi

Grelnik Ika

Vrstični elektronski mikroskop Supra 35VP, Carl Zeiss, Nemčija,

DSC 822e Mettler Toledo, ZDA,

TGA/DSC1 Mettler Toledo, ZDA,

FT-IR Spectrometer, Nexus Spectrum 1000, Nicolet, ZDA,

Optični mikroskop Olympus BX50, povezan z digitalno kamero Olympus DP70, Japonska,

Helijev piknometar Accupyc 1330 Pycnometer Micromeritics, ZDA,

Za inverzno plinsko kromatografijo (IGC) prirejeni plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N, ZDA,

Naprava za merjenje stičnega kota: Drop Shape Analysis System - DSA100, Krüss, Nemčija

3.2 Eksperimentalno delo

3.2.1 Priprava vzorcev

Priprava klaritromicina kristalne oblike I

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

Priprava klaritromicina kristalne oblike II

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

Priprava amorfnega klaritromicina s hitro ohlavitvijo 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 ohlavitve. Po ohlavitvi smo vzorec v terilnici uprašili.

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 aparatu 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.

3.2.2 Analizne metode

3.2.2.1 Vrstična elektronska mikroskopija prva metoda

Vzorci smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35VP. Pri ustreznih povečavah smo posneli fotografije posameznih vzorcev.

3.2.2.2. Diferenčna dinamična kalorimetrija

Vzorci smo analizirali v aluminijastih lončkih na aparatu DSC822e proizvajalca Mettler Toledo. Analizo smo opravili pri naslednjih pogojih:

- hitrost segrevanja 10°C/min,
- atmosfera N₂, pretok 40 ml/min
- temperaturno območje 20 – 240°C.

Instrument je bil kalibriran z indijem (tališče 156,6°C, talilna entalpija 28,45J/g).

3.2.2.3 Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo

Infrardeče spektre vzorcev smo snemali s FT-IR spektrometerom Spectrum 1000, proizvajalca Perkin Elmer pri naslednjih pogojih:

- območje snemanja 400 – 4000 cm⁻¹,
- ločljivost 2 cm⁻¹,
- interval 1 cm⁻¹.

Meritve smo izvedli brez predpriprave vzorca pri sobni temperaturi.

3.2.2.4 Merjenje stičnega kota

Stični kot, ki ga tvori kapljica tekočine na preiskovanih vzorcih smo določali z metodo sedeče kapljice s pomočjo aparature Krüss Drop Shape Analysis – DSA 100 povezano z osebnim računalnikom in ob uporabi računalniškega programa Krüss Drop Shape Analysis.

Približno 200 mg vzorca smo stresli v kalup in ga s pomočjo hidravlične stiskalnice stisnili z maso 8 ton (15 s) v ploščico z gladko površino. Za testno tekočino smo izbrali vodo. Volumen injicirane kapljice na preiskovani površini je bil 1 µl. Stični kot smo določili takoj zatem, ko smo dvignili iglo iz kapljice. Pazili smo, da je bila kapljica na trdni površini ustrezno osvetljena in slika kapljice, posneta z vgrajeno kamero, ustrezno izostrena, da je lahko računalniški program pravilno ocenil obliko kapljice. Iz ustrezne slike kapljice je računalniški program določil stični kot tekočine na trdni snovi z metodo Young-Laplaceovega prilaganja. Vsako meritev smo ponovili trikrat.

3.2.2.5 Določanje prave gostote

Uporabljali smo helijev piknometar Accupyc 1330. Celico helijevega piknometra smo do 2/3 napolnili z vzorcem, katerega maso smo določili z analizno tehtnico.

3.2.2.6 Inverzna plinska kromatografija

Analizo smo opravili z za IGC prirejenim plinskim kromatografom Agilent Technologies 6890N. Z določeno maso vzorca smo napolnili stekleno kolono, ki smo jo nato prepihovali pri temperaturi 30°C in s stalnim pretokom nosilnega plina helija 5ml/min najmanj 5 ur.

Pogoji analize:

- uporabljeni adsorptivi: metan, n-heksan, n-heptan, n-oktan, n-nonan, tetrahidrofuran, aceton, etilacetat, kloroform,
- 2 paralelki pri pretoku nosilnega plina helija 5 ml/min,
- temperatura kolone 30°C,
- temperatura injektorja 150°C,
- temperatura detektorja 250°C.

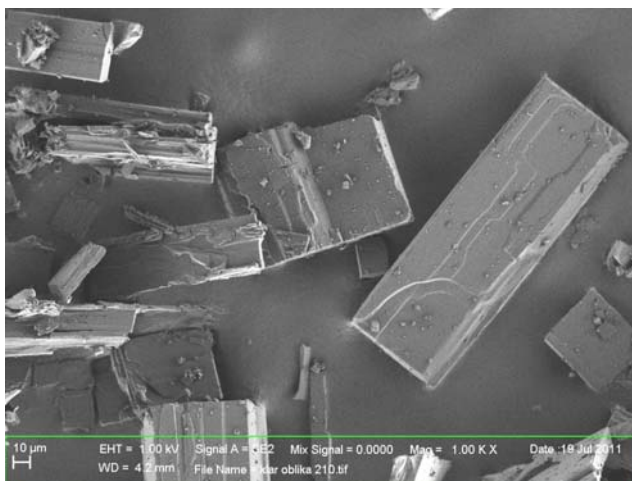
4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Vrstična elektronska mikroskopija

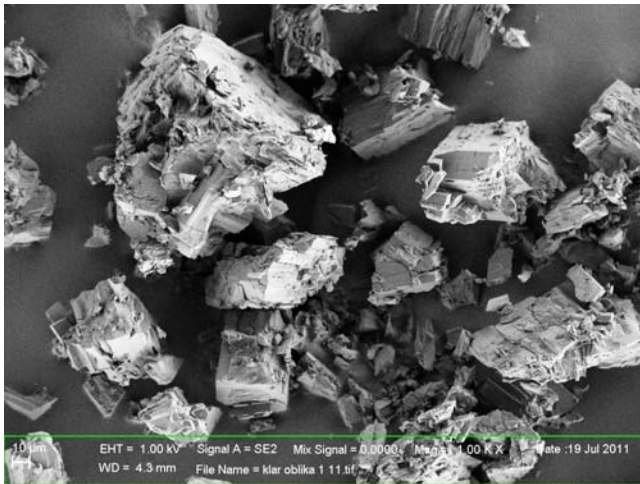
Na slikah 27 in 28 vidimo kristale vzorca klaritromicin oblike II in klaritromicin oblike I, ki se morfološko precej razlikujeta od ostalih vzorcev. Pri vzorcu klaritromicin oblike II so kristali bolj pravilne oblike, ploskve kristalov so ravne in gladke, robovi so ostri, medtem ko pri klaritromicinu oblike I, prevladujejo kristali nepravilnih oblik s hrapavo površino, ter ostrimi robovi. Vzorca se med seboj razlikujeta po zunanem videzu kristalov. Vidne so razlike v dimenzijah posameznih ploskev kristalov. Kristali vzorca klaritromicin oblike II so nekoliko bolj podolgovati, medtem ko so kristali vzorca klaritromicin oblike I kepaste oblike.

