

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN HROVAT

**PRIPRAVA IN PROUČEVANJE  
AMORFNIH VZORCEV  
HIDROKLOROTIAZIDA**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLEMEN HROVAT

**PRIPRAVA IN PROUČEVANJE  
AMORFNIH VZORCEV  
HIDROKLOROTIAZIDA**

**PREPARATION AND THE STUDY OF THE  
AMORPHOUS STATE OF  
HYDROCHLOROTHIAZIDE**

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Odona Planinška in somentorstvom izr. prof. dr. Gregorja Malija.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Odonu Planinšku za vso strokovno pomoč in nasvete tekom izvajanja naloge. Zahvala tudi izr. prof. dr. Gregorju Maliju za pomoč pri analiznih metodah.

Posebna zahvala gre Andreji, družini in prijateljem, za vso izkazano podporo tekom priprave magistrske naloge, kakor tudi tekom celotnega študija.

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Odona Planinška in somentorstvom izr. prof. dr. Gregorja Malija.

Ljubljana, 2014

Klemen Hrovat

## Kazalo

<b>Povzetek.....</b>	<b>V</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>VI</b>
<b>Seznam okrajšav – urejeno po abecednem redu .....</b>	<b>VII</b>
<b>Ključne besede .....</b>	<b>VII</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Kristalna in amorfna oblika snovi .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Metode amorfizacije.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Sušenje z razprševanjem .....	5
1.2.2. Hitra ohladitev taline.....	5
1.2.3. Mletje .....	6
<b>1.3. Določanje lastnosti amorfnih snovi.....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Diferenčna dinamična kalorimetrija .....	7
1.3.2. Rentgenska praškovna difrakcija .....	9
1.3.3. Infrardeča spektroskopija.....	10
1.3.4. Jedrska magnetna resonanca .....	11
<b>1.4. Hidroklorotiazid .....</b>	<b>13</b>
<b>2. NAMEN DELA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Materiali in naprave.....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Naprave .....	15
3.1.2. Materiali .....	15
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>15</b>
3.2.1. Priprava vzorcev .....	15
3.2.2. Analitske metode .....	16
<b>4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Vizualna karakterizacija.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Termična analiza .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Rentgenska praškovna difrakcija .....</b>	<b>20</b>
<b>4.4. Jedrska magnetna resonanca v trdnem stanju .....</b>	<b>22</b>
<b>4.5. Infrardeča spektroskopija .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6. Skupen pregled uporabljenih metod.....</b>	<b>28</b>
<b>5. SKLEP.....</b>	<b>30</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>31</b>

## Povzetek

V farmacevtski industriji se je v zadnjem času povečal interes za proučevanje amorfih snovi. V primeru amorfnih zdravilnih učinkovin najpogosteje proučujemo izboljšanje raztplavljanja ter s tem povečanje biološke uporabnosti, ki je posebej pomembna za učinkovine, katerih omejitveni dejavnik delovanja sta nizka topnost in hitrost raztplavljanja. Amorfno snov lahko naredimo na različne načine. Z nalogo smo želeli proučiti učinkovitost amorfizacije z različnimi metodami ter ugotoviti ali obstajajo razlike med rezultati, ki jih dajejo različne metode za karakterizacijo amorfnegra stanja. V magistrski nalogi smo za pripravo amorfnih vzorcev hidroklorotiazida (HCT) uporabili naslednje metode: sušenje z razprševanjem (SD), hitra ohladitev taline (QC) ter mletje pri znižani temperaturi (QM). Literatura navaja, da se lahko različno pripravljeni amorfni vzorci med seboj razlikujejo, zato smo vzorce ovrednotili z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), jedrsko magnetno resonanco (NMR), rentgensko praškovno difrakcijo (XRPD) ter infrardečo spektroskopijo (IR). Tekom študije smo pripravili tudi različno dolgo mlete vzorce z namenom spremeljanja procesa amorfizacije.

Primerjava različno pripravljenih vzorcev okarakteriziranih z različnimi analiznimi metodami je kot amorfen vzorec pokazala HCT QC. Pri vzorcih HCT SD ter HCT QM 72h smo na amorfnost vzorcev sklepali na podlagi uklonskih slik XRPD ter spektrov IR meritev, vendar amorfnosti nismo opazili pri NMR ter DSC meritvah.

Z vsemi metodami smo opazili tudi razlike med različno dolgo mletimi vzorci, kjer se iz NMR meritev vidi sprememba polimorfne oblike tekom mletja. Spremembo polimorfne oblike nakazujejo tudi DSC meritve, kjer se s podaljševanjem časa mletja opazi povečevanje deleža manj stabilne oblike HCT.

Pokazalo se je, da je izbira metode amorfizacije zdravilne učinkovine pomembna predvsem zaradi fizikalne stabilnosti amorfnegra stanja, saj lahko le za popolnoma amorfne vzorce pričakujemo ustrezno stabilnost.

## Abstract

In the pharmaceutical industry the interest for studying amorphous materials has increased in the last period. While investigating active ingredients we most frequently study improvement of solubility and thereby the increase of bioavailability, which is especially important for active ingredients, where the limiting factors of activity are solubility and the dissolution rate. Amorphous phase can be prepared by various approaches. We have been studying the efficiency of various methods and monitor, if there are differences in the results obtained by various characterization methods of the amorphous form. In the dissertation we have prepared amorphous samples of hydrochlorothiazide (HCT) by spray drying (SD), quench cooling (QC) and cryomilling (QM). In literature they say that differently prepared amorphous samples can differ from one another, so we have evaluated them by differential scanning calorimetry (DSC), nuclear magnetic resonance (NMR), X ray powder diffraction (XRPD) and infrared spectroscopy (IR). During the study we have also prepared samples with a different duration of milling to monitor the process of the amorphisation.

Comparison of differently prepared amorphous samples, characterized by various methods has shown the quench cooled as the only amorphous one. For spray dried and 72 h cryomilled samples amorphous form is suggested only by XRPD and IR analyses, but not by NMR and DSC analyses. With all characterization methods we have observed differences between samples with different duration of milling, where we could see the change of the crystalline form during the milling process. The change of the polymorphic form was also indicated by DSC, where we have also seen the increase of the fraction of the less stable polymorphic form of HCT. It turned out that the choice of the method for the preparation of the amorphous sample is particularly important for the physical stability of the amorphous phase, as we can expect sufficient stability only for totally amorphous samples.

## Seznam okrajšav – urejeno po abecednem redu

CM – kriogeno mletje (angl. cryomilling)

Cp – toplotna kapaciteta

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. differential scanning calorimetry)

HCT – hidroklorotiazid

IR – infrardeča spektroskopija (angl. infrared spectroscopy)

NMR – jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)

HCT QC – hitra ohladitev taline (angl. quench cooling)

SD – sušenje z razprševanjem (angl. spray drying)

Tg – temperatura steklastega prehoda (angl. glass-transition temperature)

XRPD – rentgenska praškovna difrakcija (angl. X-ray powder diffraction)

## Ključne besede

Slovenske:

- hidroklorotiazid,
- amorfizacija,
- sušenje z razprševanjem,
- hitro ohlajanje taline,
- kriogeno mletje.

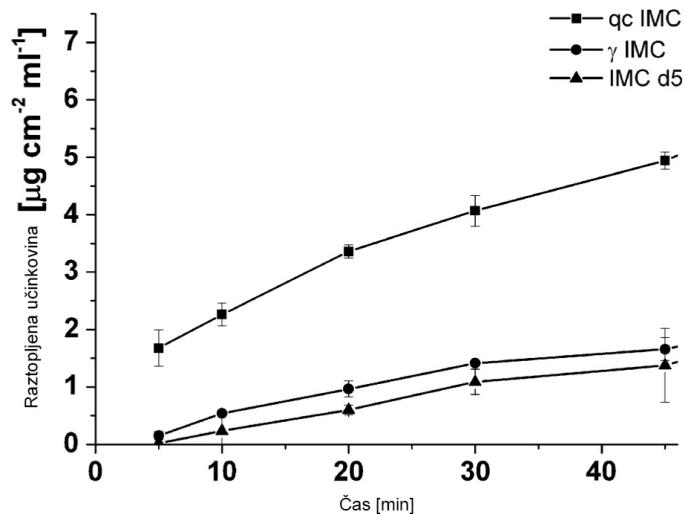
Angleške:

- hydrochlorothiazide,
- amorphisation,
- spray drying,
- quench cooling,
- cryomilling.

## 1. UVOD

### 1.1. Kristalna in amorfna oblika snovi

Oblika snovi v trdnem stanju vpliva na njene fizikalne, kemijske in mehanske lastnosti kot so topnost, temperatura tališča, stabilnost, stisljivost ter pretočne lastnosti (1). Zaradi ustrezone stabilnosti v farmacevtske oblike najpogosteje vgrajejo kristalno obliko zdravilne učinkovine (2). V zadnjem času je večina novo odkritih učinkovin slabo topnih. Slaba topnost učinkovine pomeni težavo v povezavi z zadostno biološko uporabnostjo, zato se pojavljajo novi pristopi za njeno izboljšanje (1,3). Eden izmed pristopov je priprava amorfne oblike snovi (1). Gre za obliko trdne snovi z najvišjo energijo. Ta je vzrok večje hitrosti raztopljanja in biološke uporabnosti učinkovine (4). Hancock in Parks sta za učinkovino indometacin ugotovila, da lahko s pripravo amorfne oblike povečamo topnost tudi do 4,5 krat glede na kristalno obliko, medtem ko lahko s spremembou polimorfne oblike povečamo topnost le za faktor 1,2 (5). Priemel in sodelavci so ugotovili povečanje topnosti in hitrosti raztopljanja amorfnega indometacina v primerjavi s kristalno obliko (Slika 1) (6).



Slika 1: Intrinzično raztopljanje sveže pripravljenega amorfnega indometacina z metodo hitre ohladitve taline (qc IMC), gama polimorfa indometacina ( $\gamma$  IMC) in amorfnega vzorca, shranjenega 5 dni pri 30°C in 23% relativne vlažnosti (IMC d5) (6).

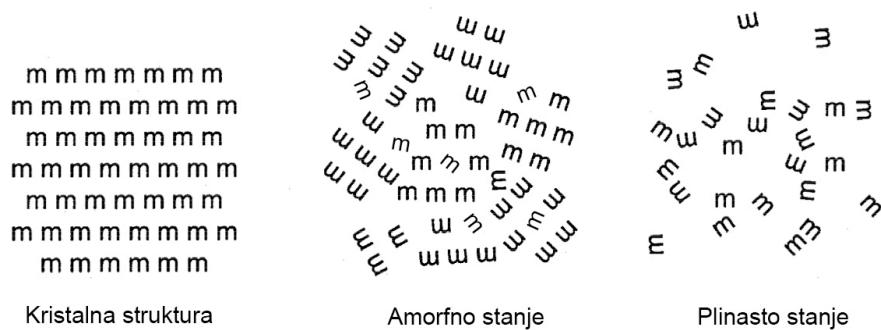
S farmacevtskega stališča se pri amorfnih oblikah soočimo s tehniološkim izzivom njihove uporabe pri proizvodnji zdravil. Na eni strani lahko povisana notranja energija in specifični

volumen povečata topnost, hitrost raztopljanja ter biološko uporabnost, po drugi strani pa lahko zaradi tega pričakujemo spontano rekristalizacijo tekom priprave zdravila ali kasneje med njegovim shranjevanjem (7).

Industrijsko zanimivost amorfnega stanja učinkovin dokazujejo podjetja, ki pri izdelavi zdravil uporabljajo amorfno obliko. Zdravila s takšno obliko učinkovine so:

- kalcijeva sol atorvastatina (Lipitor®) (8)
- kvinaprilijev klorid (Accupril®) (9)
- zafirlukast (Accolate®) (9)
- nelfinavirijev mezilat (Viracept®) (9)
- itrakonazol (Sporanox®) (9)

Amorfno obliko lahko opišemo kot ureditev molekul na kratkih razdaljah ter odsotnost ureditve na daljših, ki je značilnost kristalnih oblik. Kot je vidno na sliki 2 se razporeditev molekul (m) v amorfni obliki ne razlikuje veliko glede na kristalno (podobna gostota molekul s podobnimi razdaljami med njimi), a je pri amorfni obliki odsotna že omenjena ureditev molekul na daljših razdaljah (10).



*Slika 2: Shematski prikaz struktur amorfne in kristalne oblike snovi. Ureditev molekul v amorfni obliki ni popolnoma naključna, kot je to denimo v plinastem stanju. Opazimo ureditev, podobno kot v kristalni obliku, vendar le na krajših razdaljah (10).*

Zaradi opisane neurejenosti ima amorfna oblika višjo entalpijo, entropijo in Gibbsovo prosto energijo. Zaradi nižje termodinamske stabilnosti je zanjo značilna težnja po kristalizaciji, ki je v zdravilih nezaželena, zato je potrebna stabilizacija amorfne oblike (11). Pri amorfni obliki je zaradi večje specifične površine in s tem višje površinske energije, poleg kristalizacije, problem tudi higroskopnost, hitrejši oksidacijski razpad ter večja možnost pojava interakcij s pomožnimi snovmi v farmacevtski obliki (12,13).

## 1.2. Metode amorfizacije

Za pripravo amorfne oblike učinkovin lahko uporabimo različne pristope. Metode s pripadajočimi temperaturami tekom procesa ter možne težave so zbrane v Preglednici I.

Preglednica I: Metode priprave amorfne oblike učinkovine (14).

