UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATJAŽ PAJK

MAGISTRSKA NALOGA

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATJAŽ PAJK

OPTIMIZACIJA ŠTUDIJA POJAVNIH OBLIK ZDRAVILNIH UČINKOVIN Z VISOKOZMOGLJIVIM REŠETANJEM

THE OPTIMISATION STUDIES OF POLYMORPHIC FORMS OF API WITH HIGH-THROUGHPUT SCREENING

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljal v laboratorijih tovarne zdravil Krka, d.d., v Razvoju analitike, pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja in somentorstvom dr. Mateja Smrkolja. Analizo na rentgenskem monokristalnem difraktometru so izvedli na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

Zahvala

Krki, d.d., Novo mesto se zahvaljujem, da mi je omogočila izvedbo magistrske naloge. Zahvaljujem se vsem sodelavcem na Oddelku za strukturne analize za njihovo pomoč pri analizi vzorcev in interpretaciji rezultatov. Hvala prof. dr. Antonu Medenu za analizo vzorca na monokristalnem difraktometru. Zahvaljujem se tudi mentorjema prof. dr. Francu Vrečerju in dr. Mateju Smrkolju za strokovno pomoč in kritično oceno magistrske naloge.

Posebna zahvala pa gre mojim staršem, sestrama in Andreji za moralno podporo in vso vzpodbudo med študijem in pri nastajanju magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja in somentorstvom dr. Mateja Smrkolja.

KAZALO

1. UVOD		4
1.1. PC	DJAVNE OBLIKE	4
1.1.1.	POLIMORFNE OBLIKE	5
1.1.2.	PSEVDOPOLIMORFNE OBLIKE	5
1.1.3.	KOKRISTALI	6
1.1.4.	AMORFNE OBLIKE	6
1.1.5.	POLIMORFIZEM V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI	7
1.2. KI	RISTALIZACIJA	8
1.2.1.	METODE KRISTALIZCIJE	11
1.3. PC	DLIMORFNO REŠETANJE	12
1.4. VI	ISOKOZMOGLJIVO REŠETANJE POJAVNIH OBLIK	14
1.5. M	ODELNA ZDRAVLINA UČINKOVINA (K-2014)	16
2. NAMEN	I DELA	19
3. MATER	IALI IN METODE	20
3.1. OI	PREMA	20
3.2. M	ATERIALI IN KEMIKALIJE	20
3.3. M	ETODE	21
3.3.1.	RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA	21
3.3.2.	DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	23
3.3.3.	TERMOGRAVIMETRIČNA ANALIZA – MASNA SPEKTROMETRIJA	24
3.3.4.	VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	26
3.3.5.	INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA	27
3.3.6.	MONOKRISTALNA RENTGENSKA DIFRKACIJA	28
4. EKSPER	RIMENTALNO DELO	29
4.1. PF	RIPRAVA VZORCEV	29
4.1.1.	K-2014 v DMSO	29
4.1.2.	K-2014 v KLOROFORMU	29
4.1.3.	K-2014 v 1-PrOH	30
4.1.4.	K-2014 v ACETONU	30
4.1.5.	PRIPRAVA NOVE KRISTALNE OBLIKE MP1	30
4.1.6.	PRIPRAVA NOVE KRISTALNE OBLIKE MP2	30
4.1.7.	PRIPRAVA MONOKRISTALOV OBLIKE MP1	31
4.2. Al	NALIZNE METODE	31

4.2.1.	PRIPRAVA VZORCEV ZA XRPD V REFLEKSIJSKI TEHNIKI	31
4.2.2.	PRIPRAVA VZORCEV ZA XRPD V TRANSMISIJSKI TEHNIKI	31
4.2.3.	PRIPRAVA VZORCEV ZA DSC-ANALIZO	32
4.2.4.	PRIPRAVA VZORCEV ZA TG-MS-ANALIZO	32
4.2.5.	PRIPRAVA VZORCEV ZA SEM-ANALIZO	32
4.2.6.	PRIPRAVA VZORCEV ZA IR-ANALIZO	32
4.2.7.	PRIPRAVA VZORCA ZA SCXRD	32
5. REZULTA	ATI IN RAZPRAVA	34
5.1. FIZ	KALNA KARAKTERIZACIJA IZHODIŠČNE ZU K-2014	34
5.2. VIS	OKOZMOGLJIVO REŠETANJE ZU K-2014	36
5.2.1.	KRISTALIZACIJA K-2014 IZ DMSO	36
5.2.2.	KRISTALIZACIJA K-2014 IZ KLOROFORMA	39
5.2.3.	KRISTALIZACIJA K-2014 IZ 1-PrOH	42
5.2.4.	KRISTALIZACIJA K-2014 IZ ACETONA	46
5.3. FIZ	KALNA KARAKTERIZACIJA NOVIH KRISTALNIH OBLIK ZU K-2014	49
5.3.1.	SEM-ANALIZA DELCEV K-2014 OBLIKE MP1	49
5.3.2.	VISOKOTEMPERATURA RENTGENSKA ANALIZA OBLIKE MP1	50
5.3.3.	DSC-ANALIZA VZORCEV K-2014 OBLIK MP1 in MP2	52
5.3.4.	TG-MS-ANALIZA VZORCA K-2014 OBLIKE MP2	54
5.3.5.	FT-IR-ANALIZA VZORCEV K-2014 OBLIK MP1 IN MP2	55
5.3.6.	ANALIZA MONOKRISTALA K-2014 OBLIKE MP1	57
6. SKLEP		59
7. LITERAT	URA	61
8. PRILOGA		65
8.1. KRI	STALOGRAFSKI PODATKI ZA K-2014 OBLIKO MP1	65

POVZETEK

Podrobna karakterizacija zdravilnih učinkovin in tudi pomožnih snovi v trdnem stanju je eno najpomembnejših področij v farmacevtski industriji. Samo z dobrim poznavanjem pojavnih oblik substanc za farmacevtsko uporabo namreč lahko zagotovimo ustrezne fizikalno – kemijske lastnosti in ustrezno biološko razpoložljivost zdravilnih učinkovin v celotnem življenjskem ciklu izdelka.

Z leti so se v kemijskem in farmacevtskem razvoju uveljavili različni pristopi k študiju polimorfizma. Do še pred nekaj časa uveljavljen pristop klasičnega polimorfnega rešetanja, ki je dolgotrajen in pri katerem je potrebna velika količina materialov, v zadnjem času vse bolj nadomešča pristop t.i. visokozmogljivega rešetanja (HTS) pojavnih oblik zdravilnih učinkovin. HTS izvajamo na mikrotitrnih ploščah, kjer je poraba materialov bistveno manjša kot pri klasičnem polimorfnem rešetanju, hkrati pa se število poskusov bistveno poveča, s tem pa tudi možnost kristalizacije novih pojavnih oblik zdravilnih učinkovin.

V okviru naloge smo princip visokozmogljivega polimorfnega rešetanja vpeljali v raziskovalni proces. Mikrotitrne plošče, na katerih smo izvajali kristalizacije, smo analizirali z rentgenskim praškovnim difraktometrom. Pri analizi rezultatov HTS smo odkrili eno novo, do sedaj neznano pojavno obliko modelne zdravilne učinkovine (ZU) K-2014, ki smo jo poimenovali oblika MP1. V nadaljevanju smo uspešno pripravili večjo količino nove oblike, ki smo jo nato fizikalno okarakterizirali še z ostalimi analiznimi tehnikami. S termično obdelavo oblike MP1 z uporabo tehnike visokotemperaturne rentgenske difrakcije smo odkrili še dodatno, novo pojavno obliko ZU K-2014 (oblika MP2). Za obe novi obliki smo ugotovili, da gre za psevdopolimorfni obliki modelne ZU, ki sta metastabilni in s časom prehajata v termodinamsko stabilno obliko II ZU K-2014. Za obliko MP1 nam je s pomočjo monokristalne rentgenske difrakcije uspelo določiti tudi strukturo, iz katere vidimo, da oblika MP1 predstavlja 1-heksanol solvat monohidrat ZU K-2014.

Glede na to, da smo pri vpeljavi visokozmogljivega rešetanja v raziskovalni proces kristalizacije izvajali le z metodo dodajanja protitopil, je spekter kristalizacij in s tem možnost odkrivanja novih pojavnih oblik še zelo širok.

ABSTRACT

Detailed solid-state characterization of active pharmaceutical substances (API) and excipients is one of the most important areas in the pharmaceutical industry. Only with a good knowledge of different crystal forms of API we can provide adequate physicalchemical properties and adequate bioavailability of API throughout the product lifecycle. Over the years the chemical and pharmaceutical development enforced different approaches to the study of polymorphism. Well established approach of classical polymorph screening, which requires a large amount of materials and it is time consuming, recently increasingly replacing approach of high-throughput screening (HTS) of crystal forms of API. HTS is carried out on a microplates, where the consumption of material is significantly lower than in the classical polymorph screening. The number of experiments with HTS increases significantly and also the possibility of crystallization of the new crystal forms of API.

In this work we have introduced the principle of high-throughput polymorph screening in the research process. Microplates, on which the crystallization was carried out, we analyzed by X-ray powder diffractometery. When we analyzed the results of the HTS, we have discovered a new, so far unknown crystal form of the API K-2014, which we have called form MP1. In the following experimetns we successfully prepared large amount of new crystal form, which was then physically characterized also with other analytical techniques. By the thermal treatment of form MP1 using high-temperature X-ray diffraction technique, we have discovered an additional, new crystal form of the API K-2014, which we have called form MP2. For both new crystal forms we found out that they are pseudpoymoprhic forms of API K-2014, which are metastable and they convert into the thermodynamically stable form II of API K-2014. By using single-crystal X-ray diffraction we have been able to determine the crystal structure of crystal form MP1. From the crystal structural data, we can see that the form MP1 is 1-hexanol solvate monohydrate API K-2014.

The fact that we have implemented only one crystallization method in the HTS process, is the range of crystallizations and the possibility of discovering new crystal forms yet very wide.

SEZNAM OKRAJŠAV

ZU – zdravilna učinkovina

XRPD (ang. X-ray powder diffraction) - rentgenska praškovna difrakcija SCXRD (ang. Single crystal X-ray diffraction) – monokristalna rentgenska difrakcija HTS (ang. High-throughput screening)- visokozmogljivo rešetanje DSC (ang. Differential scanning calorimetry) – diferenčna dinamična kalorimetrija TG-MS - termogravimetrija-masna spektroskopija IR – infrardeča spektroskopija SEM (ang. Scanning electron microscope) – vrstični elektronski mikroskop DVS (ang. Dynamic vapor sorption) - dinamična sorpcija vlage NMR (ang. Nuclear magnetic resonance) – jedrska magnetna resonanca HPLC (ang. High-performance liquid chromatography) – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti MeOH - metanol EtOH – etanol 1-PrOH – 1-propanol 2-PrOH - 2-propanol 1-BuOH – 1-butanol 2-BuOH – 2-butanol 1-HeOH – 1-heksanol THF - tetrahidrofuran

DMSO – dimetilsulfoksid

MIBK – metilizobutil keton

1. UVOD

1.1. POJAVNE OBLIKE

Med pojavne oblike zdravilnih učinkovin (ZU) uvrščamo polimorfne oblike, psevdopolimorfne oblike (solvate, hidrate), kokristale in amorfne faze. Verjetnost, da določena zdravilna učinkovina obstaja v različnih pojavnih oblikah, je velika. Po podatkih naj bi blizu 90 % manjših organskih molekul obstajalo v več kot eni pojavni obliki (1,2). Zdravilne učinkovine (ZU) največkrat obstajajo v obliki prostih baz ali kislin. Pogost problem pri uporabi ZU v obliki prostih baz ali kislin v formulacijah predstavlja njihova slaba topnost in biološka razpoložljivost. Topnost in biološko razpoložljivost ZU lahko izboljšamo s tvorbo t.i. večkomponentnih molekulskih kristalov. Mednje sodijo psevdopolimorfi (solvati in hidrati) in kokristali (2), v posebno skupino pa uvrščamo še soli. Med večkomponentne kristale uvrščamo vse tiste kristale, ki imajo v osnovni celici kristala poleg ZU vgrajeno še dodatno molekulo ali ion. Različni tipi večkomponentnih molekulskih kristalov so predstavljeni na sliki 1.



Slika 1: Shematični prikaz različnih tipov večkomponentnih molekulskih kristalov (prirejeno po 2).

1.1.1. POLIMORFNE OBLIKE

Veliko zdravilnih učinkovin izkazuje polimorfizem (3). Polimorfizem je lastnost snovi, da ta kristalizira v več polimorfnih oblikah, ki se med seboj razlikujejo po različni razporeditvi molekul ZU v osnovni celici kristala (1, 3-7). Med procesom kristalizacije lahko identificiramo oz. pogosto tudi izoliramo več polimorfnih oblik ZU, začenši z termodinamsko najmanj stabilno, ki jo imenujemo tudi metastabilna oblika, do končne termodinamsko najbolj stabilne oblike. Hitra kristalizacija ponavadi vodi k nastanku termodinamsko manj stabilne oblike, počasna pa k nastanku termodinamsko stabilne (8). Stabilnost posamezne polimorfne oblike je odvisna od njene proste energije. Nižja kot je ta, bolj je polimorfna oblika stabilna. Metastabilne polimorfne oblike, ki imajo visoko prosto energijo, le-to znižajo s prehodom v termodinamsko stabilno oz. stabilnejšo obliko (1). Različne polimorfne oblike ZU se med seboj razlikujejo po kemijskih in fizikalnih lastnostih, kot so topnost, kemijska stabilnost, tališče, gostota, nasipni volumen, velikost in oblika delcev, itd. (1, 7). Te lastnosti so značilne tudi za ostale pojavne oblike.