Razlike v zunanji obliki kristalov so posledica uporabe različnih kristalizacijskih topil, ki vodijo do različnih interakcij med topilom in kristalizirajočim topljencem. Ta razlika lahko neposredno vpliva predvsem na tehnološke lastnosti, pomembne pri proizvodnji zdravila, kot so pretočne lastnosti, stisljivost ipd.

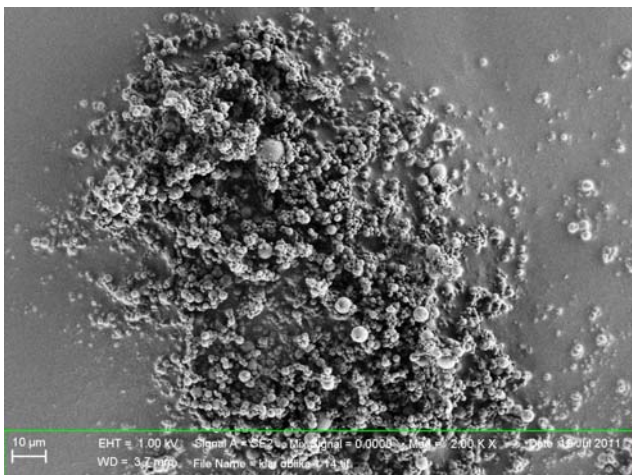
Vzorec klaritromicin sušen z razprševanjem (slika 29) je amorfen in SEM slika kaže aglomerate okroglih delcev. Vzorec klaritromicina pridobljen s hitro ohlavitvijo taline (slika 30) je zmes različnih velikosti in oblik aglomeratov.



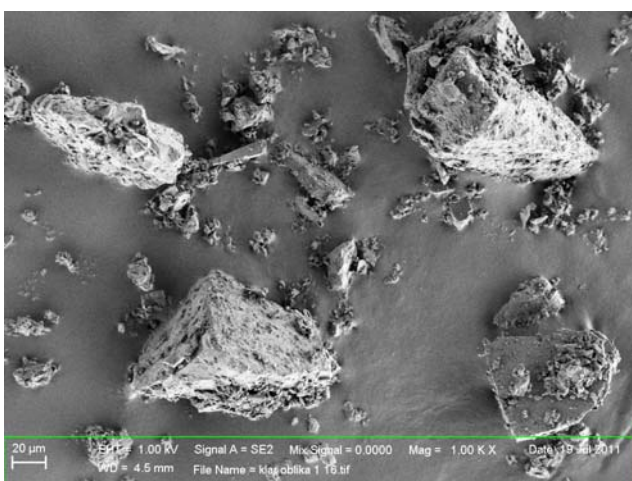
Slika 27: slika delcev klaritromicina kristalne oblike II pod elektronskim mikroskopom; povečava 1000 X (Vir: Fakulteta za farmacijo).



Slika 28: slika delcev klaritromicina kristalne oblika I pod elektronskim mikroskopom; povečava 1000X (Vir: Fakulteta za farmacijo).



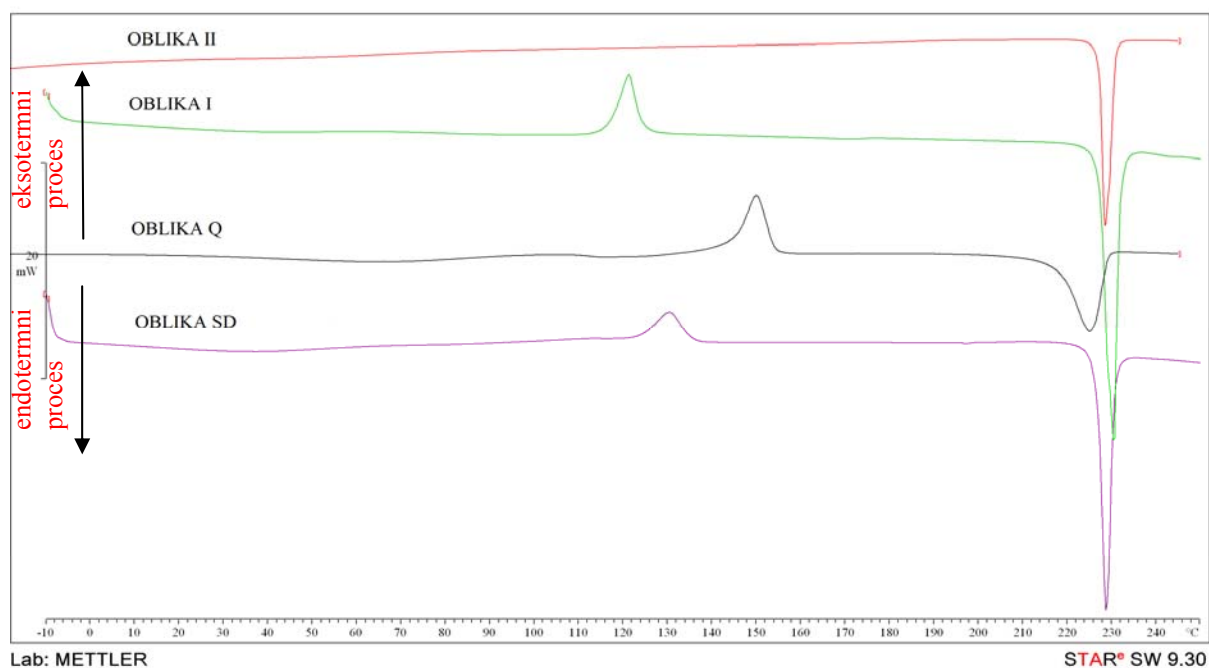
Slika 29: slika amornega klaritromicina sušen z razprševanjem pod elektronskim mikroskopom; povečava 2000X (Vir: Fakulteta za farmacijo).



Slika 30: slika amornega klaritromicina pridobljenega s hitro ohladitvijo taline pod elektronskim mikroskopom; povečava 1000X (Vir: Fakulteta za farmacijo).