Metoda	Procesna temperatura	Možni problemi tekom priprave in procesne metode
<b>Industrijsko zanimivo</b>		
Liofilizacija (Freeze-drying)	< 0 °C	Poraba energije Počasna in posledično draga Omejena kapaciteta Zaostala topila
Sušenje z razprševanjem (Spray-drying)	>25 °C	Visoke temperature (do 160 °C) Mnogi procesni parametri Poraba energije Zaostala topila
Iztiskanje taline (Melt extrusion)	>25 °C	Visoke temperature Visoka vsebnost pomožnih snovi
<b>Ostale metode</b>		
Dodatek nečistot/izomerov	Cca 25 °C	Malo raziskana metoda
Hitra ohladitev taline (Quench cooling)	> 25 °C	Visoke temperature Potrebno hlajenje Možen kemijski razpad Poraba energije
Dodatek netopila	Cca 25 °C	Hiter dodatek topila Zaostanek topil Možne težave z netopnostjo, ob uporabi vode
Dehidracija hidratov kristalov	>25 °C	Obetaven postopek Ni primerno za vse kristale
Mehanska obremenitev (mletje)	<25 °C	Potreben čas za mletje Visoke temperature ob nehlajenju Odvisno od kristalne oblike Ostanki kristalov v formulaciji
Kompaktiranje z visokimi tlaki	Cca 25 °C	Tlaki od 0,1 do 5 GPa Poraba energije Uporabno le za majhne količine materialov
Električno polje	Cca 25 °C	Neuporabno za učinkovine Testirano le za polimere

Sprememba pH	Cca 25 °C	Zaostanek topil
Odparevanje	>25 °C	Nova metoda za učinkovine Pripravljeni materiali imajo odlične lastnosti (npr. fizikalna stabilnost) Možen kemijski razpad
Sistem z vakuumom	>25 °C	Zaostanek topil
Elektrostatsko sukanje	>25 °C	Nanovlakna kompleksov učinkovina-polimer
Ultrazvok	Cca 25 °C	Kavitacija Možen kemijski razpad Netestirano za učinkovine

Pri mletju snovi pride do pretvorbe v amorfno stanje preko mehanske aktivacije. Ta vodi do porušenja kristalne strukture, tako da se tvori amorfna oblika preko pretvorbe trdno-trdno. Pri taljenju pride do tvorbe amorfnegata stanja preko tekočega stanja, če je ohlajanje taline dovolj hitro, da molekule nimajo dovolj časa za ureditev v kristalno strukturo. Pri liofilizaciji in sušenju z razprševanjem se amorfno stanje tvori preko raztopine, kjer s hitrim odparevanjem topila prihaja do tvorbe amorfnih delcev. V primeru tvorbe amorfnegata stanja preko pretvorbe trdno-trdno obstaja večja verjetnost, da se bo ohranil določen "spomin" ureditve molekul na daljših razdaljah, ki je bila prisotna v osnovni kristalni strukturi (15). Nekatere metode amorfizacije bom nekoliko podrobnejše opisal še v nadaljevanju.

V literaturi se pojavljajo poročila, da uporaba različnih tehnik pri pripravi amorfnih vzorcev lahko vodi do razlik v amorfнем stanju (15–18). Karmwar in kolegi so ugotovili, da je vzorec indometacina, pripravljen s kriogenim mletjem, manj stabilen v primerjavi z amorfним vzorcema, pripravljenima z metodama sušenje z razprševanjem ter s hitrim ohlajanjem taline (19). Med amorfнимi vzorci lahko poleg razlik v stabilnosti opazimo tudi razlike na molekulske nivoju, ki jih zaznamo z uporabo teraherčne spektroskopije ali jedrske magnetne rezonance (NMR) v trdnem stanju (20,21).

Tako kot pri kristalnih oblikah polimorfizem, se pri amorfnih oblikah uporablja izraz poliamorfizem, ki pomeni prisotnost vsaj dveh različnih amorfnih oblik. V farmacevtskih krogih pravega poliamorfizma še niso uspeli dokazati, saj bi za pravo poliamorfnost snovi morali izmeriti prehod prvega reda med oblikama (22,23). Namesto poliamorfizma se zato uporablja poimenovanje psevdopoliamorfizem, ki ga uporabljajo za opis različnih amorfnih vzorcev iste učinkovine (10).

### 1.2.1. Sušenje z razprševanjem

Pri metodi sušenja z razprševanjem (angl. Spray drying - SD) raztopino, suspenzijo ali emulzijo pretvorimo v prahove (24). Tekočino najprej razpršimo skozi šobo v sušilno komoro, pri čemer nastanejo drobne kapljice. Te pridejo v stik z vročim suhim zrakom. Z razprševanjem ob visokem tlaku na šobi ustvarimo kapljice, ki imajo veliko specifično površino. Izparevanje topila se dogaja na površini kapljice, kjer nastaja trdna plasttopljenca, ki preprečuje nadaljnje izparevanje topila. Izparevanje je endotermen proces, zato se z upočasnjevanjem izparevanja, zaradi nastajanja trdne plasti, zvišuje temperatura kapljice, hkrati pa narašča tudi tlak v njeni notranjosti. Ko je ta tlak dovolj visok, predre nastalo steno; posledično se iztisne topilo, ki nato hitro odpari (24). Prahovi, pridobljeni s to metodo, so običajno okrogli, votli delci z ozko porazdelitvijo velikosti. Zaradi votlosti imajo nizko nasipno gostoto, zaradi okrogle oblike pa dobre pretočne lastnosti (25).

V literaturi zasledimo več primerov učinkovin, ki so jih pretvorili v amorfno obliko s SD: nesteroidne protivnetne zdravilne učinkovine (indometacin, ketoprofen, ibuprofen), tiazidni diuretiki (hidroflumetazid, klortiazid, hidroklorotiazid, ciklopentiazid, bendrofluazid), cefditoren pivoksil, tolbutamid, atorvastatin, celekoksib ter fenobarbital (17, 19, 26–33).

### 1.2.2. Hitra ohladitev taline

Metoda hitrega ohlajanja taline (angl. Quench cooling - QC) je običajno bolj primerna za anorganske spojine, manj pa za organske zdravilne učinkovine, saj pri večini le teh pride do razpada v temperaturnem območju blizu tališča (13).

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. Za zagotavljanje ustrezne hitrosti ohlajanja pogosto uporabimo tekoči dušik. Z ohlajanjem se mobilnost molekul taline zmanjšuje – talina najprej postane »sirupasta«, nato viskoelastična, pod temperaturo steklastega prehoda ( $T_g$ ) pa nastane trdna krhka steklasta struktura, ki v smislu urejenosti molekul ohrani lastnosti tekočine.

V literaturi lahko zasledimo več primerov učinkovin, ki so jih avtorji pretvorili v amorfno obliko s to metodo. Nekateri primeri so: indometacin, simvastatin, karvedilol, irbesartan, ketoprofen, dipiridamol, karbamezepin, glibenklamid ter felodipin (18, 34–42).

### 1.2.3. Mletje

Mletje običajno uporabljamo kot metodo zmanjševanja delcev pri izdelavi in pripravi učinkovin, pomožnih snovi ter farmacevtskih oblik (43, 44). Pogosto se uporablja tudi za povečanje specifične površine delcev slabo vodotopnih učinkovin z namenom povečanja hitrosti raztplavljanja in biološke uporabnosti (45). Poleg zmanjševanja delcev se pri mletju pogosto pojavljajo tudi drugi nenamerni efekti kot so sprememba morfologije, kristalnosti (46), polimorfne oblike (47), pojav amorfne stanja (48), kemijske nestabilnosti (49) in sprememb obnašanja pri taljenju (50). Učinkovitost mletja je odvisna od lastnosti spojine (51,52), temperature mletja (53), morfologije vstopnih delcev, časa mletja ter vložene energije (54).

V literaturi lahko zasledimo več primerov učinkovin, ki so jih avtorji pretvorili v amorfno obliko z mletjem na različne načine. Vsi so za mletje uporabljali kroglični mlin, večina jih je mlela pri znižani temperaturi, v nekateri člankih pa so amorfne vzorce pridobili z mletjem pri sobni temperaturi. Nekateri izmed primerov so: ranitidinijev klorid, simvastatin, indometacin, piroksikam, ciklosporin, sukcinska kislina, dipiridamol, karbamezepin ter glibenklamid (15,18,36,37,39,54–57).

Na uspešnost pretvorbe učinkovine v amorfno obliko z mletjem ima velik vpliv čas mletja. Običajno je za pretvorbo kristalne v amorfno obliko potrebnih več ur (58,59). Potreben čas mletja za pretvorbo kristalne v amorfno obliko se razlikuje med posameznimi snovmi, kar je prikazano v preglednici II. Čas do nastanka amorfne oblike se razlikuje tudi glede na uporabljeni metodo karakterizacije amorfne strukture (21,36,60).

*Preglednica II: Vpliv časa mletja na amorfizacijo različnih učinkovin ter uporabe različnih metod karakterizacije.*

	Indometacin	Laktoza	Trehaloza
DSC (diferenčna dinamična kalorimetrija)	120 min	50 h	10 h
XRPD (rentgenska praškovna difrakcija)	30 min	1 h	ni podatka
NMR (jedrska magnetna resonanca)	195 min	30 h	20 h

### 1.3. Določanje lastnosti amorfnih snovi

Z različnimi analiznimi metodami lahko pridobimo različne informacije o amorfni oblikih, predvsem o njeni strukturni urejenosti, termodinamskih lastnostih in kinetiki

rekristalizacije. Spremljamo lahko tudi vplive različnih pomožnih snovi na temperaturo steklastega prehoda in stabilnost amorfne oblike zdravilne učinkovine (61).

Iz pregleda nekaterih raziskovalnih člankov, ki so bili objavljeni s področja proučevanja amorfnegra stanja, lahko naredimo prikaz, kjer je iz števila referenc razvidno, katere metode se največkrat uporabljajo pri proučevanju amorfnih oblik:

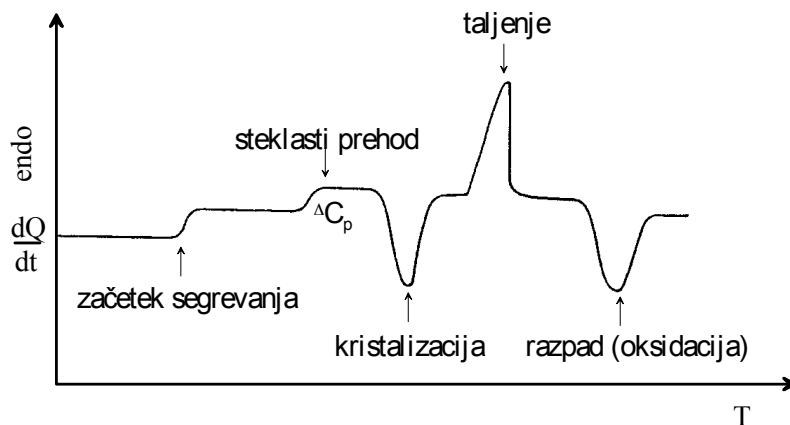
- Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD) (7,34,37–39,47,51,53,56–58,60–64,67, 74–76,79,81–96)
- Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) (7,37,38,40,53,55–58,60,62,63,67,74, 75,83,85,87,88,90,91,93,95–100)
- Infrardeča spektroskopija (IR) (6,54,57,59–62,74–6,84,86, 89,94)
- Jedrska magnetna resonanca (NMR) (14,21,33,42,60)
- Ramanska spektroskopija (14,28,37,39,40,42,65,66,73)
- Bližnja infrardeča spektroskopija (28,37,66,74,80)
- DSC z modulacijo temperature (39,76)
- Sorpcija in desorpcija vlage (17,76)
- Inverzna plinska kromatografija (17,71)
- Opazovanje difuzijskega vedenja (7)
- Merjenje gostote (64)

Glede na pregledane članke se največ uporabljava metodi XRPD in DSC, ki se običajno uporablja skupaj. Skupaj ju avtorji uporabljajo zaradi pomanjkljivosti posamezne metode. Samo z XRPD še ne moremo dokazati amorfne oblike. Pri mletju se namreč kristalna snov lahko pretvori v mikrokristalno, ki daje uklonsko sliko karakteristično za amorfno obliko. Tako je Johari s kolegi uporabil DSC za ločevanje med amornim in mikrokristalnim vzorcem na podlagi prisotnosti steklastega prehoda, ki je karakterističen za amorfno obliko snovi (81).

### 1.3.1. Diferenčna dinamična kalorimetrija

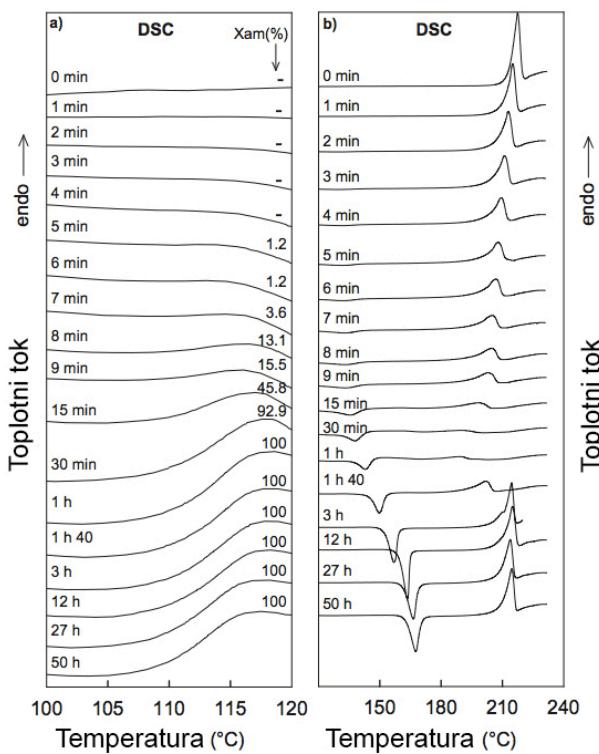
Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je metoda, ki je splošno uporabljena za proučevanje faznih sprememb (fazni prehodi, taljenje, steklast prehod) in kemičnih reakcij (razpad, redukcija, oksidacija) trdnih vzorcev, kar vključuje tudi kvantifikacijo amorfnosti v vzorcih (82). Metoda omogoča merjenje razlik v topotnem toku med preiskovanim vzorcem in referenco (npr. prazen lonček) v odvisnosti od temperature vzorca. Vzorec lahko energijo absorbira (endotermna sprememba) ali jo sprošča (eksotermna sprememba).