1.1.2. PSEVDOPOLIMORFNE OBLIKE

Pri psevdopolimorfnih oblikah, kamor uvrščamo solvatne in hidratne oblike, je v osnovno celico kristala poleg molekule ZU vgrajena tudi ena ali več različnih molekul topila (1), kar je shematsko prikazano na sliki 1. Molekule topila so v osnovni celici lahko prisotne v stehiometričnem ali pa v nestehiometričnem razmerju, zato govorimo o stehiometričnih in nestehiometričnih solvatih. Pri stehiometričnih solvatih molekule topil(a) sestavlja(jo) kristalno strukturo in je (so) kot taka(e) sestavni del osnovne celice (slika 2b). Ob desolvataciji stehiometričnih solvatov vedno pride do pretvorbe pojavne oblike ali pa do amorfiranja ZU. Pri nestehiometričnih solvatih je topilo ujeto v kanalčke oz. v prazne prostore v osnovni celici kristala med molekule ZU (slika 2a). Za nestehiometrične solvate je značilno, da se struktura ohranja ne glede na to, koliko topila se nahaja v osnovni celici. Količina topila v osnovni celici je odvisna od parcialnega tlaka v okolici snovi in od temperature. Pri desolvataciji nestehiometričnih solvatov se lahko zgodi, da se osnovna celica in s tem tudi kristalna oblika ne spremeni. V tem primeru govorimo o desolvatiranih solvatih oz. v primeru vođe o dehidratiranih hidratih (10). Posebno skupino psevdopolimorfnih oblik pa tvorijo izostrukturne solvatne oblike. Med izostrukturne

solvate oblike sodijo tiste, pri katerih osnovno celico kristala poleg molekul ZU sestavljajo različne molekule topil, pojavna oblika pa, ne glede na to, katero topilo je v osnovno celico vgrajeno, ostaja enaka (10).



Slika 2: Primer pakiranja molekul pri nestehiometričnem solvatu (a) in pakiranja molekul pri stehiometričnem solvatu (b) (povzeto po 10).

1.1.3. KOKRISTALI

Podobno vlogo kot molekule topila pri psevdopolimorfnih imajo pri kokristalnih t.i. inertne molekule. Tvorba kokristalov je dobra alternativa tvorbi psevdopolimorfov in soli posebej takrat, ko imamo opravka z ZU, ki so šibke baze ali pa šibke kisline (1), ki izkazujejo problematiko bodisi slabe topnosti ali stabilnosti oz. neustrezne procesibilnosti.

1.1.4. AMORFNE OBLIKE

Medtem ko pri kristaliničnih snoveh govorimo o urejenosti dolgega dosega, kar pomeni, da se določeni vzorci ureditve molekul v trdni snovi periodično ponavljajo v vseh smereh v kristalu, pa pri amorfnih snoveh govorimo o urejenosti kratkega dosega (11), kjer so molekule naključno razporejene, kar je sicer lastnost tekočin (5). Amorfne snovi imajo torej reološke lastnosti podobne trdnim snovem, strukturne lastnosti pa spominjajo na tekočine (5). Topnost amorfnih snovi je ponavadi boljša od kristaliničnih, kemijska in fizikalna stabilnost pa je slabša. Slabša fizikalna stabilnost ima lahko za posledico

kristalizacijo ZU, ki je lahko bodisi spontana ali inducirana z zunanjimi vplivi, npr.: mehanskim stresom, povišano temperaturo, vlago, itd..

1.1.5. POLIMORFIZEM V FARMACEVTSKI INDUSTRIJI

Lastnost določene zdravilne učinkovine, da le-ta lahko tvori oz. obstaja v več pojavnih oblikah, je s pogleda farmacevtske industrije zelo zanimiva, saj vsaka pojavna oblika izkazuje različne fizikalno-kemijske lastnosti. Fizikalno-kemijske lastnosti različnih pojavnih oblik pomembno vplivajo na biološko razpoložljivost, procesibilnost in kemijsko in fizikalno stabilnost ZU in formulacij (4). V izogib neželenim spremembam pojavne oblike med proizvodnim procesom in/ali shranjevanjem (v roku uporabnosti) farmacevtskega izdelka je pomembno, da lastnosti pojavne oblike, ki je v izdelek vstopala, dobro poznamo in jih kontroliramo (4). Znani so namreč primeri, ko je bil zaradi spremembe pojavne oblike in s tem posledično spremenjene biološke razpoložljivosti, potreben odpoklic farmacevtskega izdelka (posamezne serije ali celotnega izdelka) iz trga (3).

Obstaja več dejavnikov, ki lahko vplivajo na spremembo pojavne oblike. Med njimi so najpogostejši: sprememba T, sprememba v relativni vlagi in prisotnost svetlobe (7). Prav tako lahko tudi določeni tehnološki procesi, kot so mletje, granuliranje in tabletiranje, vplivajo na spremembe pojavne oblike ZU v formulaciji (1).

Običajno v končne izdelke vstopa polimorfna oblik, ki je termodinamsko najbolj stabilna. Metastabilno obliko pa v izdelkih lahko uporabimo v primerih:

- ko je absorpcija in biološka razpoložljivost boljša kot pri termodinamsko najbolj stabilni obliki (1,3),
- ko je potrebna visoka hitrost raztapljanja, posebej pri formulacijah, kjer je potrebno hitro sproščanje ZU,
- pri procesnih težavah v proizvodnji stabilne oblike,
- pri patentnih omejitvah uporabe stabilne oblike, itd. (1).

1.2. KRISTALIZACIJA

Kristalizacija je proces, ki je sestavljen iz več korakov, in sicer prenasičenja raztopine, tvorbe kristalizacijskih jeder (nukleacije), rasti kristalov in Ostvaldovega zorenja kristalov (1).

Prenasičenje raztopine je pogoj za začetek nukleacije. O prenasičeni raztopini govorimo takrat, ko je v raztopini raztopljene več snovi, kot jo je pri določenih pogojih okolja (T, p) mogoče raztopiti. Prenasičenje lahko dosežemo s spremembo T ali tlaka, odparevanjem topila ali pa dodajanjem protitopila (12). Medsebojno odvisnost med prenasičenjem in kristalizacijo lahko opišemo tudi z diagramom, ki je prikazan na sliki 3. V diagramu črta a – b prikazuje krivuljo nasičenja, črta c – d pa mejo med metastabilnim in labilnim področjem.



Slika 3: Meji nasičenja in metastabilnega področja v C-T, p diagramu (prirejeno po 13).

V stabilnem področju do kristalizacije ne prihaja, saj je sistem nenasičen (točka e). V metastabilnem področju do spontane nukleacije ne prihaja, do nje pride pa pride v primeru, če raztopino ohlajamo ali pa dodajamo kristale, ki služijo kot cepivo oz. kristalizacijska jedra. Spontana nukleacija se začne, ko prečkamo mejo metastabilnega področja in preidemo v labilno področje (točka f) (14).

Nukleacija je eden najbolj kritičnih korakov kristalizacije, saj je prav od nje odvisno, v kateri polimorfni obliki bo ZU iz raztopine kristalizirala. Je proces nastajanja kristalizacijskih jeder iz prenasičene raztopine (14). Na shemi na sliki 4 so prikazani različni tipi nukleacije.



Slika 4: Tipi nukleacije (prirejeno po 15).

Do primarne homogene nukleacije pride v primeru, ko v raztopini ni prisotnih nobenih dodanih tujih delcev ali posameznih kristalov ZU. Do primarne nukleacije lahko torej pride le na meji med labilnim in metastabilnim področjem, kar je prikazano tudi v diagramu na sliki 5. Če so v raztopini prisotni tuji delci (nečistot, prahu, stekla, mehurčkov) lahko pride do primarne heterogene nukleacije, za katero ni potrebna tako visoka stopnja prenasičenja, tako, da lahko ta poteče že v metastabilnem območju. Do primarne heterogene nukleacije lahko pride tudi na stenah kristalizacijske posode npr. sprožitev nukleacije oz. kristalizacije z drgnjenjem steklene palčke ob notranjo steno bučke (kristalizatorja). Še nižja stopnja prenasičenja pa je potrebna pri sekundarni nukleaciji, kjer v nasičeno raztopino dodamo cepivo, s katerim kristalizacijo vodimo v želeno smer t.j. v smer točno določene kristalinične pojavne oblike (15).



temperatura (T)

Slika 5: Tipi nukleacij v odvisnosti od T in C (prirejeno po 15).

Ko kristalizacijska jedra dosežejo kritično velikost, se proces nukleacije ustavi, prične pa se rast kristalov. Skupaj z nukleacijo ima rast kristalov največji vpliv na končno obliko in velikost delcev oz. kristalov (15).

Obstaja veliko modelov, ki opisujejo rast kristalov, vendar nobeden izmed njih ne velja za vse primere (15). Najpreprostejši model rasti kristalov je predstavljen na sliki 6. Pri tem modelu enota rasti kristala (gradnik, t.j. molekula, atom, ion) (položaj A) difundira na površino rastočega kristala, od tu nato potuje po površini kristala do položaja kjer se lahko vgradi v kristalno rešetko (položaja B, C). Enota rasti kristala se v rastoči kristal vgradi na mestu, kjer je energija za pripenjanje najnižja (položaj C) (16), navadno na mesto, kjer je v najmanjši možni meri njena površina brez stika z ostalimi gradniki kristala.



Slika 6: Idealiziran model rasti kristala na površini le-tega (povzeto po 16).

Vendar pa posplošeni model za večino primerov realnih rasti kristalov ne velja, saj imajo kristali na površini nepravilnosti oz. defekte. Za pojasnjevanje rasti teh kristalov uporabljamo model BCF (Burton-Carbrera-Frank), ki rast kristalov pojasnjuje s t.i. vijačno dislokacijo in je prikazana na sliki 7 (16).



Slika 7: Shematični prikaz vijačne dislokacije po modelu BCF (prirejeno po 16).

1.2.1. METODE KRISTALIZCIJE

Izbira metode kristalizacije ima pomemben vpliv na pojavno obliko, ki jo bomo na koncu izolirali iz procesa kristalizacije. Iz tega sledi, da pri polimorfnem rešetanju načrtujemo poskuse tako, da zajamemo čim širši spekter metod kristalizacije. Med pogostejše metode kristalizacije uvrščamo:

- kristalizacija z ohlajanjem raztopine,
- kristalizacija z odparevanjem topila,
- precipitacija,
- sprememba kristalne oblike kot posledica segrevanja,
- kristalizacija iz taline,
- sublimacija,
- izsoljevanje,
- sprememba v pH,
- liofilizacija (8).

Na sliki 8 so prikazane metode kristalizacij iz topila in kristalizacij v trdnem v odvisnosti od časa kristalizacije. V odvisnosti od izbora načina kristalizacije lahko predvidimo, ali bo ZU kristalizirala v stabilni ali pa metastabilni polimorfni obliki. Hitra kristalizacija ponavadi vodi k nastanku metastabilne oblike, medtem ko s počasno kristalizacijo dobimo oblike, ki so termodinamsko stabilne, kar je prikazano na sliki 8.



Slika 8: Shema kristalizacij v trden in iz topil v odvisnosti od časa kristalizacije (prirejeno po 2, 17).

Pri metodah, kjer uporabljamo različna topila oziroma mešanico le-teh, je zelo pomembno katera topila izberemo, saj mora biti ZU v njih kemijsko stabilna. Pomembno je tudi, da je topnost ZU v kristalizacijskem topilu ravno pravšnja, in sicer je optimalno, da je le-ta v območju med 10 in 100 mg/ml. Če je topnost prenizka, ima to za posledico nizke izkoristke, če pa je previsoka, se lahko viskoznost raztopine tako poveča, da je kristalizacija zaradi tega zelo počasna, kar ima lahko za posledico, da dobimo končni produkt v obliki gela. Metodi kristalizacija iz taline in sprememba kristalne oblike kot posledice segrevanja sta sprejemljivi le v primeru, da je ZU termično stabilna pri temperaturi tališča oz. v temperaturnem območju polimorfnega prehoda oz. pretvorbe, kar pomeni, da pri teh temperaturah kemijsko ne razpada (8).

1.3. POLIMORFNO REŠETANJE

V začetni fazi razvoja ZU je pomemben korak tudi izolacijo in identifikacija vseh oz. vsaj večine potencialnih polimorfnih in pseudopolimorfnih oblik ter amorfne oblike določene

ZU. Če imamo v razvojni fazi tako neionizirane ZU, t.j. proste kisline oz. baze, kot različne soli in kokristale, je potrebno čim širše proučiti tudi njihove pojavne oblike. Pri tem je pomembna je njihova fizikalno-kemijska karakterizacija na podlagi katere nato izberemo obliko, ki je s stališča kemijskega in farmacevtskega razvoja najbolj primerna (1, 8).

Različne polimorfne oblike lahko nastanejo, če spreminjamo pogoje kristalizacije (8). Z namenom izdelave široke palete možnih pojavnih oblik se lahko poslužujemo tehnike polimorfnega rešetanja (ang. *polymorph screening*). Dodatno si pri napovedovanju možnih pojavnih oblik posamezne ZU lahko pomagamo tudi z računalniškimi metodami. V preglednicah I in II so podane procesne spremenljivke in parametri kristalizacije, katere lahko pri polimorfnem rešetanju spremljamo in spreminjamo.

SPREMENLJIVKE GLEDE NA VRSTO POJAVNE OBLIKE		
POLIMORFI / SOLVATI	SOLI / KOKRISTALI	
topilo / kombinacija topil	tip protiona	
stopnja prenasičenja	kislinsko / bazno razmerje	
vrste dodatkov	topilo / kombinacija topil	
Iron contraction de dettrou	topilo / kombinacija topil	
Koncentracija dodatkov	(vrstni red dodajanja topil)	
	stopnja prenasičenja	
	vrste in koncentracija dodatkov	
	pH	
	ionska moč	

Preglednica I: Spremenljivke glede na vrsto pojavne oblike (prirejeno po 2, 18).

Preglednica II: Procesne spremenljivke (prirejeno po 2, 18).

PROCESNE SPREMENLJIVKE					
TERMIČNE	PROTIOPILA	IZHLAPEVANJE	PRETVORBA V SUSPENZIJI	OSTALE SPREMENLJIVKE	
hitrost segrevanja	vrsta	hitrost izhlapevanja	vrsta topila	hitrost mešanja	
hitrost ohlajanja	hitrost dodajanja protitopila	čas izhlapevanja	inkubacijska T	oblika in tip mešala	
maksimalna T	T pri dodajanju protitopila	nosilni plin	inkubacijski čas	oblika kristalizacijske posode	
inkubacijska T	čas dodajanja protitopila	razmerje med površino in V	temperaturni cikli		
inkubacijski čas					

Pristopi k polimorfnemu rešetanju so različni. Odvisni so od fizikalno-kemijskih lastnosti ZU (8). Po Hilfikerju (8) naj bi vsako polimorfno rešetanje vsebovalo naslednje elemente oz. faze:

- izhodiščno obliko ZU je potrebno podrobno okarakterizirati z analiznimi metodami, med katere sodijo: XRPD, IR, TG-MS, DVS, Raman, NMR, raztapljanje, elektronska mikroskopija, HPLC,
- uporaba visokotemperaturne optične mikroskopije, pri kateri hitro dobimo informacijo, ali je ZU podvržena polimorfnemu prehajanju, ki je posledica povišane T,
- pravilna izbira topil in ustreznih metod kristalizacije izboljšuje možnosti za detekcijo novi polimorfnih oblik. Pomembno je, da izberemo topila z različnim lastnostmi, kot so npr. polarnost, proton akceptorske oz. proton donorske lastnosti, viskoznost,
- karakterizacija hidratnih oblik s tehniko DVS,
- uporaba kromatografskih metod za detekcijo nečistot, ki lahko imajo ključen vpliv pri nukleaciji in kristalizaciji novih kristalnih oblik ZU,
- pri kristalizaciji iz raztopin je potrebno izbrati čim širši nabor topil s čim širšim spektrom njihovih lastnosti in pripraviti zmesi le-teh, s čimer se poveča verjetnost za detekcijo novih polimorfnih oblik,
- izbrati je potrebno ustrezne kristalizacijske metode,
- iz nabora novih polimorfnih oblik je potrebno izbrati tiste, ki so iz farmacevtsko tehnološkega stališča perspektivne, in jih podrobno in natančno analizirati (8).