4.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Z diferenčno dinamično kalorimetrijo smo za posamezne vzorce posneli termograme (slika 31) na podlagi katerih smo kvalitativno določali nastanek ustrezne kristalne oblike in nastanek amorfne oblike klaritromicina.



Slika 31: DSC krivulje vzorcev klaritromicina.

Na sliki 31 sta prikazani DSC krivulji kristalnih oblik klaritromicina, kjer se vidi razlika med vzorcema. Položaja ostrih endotermnih vrhov, ki predstavljata taljenje vzorca se ujemata, in tako je temperatura taljenja pri obeh vzorcih v območju 227-230°C. Pri vzorcu klaritromicin I lahko opazimo še širok eksotermen vrh pri nekoliko nižji temperaturi 124°C, ki predstavlja polimorfno transformacijo trdno-trdno oziroma kristalizacijo, pri kateri pride do pretvorbe klaritromicin I v termodinamsko ugodnejšo obliko klaritromicin II.

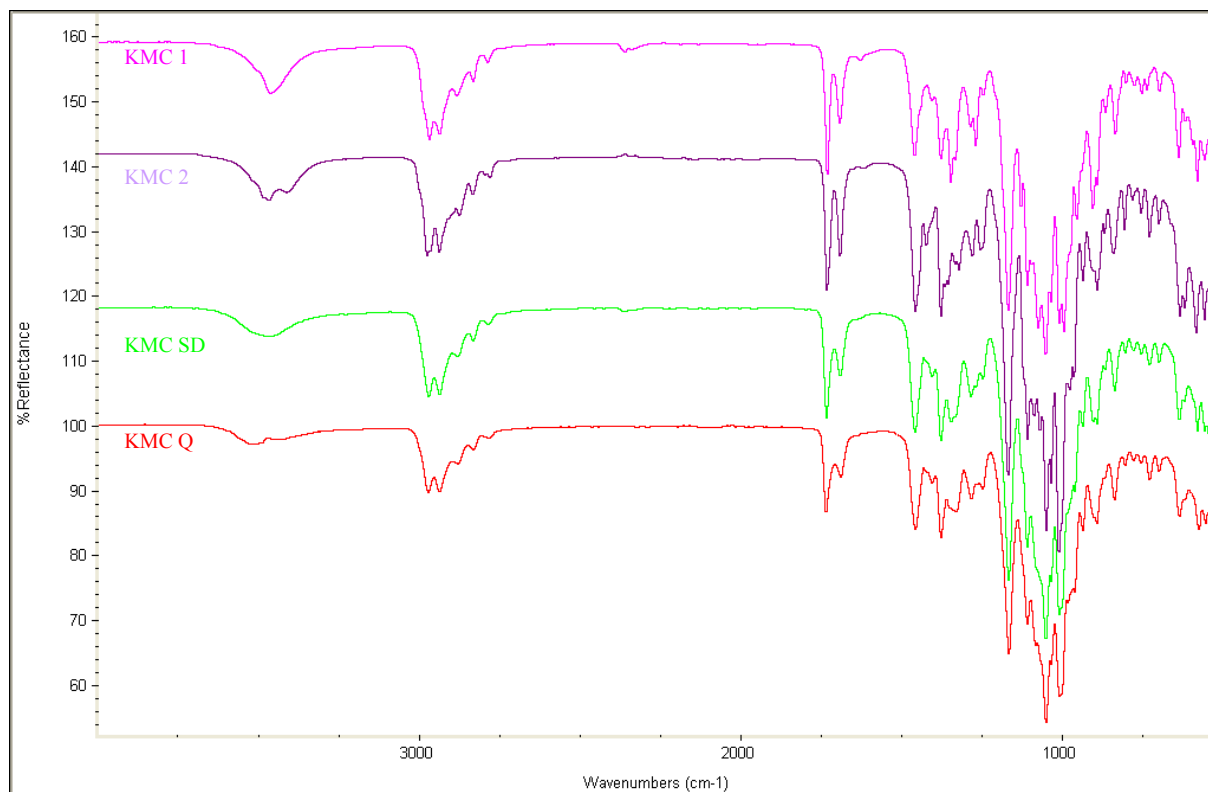
Tako kot pri kristalnih oblikah, tudi med amorfni vzorcema opazimo razlike. Pri obeh amorfni oblikah sta vidna eksotermna vrhova, ki predstavljata rekristalizacijo, ki poteče pri SD vzorcu pri nižji temperaturi kot pri vzorcu Q. Razlike lahko pripišemo različnim velikostim amorfni delcev, različni morfologiji delcev ali dejanski razliki v lastnostih dveh amorfni oblik, kot posledico različne priprave preučevanih vzorcev. Temperaturi tališča obeh vzorcev se pričakovano le malo razlikujeta (227°C za klaritromicin pripravljen z

metodo hitre ohladitve taline in 229°C za klaritromicin pripravljen s sušenjem z razprševanjem).

4.3 ATR infrardeča spektroskopija

Za analizo izdelanih vzorcev smo uporabili tudi ATR IR spektroskopijo oziroma tehniko oslabiljenega popolnega odboja (angl.: attenuated total reflection), ki temelji na merjenju interne refleksije. Primerna je za analizo različnih snovi, predvsem tistih, ki so predebele ali premočno absorbirajo, da bi jih lahko analizirali s transmissijsko tehniko.