Rezultat meritve je DSC krivulja odvisnosti toplotnega toka ( $dH/dt$ ) od temperature (T), shematsko prikazana na sliki 3 (83).



Slika 3: Shematski prikaz možnih sprememb, ki jih opazimo na DSC krivulji (od leve proti desni). Sprememba toplotne kapacitete na začetku je posledica začetka segrevanja. Endotermno spremembo toplotne kapacitete ( $\Delta C_p$ ) pripisujemo steklastemu prehodu amorfne oblike. Sledi eksotermska sprememba, ki označuje kristalizacijo amorfne oblike, ki se kasneje stali, kar nakazuje endotermni vrh na krivulji. Na koncu je vidna eksotermska sprememba, ki jo pripisujemo termičnemu razpadu (83).

Caron in kolegi so DSC uporabili za določanje deleža amorfnosti v vzorcih laktoze, ki so jih mleli različno dolgo časa. Na sliki 4 sta predstavljena dva izseka DSC analiz. Na a) je prikazan odsek, kjer se pojavi steklast prehod. Iz  $\Delta C_p$  so izračunali delež amorfnosti v vzorcu, označenem z  $X_{am}(\%)$ . Na delu b) je prikazano območje, kjer od  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$  naprej prihaja do rekristalizacije amofnega vzorca in nato pri  $210\text{ }^{\circ}\text{C}$  tudi do taljenja kristalne oblike. Iz rezultatov je vidno, da se s podaljševanjem časa mletja povečuje amorfnost vzorca (60).



Slika 4: DSC termogrami a) v območju steklastega prehoda [100-120 °C]. Delež amorfnega dela v vzorcu ( $X_{am}$ ) izračunan iz spremembe  $C_p$  je označen na desnem delu grafa. b) v območju kristalizacije in taljenja [120-240 °C]. Pri 150 °C prihaja do rekristalizacije amorfnega vzorca, pri 210 °C pa do taljenja kristalne oblike Področje a) je 50x povečano glede na področje b), da je steklast prehod bolje viden (60).

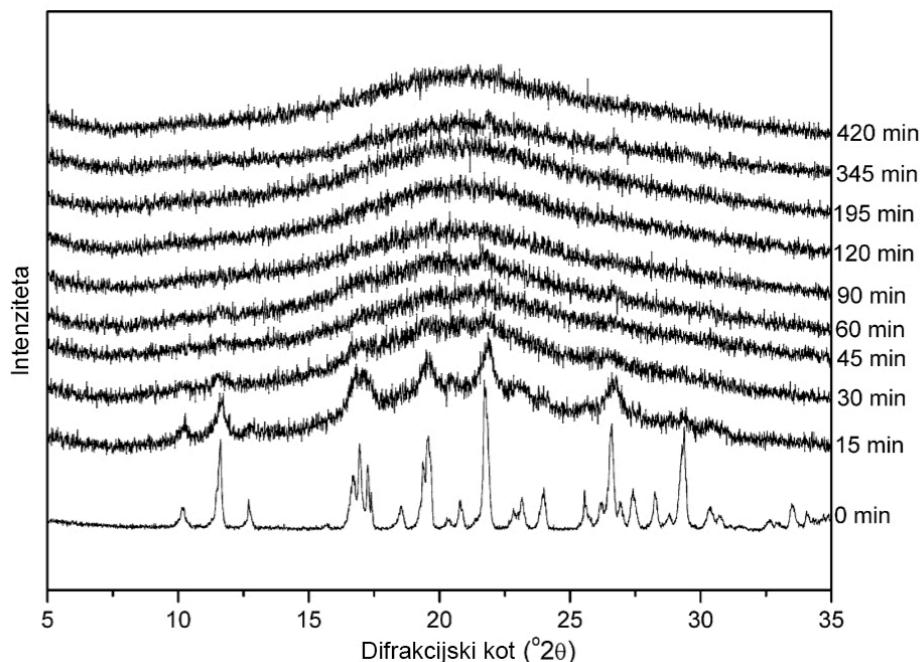
### 1.3.2. Rentgenska praškovna difrakcija

Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD) je ena izmed najbolj pogosto uporabljenih metod za kvantitativno in kvalitativno analizo kristalnih snovi. S to tehniko pridobimo informacije kot so tip kristalne oblike, strukturne ureditve v kristalni fazi, stopnja kristalnosti, vsebnost amorfnega vzorca, velikost in orientacija kristalov.

XRPD se pri analizi amorfnih vzorcev običajno uporablja za določitev prisotnosti oziroma odsotnosti kristalnih delcev, kar lahko določimo z odsotnostjo uklonskih vrhov na uklonski sliki, ki jih sicer vidimo pri kristalnih oblikah snovi (10).

XRPD metodo so uporabili pri proučevanju pretvorbe indometacina v amorfno obliko z mletjem. Na sliki 5 so prikazane uklonske slike mletih vzorcev indometacina, kjer je vidno izginjanje karakterističnih vrhov kristalne oblike s podaljševanjem časa mletja. Avtorji navajajo, da uklonski vrhovi kristalne oblike popolnoma izginejo že pri 30 minut mletju vzorcu, jaz pa bi iz slike sklepal na popolno amorfizacijo šele po 45 minutah, saj so pri 30 minut mletju vzorcu nekateri vrhovi še opazni. Uklonske slike vzorcev mletih 45 minut

ali več so enake, brez karakterističnih vrhov kristalne oblike, kar pomeni, da samo na podlagi XRPD meritev ne moremo ločiti med temi vzorci, sklepamo pa lahko, da je vzorec popolnoma amorfen po 45 minutah mletja. Vzorce so testirali tudi z DSC, kjer so navajali razlike v termogramih vzorcev mletih do 120 minut, pri vzorcih mletih dalj časa, pa razlik niso več opazili (36).



*Slika 5: XRPD uklonske slike kriogeno mletega  $\gamma$ -indometacina ter mletega različno dolgo časa (čas ob spektri podaja čas mletja vzorca) (36).*

### 1.3.3. Infrardeča spektroskopija

Pri absorpcijskih spektroskopskih analiznih metodah gre za vzbujanje molekul s svetlobnim sevanjem določene valovne dolžine oziroma energije. Infrardeče valovanje je področje med vidno svetlobo in mikro valovi v elektromagnetskem spektru in ima valovno dolžino med 0,7 in 500  $\mu\text{m}$ . Bolj kot valovna dolžina se pri IR spektroskopiji uporablja valovno število (v enotah  $\text{cm}^{-1}$ ), ki pomeni število valov na cm.

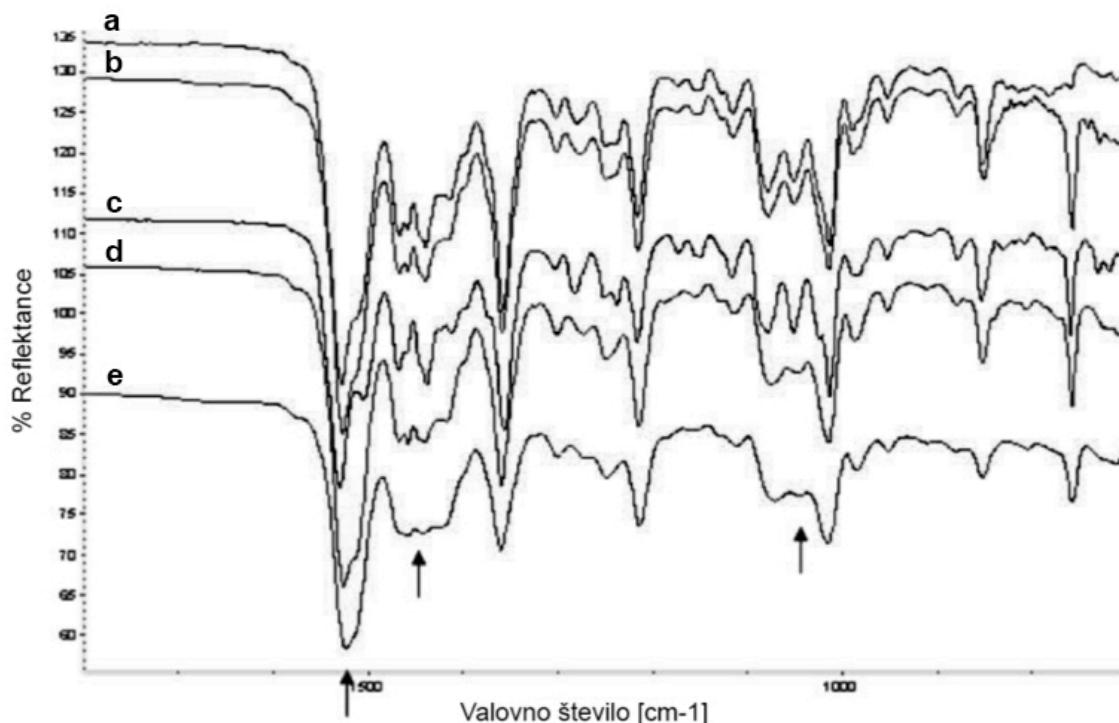
IR področje ( $14.000 - 20 \text{ cm}^{-1}$ ) je razdeljeno na tri območja:

- Bližnja IR:  $14.000 - 4.000 \text{ cm}^{-1}$
- Srednja IR:  $4.000 - 400 \text{ cm}^{-1}$
- Daljna IR:  $400 - 20 \text{ cm}^{-1}$

Uporaba Furierjeve transformacije (FT) z IR spektrofotometrom je prinesla napredek celotnega področja IR spektroskopije. Nekatere prednosti FT-IR pred običajno metodo so visoka ločljivost, visoka selektivnost ter hitro snemanje spektra. Metoda je uporabna za

proučevanje snovi v farmaciji, še posebno uporabna pa je za identifikacijo različnih polimorfov in psevdopolimorfov, kjer analiziramo vzorce v trdnem stanju (komprimati s KBr ali NaCl, ki ne absorbirata IR sevanja). Vsaka snov ima svoj specifičen spekter absorbiranih frekvenc, kar omogoča identifikacijo in kvantifikacijo nepoznanega vzorca snovi (84).

IR tehnike uporabljam tudi pri proučevanju amorfnih snovi. Patterson in kolegi so uporabili FT-IR tehniko pri proučevanju amorfnih oblik indometacina, katerih IR spektri so prikazani na sliki 6. S puščicami so označena področja, v katerih je prišlo do sprememb v spektrih zaradi amorfizacije vzorca (18).



Slika 6: FT-IR spektri indometacina; a) mlet in shranjen 8 tednov pri  $40^{\circ}\text{C}$  in < 10 % relativni vlažnosti, b) hitro ohlajena talina in shranjena 8 tednov pri  $40^{\circ}\text{C}$  in < 10 % relativni vlažnosti, c) kristalni indometacin d) takoj po krogličnem mletju, e) takoj po hitri ohladitvi taline. Puščice nakazujejo področja spekrov, ki so se spremenila med amorfizacijo (18).

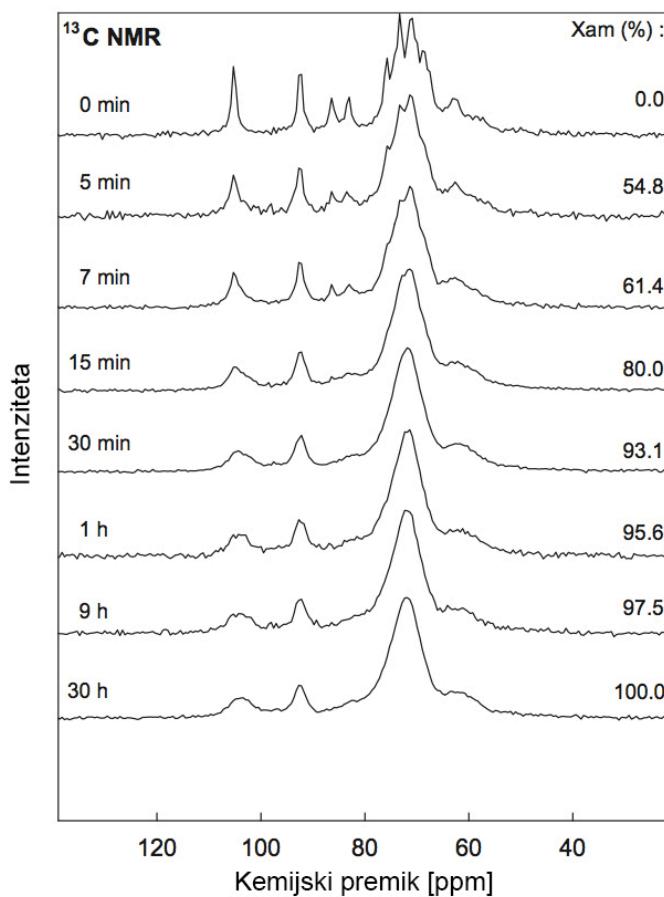
#### 1.3.4. Jedrska magnetna resonanca

Jedrska magnetna resonanca (NMR) je v farmaciji zelo pogosto uporabljana analitska spektroskopska tehnika pri določanju struktur molekul na področju sintezne kemije, kot tudi določanju struktur nečistot, ki so posledica sinteznih reakcij, razpadnih produktov in metabolitov. Uporaba jedrske magnetne resonance je še precej širša in vključuje določanje

tridimenzionalne strukture proteinov, proučevanje dinamike molekul in proučevanja trdnih snovi (85).