Slabosti klasičnega polimorfnega rešetanja sta predvsem velika poraba materialov ter časovna potratnost (8).

1.4. VISOKOZMOGLJIVO REŠETANJE POJAVNIH OBLIK

Z visokozmogljivim rešetanjem (HTS) se izognemo pretirani porabi materialov, poleg tega pa v veliko krajšem času pridobimo mnogo več podatkov kot pri klasičnem polimorfnem rešetanju. Pri HTS je torej velik poudarek na automatizaciji in minituarizaciji poskusov. Kljub temu da poskuse lahko izvajamo vzporedno in hitro, je potrebno le-te smiselno načrtovati. Pri HTS velja pravilo, da visokozmogljivo rešetanje ni nadomestilo za razmišljanje oz. načrtovanje poskusov (8).

Visokozmogljivo rešetanje vključuje izbiro načina in pogojev kristalizacije, izvedbo kristalizacije, izbor metod za analizo vzorcev (XRPD, Raman mikroskop, itd.) in obdelavo pridobljenih podatkov (4). HTS uporabljamo tako za iskanje novih pojavnih oblik ZU kot tudi za raziskave stabilnosti določene pojavne oblike v smislu določitve robnih pogojev kristalizacije in stabilnosti procesa.

Poskuse pri polimorfnem HTS ponavadi izvajajo na modificiranih mikrotitrnih ploščah s 96-imi kristalizacijskimi vdolbinami in volumni posamezne vdolbine med 100 in 200 μ l (8). V uporabi so tudi mikrotitrne plošče s 384 kristalizacijskimi vdolbinami, pri katerih znaša volumen vdolbine med 30 in 100 μ l, in plošče s 1536 kristalizacijskimi vdolbinami, pri katerih znaša volumen vdolbine med 2,5 in 10 μ l. Pri povečanju števila mikrotitrnih vdolbin se velikost mikrotitrnih plošč ne spremeni (19). Mikrotitrne plošče z različnimi števili filtrnih vdolbin so prikazane na sliki 9.



Slika 9: Primeri mikrotitrnih plošč s 96, 384 in 1536 filtrnimi vdolbinami (povzeto po 19).

Mikrotitrne plošče morajo biti oblikovane tako, da jih lahko zaporedno analiziramo z več analiznimi tehnikami. Pri pripravi vzorcev na mikrotitrnih ploščah moramo biti posebej pozorni na preprečevanje navzkrižne kontaminacije vzorcev. Razdalja med posameznimi vdolbinami je namreč zelo majhna, tako da lahko navzkrižna kontaminacija postane velik problem (8).

Najbolj pogosto uporabljeni tehniki pri analizi vzorcev pridobljenih pri polimorfnem HTS sta rentgenska praškovna difrakcija v transmisijski tehniki in Ramanska analiza (8, 18). Obe analizni tehniki imata svoje prednosti in tudi slabosti. Glavna prednost Ramanske analize vzorcev je predvsem v tem, da je čas analize vzorca v primerjavi z rentgensko difrakcijo nekoliko krajši. Poleg tega pa je potrebna količina vzorca pri tej analizi manjša

kot pri rentgenski difrakciji, saj je za analizo dovolj že en kristal ZU. Slabost Ramanske sprektroskopije pa se izrazi v primeru obarvanih vzorcev (18). Pri rentgenski analizi vzorcev največji problem predstavlja premajhna ali prevelika količina izpadlega produkta v filtrnih vdolbinah, vpliv preferenčne orientacije v primeru, ko izpadejo veliki kristali in problem kristalizacije na stenah filtrnih vdolbin. Vse to se v difraktogramih lahko odraža v visokem ozadju, premiku določenih uklonov ali celotnega difraktograma, v asimetriji uklonov ter v pojavu ram ob karakterističnih uklonih (20). Pri rentgenski analizi mikrotitrnih plošč imajo pomembno vlogo tudi pravilne nastavitve difraktometra. Obliko rentgenskih žarkov je potrebno z režami omejiti tako, da ti padajo izključno skozi eno flitrno vdolbino naenkrat. Pred analizo je prav tako potrebno točno definirati položaj napačen, se to v difraktogramu odraža v zamiku določenega dela difraktograma. Pri obdelavi in interpretaciji rezultatov pridobljenih s HTS, je zelo pomembna tudi kritična ocena izkušenega analitika, še posebej, če pri obdelavi uporabljamo klaster analizo.

1.5. MODELNA ZDRAVLINA UČINKOVINA (K-2014)

Za modelno zdravilno učinkovino je v literaturi znanih več polimorfnih, predvsem pa veliko pseudopolimorfnih oblik. Do sedaj znane kristalne oblike so zbrane v preglednici III.

patentna prijava	oblike
	mono (MeOH) solvat, mono (EtOH) solvat,
patentna prijava št. 1	mono (1-PrOH) solvat, (podatki tudi za
	obliko II)
patentna prijava št. 2	oblika II, (podatki tudi za obliko I)
natontna nuijava čt. 3	oblika I, oblika II, mono(metilenklorid)
patentna prijava st. 5	solvat
patentna prijava št. 4	brezvodna oblika I, brezvodna oblika II
notontno prijovo št. E	dihidrat D, (podatki tudi za oblike I, II in
patentna prijava st. 5	dihidrat B)
notontno nuitovo št. (dihidrat B, dihidrat D, dihidrat E, (podatki
patentna prijava st. o	tudi za obliko I, obliko II)
	brezvodna oblika III, oblika IV- enaki XRD
patentna prijava št. 7	podatki kot oblika I, oblika V, (podatki tudi
	za obliko I, obliko II)
notontno nuitovo št. 8	monohidrat-I, dihidrat-I, oblika II iz
patentna prijava st. 8	acetonitrila, oblika I iz diklorometana

Preglednica III: Pregled v literaturi znanih kristalnih oblik modelne ZU.

patentna prijava št. 9	oblika X – enak difraktogram kot dihidrat E
patentna prijava št. 10	dihidrat-II, (podatki tudi za obliko II)
patentna prijava št. 11	oblika X – enak difraktogram kot dihidrat E
patentna prijava št. 12	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 13	oblika VI
	(metilenklorid) voda solvat, (DMSO) voda
patentna prijava št. 14	solvat, (podatki tudi za obliko I)
patentna prijava št. 15	brezvodna oblika I
	acetonitril/metilenklorid/voda solvat,
	acetonitril/voda solvat, 2-PrOH solvat,
patentna prijava št. 16	metilenklorid solvat IA, metilenklorid solvat
	IB, oblika A
natantna nrijava št. 17	oblika G, oblika H, oblika J, oblika K, oblika
	Q, oblika S, oblika X, oblika Y
patentna prijava št. 18	čistost brezvodne oblike I
patentna prijava št. 19	amorf
patentna prijava št. 20	oblika I
patentna prijava št. 21	soli K-2014 (ni polimorfnih podatkov)
patentna prijava št. 22	acetat, oblika I
patentna prijava št. 23	oblika I, oblika II
patentna prijava št. 24	dihidrat C
patentna prijava št. 25	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 26	oblika X
patentna prijava št. 27	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 28	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 29	soli s maleinsko, fumarno, salicilno,
F L - J	acetilsalicilno, benzojsko kislino
patentna prijava št. 30	voda/THF solvat
patentna prijava št. 31	oblika E
patentna prijava št. 32	hidrat J_2 , dihidrat J_1
patentna prijava št. 33	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 34	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 35	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 36	brezvodna oblika I
patentna prijava št. 37	sol v obliki amorfnega pamoata
članek št. 1	amorf
	oblika I, dihidrat B, dihidrat D, dihidrat E,
članek št. 2	višji hidrat
	brezvodne oblike I, II, III, hidratne oblike po
članek št. 3	raztapljanju ZU v razredčeni HCl, etilacetatu,
	etilacetatu/toluen, aceton in po suspendiranju
	V VOOI
članek št. 4	etanoi soivat dinidrat, butanoi soivat
	monogoatat 2 DrOU hamigalyat manahidrat
članek št. 5	nonoacetat, 2-FIOR nemisolvat monohidrat,
ělanok št. 6	2-propanon nemisorvat monomutat
Alanak št. 7	metanol solvat
Clanck St. /	motanoi sorvat

članek št. 8	metanol solvat monohidrat
	etilacetat, MeOH solvat, EtOH solvat, 1-
članek št. 9	solvat, THF solvat, kloroform solvat,
	diklorometan solvat
	dimaleat monofumarat, p-Aminobenozoat
	hemihidrat, hidrogenmalonat, benzen
članak št. 10	salicilat, etanol monohidrat form II, etanol
clanck St. 10	hidrat form I, acetonitril monohidrat,
	nitrometan monohidrat, nikotinat, dimaleat,
	monomaleat, malonat

Pregled kristalnih oblik je pripravljen po podatkih iz patentnih prijav in člankov modelne ZU K-2014 (21 - 67).

Oblike I, II in III so brezvodne oblike K-2014. Obliki I in II sta v člankih, glede na patente, ravno obratno poimenovani. Zanimivo je predvsem to, da je obratno poimenovanje v članku kot prvo uporabilo isto farmacevtsko podjetje, ki je prvo obliki poimenovalo tudi v patentni prijavi. V naši nalogi bomo oblike poimenovali tako, kot jih navaja patentna prijava številka 3.

Za veliko pojavnih oblik ZU K-2014 so poznani tudi kristalografski podatki. Tako so za oblike I, II, dihidrat B, dihidrat D, višji hidrat, metanol solvat, metanol solvat monohidrat, etanol solvat dihidrat, butanol solvat monohidrat, diklorometan solvat, 2-propanol solvat, 2-propanon hemisolvat monohidrat in 2-propanol disolvat rešene strukture, za dimaleat monofumarat, p-Aminobenozoat hemihidrat, hidrogenmalonat, benzen salicilat, etanol monohidrat form II, etanol hidrat form I, acetonitril monohidrat, nitrometan monohidrat, nikotinat, dimaleat, monomaleat, malonat pa so podani parametri osnovnih celic.

2. NAMEN DELA

Dobro poznavanje pojavnih oblik in še posebej polimorfizma določene ZU je s pogleda farmacevtske industrije izrednega pomena. Za študij polimorfizma uporabljamo več različnih konceptov, od klasičnega polimorfnega rešetanja pa do visokozmogljivega. Odkrivanje novih pojavnih oblik in variranje postopkov kristalizacije se je z uporabo koncepta visokozmogljivega rešetanja bistveno poenostavilo.

Namen dela je bil vpeljati koncept polimorfnega HTS v raziskovalni proces ob uporabi rentgenske praškovne difrakcije kot izbrane analizne tehnike. Na modelni zdravilni učinkovini K-2014 bomo izvedli serijo poskusov, pri čemer bomo K-2014 raztopili v različnih topilih, kristalizacijo pa nato izvedli z uporabo vnaprej izbranih protitopil na mikrotitrnih ploščah. Poleg uporabe različnih topil bomo spreminjali tudi pogoje kristalizacija, kot so kristalizacija pod znižanim tlakom, kristalizacija pod N₂ in kristalizacija pri nizki T. Mikrotitrne plošče bomo nato analizirali z XRPD. Če bomo pri XRPD analizi ugotovili nove, še neznane kristalne oblike modelne ZU, bomo le-te po ponovljeni kristalizaciji, s čimer bomo pridobili večjo količino vzorca za analizo, še bolj podrobno fizikalno ovrednotili z ostalimi analiznimi tehnikami, kot so visokotemperaturna rentgenska difrakcija, vrstična elektronska mikroskopija, diferenčna dinamična kalorimetrija, termogravimetrija z masno spektrometrijo, monokristalna rentgenska difrakcija in infrardeča spektroskopija.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. OPREMA

- Rentgenski praškovni difraktometer: Empyrean, PANalytical, Nizozemska
- Vrstični elektronski mikroskop: Ultra Plus, Carl Zeiss, Nemčija
- Termogravimetrični analizator: TGA/DSC 1, Mettler Toledo, Švica
- Masni spektrometer: GSD301, Pfeiffer Vacuum, Avstrija
- Diferenčni dinamični kalorimeter: DSC 1, Mettler Toledo, Švica
- FT-IR spektrometer: Spectrum Frontier, Perkin Elmer, ZDA
- Monokristalni difraktometer: Agilent SuperNova, Agilent Technologies, ZDA
- Magnetno mešalo: IKA C-MAG MS7, Nemčija
- Mikropipeta: mLine, Sartorius Biohit, Finska
- Mikrototrne plošče: MSFBN6B, MultiScreen HTS FB, Merck Millipore, Nemčija
- Precizna tehtnica: PG2002-S, Mettler Toledo, Švica
- Analitska tehtnica: MT5, Mettler Toledo, Švica
- Hladilnik: Gorenje, Slovenija

3.2. MATERIALI IN KEMIKALIJE

- K-2014 (vsebnost 99,7%), Krka, Slovenija
- Etanol (96 vol%), Sigma Aldrich, Nemčija
- Etanol (abs.), Sigma Aldrich, Nemčija
- Metanol, J.T. Baker, Nizozemska
- 1-propanol, Merck, Nemčija
- 2-propanol, Merck, Nemčija
- 1-butanol, Sigma Aldrich, Nemčija
- 2-butanol, Sigma Aldrich, Nemčija
- Heptan, Sigma Aldrich, Nemčija
- Aceton, Merck, Nemčija
- Acetonitril, Sigma Aldrich, Nemčija
- 1,2-dikloroetan, Merck, Nemčija
- Diklorometan, J.T. Baker, Nizozemska

- Metilizobutil keton, Merck, Nemčija
- Butilacetat, J.T. Baker, Nizozemska
- Etilacetat, Sigma Aldrich, Nemčija
- Toluen, Merck, Nemčija
- Heksan, J.T. Baker, Nizozemska
- Cikloheksan, Merck, Nemčija
- 1-heksanol, Merck, Nemčija
- Klorobenzen, Sigma Aldrich, Nemčija
- Tetrahidrofuran, Merck, Nemčija
- Dieltiketon, Sigma Aldrich, Nemčija
- Dimetilsulfoksid, Merck, Nemčija
- Kloroform, Sigma Aldrich, Nemčija

3.3. METODE

3.3.1. RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD) je ena izmed ključnih analiznih tehnik na področju karakterizacije trdnih kristaliničnih in tudi amorfnih snovi. XRPD uporabljamo predvsem pri raziskavah, pri katerih imamo opravka s polikristaliničnimi snovmi (68).