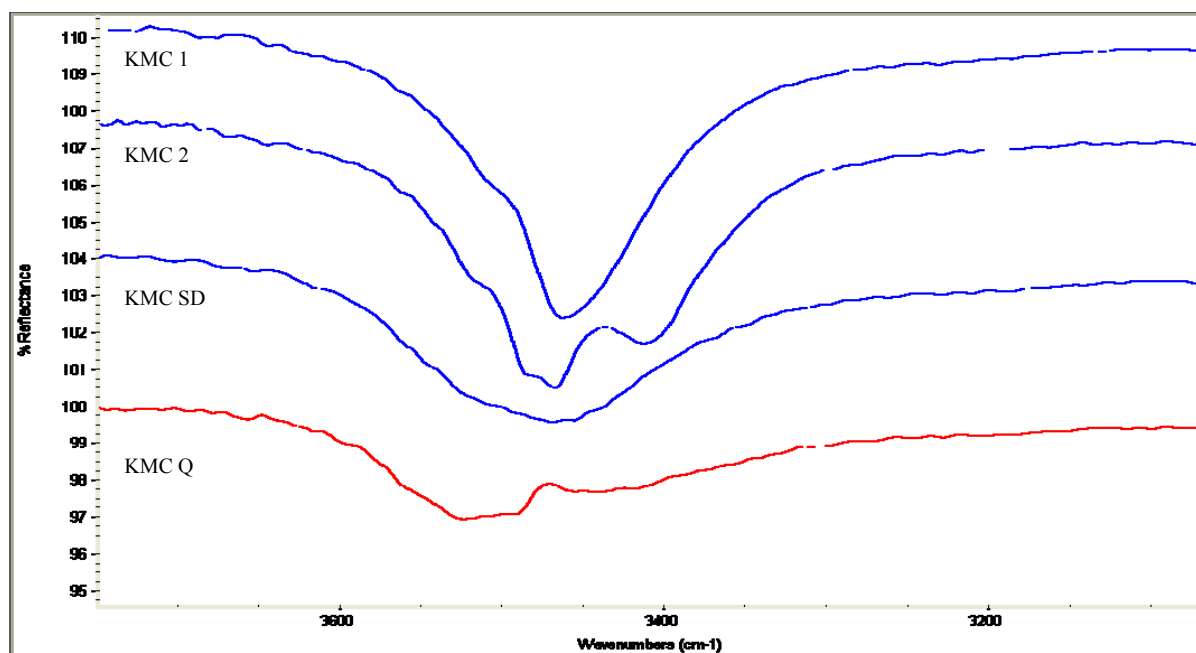
Po natančnem pregledu in primerjavi absorpcijskih trakov v IR spektrih različnih oblik klaritromicina (slika 32), opazimo razlike.



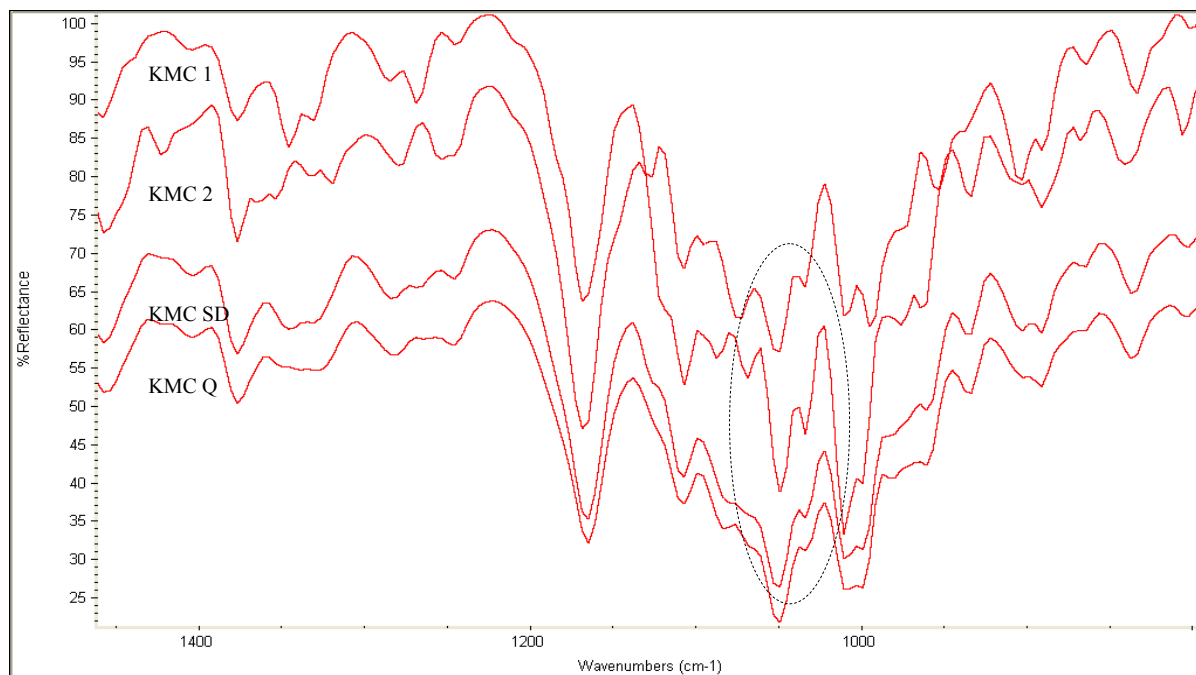
Slika 32: Primerjava IR spektrov različnih oblik klaritromicina.

Med seboj se razlikujeta kristalni obliki klaritromicina, medtem ko se IR spektra amorfni vzorcev ne razlikujeta. Poleg tega lahko opazimo razlike med kristalnima oblikama in amorfni vzorcema.

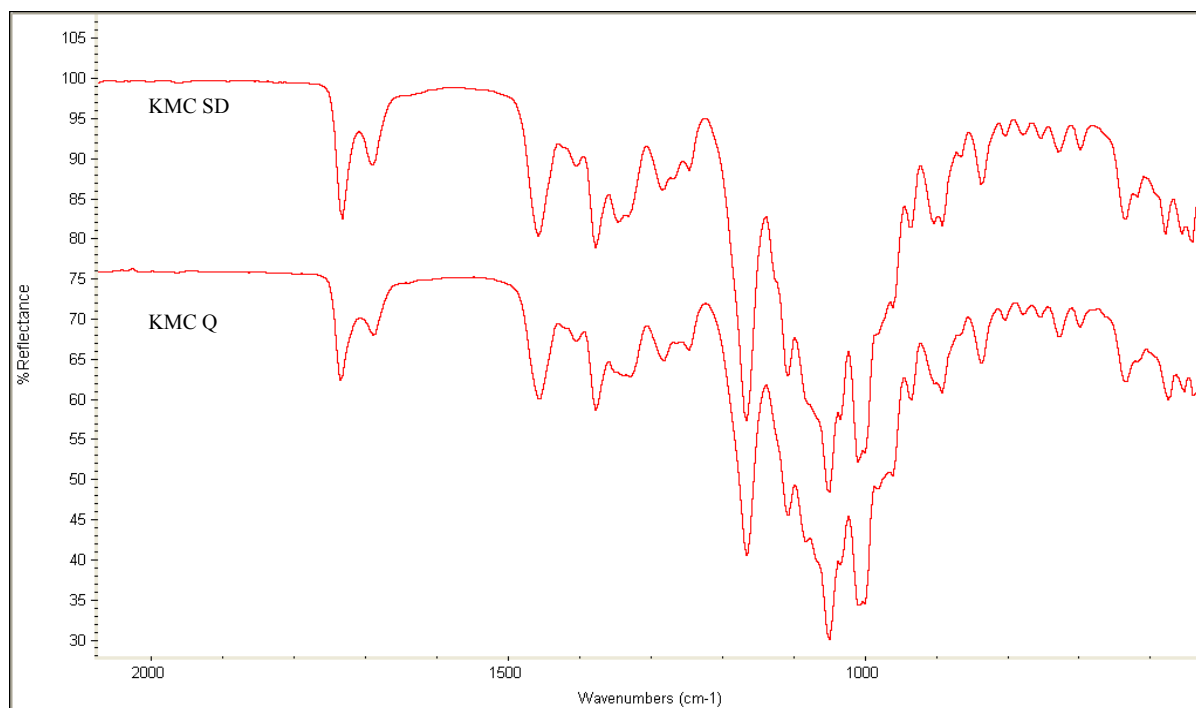
Razliki, ki sta vidni med kristalnima oblikama sta v območju 3500 cm^{-1} - 3400 cm^{-1} (slika 33) in 1100 cm^{-1} - 1050 cm^{-1} (slika 34). V območju 3500 cm^{-1} - 3400 cm^{-1} vidimo, da imata kristalni obliki različni spekter in da se amorfni obliki razlikujeta od kristalnih vzorcev. Naslednjo razliko, ki jo vidimo med kristalnima oblikama v območju 1100 cm^{-1} - 1050 cm^{-1} , kjer ima klaritromicin oblike II dodaten vrh, ki ni prisoten pri klaritromicinu oblike I.