Za proučevanje amorfnih oblik je najbolj primeren NMR v trdnem stanju (angl. Solid-state NMR; ss-NMR). S ss-NMR lahko proučujemo različne polimorfne oblike, določujemo število različnih polimorfov v vzorcu in določamo vsebnost amorfne oblike v snovi (85).

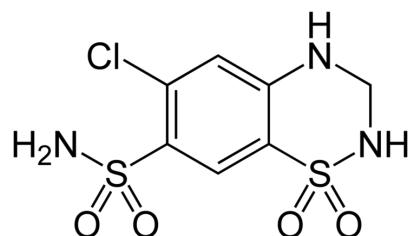
Caron in kolegi so uporabili  $^{13}\text{C}$  NMR pri proučevanju različno dolgo mletih vzorcev laktoze (60). Na sliki 7 so zbrani NMR spektri vzorcev, kjer so opazne spremembe s podaljševanjem časa mletja laktoze. S podaljševanjem časa mletja so vrhovi vse bolj zglajeni, kar je posledica amorfizacije.



Slika 7:  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR spektri vzorcev laktoze posneti pri sobni temperaturi. Vzorci od zgoraj navzdol: kristalna oblika, mleti vzorci: 5 min, 7 min, 15 min, 30 min, 1 h, 9 h ter 30 h. Vsebnost amorfne dela vzorca ( $X_{\text{am}}$ ) ocenjen iz NMR spektra je naveden na desni strani slike (60).

#### 1.4. *Hidroklorotiazid*

Hidroklorotiazid (HCT) je tiazidni diuretik prvega izbora. Deluje preko zaviranja reabsorpcije  $\text{Na}^+$  v ledvicah v distalnem tubulu, s čimer povečuje odvajanje vode iz telesa. Uvrščamo ga v skupino s kalcijem varčnih diuretikov, kar pomeni, da v telesu kljub povečanemu odvajanju vode ostane dovolj kalcija (86). Uporabljamo ga za zdravljenje hipertenzije, kongestivnega srčnega popuščanja, edema, diabetes insipidusa, renalne tubularne acidoze in pri preventivi ledvičnih kamnov. Uporablja se tudi pri osteoporozni, saj z zmanjševanjem izgub kalcija preko ledvic skrbi za manjšo izgubo kostne gostote, hkrati pa tudi spodbuja diferenciacijo osteoblastov in izgradnjo kostne mase (87). Hidroklorotiazid se pojavlja v dveh polimorfnih oblikah; komercialno dostopni sta obliki I in II (88). Na sliki 8 je prikazana strukturna formula hidroklorotiazida.



Slika 8: Strukturna formula hidroklorotiazida

## 2. NAMEN DELA

V zadnjem času je vse več novo odkritih učinkovin slabo topnih, zaradi česar razvijamo pristope za izboljševanje te lastnosti. Eden izmed njih je izdelava amorfne oblike učinkovine. Obstaja več metod priprave amorfne učinkovine, ki potencialno vodijo do spremembe njenih lastnosti.

Namen diplomske naloge je proučiti različne metode priprave amorfne oblike hidroklorotiazida. Različno pripravljene vzorce bomo ovrednotili s pomočjo različnih analiznih metod, da bomo raziskali morebitne razlike med različno pripravljenimi amorfnimi vzorci hidroklorotiazida. Poleg tega želimo spremljati tudi proces pretvorbe kristalne oblike v amorfno s podajljevanjem časa mletja, kar je uporabno pri morebitnih nadaljnjih industrijskih aplikacijah priprave amorfnegra vzroca. Ovrednotiti želimo tudi rezultate različnih analiznih metod, dobljenih pri karakterizaciji amorfnih oblik ter ovrednotiti morebitne razlike med njimi, kar bo služilo pri opredelitev ustreznosti izbranih analiznih metod pri vrednotenju amorfnih vzorcev.

### 3. EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1. *Materiali in naprave*

##### 3.1.1. Naprave

- DSC 1 Mettler-Toledo (Mettler Toledo, Švica)
- X'Pert PRO MPD diffraktometer (PANalytical, Nizozemska)
- FTIR Spectrometer, Nicolet Nexus 1000 (Nicolet Instrument Co., ZDA) opremljen z DTGS (Deuterian Triglicine Sulfate) detektorjem
- NMR Varian 600 MHz (Agilent Technologies, ZDA)
- Termogravimeter: TGA/DSC 1 Mettler-Toledo (Mettler Toledo, Švica)
- Tehnica: Mettler Toledo PG6002-S (Delta Range, Švica)
- Mini Spray Dryer-290 (Büchi, Švica).
- Oscilatorni kroglični mlin Pulverisette 0 (Fritsch, Nemčija)

##### 3.1.2. Materiali

- Hidroklorotiazid oblika I, čistost  $\geq 99,7\%$  (Sigma Aldrich, Nemčija)
- Metanol (MeOH), analitska čistost (Sigma Aldrich, Nemčija)
- Tekoči dušik (Messer, Slovenija)

#### 3.2. *Metode*

##### 3.2.1. Priprava vzorcev

###### Priprava amorfnega hidroklorotiazida s hitro ohladitvijo taline (HCT QC)

HCT (30 mg) smo stalili pri  $280^{\circ}\text{C}$  v aluminijastih posodicah (volumen  $150 \mu\text{l}$ ) z uporabo termogravimetra ter nato hitro ohladili s postavitvijo posodic v tekoči dušik. Taljenje smo spremljali s pomočjo DSC analize, z namenom preprečitve termičnega razpada vzorca. Proces smo ponavljali toliko časa, da smo dobili dovolj veliko količino vzorca (cca. 5 g vzorca). Pripravljeni vzorce smo shranjevali pri  $6^{\circ}\text{C}$  v zaprtih vialah.

### Priprava amorfnega hidroklorotiazida s sušenjem z razprševanjem (HCT SD)

HCT (1g) smo raztopili v 100 ml metanola. Tako pripravljeno 1% raztopino smo razprševali v dušikovi atmosferi (tlak na šobi 600 kPa) z Büchi Mini Spray Dryer-290. Za razprševanje raztopine v hladilno komoro smo uporabljali šobo z dvojnim razprševanjem z 0,7 mm premera notranje šobe ter 1,5 mm premera zunanje šobe. Uporabljali smo originalno steklovino procesne komore (premer 15 cm in dolžina 60 cm), visoko zmogljiv ciklon, aspirator in zunaji filter. Temperatura vhodnega zraka je bila 160 °C, aspirator smo nastavili na 100%, črpalko pa na 10% maksimalne hitrosti. Proces smo ponavljali toliko časa, da smo dobili dovolj veliko količino vzorca (cca. 5g vzorca). Pripravljene vzorce smo shranjevali pri 6 °C v zaprtih vialah.

### Priprava amorfnega hidroklorotiazida s kriogenim mletjem (HCT QM)

Približno 1g HCT smo dali v oscilirajoči mlin iz nerjavečega jekla, v katerega smo dali tudi kroglo iz nerjavečega jekla s premerom 25 mm. Kristalno obliko smo mleli pri 6 °C z 2/3 maksimalne frekvence različne časovne intervale. Intervalli mletja so bili: 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h ter 72 h. Proces smo ponavljali toliko časa, da smo dobili dovolj veliko količino vzorca (cca. 5g vzorca). Pripravljene vzorce smo shranjevali pri 6 °C v zaprtih vialah.

### **3.2.2. Analitske metode**

#### Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Analize smo opravili na Mettler-Toledo DSC 1. Aparat smo kalibrirali za temperaturo in entalpijo z indijem. Vzorce (2 – 7 mg) smo natehtali v aluminijaste lončke s pokrovčkom, ki smo ga preluknjali. Lončke smo nato segrevali s konstantno hitrostjo 10 K/min v temperturnem območju 0 – 240 °C, pri čemer smo za referenco uporabili prazen aluminijast lonček. Meritve smo izvajali v inertni dušikovi atmosferi, ki smo jo vzdrževali s pretokom 50 ml/min.

#### Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)

Rentgensko praškovno analizo smo pri vseh vzorcih izvedli s Siemens D-5000 difraktometrom, ki uporablja sevanje CuK<sub>α</sub>. Uklonske slike (difraktograme) smo

posneli v območju  $2\text{-}40^\circ$   $2\theta$  pri korakih  $0,04^\circ$   $2\theta$  z integracijskim časom 1 s. Pridobljene rezultate smo obdelali s pomočjo programske opreme Microsoft Excel.

#### Jedrska magnetna resonanca (ss-NMR)

$^1\text{H}$  MAS (Magic-Angle Spinning) in  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  CPMAS (Cross-Polarization Magic-Angle Spinning) NMR spektre smo posneli na 600 MHz Varian NMR sistemu. Larmorjeve frekvence za  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  so bile 599,72 MHz oziroma 150,82 MHz, frekvence vrtenja vzorcev 20 kHz oziroma 16 kHz ter število posnetkov 64 oziroma 600. Pri vseh snemanjih je bil premor med posameznimi posnetki 5 s. Kemijski premiki pri  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  signalih so preračunani glede na referenčni signal tetrametilsilana (TMS).

#### Infrardeča spektroskopija (IR)

Za analizo vseh vzorcev smo uporabili FTIR Spectrometer, Nicolet Nexus 1000 opremljen z DTGS detektorjem. Pri vseh analizah smo uporabili tudi diamantni ATR (angl. Attenuated total reflectance) pripomoček. Vsak vzorec smo posneli pri enakem pritisku nad vzorcem. Vsak spekter je povprečje 1000 posnetih spektrov naenkrat, posnetih pri ločljivosti  $4 \text{ cm}^{-1}$  v območju  $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$  in odprtini 36. Spektre smo pridobili s pomočjo programske opreme Omnic E.S.P. software verzija 5.2.

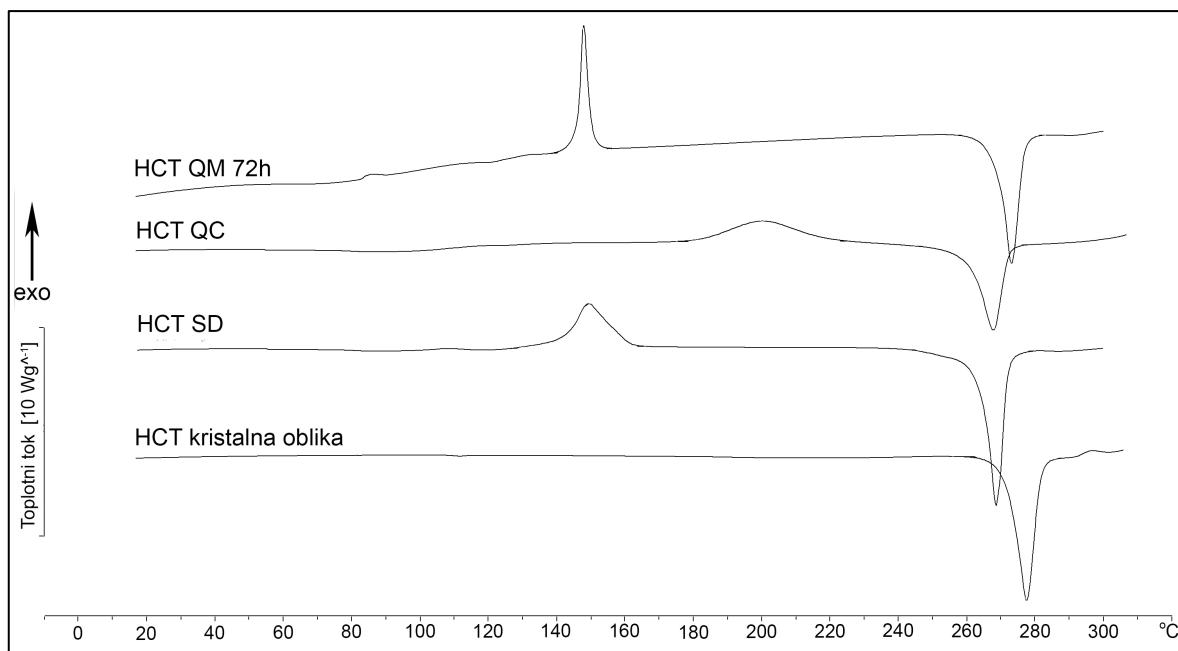
## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1. Vizualna karakterizacija

Pripravljene amorfne vzorce smo takoj po pripravi vizualno okarakterizirali. Vzorec pridobljen s hitrim ohlajanjem taline je bil bel prah, brez znakov termičnega razpada hidroklorotiazida. Vzorec pridobljen s sušenjem z razprševanjem je bil bel prah z zelo rahlo strukturo, ki je imel veliko statične energije, kar se je kazalo kot »lepljenje« vzorca na steno posode. Mleti vzorci so bili beli prahovi; med različno dolgo mletimi vzorci vizualno ni bilo opaznih razlik.