Rentgenski posnetki (difraktogrami) se uporabljajo za določanje kristaliničnih faz v vzorcu, za določanje fazne čistosti in za določanje strukturnih lastnosti materialov.

Pri rentgenski praškovni difrakciji sta poznani dve tehniki snemanja vzorcev, in sicer transmisijska, kjer rentgenski žarki potujejo skozi vzorec, in refleksijska, kjer se rentgenski žarki uklanjajo na površini vzorca (kristala). Pri obeh tehnikah lahko uporabimo različne geometrije snemanja. Med temi so najbolj pogosto uporabljene θ -2 θ , θ - θ in 2 θ geometrija. Pri θ -2 θ geometriji je izvor žarkov fiksen, medtem ko se detektor pomika po krožnici, vzorec pa se nagiba s polovično kotno hitrostjo detektorja. V primeru 2 θ geometriji pa se rentgenska cev in detektor eden drugemu približujeta, vzorec, ki stoji med njima, pa miruje (68).

Rentgenski žarki iz rentgenske cevi potujejo skozi reže, ki žarke poravnajo oz. usmerijo do vzorca, kjer prihaja do difrakcije (uklanjanja rentgenskih žarkov na kristalnih ravninah).

Do difrakcije pride le v primeru, ko je izpolnjen Braggov pogoj, ki je shematsko prikazan na sliki 10. Braggov pogoj zapišemo s formulo /1/:

$$n^*\lambda = 2^* d_{hkl}^* \sin\theta \qquad /1/,$$

pri čemer je Θ kot (Braggov kot) med vpadnim žarkom in kristalno ravnino, d_{hkl} – razdalja med kristalnimi ravninami, n – celo število in λ – valovna dolžina rentgenskih žarkov (68).



Slika 10: Braggov pogoj (povzeto po 68).

Do uklanjanja rentgenskih žarkov na kristalnih ravninah pride takrat, ko je vpadni kot primarnega žarka enak Braggovemu kotu. Kot med izvorom žarkov in detektorjem označimo z 2θ in se imenuje uklonski kot (68).

Shematsko lahko difrakcijo opišemo tudi s t. i. žariščnim krogom. Na obodu kroga se nahajajo izvor žarkov, vzorec in žariščna točka, ki je v tem primeru sprejemna reža. Poleg žariščnega kroga poznamo tudi difraktometrski krog. Pri difraktometrskem krogu pa je v vzorec postavljen v središče kroga, medtem ko se rentgenska cev in žariščna točka, ki je tudi v tem primeru sprejemna reža, nahajata na njegovem obodu (68). Žariščni in difraktometrski krog sta predstavljena na sliki 11.



Slika 11: Difraktometrski in žariščni krog (prirejeno po 68).

3.3.2. DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je tehnika termične analize, kjer merimo spremembo toplote v vzorcu, medtem ko je ta izpostavljen kontrolirani temperaturni spremembi. DSC meri temperaturo in toploto, ki sta posledici fizikalnih ali kemijskih sprememb v vzorcu, v odvisnosti od časa in temperature, v kontrolirani atmosferi (69).

Pri DSC največkrat uporabljamo kompenzacijski način merjenja. To je način, pri katerem tako vzorec kot tudi referenco tekom eksperimenta držimo blizu nastavljene temperature. Temperaturne spremembe v vzorcu, ki so posledica termičnih reakcij v vzorcu (t.j. endotermnih oz. eksotermnih), ki posledično znižajo oz. zvišajo trenutno T vzorca v primerjavi z referenco, lahko kompenziramo s kontroliranim gretjem vzorca ali pa s kontroliranim gretjem reference pri eksotermnih reakcijah v vzorcu. Tako morebitni nastali termični efekt nevtraliziramo na način, da ni nobene izmenjave toplote med vzorcem in referenco, zato pa porabimo nekaj toplotne energije, iz katere izračunamo velikost toplotnega efekta (69). Starejše naprave so merile razliko v T med vzorcem in referenco podvrženo enakemu T programu. Ker pa je težko T razlike težko natančno meriti, novejši instrumenti torej merijo razliko v porabljeni toploti na vzdrževanje ničelne T razlike med vzorcem in referenco, ki jo je moč zelo natančno izmeriti.

Rezultat DSC-analize je krivulja toplotnega toka v odvisnosti od temperature ali časa. Iz krivulje za toplotni efekt (npr. fazni prehod) izračunamo entalpijo prehoda. Entalpija prehoda je vrednost integrala pod površino vrha, ki ustreza energiji faznega prehoda.

Temperaturne spremembe v vzorcu so posledica endotermnih in eksotermnih prehodov ali pa reakcij v vzorcu. Mednje sodijo taljenje, kristalizacija, steklast prehod, vrenje, sublimacija, izhlapevanje, itd. Nekatere izmed teh sprememb so predstavljene na DSC-krivulji na sliki 12.



Slika 12: Tipični tipi faznih sprememb vidnih na DSC krivulji (prirejeno po 6).

Na obliko DSC-krivulje in številčno vrednost parametrov vplivajo številni dejavniki, ki jih lahko razdelimo v dve skupini ni sicer na dejavnike instrumenta, kot so atmosfera v pečici (vrsta plina oz. atmosfere, pretok plina), oblika in material lončka, velikost in oblika peči, tip senzorja, hitrost segrevanja oz. temperaturni program, hitrost, odzivnost in občutljivost instrumenta, in dejavnike vzorca, kamor sodijo natehta, termična prevodnost, toplotna kapaciteta, stresalni volumen vzorca in velikost delcev ter stopnja kristaliničnosti vzorca (69).

V farmacevtski industriji DSC največkrat uporabljamo za študij polimorfizma ZU; identifikacijo polimorfov in spremljanje faznih prehodov ter za detekcijo amorfnega stanja v snovi (določanje temperature steklastega prehoda, kvantitativno določanje amorfne faze). Zaradi dobre občutljivosti jo uporabljamo tudi za identifikacijo surovin ter za določanje čistosti vzorcev (69).

3.3.3. TERMOGRAVIMETRIČNA ANALIZA – MASNA SPEKTROMETRIJA

Termogravimetrična (TG) analiza meri izgubo mase vzorca, ki je izpostavljen določenemu temperaturnemu programu. Meritve izvajamo pod definirano atmosfero, ponavadi pod inertnimi pogoji (pod N₂, Ar). TG analiza poda informacijo o količini hlapnih komponent v

vzorcu, kot so voda, solvatna in rezidualna topila, pa tudi informacijo o načinu razpada vzorca. Primer TG-krivulje je prikazan na sliki 13 (70).



Slika 13: TG-krivulja z efekti, značilnimi za ZU (prirejeno po 70).

Pri sklopljeni TG-MS-analizi je na aparat za termogravimetrijo zaporedno vezan še masni spektrometer. Masna spektrometrija je tehnika za identifikacijo snovi na osnovi analize ionov, nastalih iz osnovne molekule. Masni spektrometer je instrument, ki loči ione v plinski fazi glede na njihovo maso *m* in naboj *z*, oz. glede na razmerje m/z. Bistveni sestavni deli masnega spektrometra so ionski izvor, kvadrupolni analizator in detektor. V ionskem izvoru molekule ionizirajo in razpadejo na manjše fragmente, nastale ione pa pospeši električno polje. Tako dobimo curek pozitivnih ionov, ki jih kvadrupolni analizator loči v posamezne komponente/fragmente z različnimi vrednostmi razmerja m/z. Fragmentirani ioni se zaradi razlike v vrednosti m/z v električnem polju kvadrupolnega analizatorja različno odklonijo. Posledica tega je serija signalov, ki jo imenujemo masni spekter (71).

3.3.4. VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Vrstična elektronska mikroskopija je ena izmed metod karakterizacije trdnih snovi, ki nam omogoča analizo vzorcev na mikro- in nanometrskem nivoju in je zaradi tega zelo uporabna v farmacevtski industriji. Namenjena je opazovanju površin trdnih nehlapnih vzorcev.

Elektronski mikroskop, ki je shematsko prikazan na sliki 14, deluje po naslednjem principu. Elektroni iz katode zaradi velike razlike električnega potenciala med anodo in katodo pospešijo proti vzorcu. Magnetne leče elektrone oblikujejo v elektronski snop majhnega premera, ki nato zadane ob vzorec. Med elektronskim snopom in atomi vzorca prihaja do številnih interakcij, ki nam s pomočjo ustreznih detektorjev podajo informacijo o morfologiji, topografiji, elementni sestavi in deležu posameznih elementov v vzorcu (72). Tipi interakcij elektronskega snopa z vzorcem so prikazani na sliki 15.



ekran za opazovanje





Slika 15: Tipi interakcij elektronskega snopa z vzorcem (povzeto po 73).

Za opazovanje morfologije delcev uporabljamo sekundarne elektrone. Sekundarni elektroni nastanejo ob neelastičnem sipanju primarnih elektronov v jedru ali pa na elektronih iz lupin atomov vzorca (72).

3.3.5. INFRARDEČA SPEKTROSKOPIJA

IR-spektroskopija je analizna tehnika, ki uporablja sevanje v območju infrardečega elektromagnetnega valovanja. To je sevanje, ki ima valovno dolžino daljšo, frekvenco pa nižjo od vidne svetlobe (74). Fotoni infrardečega sevanja z valovnimi dolžinami od 2.5 do 50 µm imajo dovolj visoko energijo, da vzbudijo nihanja atomov v molekulah. Število možnih nihanj narašča z velikostjo molekule, zato so lahko IR-spektri velikih molekul zelo zapleteni in je tako skoraj nemogoče določiti, kateremu nihanju ustreza določen absorpcijski trak (75).

IR-spekter delimo na tri spektralna območja, in sicer bližnje (*ang. near*) (14000 – 4000 cm⁻¹), srednje (*ang. middle*) (4000 – 400 cm⁻¹) in daljno (*ang. far*) območje (400 – 100 cm⁻¹). Srednje IR območje delimo na dva dela, in sicer na območje funkcionalnih skupin (4000 – 1200 cm⁻¹) in območje prstnih odtisov (*ang. finger print*) (1200 – 400 cm⁻¹) (76).

V farmacevtski industriji IR-spektroskopija služi za identifikacijo molekul, funkcionalnih skupin, strukturno analizo, spremljanje kemijskih reakcij in kvantitativno analizo (76).

Obstaja več tipov spektrometrov. Največkrat pa uporabljamo FT-IR (Fourier Transform Infrared)-spektrometre, ki za analizo uporabljajo tehniko Fourierove transformacije. Glavni del FT-IR-spektrometra je interferometer, ki je sestavljen iz treh glavnih komponent, in sicer razdelilca žarka (*ang. beamsplitter*), fiksnega in premičnega zrcala. Iz interferograma, ki ga dobimo med meritvijo, nato z matematičnim procesom Fourierove transformacije dobimo spekter, ki predstavlja energijo kot funkcijo frekvence. IR spekter nam pokaže značilno frekvenco, ki pove ali v molekuli obstaja določena vez ali pa funkcionalna skupina (76). V IR-spektrih namesto valovne dolžine največkrat uporabljamo valovno število (V), ki je recipročna vrednost valovne dolžine, izražena v cm⁻¹ (75).

3.3.6. MONOKRISTALNA RENTGENSKA DIFRKACIJA

Monokristalna rentgenska difrakcija (SCXRD) je glavna analizna tehnika za določevanje struktur trdnih kristaliničnih snovi. Je nedestruktivna analizna tehnika, ki nam poda podrobno informacijo o notranji zgradbi kristaliničnih snovi, kar vključuje parametre osnovne celice kristala, kot so dimenzije osnovne celice, oblika osnovne celice, položaja atomov v osnovni celici, itd. (77).

Monokristalni difraktometer je tako kot difraktometer za rentgensko praškovno difrakcijo sestavljen iz rentgenske cevi, nosilca vzorca in detektorja. Za monokristalno rentgensko difrakcijo uporabljamo monokromatske rentgenske žarke, pridobljene ob izbijanju elektronov iz K lupine (K_{a1} in K_{a2}). Valovna dolžina rentgenskih žarkov je odvisna le od anodnega materiala, ki je pri SCXRD najbolj pogosto Mo z valovno dolžino K α =0,7107 Å, redkeje pa tudi Cu z valovno dolžino K α =1,5419 Å. Na sliki 16 je shematsko prikazan monokristalni difraktometer s štirimi gniometrskimi glavami. Te štiri glave predstavljajo štiri kote (2 Θ , χ , Φ , Ω), ki definirajo razmerje med kristalno mrežo, primarnim žarkom in detektorjem (77).



Slika 16: Shematski prikaz zgradbe monokristalnega difraktometra (prirejeno po 77).

Za SCXRD so primerni le nepoškodovani, optično čisti kristali dimenzij 150 – 250 µm. Za analizo lahko uporabimo tudi lomljeni delci večjega monokristala (77).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. PRIPRAVA VZORCEV

4.1.1. K-2014 v DMSO

Modelno zdravilno učinkovino K-2014 smo pri sobni temperaturi raztopili v DMSO v koncentraciji 300 mg/ml. Z mikropipeto smo nato napolnil vdolbine na mikrotitrni plošči. Vzeli smo po 100 µl ZU, raztopljene v DMSO, ter dodali še 100 µl izbranega protitopila. Protitopila smo dodajali v vrstnem redu, kot je prikazano v preglednici IV. Tako pripravljeno disperzijo ZU na mikrotitrni plošči smo nato vzdrževali pri 25° C in 40 % relativni vlažnosti (RV) 24 h, da so topila odparela.

Preglednica IV: Seznam dodatnih protitopil.

	Α	В	С	D	Ε	F	G	Η
1	dietilketon	Toluen	Heksan	cikloheksan	1-HeOH	klorobenzen	THF	slepa*
2	EtAc	BuAc	MIBK	diklorometan	dikloroetan	acetonitril	Aceton	Heptan
3	dest. H2O	EtOH (96%)	EtOH (abs.)	МеОН	1-PrOH	2-PrOH	2-BuOH	1-BuOH

*- kot vzorec slepe smo označili raztopino K-2014 v topilu brez dodatka protitipila.