Slika 33: povečava IR spektrov različnih oblik klaritromicina, ki nakazuje prvo razliko med kristalnima oblikama in med kristalno in amorfno obliko



Slika 34: povečava IR spektrov različnih oblik klaritromicina, ki nakazuje drugo razliko med kristalnima oblikama in med kristalno in amorfno obliko



Slika 35: IR spekter amorfnih vzorcev v «fingerprint» območju

Slika 35, prikazuje primerjavo dela IR spektra amorfnih vzorcev klaritromicina in potrjuje njuno podobnost.

4.4 Določanje stičnega kota

Proces raztapljanja trdne snovi v topilu se začne, če topilo moči površino trdne snovi. Merilo za močljivost trdne snovi je stični kot oz. kot močenja, ki smo ga določili z metodo sedeče kapljice. Kot testno tekočino smo uporabili vodo. Izmerjeni stični koti so podani v preglednici 2 in se nahajajo v območju od 51° do 70°. Stični koti so nižji pri kristalnih oblikah klaritromicina, kot pri amorfnih vzorcih. To pomeni da tvori kristalna oblika klaritromicina s polarnimi topli močnejše interakcije. Iz literature bi pričakovali, da voda bolje od kristalnih moči amorfne vzorce. V našem primeru so rezultati drugačni, voda tvori na površini amorfnih vzorcev višji stični kot, kot pri kristalnih oblikah.

Preglednica 2: Stični kot vode na gladki površini vzorcev klaritromicina

UČINKOVINA	STIČNI KOT (°) VODE
klar. oblika II	56,0
klar. oblika I	51,8
klar. QUENCHED	70,0
klar. SPRAY DRYING iz kloroforma	66,4

Na diagramu 1 in na diagramu 2, ki prikazujeta raztapljanje oziroma topnost štirih vzorcev klaritromicina in je povzet iz magistrske naloge Suzane Smrekar (literatura: Suzana Smrekar: Proučevanje raztapljanja amorfne in kristalnih oblik klaritromicina, Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011) lahko vidimo, da se rezultati ujemajo z rezultati močenja. Kristalna oblika I klaritromicina se je v vodi najhitreje raztapljala, prav tako ima najboljšo topnost, kar nakazuje tudi kot močenja, ki je najmanjši. Pričakovali smo, da bo imela amorfna oblika manjši kot močenja in boljše raztapljanje in topnost v vodi od kristalinične, saj naj bi imela kristalna oblika nižjo površinsko energijo od amorfne oblike iste snovi. Značilnost molekul v amorfni obliki sta njihova neurejenost in višja energija. Sklepamo lahko, da slabo močenje amorfnih vzorcev negativno vpliva na raztapljanje in topnost.

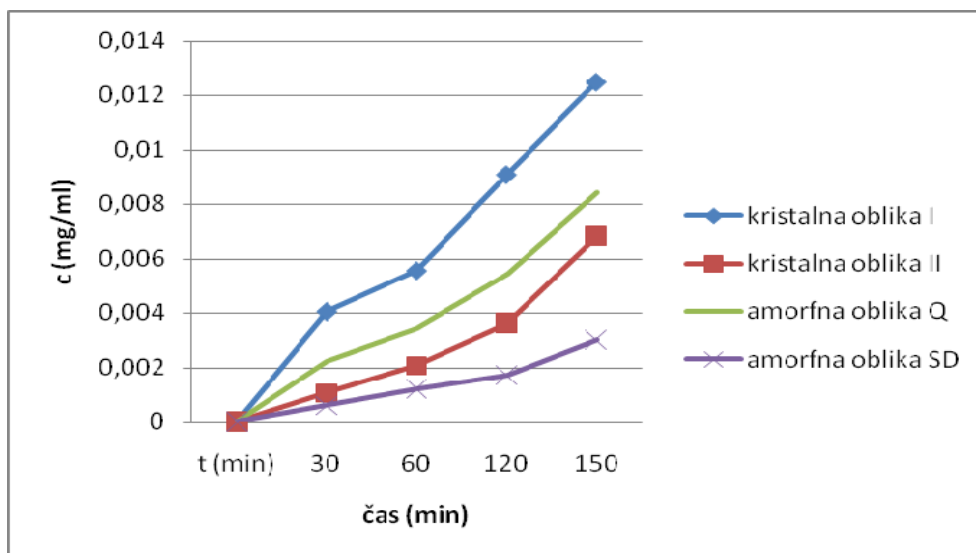


Diagram 1: Raztapljanja vzorcev klaritromicina kristalne oblike I, kristalne oblike II, amorfne oblike Q in amorfne oblike SD v vodi.