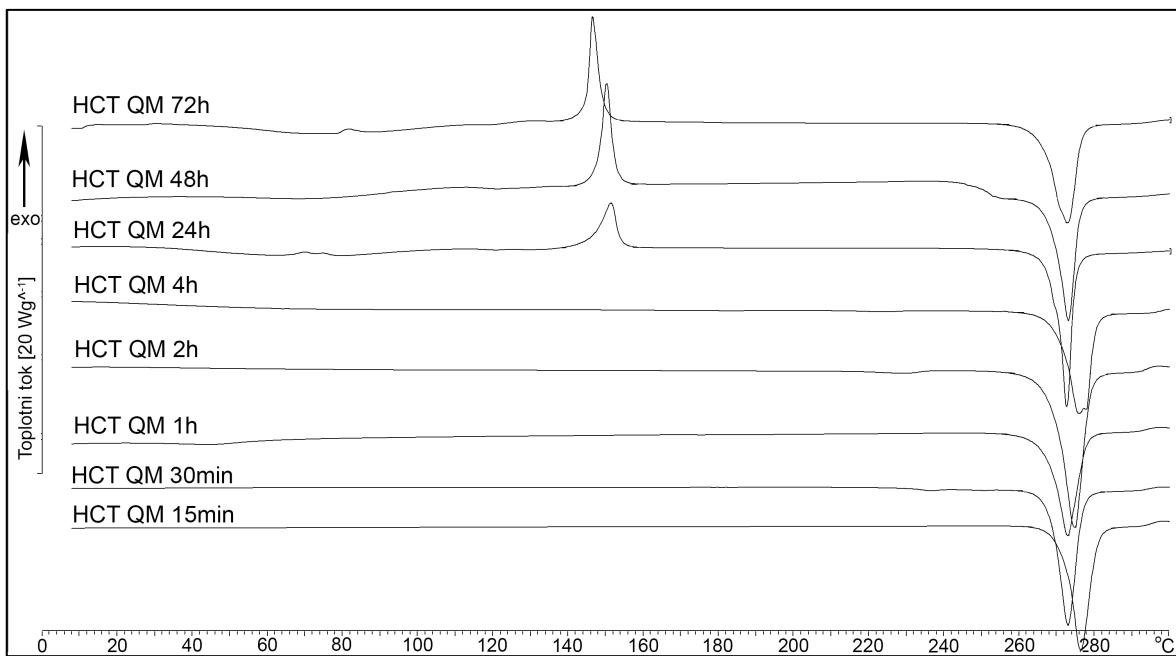
### 4.2. Termična analiza

Na sliki 9 so prikazani rezultati termične analize treh različnih amorfnih vzorcev (HCT SD, HCT QC in HCT QM) ter osnovne kristalne oblike. Na vseh krivuljah DSC meritev smo opazili endotermen vrh pri okoli 270 °C, kar smo pripisali taljenju vzorca. Manjše razlike v temperaturi tališča lahko povežemo z različno velikostjo delcev v vzorcih. Pri HCT QC vzorcu lahko sklepamo na spremembo topotne kapacitete ( $\Delta C_p$ ) v območju 100 - 120 °C, kar je moč pripisati steklastemu prehodu (Tg). Prisotnost amorfnegra stanja v vzorcu potrjuje tudi eksotermni vrh pri 200 °C, kar smo pripisali kristalizaciji amorfnegra stanja. Steklastega prehoda ni opaziti pri vzorcih HCT QM in HCT SD, eksotermna vrhova vzorcev pri 150 °C pa smo pripisali prekristalizaciji manj stabilnega polimorfa v bolj stabilno obliko HCT. Da tekom priprave vzorcev z mletjem in sušenjem z razprševanjem pride do spremembe kristalne oblike smo opazili tudi pri NMR meritvah, kar bomo opisali kasneje.



Slika 9: DSC diagrami vzorcev (od spodaj navzgor) kristalne oblike HCT ter amorfnih vzorcev, pridobljenih s sušenjem z razprševanjem (HCT SD), ohlajanjem taline (HCT QC) in 72 h mletim vzorcem (HCT QM 72h).

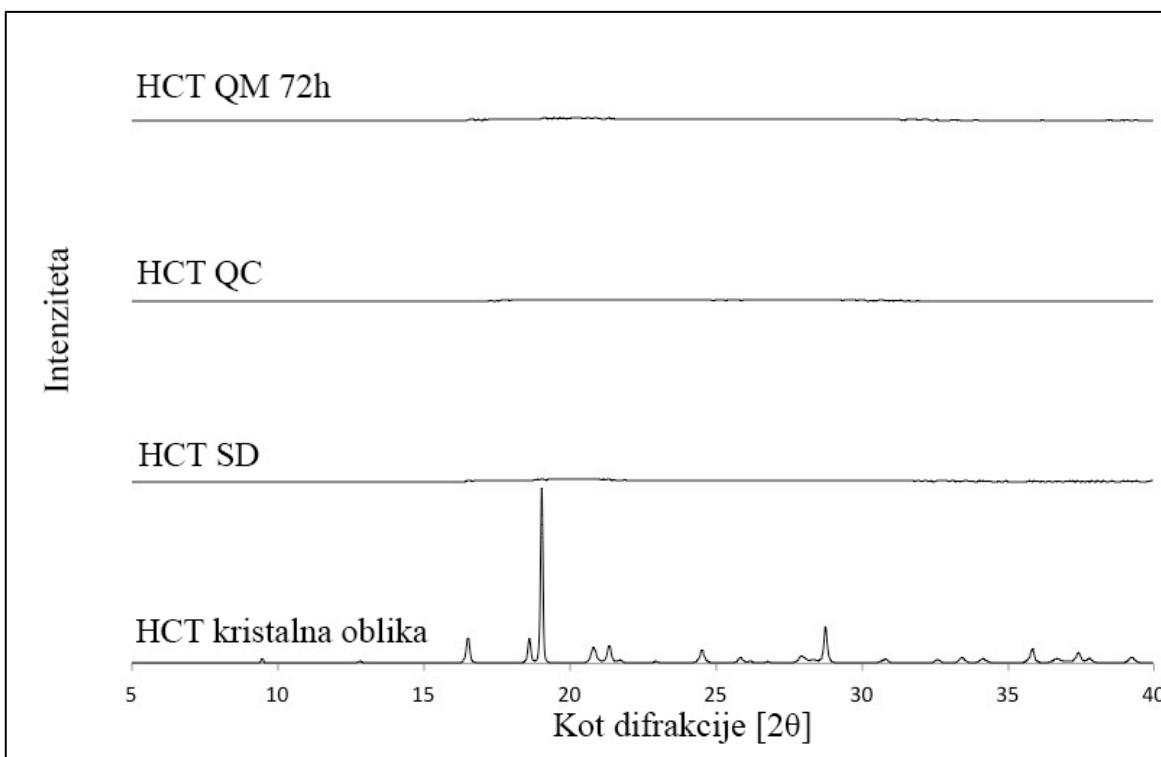
Na sliki 10 so prikazane DSC krivulje mletih vzorcev HCT v različnih časovnih intervalih. Pri vzorcih, mletih 24, 48 ter 72 h vidimo eksotermne vrhove v območju 147 – 151 °C, ki jih pripisujemo prekristalizaciji manj stabilnega polimorfa v bolj stabilno obliko HCT. S podaljševanjem časa mletja opazimo tudi povečevanje površine vrha v območju 147 – 151 °C, kar nakazuje na povečevanje deleža manj stabilne polimorfne oblike v vzorcu.



Slika 10: DSC diagrami različno dolgo mletih vzorcev HCT (od spodaj navzgor): 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h ter 72 h.

#### 4.3. Rentgenska praškovna difrakcija

Na sliki 11 so prikazane uklonske slike (difraktogrami) kristalne oblike in treh amorfnih vzorcev hidroklorotiazida. Kristalna oblika HCT izkazuje tipično XRPD uklonsko sliko za kristalno obliko I. Vzorci HCT QC, HCT SD in HCT QM 72 h izkazujejo XRPD uklonske slike značilne za popolnoma amorfno snov, saj pri vseh treh vzorcih vidimo odsotnost vrhov, značilnih za kristalno obliko.

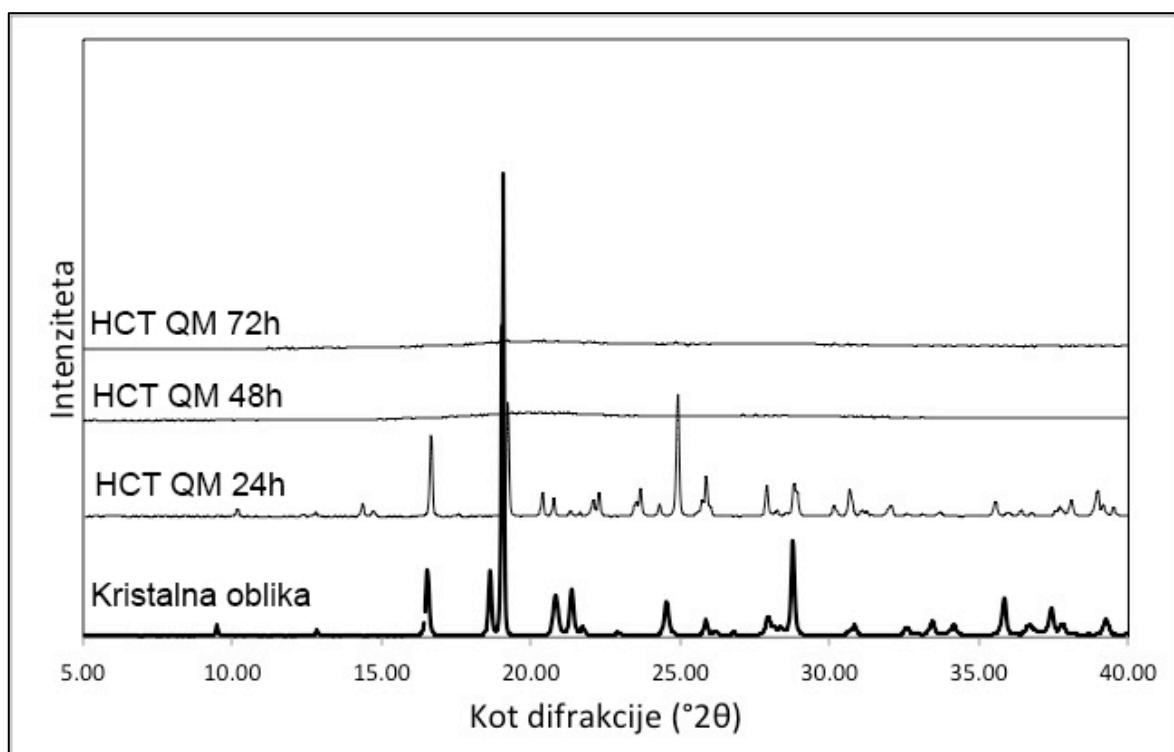


Slika 11: XRPD spektri vzorcev kristalne oblike HCT ter amorfnih vzorcev, pridobljenih s sušenjem z razprševanjem (HCT SD), ohlajanjem taline (HCT QC) in vzorcem, mletim 72 h (HCT QM 72 h).

V literaturi smo našli podobno raziskavo, kjer so proučevali dve polimorfni oblik ter štiri amorfne vzorce indometacina, pripravljene z različnimi metodami. Pri rezultatih XRPD študije je razvidna razlika med obema polimorfnima oblikama, medtem ko razlik v uklonskih slikah različno pripravljenih amorfnih oblik ni, kar se sklada z rezultati, dobljenimi tekom naše raziskave (20).

Na DSC diagramih (slika 10) smo opazili, da pri HCT vzorcih, mletih manj kot 24 h, ni prišlo do sprememb v vzorcih, opaznih z DSC, zato smo z XRPD opravili meritve zgolj na vzorcih, ki so bili mleti 24 h ali več. Na sliki 12 so prikazane uklonske slike treh različno dolgo mletih vzorcev, primerjanih z uklonsko sliko kristalne oblike. Pri 24 h mletem vzorcu vidimo veliko ozkih vrhov, ki so značilni za kristalno obliko, kar nakazuje na prisotnost kristalne strukture v vzorcu. Podrobna primerjava uklonskih slik kristalne oblike in 24 h mletega vzorca nakazuje na različni polimorfni oblik. To potrjuje spremembo kristalne oblike tekom mletja, na kar smo sklepali tudi iz DSC diagrama 72 h mletega vzorca. Kljub prisotnosti vrhov, značilnih za kristalne strukture, opazimo zniževanje vrhov pri 24 h mletem vzorcu glede na kristalno strukturo, kar nakazuje na zmanjševanje

kristalnosti vzorca. Pri vzorcih, mletih 48 in 72 h ni opaziti vrhov, značilnih za kristalno obliko, kar nakazuje na popolnoma amorfno strukturo vzorca. Zaradi pomanjkljivosti XRPD metode, ki smo jo opisali v uvodu, pa so morda tekom mletja nastali tako majhni kristali, da jih s to metodo ne zaznamo, zaradi česar ne vidimo vrhov, značilnih za kristalno strukturo.