4.1.2. K-2014 v KLOROFORMU

Modelno zdravilno učinkovino smo pri sobni temperaturi raztopili v kloroformu v koncentraciji 50 mg/ml. Z mikropipeto smo nato napolnil vdolbine na mikrotitrni plošči. Vzeli smo po 100 μ l ZU raztopljene v kloroformu ter dodali še 100 μ l izbranega protitopila. Protitopila smo dodajali v vrstnem redu kot je prikazano v preglednici IV. Tako pripravljeno disperzijo na mikrotitrni plošči smo nato vzdrževali pri 25° C in 40 % RV 4 h, da so topila odparela.

4.1.3. K-2014 v 1-PrOH

Modelno zdravilno učinkovino smo pri sobni temperaturi raztopili v 1-PrOH v koncentraciji 50 mg/ml. Z mikropipeto smo nato napolnili vdolbine na mikrotitrni plošči. Vzeli smo po 100 µl ZU raztopljene v 1-PrOH ter dodali še 100 µl izbranega protitopila. Protitopila smo dodajali v vrstnem redu kot je prikazano v preglednici IV.

Pripravili smo tri serije poskusov. Pri prvem poskusu smo vzorce pripravljene na mikrotitrni plošči, 4 ure vzdrževali pri 25° C in podtlaku 400 mbar. Pri drugem poskusu smo vzorce pripravljene na mikrotitrni plošči 2 uri vzdrževali pri 25° C ob konstantnem prepihovanju z dušikom. V tretjem poskusu pa smo vzorce pripravljene na mikrotitrni plošči za 2 dni izpostavil 7° C in 70 % RV (pogoji v hladilniku).

4.1.4. K-2014 v ACETONU

Modelno zdravilno učinkovino smo pri sobni temperaturi raztopili v acetonu v koncentraciji 44 mg/ml. Z mikropipeto smo nato napolnil vdolbine na mikrotitrno plošči. Vzeli smo po 100 μ l ZU, raztopljene v acetonu, ter dodali še 100 μ l izbranega protitopila. Protitopila smo dodajali v vrstnem redu, kot je prikazano v preglednici IV. Tako pripravljeno disperzijo ZU na mikrotitrni plošči smo nato vzdrževali pri 25° C in 40 % RV 4 h, da so topila odparela.

4.1.5. PRIPRAVA NOVE KRISTALNE OBLIKE MP1

V 100 ml čašo smo natehtali 200 mg ZU K-2014 in jo pri sobni temperaturi raztopili v 4 ml 1-PrOH. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo dodali 4 ml protitopila 1-HeOH. Čašo smo nato postavili pod vakuumsko odsesovanje (vakuum 400 mbar), s čimer smo pospešili izhajanje topil. Po 24 urnem odsesovanju so v čaši izpadli kristali, ki po rentgenski analizi predstavljajo obliko MP1.

4.1.6. PRIPRAVA NOVE KRISTALNE OBLIKE MP2

V 100 ml čašo smo natehtali 200 mg ZU K-2014 in jo pri sobni temperaturi raztopili v 4 ml 1-PrOH. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo dodali 4 ml protitopila 1-HeOH.

Čašo smo nato 48 ur prepihovali z N₂. Izpadli kristali po rentgenski analizi predstavljajo obliko MP2.

4.1.7. PRIPRAVA MONOKRISTALOV OBLIKE MP1

V 100 ml čašo smo natehtali 200 mg ZU K-2014 in jo pri sobni temperaturi raztopil v 4 ml 1-PrOH. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo dodali 4 ml protitopila 1-HeOH. Čašo smo pokrili s parafilmom, v katerega smo naredili nekaj luknjic. Po 1 tednu so iz raztopine izpadli večji kristali. Nekaj kristalov smo z namenom preveritve kristalne oblike zdrobili v terilnici, prah pa analizirali na XRPD. Z rentgensko analizo smo potrdili, da izpadli kristali predstavljajo obliko MP1.

4.2. ANALIZNE METODE

4.2.1. PRIPRAVA VZORCEV ZA XRPD V REFLEKSIJSKI TEHNIKI

Majhno količino vzorca (~10 mg) smo na tanko nanesli na Si-rezino. Vzorec smo analizirali z uporabo θ - θ geometrije v kotnem območju med 3 in 32,5° 2 θ . Integracijski čas ob uporabi detektorja X`Celerator je bil 100 s in koraku 0,033° 2 θ . Napetost na rentgenski cevi je znašala 45 kV, tok pa 40 mA. Celotni čas snemanja je bil 11 minut.

4.2.2. PRIPRAVA VZORCEV ZA XRPD V TRANSMISIJSKI TEHNIKI

Mikrotitrno ploščo s 96 fitrnimi vdolbinami smo namestil na nosilec le-te. S programom za krmiljenje difraktometra smo višino mikrotitrne plošče prilagodil tako, da ob analizi standarda Si-prahu v difraktogramu nismo zaznali premika uklonov.

Vzorce smo analizirali z uporabo 2θ geometrije v kotnem območju med 3 in 32,5° 2θ. Integracijski čas ob uporabi detektorja PIXcel je bil 30 s in koraku 0,026° 2θ. Napetost na rentgenski cevi je znašala 45 kV, tok pa 40 mA. Posamezno filtrno vdolbino smo snemali po trikrat s t.i. »wobble scanom«, pri katerem se mikrotitrna plošča ves čas premika po Xsmeri. S tem smo dosegli, da smo posneli celotno filtrno vdolbino. Eno snemanje je trajalo 2,5 minute, skupni čas snemanja ene vdolbine pa je bil 7,5 minute.

4.2.3. PRIPRAVA VZORCEV ZA DSC-ANALIZO

Vzorec z maso ~3 mg smo natehtali v 40 μ l aluminijaste lončke. Analiza je potekala v inertni atmosferi pri konstantnem pretoku N₂ 40 ml/min. Hitrost segrevanja je bila 10° C/min.

4.2.4. PRIPRAVA VZORCEV ZA TG-MS-ANALIZO

Vzorec z maso ~10 mg smo natehtali v 100 μ l aluminijaste lončke. Analiza je potekala v inertni atmosferi pri konstantnem pretoku N₂ 40 ml/min. Hitrost segrevanja je bila 10° C/min.

4.2.5. PRIPRAVA VZORCEV ZA SEM-ANALIZO

Vzorec smo v tanki plasti nanesli na aluminijast nosilec, na katerega smo predhodno nalepili dvostransko prevodno karbonsko folijo, ki ima tako kot nosilec lastnost elektrostatične nevtralnosti. Skupaj z nosilcem vzorcev v komori tvorijo prevodnika, kar onemogoča ustvarjanje električnega naboja na površini vzorca.

Produkcija slik je potekala pri pospeševalni napetosti 1,00 kV in delovni razdalji nad 3,5 mm. Tlak v komori je bi vedno pod 1x 10^{-4} mbar. Za detektor elektronov smo uporabili SE2-detektor, ki zaznava sekundarne elektrone, ki so emitirani z relativno nizko energijo iz površine vzorca.

4.2.6. PRIPRAVA VZORCEV ZA IR-ANALIZO

Vzorce smo v terilnici pomešali in homogenizirali s KBr in jih na hidravlični stiskalnici stisnili v tabletko. Sila stiskanja je bila 10 ton. FT-IR spektre smo posneli v območju 4000 do 400 cm⁻¹ pri resoluciji 4 cm⁻¹.

4.2.7. PRIPRAVA VZORCA ZA SCXRD

Kristal za analizo smo izbrali pod stereomikroskopom in ga z vakuumsko pasto nalepili na stekleno nitko, kot je prikazano na sliki 17. Manjši kristalček, ki je viden na sliki 17 na

vrhu, je sicer motnja, ki pa na samo analizo nima vpliva. Kristal je bil med analizo z napravo CryoJet XL ohlajen na 150 K. Analizo smo izvedli na monokristalnem difraktometru Agilent SuperNova z detektorjem Atlas CCD ob uporabi Mo K α svetlobe (λ = 0.71073 Å) v kotnem območju med 5,6 in 70,62° 2 Θ .



Slika 17: Izbrani kristal K-2014 oblike MP1 za monokristalno rentgensko difrakcijo.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pojavne oblike ZU K-2014 so v literaturi večinoma opisane le s XRPD-analizami. Za širši in bolj poglobljen vpogled v lastnosti posameznih pojavnih oblik smo tako izhodiščno obliko ZU K-2014 kot tudi novo nastale pojavne oblike okarakterizirali še z ostalimi analiznimi tehnikami.

5.1. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA IZHODIŠČNE ZU K-2014

Z XRPD, DSC in FT-IR smo ugotovili, da izhodiščna oblika ZU predstavlja v literaturi znano in opisano obliko I ZU K-2014, kar je prikazano slikah 18 do 20.

Na sliki 18 vidimo, da se praškovni difraktogram vzorca izhodiščne oblike K-2014 popolnoma ujema z difraktogramom K-2014 oblike I, ki je izračunan iz strukturnih podatkov. V difraktogramu ne ugotovimo dodatnih uklonov katere od ostalih pojavnih oblik K-2014.



Slika 18: Praškovni difraktogram ZU K-2014 primerjalno na difraktogram oblike I, ki je izračunan iz strukturnih podatkov.

Iz DSC-krivulje na sliki 19 v območju med 180 in 185° C opazimo talilni vrh, ki predstavlja taljenje ZU K-2014 oblike I ter rekristalizacijo v obliko II. K-2014 oblika II se nato pri ~195° C tali, kar se na DSC-krivulji na sliki 19 odraža v izrazitem talilnem vrhu.



Slika 19: DSC-krivulja izhodiščne oblike ZU K-2014.

Tudi z FT-IR-analizo ugotovimo, da se izhodiščna oblika K-2014 ujema s standardom za K-2014 oblike I, kar je prikazano na sliki 20. V spektru ni prisotnih dodatnih vrhov, ki bi nakazovali na primesi drugih pojavnih oblik K-2014.



Slika 20: IR-spekter izhodiščne ZU K-2014 primerjalno na standard oblike I.

Morfološko analizo vzorca smo izvedli z vrstično elektronsko mikroskopijo. Iz posnetih slik 21 in 22 je jasno razvidno, da so primarni delci stebričastih oblik in ostrih robov.

Primarne delce smo fizikalno okarakteriziral s pomočjo programa Analaysis (program za obdelavo slik) in ocenili velikost primarnih delcev na ~10 μ m, maksimalno do 45 μ m. Delci so večinoma sprijeti v skupke, katerih maksimalna velikost je 300 μ m.



Sliki 21, 22: SEM-slike izhodiščne ZU K-2014 pri 500x in 1000x povečavi.

Izhodiščna oblika K-2014 je torej polimorfno čista. Z nobeno izmed analiznih tehnik namreč nismo ugotovili prisotnost drugih pojavnih oblik, ki bi lahko kot nečistoče vplivale na potek kristalizacij pri visokozmogljivem rešetanju ZU K-2014.

5.2. VISOKOZMOGLJIVO REŠETANJE ZU K-2014

ZU K-2014 smo raztopili v topilih, v katerih je le-ta dobro topna. Kot protitopila smo izbrali topila, ki jih pri proizvodnji ZU pogosteje uporabljajo in ki ne poškodujejo mikrotitrnih plošč.

5.2.1. KRISTALIZACIJA K-2014 IZ DMSO

V preglednici V smo zbrali podatke o vplivu protitopila na pojavno obliko K-2014, kristalizirane iz DMSO kot topila.

Preglednica V: Kristalne oblike K-2014, kristalizirane iz raztopine v DMSO v odvisnosti od dodanega protitopila.

PROTITOPILO	IZPADLA KRISTALNA OBLIKA
destilirana H ₂ O	monohidrat
EtOH (96%)	monohidrat

EtOH (absolutni)	monohidrat
MeOH	monohidrat
1-PrOH	monohidrat
2-PrOH	monohidrat
1-BuOH	monohidrat
2-BuOH	monohidrat
EtAc	monohidrat
BuAc	monohidrat
MIBK	monohidrat
Diklorometan	monohidrat
Dikloroetan	monohidrat
Acetonitril	monohidrat
Aceton	monohidrat
Heptan	monohidrat
Dietilketon	monohidrat
Toluen	monohidrat
Heksan	monohidrat
Cikloheksan	monohidrat
1-HeOH	monohidrat
Klorobenzen	monohidrat
THF	monohidrat
brez protitopila	monohidrat

Iz rezultatov visokozmogljivega polimorfnega rešetanja vidimo, da vseh primerih dobimo enako, monohidratno obliko modelne ZU K-2014 in da ta izpade tudi v primeru, kjer protitopila ne dodamo (slepa), zato lahko sklepamo, da do interakcije med protitopilom in ZU v nobenem primeru ne pride. Na sliki 23 je primerjalno prikazan difraktogram vzorca kristalizacije iz DMSO brez dodatka protitopila in pozicije uklonov monohidratne oblike K-2014 iz patentne prijave št. 8 (28). Ob primerjavi difraktograma na patentne podatke vidimo, da se intenzitete uklonov v difraktogramu glede na intenzitete uklonov iz patentne prijave precej razlikujejo. To je posledica preferenčne orientacije kristalov monohidratne oblike v vzorcu. Še bolj nazorno je vpliv preferenčne orientacije prikazan na sliki 24, kjer so predvsem pri primeru, kjer smo kot protitopilo uporabili diklorometan močneje izraženi le nekateri ukloni monohidratne oblike, medtem ko ostalih v difraktogramu praktično ne vidimo. Do pojava preferenčne orientacije pride predvsem takrat, ko so kristali zelo veliki in so določene kristalne ravnine bolj zastopane in izpostavljene difrakciji kot druge. Preferenčno orientacijo lahko zmanjšamo z mletjem kristalov, kar pa seveda pri kristalizaciji na mikrotitrnih ploščah ni mogoče.



Slika 23: Primerjava difraktograma K-2014 vzorca slepe na uklone monohidratne oblike iz patentne prijave št.8.



Slika 24: Vpliv preferenčne orientacije kristalov monohidratne oblike K-2014 na difraktogram vzorca.

5.2.2. KRISTALIZACIJA K-2014 IZ KLOROFORMA

Rezultati rentgenskega visokozmogljivega polimorfnega rešetanja K-2014, kristalizirane iz raztopine v CHCl₃, so podani v preglednici VI.

Preglednica VI: Kristalne oblike K-2014, kristalizirane iz raztopine v kloroformu v odvisnosti od dodanega protitopila.