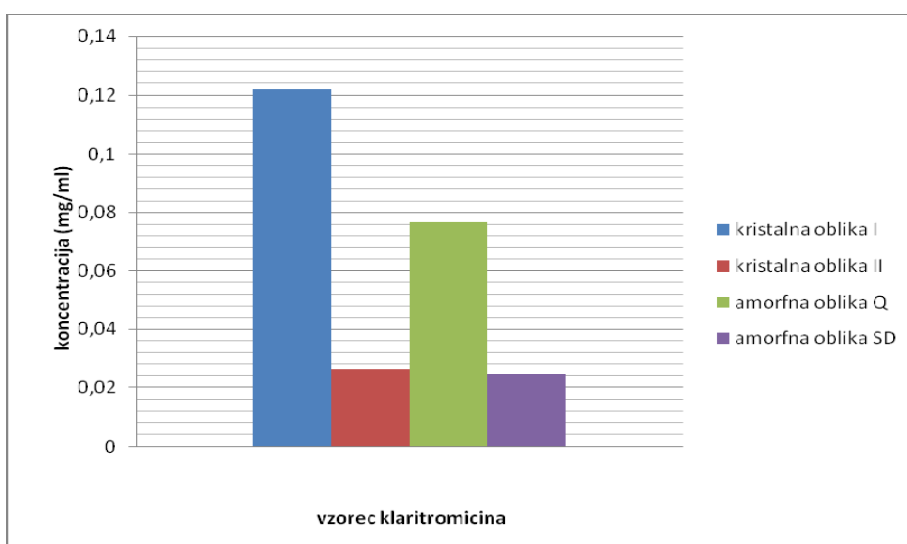


Diagram 2: Koncentracije vzorcev klaritromicina kristalne oblike I, kristalne oblike II, amorfne oblike Q in amorfne oblike SD v vodi po 24 urnem mešanju na magnetnem mešalu.

4.5 Določanje prave gostote

Rezultati določanja helijeve gostote so podani v preglednici 3. Pravo gostoto vzorcev, določene s helijevim piknometrom se med seboj nekoliko razlikujejo. Najnižjo gostoto ima amorfni klaritromicin pripravljene z metodo hitre ohladitve taline, sledi mu amorfni klaritromicin pripravljene s sušenjem z razprševanjem, klaritromicin I in na koncu klaritromicin II. Rezultati kažejo, da imata amorfna vzorca nižjo gostoto od kristalnih. To je pričakovano, saj so v amorfni delcih klaritromicina molekule bolj oddaljene med seboj, zato imajo večji volumen in posledično manjšo gostoto. Prava gostota to ugotovitev potrjuje. Zanimivo je, da se gostoti amorfni vzorcev bistveno razlikujeta kar nakazuje različno razporeditev molekul v prostoru.

Preglednica 3: Prava gostota kristalnih in amorfni klaritromicinov

VZOREC	ρ_1 (g/ml)	ρ_2 (g/ml)	povp. ρ (g/ml)
klar. oblika II	1,1851	1,1877	1,186
klar. oblika I	1,1844	1,1831	1,184
klar. QUENCHED	1,1580	1,1565	1,157
klar. SPRAY DRYING iz kloroforma	1,1759	1,1684	1,170

4.6 Inverzna plinska kromatografija

Z inverzno plinsko kromatografijo smo izmerili disperzijske in specifične interakcije med izbranimi vzorci modelne zdravilne učinkovine in apliciranimi standardi. Rezultati, zbrani v preglednici 4.

Preglednica 4: rezultati določanja površinske energije vzorcev klaritromicina z IGC

vzorec	masa (g)	T (°C)	gamma sd	R ²	THF (kJ/mol)	ACETON (kJ/mol)	EtAc (kJ/mol)	CHCl ₃ (kJ/mol)	Ka	Kd	R ²
meritev 1											
Klar. oblika I P _{in} = 5	0,445	30	35,04	0,9995	2,66	6,26	2,61	1,46	0,027	0,189	0,9055
meritev 2											
Klar. oblika I P _{in} = 10	0,305	30	34,85	0,9994	2,73	6,65	3,80	1,90	0,027	0,264	0,9053
meritev 1											
Klar. oblika II P _{in} = 7	0,414	30	44,92	0,9999	6,49	11,39	5,48	4,85	0,069	0,308	0,9667
meritev 2											
Klar. oblika II P _{in} = 4	0,353	30	40,43	0,9995	3,97	11,05	5,48	4,20	0,037	0,46	0,8683
meritev 1											
klar. QUENCHED P _{in} = 7	0,166	30	31,15	0,9999	5,29	4,54	2,40	0,83	0,063	0,081	0,9763
meritev 2											
klar. QUENCHED P _{in} = 7	0,166	30	29,12	0,9998	7,42	5,22	3,33	1,57	0,089	0,146	0,9774
meritev 1											
klar. SPRAY DRIED IZ KF P _{in} = 19	0,185	30	33,38	0,9998	1,91	17,35	15,48	8,75	-0,003	1,40	0,0043

Z uporabo različnih topil za kristalizacijo dveh kristalnih oblik klaritromicina smo ugotovili, da se površinske lastnosti razlikujeta v nepolarni in polarni komponenti. Vzorec klaritromicina I ima nižje vrednosti polarnih in nepolarnih komponent površinske energije od kristalne oblike II (nižji gamma sd, Ka in Kd). Iz teh rezultatov bi pričakovali, da se bi oblika II, hitreje raztapljala v vodi od oblike I. Rezultati raztapljanja so pokazali ravno nasprotno (diagram 1). Amorfn vzorca imata nižji nepolarni del površinske energije od obeh kristalnih vzorcev. Klaritromicin pripravljen s hitro ohladitvijo taline kaže nižjo kislost in bazičnost površin od kristalnih oblik, klaritromicin izdelan s sušenjem z razprševanjem pa nižjo kislost

in večjo bazičnost od kristalnih vzorcev. V primeru IGC analize se nepolarni del površinske energije amorfni vzorcev ne ujemajo z rezultati merjenja močljivosti in rezultati raztapljanja.

5. ZAKLJUČEK:

V magistrski nalogi smo izdelali dva kistalna in dva amorfna vzorca klaritromicina. Kristalno obliko I smo pripravili s prekristalizacijo iz etanola ter kristalno obliko II s prekristalizacijo iz acetona. Amorfna vzorca klaritromicina smo pripravili s hitro ohladitvijo taline (amorfna oblika Q) ter s sušenjem z razprševanjem (amorfna oblika SD).

Izdelane vzorce smo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), infrardečo spektroskopijo s Fourierjevo transformacijo, s helijevim piknometrom določili prave gostote, z metodo sedeče kapljice zmerili stične kote, vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) in inverzno plinsko kromatografijo.