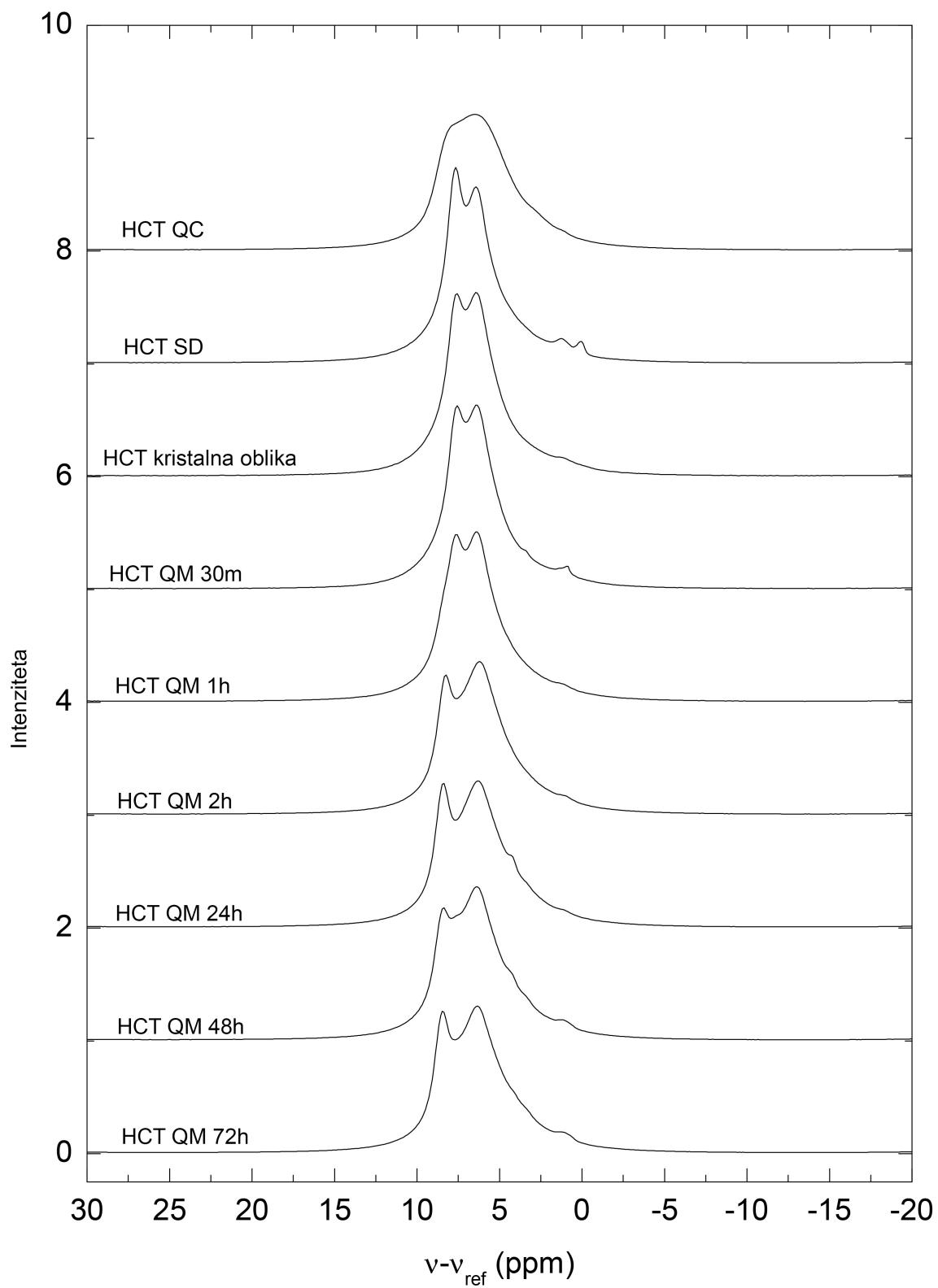
Slika 12: XRPD spektri (od spodaj navzgor) kristalne oblike ter vzorcev mletih 24 h, 48 h ter 72 h.

V literaturi smo zasledili študijo, kjer so proučevali amorfizacijo lakoze s podaljševanjem časa mletja. Na XRPD uklonskih slikah je opazno izginjanje karakterističnih vrhov kristalne oblike s podaljševanjem časa mletja. V študiji so iz površin vrhov izračunali tudi delež amorfne oblike. Rezultati potrjujejo naše ugotovitve, da se s podaljševanjem časa mletja povečuje amornost vzorca (60).

#### **4.4. Jedrska magnetna resonanca v trdnem stanju**

ss-NMR metodo smo v naši raziskavi uporabili za proučevanje možnih razlik med amornimi vzorci. Na sliki 13 so podani  $^1\text{H}$  MAS NMR spektri vzorcev HCT SD, HCT QC ter različno dolgo mletih vzorcev ter kristalne oblike. Za vzorec HTC QC vidimo precej

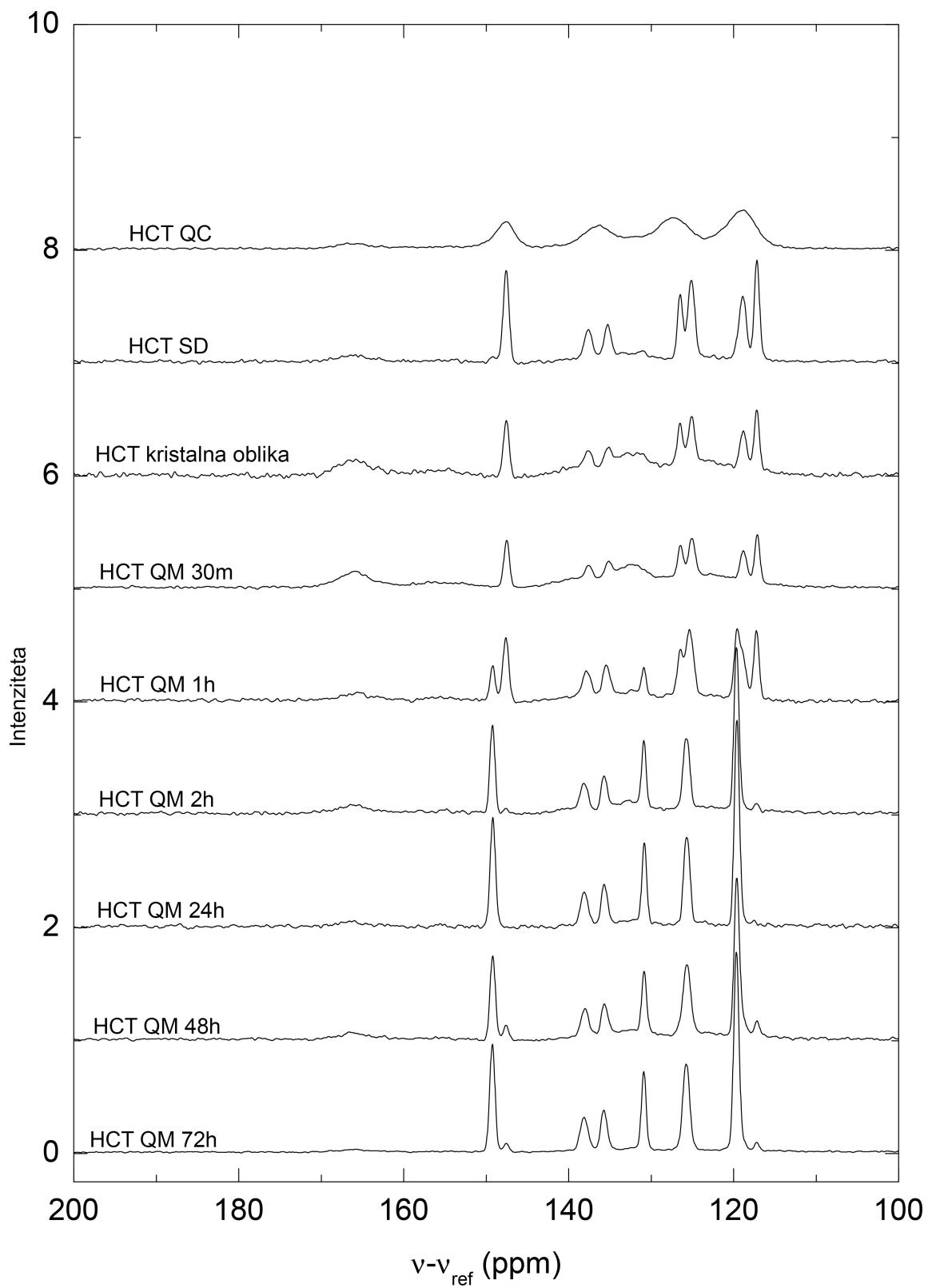
širok signal, ki ima samo en, zaobljen vrh, kar je značilno za amorfne strukture. Enako zaobljenost pri amorfnih vzorcih glede na kristalnega so opazili Caron in kolegi pri spremeljanju amorfizacije laktoze s pomočjo NMR (slika s pripadajočo obrazložitvijo je navedena v poglavju 1.3.4. Jedrska magnetna resonanca) (60). Pri ostalih vzorcih je opredelitev kristalnosti oziroma amorfnosti nekoliko težja, saj se iz  $^1\text{H}$  MAS NMR spektrov vidi predvsem manjše razlike med vzorci, ki pa niso dovolj za kakšno podrobnejšo karakterizacijo. Več informacij nam podajajo  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektri, prikazani v nadaljevanju.



Slika 13:  $^1\text{H}$  NMR spektri HCT vzorcev (od spodaj navzgor): vzorci mleti (HCT QM) 72 h, 48 h, 24 h, 2 h, 1 h, 30 min, krsitalna oblika, HCT SD ter HCT QC.

Na sliki 14 so prikazani  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektri vzorcev HCT SD, HCT QC ter različno dolgo mletih vzorcev ter kristalne oblike. Pri HCT QC vzorcu so vsi vrhovi zaobljeni ter razširjeni, kar nakazuje na popolno amorfost vzorca. Spekter HCT SD vzorca je precej podoben spektru osnovne kristalne strukture, z lepimi ozkimi vrhovi, kar nakazuje na kristalno strukturo v vzorcu. Pri različno dolgo mletih vzorcih je vidno spreminjanje spektrov s podaljševanjem časa mletja. Okoli 150 ppm vidimo izginjanje desnega vrha in pojav levega vrha. V območju pod 140 ppm vidimo poudarjanje dveh vrhov, ki sta s podaljševanjem časa mletja vse višja. Pri 130 ppm s podaljševanjem časa mletja vidimo nastanek novega vrha, ki ga pri kristalni obliki ne vidimo. Pri 125 ppm se s podaljševanjem časa mletja manjša vrhova na vrhu vrha združita v enega, ki se s podaljševanjem časa mletja nato povečuje. V območju okoli 120 ppm vidimo izginjanje desnega vrha in vse večje poudarjanje levega vrha. Opisane spremembe nakazujejo na spremembo polimorfne oblike HCT s podaljševanjem časa mletja. Pri vzorcih HCT QM 48 h in HCT QM 72 h vidimo pojav manjšega vrha na desni strani vrhov pri 150 in 120 ppm. Ta dva majhna vrhova se pojavljata pri kemijskih premikih, pri katerih so vrhovi vidni v osnovni kristalni obliki, kar nakazuje na ponoven pojav bolj stabilnega polimorfa ob daljših časih mletja. Do ponovnega pojava bolj stabilnega polimorfa lahko pride zaradi segrevanja mlina po daljšem času mletja. Rešitev bi bila, da bi mlin vsaki 2 uri ustavili za 15 min, da se celoten sistem ponovno ohladi na 6 °C, kar bi preprečilo ogrevanje mlina ob daljših časih mletja. Daljše čase mletja bi tako dosegli kumulativno, z vmesnimi ustavitvami mletja zaradi ohlajanja mlina.

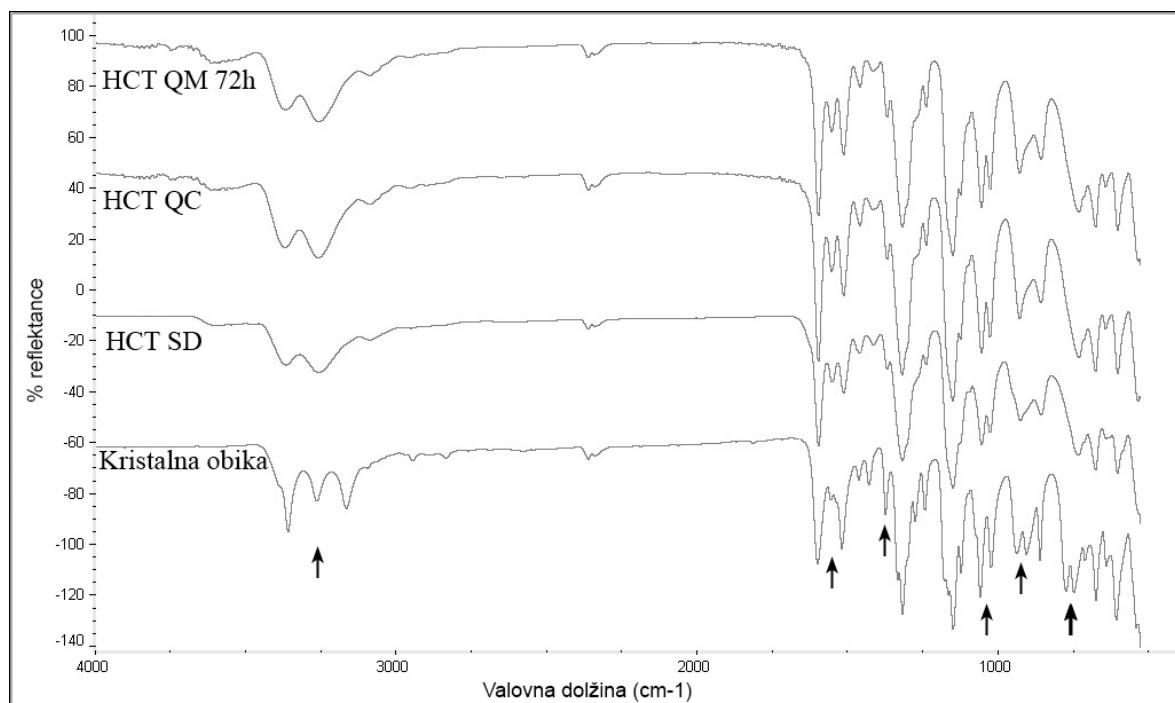
NMR meritve potrjujejo, da je amorfen zgolj vzorec HCT QC, pri ostalih vzorcih pa amorfizacije ni opaziti.