PROTITOPILO	IZPADLA KRISTALNA OBLIKA
destilirana H ₂ O	dihidrat E
EtOH (96%)	dihidrat E
EtOH (absolutni)	dihidrat E
МеОН	/*
1-PrOH	dihidrat E
2-PrOH	/
1-BuOH	/
2-BuOH	/
EtAc	/
BuAc	dihidrat E
MIBK	sledi dihidrat E
Diklorometan	dihidrat E + sledi MP1
Dikloroetan	MP1 + sledi dihidrat E
Acetonitril	/
Aceton	/
Heptan	sledi dihidrat E
Dietilketon	/
Toluen	/
Heksan	dihidrat E
Cikloheksan	dihidrat E
1-HeOH	sledi dihidrat E
Klorobenzen	/
THF	/
brez protitopila	/

*- / pomeni da v difraktogramu ni odzivov, značilnih za amorfno ali kristalinične oblike ZU.

Iz rezultatov polimorfnega HTS K-2014, raztopljene v kloroformu, vidimo, da pri polovici vzorcev v difraktogramih ugotovimo le uklone K-2014 oblike dihidrat E, ki je opisana v patentni prijavi št. 6 (26) ter članku št. 2 (59). V literaturi je sicer opisanih pet oblik dihidrata K-2014. Od teh petih je prav oblika dihidrat E med termodinamsko najmanj stabilnimi in s časoma prehaja v termodinamsko stabilno brezvodno obliko II K-2014. Ukloni oblike dihidrat E so v nekaterih difraktogramih dobro izraženi, medtem ko so pri ostalih vidni le najbolj karakteristični ukloni. Na sliki 25 je prikazana primerjava

difraktograma vzorca, kjer so ukloni oblike dihidrat E dobro izraženi, in difraktograma vzorca, kjer sta vidna le najbolj karakteristična uklona, na difraktogram K-2014 oblike dihidrat E, ki je bil izračunan iz strukturni podatkov. Iz difraktogramov na sliki 25 vidimo tudi, da je vpliv preferenčne orientacije na difraktogram vzorca v tem primeru zanemarljiv, saj se difraktogram vzorca, pri katerem so kot protitopilo uporabili heksan, tudi po intenzitetah uklonov ujema z intenzitetami iz difraktograma izračunanega iz strukturnih podatkov. V zelenem difraktogramu na sliki 25 vidimo, da je ozadje precej višje kot pri ostalih dveh vzorcih. Dvignjeno ozadje ni amorfna faza K-2014 ampak pripada instrumentalnemu ozadju, ki ga dobimo, če posnamemo prazno filtrno vdolbino. Ko govorimo o sledeh določne faze v difraktogramu imamo v mislih le nekaj nizko intenzivnih uklonov, ki so običajno najbolj karakteristični ukloni določene kristalne oblike.



Slika 25: Primerjava difraktogramov K-2014 oblike dihidrat E na difraktogram oblike dihidrat E izračunan in strukturnih podatkov.

Pri analizi vzorcev, pri katerih smo kot protitopilo dodali diklorometan in dikloroetan, ugotovimo uklone nove, neznane kristalne oblike (MP1). K-2014 oblika MP1 je v vzorcih, pri katerih smo kot protitopilo uporabili diklorometan in dikloroetan, prisotna zmesi z obliko dihidrat E, kar je prikazano tudi na sliki 26. Pri poskusu, kjer smo kot protitopilo uporabili diklorometan, je oblika MP1 prisotna v sledeh, medtem ko je njen delež v vzorcu, kjer je bil kot protitopilo uporabljen dikloroetan, njen delež precej višji. Ukloni

oblike MP1 so na sliki 26 označeni z zelenimi črtami. V obeh difraktogramih vzorec zopet opazimo dvignejo ozadje. Tudi v tem primeru je to posledica instrumentalnega ozadja.



Slika 26: Difraktograma vzorcev K-2014 zmesi oblike dihidrat E in oblike MP1 primerjalno na difraktogram oblike dihidrat E.

Iz rezultatov rentgenskega polimorfnega HTS K-2014, raztopljene v kloroformu, vidimo tudi, da pri določenih poskusih odzivov v difraktogramih ne dobimo oz. se ti v difraktogramih kažejo le kot instrumentalno ozadje, kar je prikazano na primeru na sliki 27. Do tega je verjetno prišlo, ker je ZU kristalizirala hitro in v zelo tankem sloju po celotni filtrni vdolbini. Zaradi hitre kristalizacije je ZU verjetno izpadla v amorfni obliki, katere pa zaradi njene majhne količine in porazdelitve po celotni površini filtrne vdolbine v difraktogramu nismo zaznali. Rama na začetku difraktograma pripada primarnemu žarku.



Slika 27: Primerjava difraktograma K-2014, raztopljene v kloroformu, pri uporabi protitopila acetonitril na instrumentalno ozadje.

5.2.3. KRISTALIZACIJA K-2014 IZ 1-PrOH

Glede na to, da pri kristalizacijah iz DMSO in CHCl₃ nismo ugotovili novih kristalnih oblik, oziroma je ta izpadla le v dveh primerih, pa še to v zmeseh s K-2014 obliko dihidrat E, smo pri kristalizaciji iz 1-PrOH poskusili z drugačnimi načini odstranjevanja topil iz filtrnih vdolbin.

Rezultati rentgenskega visokozmogljivega polimorfnega rešetanja ZU, raztopljene v 1-PrOH, so podani v preglednicah VII, VIII in IX.

Preglednica VII: Kristalne oblike K-2014, raztopljene v 1-PrOH, v odvisnosti od dodanega protitopila pri sušenju mikrotitrne plošče pri 25° C 4 h pri podtlaku 400 mbar.

PROTITOPILO	IZPADLA KRISTALNA OBLIKA
destilirana H ₂ O	dihidrat E
EtOH (96%)	dihidrat E
EtOH (absolutni)	dihidrat E
MeOH	dihidrat E
1-PrOH	dihidrat E
2-PrOH	dihidrat E
1-BuOH	dihidrat E
2-BuOH	dihidrat E
EtAc	dihidrat E
BuAc	dihidrat E

MIBK	dihidrat E
Diklorometan	dihidrat E
Dikloroetan	dihidrat E + MP1
Acetonitril	dihidrat E
Aceton	dihidrat E
Heptan	dihidrat E
Dietilketon	dihidrat E
Toluen	dihidrat E
Heksan	dihidrat E
Cikloheksan	dihidrat E
1-HeOH	MP1
Klorobenzen	dihidrat E
THF	sledi dihidrata E
brez protitopila	dihidrat E

Pri večini poskusov smo v difraktogramih ugotovili le uklone literaturno znane polimorfne oblike dihidrat E ZU K-2014. Izjemi sta bila vzorca, pri katerih smo kot protitopilo uporabili dikloroetan in 1-HeOH. V teh dveh primerih v difraktogramu ugotovimo uklone neznane kristalne oblike MP1, ki je pri uporabi protitopila dikloroetan prisotna v zmesi z K-2014 obliko dihidrat E, medtem ko je v pri uporabi protitopila 1-HeOH polimorfno čista, kar je prikazano na sliki 28. Iz difraktograma K-2014 oblike MP1 vidimo, da je kristaliničnost vzorca precej visoka. Poleg tega v difraktogramu vidimo tudi, da je prvi uklon na $6,4^{\circ}$ 2 Θ , glede na ostale uklone močneje izražen. To je lahko posledica zrnatosti vzorca, manj verjetno pa preferenčne orientacije kristalov. V primeru preferenčne orientacije bi se morali bolj intenzivni ukloni nekajkrat pojaviti v celotnem difraktogramu kot mnogokratniki prvega uklona in kot predstavniki ene kristalne ravnine.



Slika 28: Primerjava difraktograma K-2014 oblike MP1 na difraktogram oblike dihidrat E.

PROTITOPILO	IZPADLA KRISTALNA OBLIKA		
destilirana H ₂ O	dihidrat E		
EtOH (96%)	dihidrat E		
EtOH (absolutni)	dihidrat E		
МеОН	dihidrat E		
1-PrOH	dihidrat E		
2-PrOH	dihidrat E		
1-BuOH	sledi dihidrata E		
2-BuOH	sledi dihidrata E		
EtAc	dihidrat E		
BuAc	sledi dihidrata E		
MIBK	sledi dihidrata E		
Diklorometan	dihidrat E		
Dikloroetan	dihidrat E		
Acetonitril	dihidrat E		
Aceton	dihidrat E		
Heptan	dihidrat E		
Dietilketon	/		
Toluen	sledi dihidrata E		
Heksan	dihidrat E		
Cikloheksan	sledi dihidrata E		
1-HeOH	MP1		
Klorobenzen	sledi dihidrata E		

Preglednica VIII: Kristalne oblike K-2014, raztopljene v 1-PrOH, v odvisnosti od dodanega protitopila pri sušenju mikrotitrne plošče pri 25° C 24 h pod N₂.

THF	/
brez protitopila	dihidrat E

Pri večini poskusov smo v difraktogramih ugotovili le uklone literaturno znane polimorfne oblike dihidrat E ZU K-2014. Izjema je vzorec, kjer smo kot protitopilo uporabili 1-HeOH. Difraktogram tega vzorca predstavlja K-2014 obliko MP1. V primerih, kjer smo ugotovili le sledi K-2014 oblike dihidrat E, je ostali del difraktograma predstavljalo instrumentalno ozadje.

Preglednica IX: Kristalne oblike K-2014, raztopljene v 1-PrOH, v odvisnosti od dodanega protitopila pri odhlapevanju topil iz mikrotitrne plošče pri 7° C 70 % RV 2 dni (pogoji v hladilniku).

PROTITOPILO	IZPADLA KRISTALNA OBLIKA	
destilirana H ₂ O	dihidrat E	
EtOH (96%)	dihidrat E	
EtOH (absolutni)	dihidrat E	
MeOH	dihidrat E	
1-PrOH	dihidrat E	
2-PrOH	dihidrat E	
1-BuOH	dihidrat E	
2-BuOH	dihidrat E	
EtAc	dihidrat E	
BuAc	dihidrat E	
MIBK	dihidrat E	
Diklorometan	dihidrat E	
Dikloroetan	dihidrat E + sledi MP1	
Acetonitril	dihidrat E	
Aceton	dihidrat E	
Heptan	dihidrat E	
Dietilketon	dihidrat E	
Toluen	dihidrat E	
Heksan	dihidrat E	
Cikloheksan	dihidrat E	
1-HeOH	MP1 + dihidrat E	
Klorobenzen	dihidrat E	
THF	/	
brez protitopila	dihidrat E	

Pri večini poskusov smo v difraktogramih ugotovili le uklone v literaturi znane pojavne oblike dihidrat E ZU K-2014. V difraktogramu vzorca, kjer smo kot protitopilo uporabili 1-HeOH, poleg uklonov oblike dihidrat E, ugotovimo še uklone K-2014 oblike MP1, ta je

v sledeh prisotna tudi v difraktogramu vzorca, kjer smo kot protitopilo uporabili dikloroetan.

5.2.4. KRISTALIZACIJA K-2014 IZ ACETONA

Rezultati rentgenskega polimorfnega rešetanja ZU, raztopljene v acetonu, so podani v preglednici X.

Preglednica X: Kristalne oblike K-2014, raztopljene v acetonu, v odvisnosti od dodanega protitopila pri odparevanju topil iz mikrotitrne plošče pri 25° C 40 % RV 24 h.

PROTITOPILO	IZPADLA KRISTALNA OBLIKA		
destilirana H ₂ O	dihidrat E		
EtOH (96%)	dihidrat E		
EtOH (absolutni)	etanol solvat		
MeOH	dihidrat E		
1-PrOH	metanol solvat		
2-PrOH	dihidrat E		
1-BuOH	dihidrat E		
2-BuOH	sledi dihidrata E		
EtAc	sledi dihidrata E		
BuAc	dihidrat E		
MIBK	dihidrat E		
Diklorometan	dihidrat E		
Dikloroetan	dihidrat E + sledi MP1		
Acetonitril	dihidrat E		
Aceton	dihidrat E		
Heptan	dihidrat E		
Dietilketon	/		
Toluen	dihidrat E		
Heksan	dihidrat E		
Cikloheksan	dihidrat E		
1-HeOH	MP1		
Klorobenzen	dihidrat E		
THF	/		
brez protitopila	dihidrat E		

Pri poskusih, kjer smo ZU K-2014 raztopili v acetonu, je po dodatku protitopil izpadlo največ različnih kristalnih oblik. Pri kristalizaciji, pri kateri smo kot protitopilo uporabili MeOH, je izpadla literaturno znana oblika K-2014 metanolnega solvata. Pri kristalizaciji, pri kateri smo kot protitopilo uporabili absolutni etanol, pa je izpadla K-

2014 oblika etanolni solvat, ki je prav tako že poznana v literaturi. Za metanolni solvat je v literaturi rešena tudi struktura, tako da smo iz nje lahko izračunali difraktogram, le-tega pa primerjali na difraktogram izmerjenega vzorca po polimorfnem HTS. Izmerjen difraktogram etanolnega solvata smo primerjali na uklone za etanolni solvat iz patentne prijave št. 1 (21). Primerjave difraktogramov so podane na slikah 29 in 30. Iz primerjav lahko vidimo, da se izmerjena difraktograma dobro ujemata z literaturnimi podatki. V difraktogramu etanolnega solvata okoli prvega uklona opazimo večje število nižje intenzivnih uklonov. Ti ukloni so lahko posledica neenakomerne kristalizacije vzorca na stenah in robovih filtrne vdolbine na mikrotitrni plošči, kar ima za posledico premaknjene uklone v difraktogramu.



Slika 29: Primerjava izmerjenega difraktograma K-2014 MeOH solvata na difraktogram izračunan iz strukturnih podatkov.



Slika 30: Primerjava izmerjenega difraktograma K-2014 EtOH solvata na pozicije uklonov EtOH solvata iz patentne prijave št.1.

Iz rezultatov visokozmogljivega polimorfnega rešetanja ZU K-2014 lahko vidimo, da v večini primerov izpadejo hidratne (monohidrat, dihidrat E) oblike ZU K-2014. Ti dve obliki sta termodinamsko metastabilni in sta namenjeni, kot je opisano v literaturi (patentni prijavi št. 6 in 8), kot intermediata za pripravo termodinamsko stabilne brezvodne oblike II. S tem smo samo potrdili dejstvo, da pri kristalizaciji najprej izpadejo termodinamsko manj stabilne oblike, ki nato s časom in pod ustreznimi pogoji prehajajo v termodinamsko bolj stabilne.