- z vrstično elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da se delci posameznih vzorcev med seboj razlikujejo. Največje delce ima vzorec klaritromicina kristalne oblike II, najmanjše pa vzorec klaritromicina sušen z razprševanjem. Od ostalih vzorcev se najbolj razlikuje klaritromicin oblika II s kristali pravilnih oblik, gladkimi ploskvami in ostrimi robovi.
- z DSC metodo smo dokazali uspešnost priprave obeh kristalnih oblik in dveh amorfni vzorcev. Med segrevanjem kristalna oblika II in amorfna vzorca prehajata v najbolj stabilno obliko I. Temperatura prehoda kristalna oblika II v I ter temperatura rekristalizacije amorfni vzorcev se v vseh treh primerih razlikujejo.
- ATR infrardeča spektroskopija je pokazala razliko med kristalnima vzorcema, ter med njima in amorfni vzorcema. Med IR spektrom amorfni vzorcev ni razlik.
- pri merjenju stičnega kota smo prišli do ugotovitve, da so stični koti nižji pri kristalnih oblikah klaritromicina, kot pri amorfni vzorcih. To sicer nismo pričakovali, vendar kaže, da tvori kristalna oblika klaritromicina s polarnimi topili močnejše interakcije. Rezultati določanja močenja se relativno dobro ujemajo z rezultati raztapljanja v vodi.
- z določitvijo prave gostote smo ugotovili da imata amorfna vzorca nižjo gostoto od kristalnih. Pri amorfni vzorcih sta gostoti dokaj različni, kar nakazuje na različno razporeditev molekul v prostoru.
- tudi z IGC metodo smo dokazali, da se vzorci med seboj razlikujejo v polarnih in nepolarnih lastnostih, vendar se ti rezultati ne ujemajo z rezultati raztapljanja in topnosti, kot tudi ne z rezultati močenja.

6. LITERATURA:

1. UNIVERZA V LJUBLJANI, FAKULTETA ZA MATEMATIKO IN FIZIKO ODDELEK ZA FIZIKO, Izbrana poglavja iz uporabne fizike, Amorfní polprevodniki, Gregor Plohl Mentor: doc. dr. Primož Ziherl, Ljubljana, maj 2007
2. Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterisation and stabilization. *Adv Drug Deliver Rev* 2001; 48: 27-42.
3. Tong H H Y, Chow A H L: Control of Physical Forms of Drug Particles for Pulmonary by Spray Drying and Supercritical Fluid Processing. *KONA*, 2006; 24: 27-40
4. Grant D. J.W. Theory and origin of polymorphism. In: Brittain HG. *Polymorphism in Pharmaceutical solids*. 1st ed. New York:Marcel Dekker, 1999:1-33
5. Haleblían J., McCrone W. Pharmaceutical Applications of Polymorphism. *J. Pharm. Sci* 1969; 58: 911-929
6. Carstensen JT, *Advanced Pharmaceutical Solids, Drugs and the Pharmaceutical Science*, New York:Marcel Dekker, 2001: 107-131
7. Andrej Jamnik, *Fizikalna kemija I*, skripta za študente kemije, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2011
8. McCrone W.C. *Physics and Chemistry of Organic Solid States*. *Polymorphism* 1965; 2: 725-767
9. Kerč J., Srčič S. Thermal analysis of glassy pharmaceuticals. *Thermochim. Acta*. 1995; 248: 81-95
10. 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.
11. Byrn SR, Pfeiffer RR, Stowell JG: *Solid-state chemistry of drugs*. 2nd ed. Indiana: SSCI, 1999: 22-25, 249-258.
12. Brittain HG: *Polymorphism in pharmaceutical solids*. New York, Basel: Marcel Dekker, 1999, 183-226, 395-420.
13. Mosharraf M, Sebhatu T, Nystrom C. The effects of disordered structure on the solubility and dissolution rates of some hydrophilic, sparingly soluble drugs. *Int J Pharm* 1999; 177: 29-51.

14. Farmaceutski vestnik, strokovno glasilo slovenske farmacije, št.1, marec 2007, letnik 58, Odon Planinšek; Nekaterne metode stabilizacije amorfnih učinkovin
15. Lazarini F., Brenčič J., Splošna in anorganska kemija. DZS, Ljubljana, 1992
16. Vippagunta SR, Brittain HG, Grant DJV. Crystalline solids. Adv Drug Deliver Rev 2001; 48: 3-26.
17. Khankari R. K, Grant D.J.W. Pharmaceutical Hydrates. Thermochim Acta, 1995; 284: 61-79
18. Seddon KR, Zaworotko M. Crystal Engineering. The Design and Application of Functional Solids, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1999: 4-25, 127-60, 200-01, 251-66, 325-56.
19. Grant DJW. Theory and Origin of Polymorphism. In: Brittain HG. Polymorphism in Pharmaceutical Solids. 1st Ed. New York: Marcel Dekker, 1999:1-33.
20. Dremelj Helena: Vpliv mletja na fizikalno-kemijske lastnosti laktoze in klaritromicina, Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2005.
21. Saleki-Gerhardt A, Stowell JG, Byrn SR, Zogaeafi G. Hydration and dehydration of crystalline and amorphous forms of raffinose. J Pharm Sci 1995; 84: 318-323.
22. Li Y, Han J, Zhang GGZ, Grant DJW, Suryanarayanan. In situ dehydration of carbamazepine dihydrate: a novel technique to prepare amorphous anhydrous carbamazepine. Pharm Dev and Tech 2000; 5(2): 257-266.
23. Andrej Ferlan, Franc Vrečer; Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin / Methods for amorphisation of drugs; Strokovni članek / Professional article; Farm Vestn 2004; 55: 11-21
24. Planinšek O. Nekaterne metode za povečevanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi teško topnih uoeinkovin-2.del. Farm Vestn. 2002; 53: 117-121.
25. Lieberman HA, Lachman L, Schwartz J B: Pharmaceutical dosage forms: Tablets. 2nd ed. New York, Basel: Marcel Dekker, 1990, 107-145.
26. Nakai Y, Fukuoka E. et. al. Effects of grinding on physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose. I. Some physical properties of crystalline medicinals in ground mixtures. Chem Pharm Bull 1977; 25(12): 3340-3346.