Slika 14:  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR spektri HCT vzorcev (od spodaj navzgor): vzorci mleti (HCT QM) 72 h, 48 h, 24 h, 2 h, 1 h, 30 min, kristalna oblika, HCT SD, HCT QC

#### 4.5. Infrardeča spektroskopija

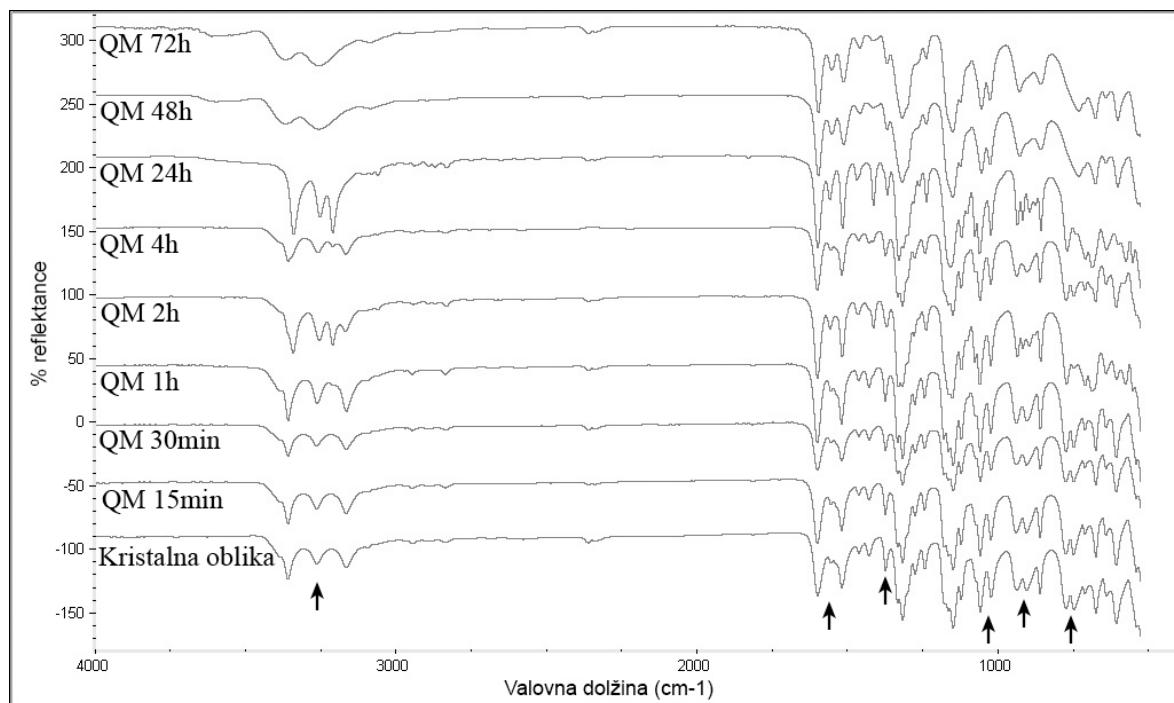
Na sliki 15 so zbrani IR spektri HCT QC, HCT SD in HCT QM 72 h vzorcev, primerjani s kristalno obliko. Pri vseh treh amorfnih vzorcih je vidno zožanje vrhov v območju 3000-3400 cm<sup>-1</sup>, poleg tega pa je pri vseh prisoten en vrh manj, kar naj bi skladno z literaturo kazalo na amorfost vzorcev (18). Opazna je razlika med vrhom pri 1500 cm<sup>-1</sup>. Srednji vrh se pri amorfnih vzorcih bolj izrazi, hkrati pa je desni vrh pri amorfnih vzorcih precej manjši kot pri kristalni obliko. Konica vrha pri 1300 cm<sup>-1</sup> je pri amorfnih oblikah nekoliko manj izrazita, enaka sprememba pa se kaže tudi pri vrhovih okoli 1000 cm<sup>-1</sup>. Pri 900 cm<sup>-1</sup> je poleg nižjih vrhov ponovno opazno manjše število vrhov pri amorfnih vzorcih, pri katerih sta vidna dva vrhova, pri kristalni obliko pa trije. Podobno lahko vidimo pri vrhu okoli 750 cm<sup>-1</sup>, kjer pri kristalni obliko vidimo dva, pri ostalih vzorcih pa zgolj en, zaobljen vrh. Vse te spremembe so morda vezane na amorfost vzorcev HCT QC, HCT SD ter HCT QM 72 h.



Slika 15: IR spektri (od spodaj navzgor) vzorcev kristalne oblike HCT ter amorfnih vzorcev, pridobljenih s sušenjem z razprševanjem (HCT SD), ohlajanjem taline (HCT QC) in vzorcem, mletim 72 h (HCT QM 72 h).

Na sliki 16 so zbrani rezultati IR analize različno dolgo mletih vzorcev kristalne oblike hidroklorotiazida. Spektri so primerjani s spektrom osnovne kristalne oblike. Enako kot pri zgoraj opisani primerjavi treh amorfnih vzorcev s kristalno, lahko tudi tu opazimo razlike v

spektrih. S podaljševanjem mletja se vrhovi nižajo in postajajo vse manj ostri. Prav tako je opazno zmanjšanje števila vrhov pri vzorcih mletih 48 h in 72 h. Iz primerjave teh spektrov je torej vidno povečevanje amorfnosti vzrocev s podaljševanjem časa mletja.



Slika 16: IR spektri kristalne oblike ter mletih vzorcev HCT (od spodaj navzgor): 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 24 h, 48 h ter 72 h.

#### 4.6. Skupen pregled uporabljenih metod

Tekom razprave smo že opisali razlike med vzorci, opažene pri posamezni analizni metodi, tu pa podajamo celovit pregled dobljenih rezultatov in usmeritve ter predloge za nadaljnje raziskave. Rezultati potrjujejo, da je za kvalitetno ovrednotenje amorfnosti vzorcev potrebno hkrati uporabljati več različnih tehnik. Hitro ohlajanje taline se je pokazala kot najbolj učinkovita metoda za amorfizacijo HCT, saj smo z vsemi analiznimi metodami potrdili amorfnost vzorca. Za HCT SD vzorec XRPD ter IR meritve kažejo na popolno amorfost, medtem ko pri DSC diagramu lahko sklepamo tudi na prekristalizacijo, pri NMR spektru pa na popolnoma kristalen vzorec. Uklonske slike XRPD meritve HCT QM 72 h ter IR meritve kažejo na amorfost, vendar enako kot pri HCT SD ss-NMR kaže na kristalno strukturo v vzorcu, eksotermni vrh pri DSC diagramu pa lahko nakazuje tudi na prekristalizacijo manj stabilnega polimorfa v bolj stabilnega.

Razlogov za različne rezultate pri različnih analiznih metodah je lahko več. Zavedati se je potrebno pomanjkljivost XRPD metode, ki kristalnih struktur ne zazna, če so v vzorcu prisotni mikrokristali, delci, ki so premajhni. Ob premajhnih delcih karakterističnih vrhov za kristalne vzorce ni opaziti. Možna razlaga tako različnih meritve je lahko tudi kristalizacija amorfnih vzorcev tekom shranjevanja. Vse meritve žal niso bile izvedene takoj po pripravi vzorca, pač pa po nekaj časa, kar pomeni, da so bili vzorci shranjeni v vialah pri 6 °C. Tekom časa shranjevanja vzorcev bi lahko torej prišlo do kristalizacije amorfnih vzorcev, kar lahko vpliva na rezultate analiznih metod. Za podrobnejšo razlago vzrokov razlik med analiznimi metodami bi lahko ponovno pripravili vse vzorce in jih takoj po pripravi analizirali z vsemi metodami. Potrebno bi bilo tudi pridobiti drugo polimorfno obliko HCT ali v literaturi poiskati rezultate pripadajočih DSC, XRPD, NMR ter IR meritve, ki bi jih lahko nato primerjali z našimi rezultati. Možna bi bila tudi uporabna dodatne metode, temperaturno odvisne XRPD analize, kjer bi videli, ali se z višanjem temperature uklonska slika spremeni. Tako bi lahko potrdili ali ovrgli, da pri približno 150 °C pride do prekristalizacije iz ene kristalne oblike v drugo obliko.

Tekom magistrske naloge smo imeli v mislih tudi industrijsko uporabnost različnih amorfnih oblik ter različnih metod njihove priprave. Rezultati meritve so nakazali na morebitne razlike v različno pripravljenih amorfnih vzorcih HCT, kar nakazuje na možnost vložitve patenta za različne amorfne oblike, vendar bi morali vse meritve ponoviti na sveže pripravljenih vzorcih. Možnost patentiranja različnih amorfnih oblik je enaka patentiranju različnih polimorfnih oblik učinkovin, kot npr. pri klaritromicinu (89). V omenjenem patentu so na drugačen način pripravili kristalno obliko klaritromicina, razlike med polimorfnimi oblikami pa dokazali s pomočjo IR in XRPD metod. Zaradi opaznih možnih razlik med amorfnnimi vzorci bi se bilo smotrno v nadalnjih študijah usmeriti v karakterizacijo in proučevanje lastnosti različno pripravljenih amorfnih vzorcev, kot so npr. stabilnost ter raztplavljanje. Morebitna potrditev razlik med amorfnnimi vzorci bi bila dovolj za vložitev patenta.

Zavedati se je potrebno, da kljub patentibilnosti posamezne metode za pripravo amorfnega vzorca učinkovine to še ne pomeni, da je ta oblika industrijsko uporabna. Težava lahko nastopi pri pridobivanju vzorca v količinah, potrebnih za industrijsko izdelavo zdravil.

## 5. SKLEP

V diplomske nalogi smo ugotovili, da lahko s hitrim ohlajanjem taline pripravimo popolnoma amorfen vzorec hidroklorotiazida.

Potrebna je souporaba več analiznih metod pri karakterizaciji amorfne oblike vzorca, saj ima vsaka izmed metod svoje pomanjkljivosti.

Razlike med amorfnnimi vzorci hidroklorotiazida, pokazane z različnimi metodami, vodijo v nadaljnjo karakterizacijo predvsem stabilnosti ter raztopljanja, ki bi še dodatno potrdili razlike.

## 6. LITERATURA

1. Grant DJW. Theory and origin of polymorphism. In: Brittain HG, editor. *Polymorphism in pharmaceutical solids*. New York: Marcel Dekker; 1999. 1–33.
2. Vippagunta S r., Brittain HG, Grant DJW. Crystaline solids. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 May 16; 48(1): 3–26.
3. Bahl D, Bogner RH. Amorphization alone does not account for the enhancement of solubility of drug co-ground with silicate: The case of indomethacin. *AAPS PharmSciTech.* 2008; 9(1): 146–53.
4. Hancock BC, Zografi G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci.* 1997 Jan; 86(1): 1–12.
5. Hancock BC, Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res.* 2000 Apr; 17(4): 397–404.
6. Priemel P a, Grohganz H, Gordon KC, Rades T, Strachan CJ. The impact of surface- and nano-crystallisation on the detected amorphous content and the dissolution behaviour of amorphous indomethacin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012 Sep; 82(1): 187–93.
7. Hancock BC, Zografi G. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci.* 1997 Jan; 86(1): 1–12.
8. Rose P, Leonard J. Process for forming amorphous Atorvastatin calcium. United States Patent, Patent Number 20070225353 A1, date of patent Sep. 27, 2007.
9. Almarsson Ö, Gardner CR. Novel approaches to issues of developability. *Curr Drug Discov.* 2003; 3: 21–6.
10. Yu L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 May 16; 48(1): 27–42.
11. 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 Mar 15; 179(2): 179–207.
12. Brittain HG, editor. *Polymorphism in pharmaceutical solids*. New York: Marcel Dekker; 1999.
13. Byrn SR. *Solid state chemistry of drugs*. New York: Academic Press; 1982.
14. Hoppu P. Characterisation and processing of amorphous binary mixtures with low glass transition temperature. Faculty of Pharmacy, University of Helsinki; 2008.
15. Sheth AR, Bates S, Muller FX, Grant DJW. Local Structure in Amorphous Phases of Piroxicam from Powder X-ray Diffractometry. *Cryst Growth Des.* 2005 Mar; 5(2): 571–8.
16. Yoshioka M, Hancock BC, Zografi G. Crystallization of indomethacin from the amorphous state below and above its glass transition temperature. *J Pharm Sci.* 1994; 83(12): 1700–5.