Poleg literaturno znanih hidratnih (monohidrat, dihidrat E) in solvatnih oblik (EtOH solvat, MeOH solvat) nam je z visokozmogljivim rešetanjem uspelo pridobiti še eno novo, v literaturi neznano kristalno obliko modelne ZU K-2014, ki smo jo poimenovali MP1. K-2014 obliko MP1 smo uspeli izolirati iz treh topil, in sicer diklorometana (prisotna v sledeh) in dikloroetana, kjer jo ugotovimo v zmesi z obliko dihidrat E ter iz 1-HeOH, kjer je prisotna kot čista pojavna oblika. Glede na to, da K-2014 obliko MP1 ugotovimo pri kristalizaciji iz treh različnih topil, lahko v tem primeru govorimo o izostrukturnih pojavnih oblikah.

Glede na to, da smo pri HTS uporabili tako polarna kot nepolarna topila in protitopila, smo s primerjavo njihovih lastnosti, kot so dielektrična konstanta, polarnost/nepolarnost, topnostni parametri, itd., poskusili predvideti njihov vpliv na nastanek določenih oblik oz. poskusili pojasniti, zakaj je bila pri nekaterih poskusih kristalizacija bolj, pri drugih pa manj uspešna. Ob primerjavi parametrov nismo ugotovili nekih konkretnih lastnosti oz. zakonitosti, s katerimi bi lahko te razlike pojasnili.

Obliko MP1 smo nato z namenom podrobnejše fizikalne karakterizacije pripravili še v večjem merilu, prav tako pa nam je za to obliko uspelo pripraviti tudi kristale, ki so bili dovolj veliki in obstojni, da smo na njih lahko izvedli analizo na monkristalnem difraktometru.

5.3. FIZIKALNA KARAKTERIZACIJA NOVIH KRISTALNIH OBLIK ZU K-2014

5.3.1. SEM-ANALIZA DELCEV K-2014 OBLIKE MP1

S SEM-analizo vzorca K-2014 oblike MP1 smo ugotovili, da so delci le-te ploščatih oblik in nekoliko zaobljenih robov. Primarni delci so večji kot pri vzorcu izhodiščne ZU in smo jih ocenil na ~130 μ m, maksimalno pa do 350 μ m. Delci so po največji ploskvi sprijeti v skupke, maksimalna velikost skupka sega do 1500 μ m, kar je prikazano na slikah 31 in 32. Na slikah 32, 33 in 34 se vidi tudi, da je površina delcev rahlo napokana, kar je posledica izpostavitve vzorca podtlaku v komori vrstičnega elektronskega mikroskopa in izhlapevanju topila iz delcev.



Sliki 31, 32: SEM-slike K-2014 oblike MP1 pri 200x in 500x povečavi.



Sliki 33, 34: SEM-slike K-2014 oblike MP1 pri 1000x povečavi.

Glede na to, da smo pri SEM-analizi opazili, da delci razpokajo kot posledica izhajanja topila, smo s visokotemperaturno rentgensko analizo želeli preveriti, kako izhajanje topila vpliva na spremembo pojavne oblike.

5.3.2. VISOKOTEMPERATURA RENTGENSKA ANALIZA OBLIKE MP1

Vzorec ZU K-2014 oblike MP1 smo z namenom preučitve polimorfnih prehodov izpostavili različnim T, ob tem pa snemali difraktograme. Difraktogram vzorca pri sobnih pogojih (~25 °C, 40 % RV) predstavlja K-2014 obliko MP1. Že ob rahlem segrevanju vzorca na T=30 °C K-2014 oblika MP1 prične prehajati v neznano obliko MP2. Prehod se še pospeši, ko vzorec segrejemo na T=40 °C. Takoj po segrevanju na to T namreč oblika MP1 popolnoma preide v K-2014 obliko MP2, kar je prikazano na sliki 35. Glede na to, da med prehajanjem ene oblike v drugo ne opazimo taljenja, gre v tem primeru za prehod v trdnem (*ang. solid-solid transition*).



Slika 35: Primerjava difraktogramov K-2014 oblik MP1 in MP2.

Karakteristični ukloni obeh oblik so podani v preglednici XI.

ukloni oblike MP1 [° 20]	ukloni oblike MP2 [° 20]
6,4	6,4
11,8	12,1
13,0	12,9
16,5	15,9
18,0	16,7
18,7	17,5
19,3	18,9
19,8	19,5
20,2	20,5
21,0	20,9
23,1	22,5
24,5	25,2
25,3	26,0

Preglednica XI: Karakteristični ukloni oblike MP1 in oblike MP2.

Ob ponovnem ohlajanju na T=25° C K-2014 oblika MP2 že po ~1 uri preide nazaj v obliko MP1. Proces prehajanja oblike MP1 v MP2 in obratno je torej temperaturno pogojen, pri čemer je temperatura prehoda ene oblike v drugo precej nizka.

Vzorec smo nato zopet segrevali. Pri tem smo ugotovili, da je oblika MP2 stabilna vse do $T=60^{\circ}$ C. Na tej T pa oblika MP2 prične prehajati v K-2014 obliko II, ki je termodinamsko

stabilna in se tudi po ohlajanju na sobno temperaturo ne spreminja, kar prikazuje slika 36. Glede na to, da med prehajanjem oblike MP2 v obliko II ne opazimo taljenja, gre tudi v tem primeru za prehod v trdnem.



Slika 36: Prehod K-2014 oblike MP2 v K-2014 obliko II.

Obliki MP1 in MP2 sta torej metastabilni obliki K-2014 in že s segrevanjem pri nižjih T prehajata v termodinamsko stabilno brezvodno obliko II ZU K-2014.

Pri rentgenski analizi vzorca K-2014 oblike MP1 po 1 mesecu iz sobnih pogojev (~ 25° C 50 % RV) smo ugotovili, da je oblika MP1 v tem času popolnoma prešla v K-2014 obliko dihidrat B, ki je objavljena v patentnih prijavah št. 5 in 6 ter članku št. 2. Oblika dihidrat B je nato ob segrevanju na 60° C prešla v termodinamsko stabilno obliko II ZU K-2014.

Z visokotemperaturno rentgensko analizo nam je torej uspelo pripraviti še eno neznano pojavno obliko K-2014, ki smo jo poimenovali MP2. Kljub temu da je oblika izrazito neobstojna, nam jo je uspelo pripraviti tudi v večjem merilu. S takojšno DSC-, TG-MS- in FT-IR-analizo smo uspeli obliko še bolj podrobno okarekterizirati.

5.3.3. DSC-ANALIZA VZORCEV K-2014 OBLIK MP1 in MP2

Na DSC krivulji K-2014 oblike MP1 (modra krivulja) na sliki 37 opazimo tri toplotno pogojene efekte. Prvi, v območju med 70 in 85° C, je posledica izhajanja vode, drugi, v območju med 85 in 120° C, pa predstavlja izhajanje 1-heksanola. Tretji toplotno pogojeni

efekt, v območju med 180 in 195° C, je posledica taljenja K-2014 oblike II. Na DSCkrivulji K-2014 oblike MP2 (črna krivulja) na sliki 37 opazimo le dva toplotno pogojena efekta. Prvi, v območju med 80 in 125° C, predstavlja izhajanje 1-heksanola, drugi, v območju 180 in 195° C, pa je, tako kot v primeru oblike MP1, posledica taljenja K-2014 oblike II.



Slika 37: DSC-krivulje K-2014 oblike MP1 in K-2014 oblike MP2 primerjalno na DSCkrivuljo izhodiščne K-2014.

Ugotovljene toplotne efekte, ki so posledica izhajanja vezanih topil, smo integrirali – številčna vrednost integrala predstavlja toploto, ki jo moramo dovesti v sistem, da se ta efekt zgodi. Pridobljene podatke smo primerjali z izparilnimi entalpijami za vodo in 1-HeOH iz literaturnih podatkov, navedenih v NIST Webbok (78) in so predstavljeni v preglednici XII.

Preglednica XII: Primerjava izmerjenih toplotnih efektov pri segrevanju oblike MP1 in MP2 na literaturne podatke.

	1-HeOH (pri T=120° C)	voda (pri T=80° C)
$\Delta H_{izp.}$ (vrednost iz literature)	480 J/g	2300 J/g
toplota izparevanja (teoretično)	0,3 J	0,3 J
toplota efekta MP1 (eksperimentalno)	0,35 J	0,5 J
toplota efekta MP2 (eksperimentalno)	0,4 J	-

Izmerjene toplote izparevanja vode in 1-HeOH iz oblik MP1 in MP2 se kar dobro ujemajo s teoretičnimi podatki. Višje eksperimentalne vrednosti toplote od teoretičnih lahko razložimo z dodatno energijo (toploto), ki jo moramo dovesti za porušitev solvatne/hidratne strukture/mreže oz. za prekinitev vezi, ki vežejo vodo in topila znotraj kristalne rešetke.

Z DSC-analizo vzorcev K-2014 oblik MP1 in MP2 smo potrdili, da sta obe obliki metastabilni in s segrevanjem prehajata v literaturno znano in termodinamsko najbolj stabilno obliko II K-2014. Glede na to, da na DSC-krivulji v območju med 70 in 120° C opazimo dva izrazita endotermna efekta, nas je v nadaljevanju zanimalo, koliko in v kakšni sestavi se nahajajo topila v vzorcih obeh oblik. Vzorca oblik MP1 in MP2 smo zato preučili še z TG-MS-analizo.

5.3.4. TG-MS-ANALIZA VZORCA K-2014 OBLIKE MP2

Na TG-MS smo analizirali vzorec, ki je po XRPD analizi predstavljal K-2014 obliko MP2. Vsa zaznana izguba mase (~ 23 %) pri TG analizi je posledica izhajanja topila 1-HeOH ($T_{vrel} = 155 - 159$ °C), kar smo potrdili z analizo hlapnih komponent na sklopljenem MS analizatorju. Zelena TG-krivulja na sliki 38 torej predstavlja K-2014 1-HeOH solvat. Eksperimentalno določena vsebnost 1-HeOH se zelo dobro ujema z stehiometrijsko vrednostjo za mono-1-heksanolni solvat, ki znaša 24,6 %.

Vzorec smo nato 4 ure pustili na sobnih pogojih (~ 25° C 45 % RV). Po analizi vzorca iz sobnih pogojev ugotovimo na TG-krivulji dva efekta: prvi efekt (do 90 °C) z izgubo ~ 4,5 % mase in drugi efekt (nad 90° C), pri katerem je izguba mase ~21%. Z MS-analizo hlapnih komponent smo ugotovili, da je prva izguba posledica izhajanja vode, druga izguba pa posledica izhajanja topila 1-HeOH. Modra TG-krivulja na sliki 38 predstavlja K-2014 obliko 1-HeOH solvat hidrat, ki po XRPD analizi predstavlja K-2014 obliko MP1. Eksperimentalno določena vsebnost vode (4,5 %) in 1-HeOH (21,2 %) se dobro ujema s stehiometrijsko vrednostjo za obliko mono-1-HeOH solvat monohidrat, ki znaša 4,2 % vode in 23,6 % 1-HeOH.



Slika 38: TG-krivulji vzorcev K-2014 oblike MP2 v času t=0 in po 4 h na sobnih pogojih.

K-2014 obliki MP1 in MP2 smo nato analizirali še z FT-IR-tehniko.

5.3.5. FT-IR-ANALIZA VZORCEV K-2014 OBLIK MP1 IN MP2

Spektra vzorcev ZU K-2014 oblike MP1 in MP2 se glede na primerjalni spekter izhodne ZU K-2014 razlikujeta, kar je prikazano na sliki 39. Razlike so vidne v območju funkcionalnih skupin in v območju prstnega odtisa.

V območju funkcionalnih skupin je razlika predvsem v delu, kjer so nihanja karakteristična za O-H skupino - $\approx 3400 \text{ cm}^{-1}$ kjer je viden dodaten vrh. Viden je tudi premik vrha - pri 3235 cm⁻¹ (N-H nihanja). Spremembe so vidne tudi v območju med 3050-3010 cm⁻¹, kjer se nahajajo signali za nihanja C-H vezi v aromatih, kar je prikazano na sliki 40. Glede na FT-IR-spektra lahko predpostavimo, da je prišlo do spremembe strukture / sestave. Glede na to, da tudi v spektru oblike MP2 opazimo O-H nihanja, je verjetno K-2014 oblika MP2 vsaj delno že prišla v obliko MP1. Še vedno pa so v obeh spektrih prisotni vrhovi, ki so značilni za tipe vezi oz. funkcionalne skupine ZU K-2014. Glede na to, da v spektrih ne ugotovimo karakterističnih absorpcijskih trakov termodinamsko stabilne oblike II K-2014, lahko sklepamo, da ob pripravi vzorca, pri kateri smo vzorec stisnili v tabletko, ni prišlo do spremembe pojavne oblike ZU.



Slika 39: Primerjava FT-IR-spektrov K-2014 oblik MP1 in MP2 na spekter izhodiščne ZU K-2014.



Slika 40: Primerjava IR-spektrov novih oblik MP1 in MP2 na spekter izhodiščne ZU K-2014 v območju 4000 in 2500 cm⁻¹.

Rahle razlike so vidne tudi med spektri vzorcev, ki smo jih po XRD analizi definirali kot obliki MP1 in MP2. Te razlike so prikazane na sliki 41 v območju med 2500 in 400 cm⁻¹. Spektra obeh oblik imata rahlo nakazane posamezne vrhove na mestu, kjer ima



absorpcijske trakove tudi spekter 1-HeOH. Posamezni vrhovi, ki so vidni v spektrih obeh vzorcev, so v spektru oblike MP1 intenzivnejši.

Slika 41: Primerjava IR spektrov novih oblike MP1 in MP2 med 2500 in 400 cm⁻¹.

Glede na rezultate TG-MS- in FT-IR-analiz lahko sklepamo, da K-2014 oblika MP1 predstavlja mono-1-heksanol solvat monohidrat hidrat ZU K-2014. Glede na to, da nam je uspelo pripraviti tudi dovolj velike kristale, ki so glede na rezultate rentgenske praškovne analize predstavljali K-2014 obliko MP1, smo le-te analizirali še z tehniko monokristalne rentgenske difrakcije.

5.3.6. ANALIZA MONOKRISTALA K-2014 OBLIKE MP1

Z analizo kristala oblike MP1 na monokristalnem difraktometru smo ugotovili, da se v asimetrični enoti poleg ene molekule ZU K-2014 nahaja še ena molekula vode in ena molekula 1-HeOH, kar je prikazano na sliki. K-2014 oblika MP1 je torej mono-1-HeOH solvat monohidrat ZU K-2014. Na molekulo ZU K-2014 je z vodikovo vezjo pripeta molekula 1-HeOH, na katero je nato zopet preko vodikove vezi pripeta molekula vode. Na slikah 42 in 43 je na molekuli 1-HeOH videti tudi nered – heksanolna veriga se zvije na dva načina, ki sta v kristalu zastopana v razmerju približno 50 : 50.