27. Watanabe T, Wakiyama N, Usui F, Ikeda M, Senna M. Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *Int J Pharm.* 2001; 226: 81-91.
28. Nakai Y, Fukuoka E. et. al. Effects of grinding on physical and chemical properties of crystalline medicinals with microcrystalline cellulose. II. Retention of volatile medicinals in ground mixture. *Chem Pharm Bull* 1978; 26(10): 2983-2989.)
29. Halebian JK, Koda RT, Biles JA. Isolation and haracterization of some solid phases of fluprednisolone. *J Pharm Sci* 1971; 60: 1485-1491.
30. Hersey JA, Krycer I. Biopharmaceutical implications of technological change *Int J Pharm Tech Prod Manuf* 1980; 1(2):18-21.
31. Hüttenrauch R. Fundamentals of pharmaceutics. *Acta Pharm Technol* 1988; 34(1): 1-10).
32. Gubskaya AV, Lisnyak YV, Blagoy YP Effect of cryogrinding on physico-chemical properties of drugs I. Theophylline: Evaluation of particle sizes and the degree of crystallinity, relation to dissolution parameters. *Drug Dev Ind Pharm* 1995; 21(17): 1953-1964.)
33. Elamin AA, Ahlneck C, Alderborn G, Nyström C. Increased metastable solubility of milled griseofulvin, depending on the formulation of a disordered surface structure. *Int J Pharm* 1994; 111: 159-170.
34. Konno T, Kinuno K. et. al. Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. I. Effect of vapor pressure on the medicinals on changes in crystalline properties. *Chem Pharm Bull* 1986; 34(1): 301-307.
35. Konno T. Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. II. Application of reduced pressure treatment for the improvement of dissolution of flufenamic acid. *Chem Pharm Bull* 1989; 37(8): 2481-2484.
36. Konno T. Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. III. Determination of vapor pressure of solid drugs by steam distillation. *Chem Pharm Bull* 1990; 38(4): 1032-1034.
37. Konno T, Physical and chemical changes of medicinals in mixtures with adsorbents in the solid state. IV. Study on reducedpressure mixing for practical use of amorphous mixtures of flufenamic acid. *Chem Pharm Bull* 1990; 38(7): 2003-2007.

38. Williams KL. An introduction to X-ray Spectrometry. X-ray fluorescence and electron microscope analysis. Allen & Unwin, London, 1987: 42-46
39. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., Principles Of Instrumental Analysis, 5th Ed, Saunders College Publishers, Philadelphia, 1998, str. 380-426, 430-491, 550-553
40. http://www.ki.si/fileadmin/user_upload/datoteke-L09/nzl/Kristalografija-NZL-UVOD.pdf
41. http://sl.wikipedia.org/wiki/Rentgenska_praškovna_difrakcija
42. KORPAR, D.: Sinteza in karakterizacija nikljevih(II) acetatov z aminopiridini, Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za kemijo, 2010.
43. Atkins, P., W., Clugston, M., J., Frazer, M., J. in Jones, A., R. (1997). Kemija zakonitosti in uporaba (drugi natis). Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.
44. Univerza v Ljubljani Fakulteta za farmacijo; VPLIV POLARNOSTI TOPIL PRI KRISTALIZACIJI MODELNE ZDRAVILNE UČINKOVINE K-2605/05 NA FIZIKALNE LASTNOSTI DELCEV; Mentor: izr. prof. dr. Franci Vrečer, somentor: dr. Silvo Zupančič, Janez Jerman, Ljubljana 2009
45. Marjan Bele: Acetato-hidroksidni postopek za pripravo superprevodnih spojin v sistemu Y-Ba-Cu-O po sol-gel metodi, magistrsko delo, samozaložba, Ljubljana, 1994: 31-33
46. Kumar N, Salman M, Gangakhedkar K K; Novel Amorphous Form of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/77017 A1, Dec. 21, 2000.
47. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., Principles Of Instrumental Analysis. Harcourt Brace College Publishers, Philadelphia, Fort Worth, Chicago, San Francisco, Austin, Montreal, Toronto, London, Sydney, Tokio, 5th, 1998, str. 380-428, 185-189.
48. <http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk6496/03-infra.pdf>
49. Rouessac, F., Rouessac, A., Chemical Analysis, Modern Instrumentation Method and Techniques, England: John Willey & Sons, 2000, str. 163-168,170.
50. Threlfall T. L. Analysis of organic polymorphs. Analyst 1995; 120: 2435-2460
51. CRYSTALLINE AND AMORPHOUS FORMS OF BETA-L-DEOXYTHYMIDINE, United States Patent Application 20100048504

52. Univerza v Ljubljani Fakulteta za farmacijo; DOLOČANJE POVRŠINSKE ENERGIJE VZORCEV LAKTOZE Z METODO INVERZNE PLINSKE KROMATOGRAFIJE; Raziskovalno delo pri predmetu fizikalna farmacija; Mentor: doc. dr. Odon Planinšek, mag. farm.; Suzana Gerdej, Rebeka Gmajner; April 2004
53. Planinšek O., Srčič S.: Navodila za vaje pri predmetu Fizikalna farmacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2001 : 1-42
54. Čakare-Samardžija, Laila (2003). Termodinamika površin trdnih snovi. Vakuumist, letnik 23, številka 1, str. 13-20
55. OSNOVE METOD SEM IN AFM ZA PREISKAVE POVRŠIN; Zoran Samardžija, Institut "Jožef Stefan", Jamova 39, 1000 Ljubljana
56. Helena Dremelj; diplomska naloga; vpliv mletja na fizikalno-kemijske lastnosti laktoze in klaritromicina; Fakulteta za farmacijo; Ljubljana, 2005
57. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Klaritromicin>
58. Karl Weiss, MD, MSc, FRCPC¹ and Anita Vanjaka, MSc,² for the Canadian Clarithromycin Study Group on Bronchitis*;; An Open-Label, Randomized, Multicenter, Comparative Study of the Efficacy and Safety of 7 Days of Treatment with Clarithromycin Extended-Release Tablets Versus Clarithromycin Immediate-Release Tablets for the Treatment of Patients with Acute Bacterial Exacerbation of Chronic Bronchitis; CLINICAL THERAPEUTICS®/VOL. 24, NO. 12, 2002
59. The Merck Index, 13th Edition. Merck & Company Incorporated, Whitehouse Station, New Jersey, USA, 2001
60. European Pharmacopoeia 5th Edition, Council of Europe, Strasbourg Cedex, France, 2005; 2: 1309-1311.
61. 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.
62. Aelion, R.; Loebel, A.; Eirich, F. J., Am. Chem. Soc. 72, 5705-5712, 1950.
63. Sohn Y T, Rhee J K, Im W B: Polymorphism of Clarithromycin. Archives of Pharmacal Research, 2000; 23: 81-384.

64. 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.
65. 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.
66. Kumar N, Salman M, Gangakhedkar K K: Novel Amorphous Form of Clarithromycin. World Intellectual Property Organization, WO 00/77017 A1, Dec. 21, 2000.
67. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01211>
68. 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
69. Kirsten A. Graeser, Clare J. Strachan, James E. Patterson, Keith C. Gordon, and Thomas Rades; Physicochemical Properties and Stability of Two Differently Prepared Amorphous Forms of Simvastatin ; CRYSTAL GROWTH & DESIGN 2008, VOL. 8, NO. 1, 128–135