17. Ohta M, Buckton G. A study of the differences between two amorphous spray-dried samples of cefditoren pivoxil which exhibited different physical stabilities. *Int J Pharm.* 2005 Jan 31; 289(1-2): 31–8.
18. Patterson JE, James MB, Forster AH, Lancaster RW, Butler JM, Rades T. The influence of thermal and mechanical preparative techniques on the amorphous state of four poorly soluble compounds. *J Pharm Sci.* 2005 Sep; 94(9): 1998–2012.
19. Karmwar P, Graeser K, Gordon KC, Strachan CJ, Rades T. Investigation of properties and recrystallisation behaviour of amorphous indomethacin samples prepared by different methods. *Int J Pharm.* 2011 Sep 30; 417(1-2): 94–100.
20. Otsuka M, Nishizawa J, Fukura N, Sasaki T. Characterization of Poly-Amorphous Indomethacin by Terahertz Spectroscopy. *J Infrared, Millimeter, Terahertz Waves.* 2012 May 15; 33(9): 953–62.
21. Lefort R, Gusseme A de, Willart J-FJ-F, Danède F, Descamps M, De Gusseme a. Solid state NMR and DSC methods for quantifying the amorphous content in solid dosage forms: an application to ball-milling of trehalose. *Int J Pharm.* 2004 Aug 6; 280(1-2): 209–19.
22. Hancock BC, Shalaev EY, Shamblin SL. Polyamorphism: a pharmaceutical science perspective. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54: 1151–2.
23. Rodriguez-Spong B, Price CP, Jayasankar A, Matzger AJ, Rodriguez-Homedo N. General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 241–74.
24. Broadhead J, Edmond Rouan SK, Rhodes CT. The spray drying of pharmaceuticals. *Drug Dev Ind Pharm.* 1992; 18(11&12): 1169–206.
25. Newton JM. Spray Drying and its Application in Pharmaceuticals. *Manuf Chem Aerosol News.* 1966; 33–6.
26. Ferlan A, Vrečer F. Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin Methods for amorphisation of drugs. *Farm Vestn.* 2004; 55(1); 11–21.
27. Corrigan OI, Sabra K, Holohan EM. Physicochemical properties of spray-dried drugs: phenobarbitone and hydroflumethiazide. *Drug Dev Ind Pharm.* 1983; 9(1&2): 1–20.
28. Savolainen M, Heinz A, Strachan C, Gordon KC, Yliruusi J, Rades T, et al. Screening for differences in the amorphous state of indomethacin using multivariate visualization. *Eur J Pharm Sci.* 2007 Feb; 30(2): 113–23.
29. Corrigan OI, Holohan EM, Reilly MR. Physicochemical properties of indomethacin and related compounds co-spray dried with polyvinylpyrrolidone. *Drug Dev Ind Pharm.* 1985; 11(2&3): 677–96.
30. Shimpi SL, Mahadik KR, Paradkar AR. Study on Mechanism for Amorphous Drug Stabilization Using Gelucire 50/13. *Chem Pharm Bull.* 2009 Sep; 57(9): 937–42.
31. Puri V, Dantuluri AK, Kumar M, Karar N, Bansal AK. Wettability and surface chemistry of crystalline and amorphous forms of a poorly water soluble drug. *Eur J Pharm Sci.* 2010 May 12; 40(2): 84–93.
32. Corrigan OI, Holohan EM, Sabra K. Amorphous forms of thiazide diuretics prepared by spray-drying. *Int J Pharm.* 1984; 18: 195–200.

33. Lorenz DA, Waterman KC. Proces for forming amorphous atorvastatin. United States Patent, Patent number 7,655,,692, date of patent Feb. 2, 2010.
34. Alonso DE, Zhang GGZ, Zhou D, Gao Y, Taylor LS. Understanding the Behavior of Amorphous Pharmaceutical Systems during Dissolution. *Pharm Res.* 2010 Apr; 27(4): 608–18.
35. Otsuka M, Kato F, Matsuda Y. Comparative evaluation of the degree of indomethacin crystallinity by chemoinfometrical Fourier-transformed [corrected] near-infrared spectroscopy and conventional powder X-ray diffractometry. *AAPS PharmSci.* 2000 Jan; 2(1): E9.
36. Bøtker JP, Karmwar P, Strachan CJ, Cornett C, Tian F, Zujovic Z, et al. Assessment of crystalline disorder in cryo-milled samples of indomethacin using atomic pair-wise distribution functions. *Int J Pharm.* 2011 Sep 30; 417(1-2): 112–9.
37. Kao JYY, McGoverin CMM, Graeser K a. A, Rades T, Gordon KCC. Measurement of amorphous indomethacin stability with NIR and Raman spectroscopy. *Vib Spectrosc.* 2012 Jan; 58: 19–26.
38. Tong P, Zografi G. Solid-State Characteristics of Amorphous Sodium Indomethacin Relative to Its Free Acid. *Pharm Res.* 1999; 16(8): 1186–92.
39. Graeser K a., Strachan CJ, Patterson JE, Gordon KC, Rades T. Physicochemical Properties and Stability of Two Differently Prepared Amorphous Forms of Simvastatin. *Cryst Growth Des.* 2008 Jan; 8(1): 128–35.
40. Pokharkar VB, Mandpe LP, Padamwar MN, Ambike A a., Mahadik KR, Paradkar A. Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. *Powder Technol.* 2006 Sep; 167(1): 20–5.
41. Chawla G. Molecular Mobility and Physical Stability of Amorphous Irbesartan. *Sci Pharm.* 2009; 77(3): 695–709.
42. Atassi F, Mao C, Masadeh AS, Byrn SR. Solid-State Characterization of Amorphous and Mesomorphic Calcium Ketoprofen. *Drug Delivery.* 2010; 99(9): 3684–97.
43. Stracey J, Tracy R. Secondary Pharmaceutical Production. In: Bill B, Graham C, editors. *Pharmaceutical Production - An Engineering Guide.* 2003. 111–201.
44. Rekhi GS, Sidwell R. Sizing of Granulation. In: Parikh DM, editor. *Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology.* 2009. 449–69.
45. Liu R, editor. *Water-insoluble drug formulation.* 2nd ed. Denver: Taylor & Francis Group, LLC; 2008.
46. Price R, Young PM. On the physical transformations of processed pharmaceutical solids. *Micron.* 2005; 36: 519–24.
47. Zhang G, Gu C, Zell M, Burkhardt R, Munson E, Grant D. Crystallization and transitions of sulfamerazine polymorphs. *J Pharm Sci.* 2002; 91: 1089–100.
48. Thanatuksorn P, Kawai K, Kajiwara K, Suzuki T. Effects of ball-milling on the glass transition of wheat flour constituents. *J Sci Food Agric.* 2009 Feb; 89(3): 430–5.
49. Willart JF, Descamps M. Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. *Mol Pharm.* 2008; 5(6): 905–20.

50. Revesz A. Melting behavior and origin of strain in ball-milled nanocrystalline Al powders. *J Mater Sci.* 2005; 40: 1643–6.
51. Clement S, Purutyan H. Narrowing down equipment choices for particle-size reduction. *Chem Eng Prog.* 2002; 50–4.
52. Kwan CC, Chen JQ, Ding YL. Development of a novel approach towards predicting the milling. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 23(4-5): 327–36.
53. Deschamps M, Willart JF. Transformation of pharmaceutical compounds upon milling and comilling. The role of Tg. *J Pharm Sci.* 2007; 96(5): 1398–407.
54. Chikhalia V, Forbes RT, Storey RA, Ticehurst M. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Jan; 27(1): 19–26.
55. Chieng N, Rades T, Saville D. Formation and physical stability of the amorphous phase of ranitidine hydrochloride polymorphs prepared by cryo-milling. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008 Mar; 68(3): 771–80.
56. Zhang F, Aaltonen J, Tian F, Saville DJ, Rades T. Influence of particle size and preparation methods on the physical and chemical stability of amorphous simvastatin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009 Jan; 71(1): 64–70.
57. Bertacche V, Pini E, Stradi R, Stratta F. Quantitative determination of amorphous cyclosporine in crystalline cyclosporine samples by Fourier transform infrared spectroscopy. *J Pharm Sci.* 2006 Jan; 95(1): 159–66.
58. Tsukushi I, Yamamuro O, Matsuo T. Solid state amorphization of organic molecular crystals using a vibrating mill. *Solid State Commun.* 1995; 94: 1013.
59. Willart JF, Gusseme A de, Hemon S, Odou G, Danede F, Descamps M. Direct crystal to glass transformation of trehalose induced by ball milling. *Solid State Commun.* 2001; 119(8-9): 501–5.
60. Caron V, Willart J-F, Lefort R, Derollez P, Danède F, Descamps M. Solid state amorphization kinetic of alpha lactose upon mechanical milling. *Carbohydr Res.* 2011 Nov 29; 346(16): 2622–8.
61. Ferlan A, Vrečer F. Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn.* 2004; 55: 11–21.
62. Bahl D, Bogner RH. Amorphization of Indomethacin by Co-Grinding with Neusilin US2: Amorphization Kinetics, Physical Stability and Mechanism. *Pharm Res.* 2006 Oct; 23(10): 2317–25.
63. Choi WS, Kim H Il, Kwak SS, Chung HYHY, Yamamoto K, Oguchi T, et al. Amorphous ultrafine particle preparation for improvement of bioavailability of insoluble drugs: grinding characteristics of fine grinding mills. *Int J Miner Process.* 2004 Dec; 74: S165–S172.
64. Hellrup J, Mahlin D. Pharmaceutical micro-particles give amorphous sucrose higher physical stability. *Int J Pharm.* 2011 May 16; 409(1-2): 96–103.
65. Savolainen M, Kogermann K, Heinz A, Aaltonen J, Peltonen L, Strachan C, et al. Better understanding of dissolution behaviour of amorphous drugs by in situ solid-state analysis using Raman spectroscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009 Jan; 71(1): 71–9.
66. Savolainen M, Jouppila K, Pajamo O, Christiansen L, Strachan C, Karjalainen M, et al. Determination of amorphous content in the pharmaceutical process environment. *J Pharm Pharmacol.* 2007 Feb; 59(2): 161–70.

67. Erizal, S. Yeyet Cahyati, S Sundani Nurono, Auzal Halim. Effect of milling on solid state transformation of Sulfamethoxazole. *Int J Pharmacol.* 2008; 4(2): 140–4.
68. Font J, Muntasell J, Cesari E. Effect of milling on the thermal behaviour of poly(ethylene terephthalate). *Thermochim Acta.* 1999 Aug; 333(2): 169–72.
69. Balani PN, Ng Waik, Tan Rbh, Chan Suiy. Influence of excipients in comilling on mitigating milling-induced amorphization or structural disorder of crystalline pharmaceutical actives. *J Pharm Sci.* 2009; 99(5): 2462–74.
70. Janssens S, Zeure A, Paudel A, Humbeeck J, Rombaut P, Mooter G, et al. Influence of Preparation Methods on Solid State Supersaturation of Amorphous Solid Dispersions: A Case Study with Itraconazole and Eudragit E100. *Pharm Res.* 2010 May; 27(5): 775–85.
71. Otte A, Carvajal MT. Assessment of milling-induced disorder of two pharmaceutical compounds. *J Pharm Sci.* 2011; 100(5): 1793–804.
72. Hilden LR, Morris KR. Physics of amorphous solids. *J Pharm Sci.* 2004 Jan; 93(1): 3–12.
73. Feng Tao, Pinal R, Carvajal MT. Process Induced Disorder in Crystalline Materials : Differentiating Defective Crystals from the Amorphous Form of Griseofulvin. *J Pharm Sci.* 2008; 97(8): 3207–21.
74. Bai SJ, Rani M, Suryanarayanan R, Carpenter JF, Nayar R, Manning MC. Quantification of glycine crystallinity by near-infrared (NIR) spectroscopy. *J Pharm Sci.* 2004 Oct; 93(10): 2439–47.
75. Ambike A a, Mahadik KR, Paradkar A. Stability study of amorphous valdecoxib. *Int J Pharm.* 2004 Sep 10; 282(1-2): 151–62.
76. Qi S, Weuts I, Cort S de E, Stokbroekx S, Leemans R, Reading M, et al. An investigation into the crystallisation behaviour of an amorphous cryomilled pharmaceutical material above and below the glass transition temperature. *J Pharm Sci.* 2010; 99(1): 196–208.
77. Weuts I, Kempen D, Six K, Peeters J, Verreck G, Brewster M, et al. Evaluation of different calorimetric methods to determine the glass transition temperature and molecular mobility below Tg for amorphous drugs. *Int J Pharm.* 2003 Jun 18; 259(1-2): 17–25.
78. Balani PN, Ng Waik, Tan RbhBH, Chan Suiy. Influence of Excipients in Comilling on Mitigating Milling-Induced Amorphization or Structural Disorder of Crystalline Pharmaceutical Actives. 2010; 99(5): 2462–74.
79. Hurtta M, Pitkänen I. Quantification of low levels of amorphous content in maltitol. *Thermochim Acta.* 2004 Sep; 419(1-2): 19–29.
80. Hogan SE, Buckton G. The application of near infrared spectroscopy and dynamic vapor sorption to quantify low amorphous contents of crystalline lactose. *Pharm Res.* 2001 Jan; 18(1): 112–6.
81. Johari GP, Ram S, Astl G, Mayer E. Characterizing amorphous and microcrystalline solids by calorimetry. *J Non Cryst Solids.* 1990; 116(2-3): 282–5.
82. Newman A, Engers D, Bates S, Ivanisevic I, Kelly RC, Zografi G. Characterization of amorphous API:Polymer mixtures using X-ray powder diffraction. *J Pharm Sci.* 2008; 97(11): 4840–56.
83. Planinšek O, Zajc N, Srčič S. Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. *Farm Vestn.* 2001; 52(2): 173–85.

84. Duerst MD. Spectroscopic Methods of Analysis: Infrared Spectroscopy. In: Swarbrick J, editor. Encyclopedia of Pharmaceutical technology. New York: Informa Healthcare; 2007. 3405–18.
85. O'Connell TM, Facchine KL. Spectroscopic Methods of Analysis: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In: Swarbrick J, editor. Encyclopedia of Pharmaceutical technology. New York: Informa Healthcare; 2007. 3440–59.
86. Duarte JD, Cooper-DeHoff RM. Mechanism for blood pressure lowering and metabolic effects of thiazide and thiazide-like diuretics. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010; 8(6): 793–802.
87. Dvorak MM, Joussineau C de, Carter DH. Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by targeting a NaCl cotransporter in bone. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(9): 2509–16.
88. Johnston A, Florence AJ, Shankland N, Kennedy AR, Shankland K, Price SL. Crystallization and Crystal Energy Landscape of Hydrochlorothiazide. *Cryst Growth Des.* 2007 Apr; 7(4): 705–12.
89. Liu J-H, Riley DA. Preparation of crystal form II of Clarithromycin. United States Patent, Patent Number 5,844,105, date of patent Dec. 1, 1998.