Slika 42: Asimetrična enota K-2014 oblike MP1.



Slika 43: Pakiranje molekul v kristalu K-2014 oblike MP1.

Iz vseh pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da sta obliki MP1 in MP2 solvatni obliki ZU K-2014. Za obliko MP1 lahko potrdimo, da je glede na njene fizikalne lastnostih stehiometrijski solvat K-2014.

6. SKLEP

Kot sledi iz namena naloge, je bil primarni cilj magistrskega dela na izbrani modelni ZU K-2014 vpeljati koncept visokozmogljivega polimorfnega rešetanja v raziskovalni proces. Kot sekundarni cilj smo si postavili podrobno fizikalno karakterizacijo novonastalih kristalnih oblik modelne ZU K-2014.

Pri visokozmogljivem rešetanju smo K-2014 raztopili v več različnih topilih, medtem ko so bila uporabljena protitopila pri vseh kristalizacijah enaka. Na ta način smo dobili 24 različnih sistemov topil. Pri večini kristalizacij so izpadle literaturno znane hidratne (dihidrat E, monohidrat) oblike modelne zdravilne učinkovine K-2014. Poleg hidratnih oblik nam je s HTS uspelo pripraviti še dve literaturno znani solvatni obliki (matanolat in etanolat) in neznano kristalno obliko MP1, pri kateri smo nato ob segrevanju le-te ugotovili njen prehod v novo neznano obliko MP2. Vse izolirane oblike ZU K-2014 so termodinamsko nestabilne in s časoma ali pa ob segrevanju nad 60° C prehajajo termodinamsko stabilno obliko II.

Pri HTS ZU raztopljene v DMSO je vedno izpadla monohidratna oblika K-2014, medtem ko smo pri raztapljanju ZU v kloroformu, 1-propanolu in acetonu od hidratnih oblik vedno dobili enako pojavno obliko, t.j. dihidrat E.

Iz rezultatov HTS ZU, raztopljene v DMSO, v difraktogramih vzorcev opazimo močan vpliv preferenčne orientacije kristalov, kar je posledica različne rasti kristalov v filtrnih vdolbinah mikrotitrnih plošč. Rast kristalov je, glede na to, da so bili vsi ostali pogoji enaki, kot kaže bila odvisna le od tega, katero protitopilo smo uporabili.

Pri HTS ZU, raztopljene v kloroformu, je iz dveh protitopil v zmesi z literaturno znano obliko dihidrat E izpadla tudi neznana oblika MP1. V več primerih HTS ZU raztopljene v kloroformu pa odzivov v difraktogramu nismo dobili. Difraktogrami iz določenih filtrnih vdolbin so se namreč ujemali z difraktogramom instrumentalnega ozadja. To je verjetno posledica hitrega in enakomernega izpadanja K-2014 po celotni filtrni vdolbini v obliki plasti, ki je bila zaradi majhne količine tako tanka, da oborjene substance v samem difraktogramu nismo zaznali niti kot amorfno fazo.

Pri HTS ZU, raztopljene v 1-propanolu, je v večini primerov izpadla K-2014 oblika dihidrat E in to ne glede na to, kakšne pogoje kristalizacije smo uporabili. Izjemo smo ugotovili le pri vzorcih kristalizacije, kjer smo kot protitopili uporabili dikloroetan in 1-heksanol. Pri teh dveh protitopilih je vedno izpadla neznana oblika MP1. Oblika MP1 je v

primeru, kjer smo kot protitopilo uporabili 1-heksanol ter pri »sušenju« mikrotitrnih plošč pri podtlaku 400 mbar ali pod N_2 , bila polimorfno čista, v vseh ostalih primerih pa nastopa v zmesi z obliko dihidrat E.

Polimorfno čisto obliko MP1 smo pri uporabi protitopila 1-heksanol ugotovili tudi pri HTS ZU, raztopljene v acetonu, prav tako je oblika MP1 v zmesi z obliko dihidrat E, v sledeh prisotna tudi pri uporabi protitopila dikloroetan. Pri uporabi protitopil etanol (abs.) in metanol pa izpadeta literaturno znani solvatni obliki K-2014 (etanol in metanol solvat). Z bolj podrobno analizo K-2014 oblike MP1 smo ugotovili, da ta ob segrevanju na 40° C prehaja v obliko MP2, le-ta pa ob ohlajanju prehaja nazaj v obliko MP1. Če smo vzorec segreli nad 60° C, pa oblika MP2 preide v literaturno znano in termodinamsko stabilno obliko II K-2014. Obliko MP2 smo nato uspeli pripraviti tudi v večjem merilu. Izkazalo se je, da je le-ta izrazito neobstojna in že po nekaj minutah na sobnih pogojih preide nazaj v obliko MP1. Nadalinja karakterizacija obeh neznanih oblik je pokazala, da sta obe obliki psevdopolimorfni obliki ZU K-2014. Glede na rezultate TG-MS-analize je oblika MP1 mešani solvat 1-heksanola ter vode, katerih deleži se ujemajo s stehiometričnimi vrednostmi za mono-1-heksanol solvat monohidrat, oblika MP2 pa 1-heksanol solvat, katerega delež se ujema s stehiometrično vrednostjo za mono-1-heksanolni solvat. Da gre pri obliki MP1 za mešani solvat smo potrdili tudi z IR-analizo vzorca. Kristal oblike MP1 smo analizirali tudi na monokristalnem difraktometru. Iz rezultatov monokristalne difrakcije smo rešili strukturo, iz katere se vidi, da se v asimetrični enoti poleg ene molekule ZU K-2014 nahaja še ena molekula 1-heksanola in ena molekula vode. V primeru oblike MP1 gre torej za K-2014 mono-1-heksanol solvat monohidrat s čimer smo potrdili rezultate TG-MS-analize.

Obe novi obliki sta torej metastabilni in s časom prehajata v termodinamsko stabilno obliko II ZU K-2014. Poleg polimorfne nestabilnosti v obeh oblikah predstavlja težavo tudi velika vsebnost topila. Kot heksanolna solvata sta obliki neprimerni za uporabo v farmacevtskih izdelkih tudi s stališča tehnologije.

Visokozmogljivo rešetanje smo uspešno vpeljali v raziskovalni proces. Pri samem delu smo ugotovili, da tehnika HTS, ob ustreznem načrtovanju poskusov, omogoča širok in poglobljen vpogled v polimorfizem izbrane zdravilne učinkovine.

Pri tej magistrski nalogi smo se omejili le na en način kristalizacije, in sicer kristalizacije z uporabo protitopil. Nadaljnje raziskave bi lahko temeljile na uporabi HTS pri drugih načinih kristalizacije in pri iskanju robnih pogojev kristalizacije izbrane pojavne oblike.

7. LITERATURA

- R Hilfiker, F Blatter, M von Raumer: Relevance of Solid-state Properties for Pharmaceutical Products (Chapter 1.). Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry (R Hilfiker), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 1-18
- A Newmann, An overview of solid form screening during drug development.ppt. Seventh St Dev Group 2011
- Miller J M, Collman B M, Greene L R, Grant D J, Blackburn A C: Identifying the stable polymorph early in the drug discovery-development process. Pharm Dev Technol. 2005; 10(2): 291-297
- 4. R Hilfiker, J Berghausen, F Blatter, A Burkhard, S M De Paul, B Freiermuth, A Geoffroy, U Hofmeier, C Marcolli, B Siebenhaar, M Szelagiewicz, A Vit, M von Raumer: Polymorphism: Integrated approach from high-throughput screening to crystallization optimization, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 2003; 73: 429-440
- T L Threlfall: Analysis of organic polymorphs. A review. Analyst 1995; 120: 2435-2460
- 6. Giron D: Thermal analysis and calorimetric methods in the characterisation of polymorphs and solvates. Thermochimica Acta 1995; 248: 1-59
- Haleblian J, McCrone W: Pharmaceutical applications of polymorphism. J Pharm Sci 1969; 58: 911–929
- R Hilfiker, Susan M De Paul, Martin Szelagiewicz: Approaches to Polymorphism Screening (Chapter 11.), Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry (R Hilfiker), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 287-308
- R J Griesser: The importance of solvates (Chapter 8.). Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry (R Hilfiker), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 211-230
- 10. http://www.rsc.org/ej/CE/2008/b717198f/b717198f-f5.gif
- 11. S Petit, G Coquerel: The amorphous state (Chapter 10.). Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry (R Hilfiker), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 259-260.
- 12. http://www2.ul.ie/pdf/280834929.pdf

- http://iepoi.unimb.si/hribersek/Stud_gradivo/Procesna%20tehnika%201/procesna% 20I%20-%20kristalizacija.pdf, 3.4.2014
- 14. S Lohan, D J W Grant: Thermodynamics of Polymorphs (Chapter 2.), Polymorphism: in the Pharmaceutical Industry (R Hilfiker), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 21-43
- 15. http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/06H049/t3.pdf
- 16. http://memo.cgu.edu.tw/lie-ding/particulate.htm
- 17. Llinàs A, Goodman J M: Polymorph control: past, present and future. Drug discovery today 2008; 13: 198-210
- Morissette S L, Almarsson O, Peterson M L, Remenar J F, Read M J, Lemmo AV, Ellis S, Cima M J, Gardner C R: High-throughput crystallization: polymorphs, salts, co-crystals and solvates of pharmaceutical solids. Adv Drug Deliv Rev 2004; 56(3): 275-300
- L M Mayr, D Bojanic: Novel trends in high-throughput screening. Current Opinion in Pharmacology 2009; 9: 580–588
- 20. C J Gilmore, G Barr, J Paisley: High-throughput powder diffraction. I. A new approach to qualitative and quantitative powder diffraction pattern analysis using full pattern profiles. J. Appl. Cryst. 2004; 37: 231-242
- 21. patentna prijava št. 1
- 22. patentna prijava št. 2
- 23. patentna prijava št. 3
- 24. patentna prijava št. 4
- 25. patentna prijava št. 5
- 26. patentna prijava št. 6
- 27. patentna prijava št. 7
- 28. patentna prijava št. 8
- 29. patentna prijava št. 9
- 30. patentna prijava št. 10
- 31. patentna prijava št. 11
- 32. patentna prijava št. 12
- 33. patentna prijava št. 13
- 34. patentna prijava št. 14
- 35. patentna prijava št. 15

- 36. patentna prijava št. 16
- 37. patentna prijava št. 17
- 38. patentna prijava št. 18
- 39. patentna prijava št. 19
- 40. patentna prijava št. 20
- 41. patentna prijava št. 21
- 42. patentna prijava št. 22
- 43. patentna prijava št. 23
- 44. patentna prijava št. 24
- 45. patentna prijava št. 25
- 46. patentna prijava št. 26
- 47. patentna prijava št. 27
- 48. patentna prijava št. 28
- 49. patentna prijava št. 29
- 50. patentna prijava št. 30
- 51. patentna prijava št. 31
- 52. patentna prijava št. 32
- 53. patentna prijava št. 33
- 54. patentna prijava št. 34
- 55. patentna prijava št. 35
- 56. patentna prijava št. 36
- 57. patentna prijava št. 37
- 58. članek št. 1
- 59. članek št. 2
- 60. članek št. 3
- 61. članek št. 4
- 62. članek št. 5
- 63. članek št. 6
- 64. članek št. 7
- 65. članek št. 8
- 66. članek št. 9
- 67. članek št. 10

- 68. C Suryanarayana, M Grant Norton: X-Ray Diffraction A Practical Approach, Plenum Press, New York, 1998
- 69. Wendelandt W W: Thermal Analysis, 3rd edition, Wiley-Interscience, 1986
- 70. E Schwarz, J de Buhr: Collected applications Thermal analysis Pharmaceutical, Mettler Toledo
- http://www.buenastareas.com/ensayos/Masna-Spektrometrija/1068388.html,
 4.4.2014
- 72. M Marinšek: Elektronska mikroskopija, Vaje iz materialov Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2008-2009
- 73. http://www.vcbio.science.ru.nl/en/fesem/eds
- 74. http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared_spectroscopy
- 75. http://www.kii.ntf.uni-lj.si/keminfo/proj/ro03m/ir.htm
- 76. A Sitar Čurin: Študij specialnih FT-IR tehnik za analizo polimernih filmov, Pripravniška naloga, 1993
- 77. http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SXD.html
- 78. http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html

8. PRILOGA

8.1. KRISTALOGRAFSKI PODATKI ZA K-2014 OBLIKO MP1

Instrument	Agilent/SuperNova/Atlas CCD		
Formula	(K-2014)(C ₆ H ₁₃ OH)(H ₂ O)		
Molska masa	432,63		
Temperatura/K	150.00(10)		
Singonija	monoklinska		
Prostorska skupina	P2 ₁ /c		
a/Å	13.4866(3)		
b/Å	12.0948(2)		
c/Å	14.8555(3)		
α/°	90		
β/°	102.082(2)		
$\gamma/^{\circ}$	90		
Volumen/Å ³	2369.53(9)		
Z	6		
$\rho_{calc} mg/mm^3$	1.2126		
m/mm ⁻¹	0.162		
F(000)	936.8		
Dimenzije kristala/mm ³	0,2 imes 0,2 imes 0,02		
Radiacija	Mo K α ($\lambda = 0.71073$)		
Območje merjenja 2□	5.6 to 60.72°		
Območja indeksov	-17 \leq h \leq 19, -17 \leq k \leq 15, -20 \leq l \leq 20		
Izmerjenih uklonov	24346		
Neodvisnih uklonov	6439 [$R_{int} = 0.0393$, $R_{sigma} = 0.0378$]		
Podatki/omejitve/parametri	6439/0/315		
Kakovost ujemanja na F ²	1.080		
Končni R indeksi [I>=2 σ (I)]	$R_1 = 0.0508, wR_2 = 0.1186$		
Končni R indeksi [vsi podatki]	$R_1 = 0.0749, wR_2 = 0.1386$		
Največji diferenčni mx./luknja/ e Å ⁻³ 0.49/-0.30			

Frakcijske koordinate atomov in izotropni atomski parametri odmika

Atom	x	у	z	U(eq)
S 1	500.9(3)	4065.3(3)	2939.1(3)	27.65(12)
N21	1577.8(11)	8189.5(11)	-356.8(10)	26.8(3)
C2	1327.8(13)	4042.3(13)	2183.8(11)	25.7(3)
C6	139.2(12)	5394.8(13)	1557.8(11)	22.8(3)
C14	1281.5(12)	7274.3(14)	1037.5(11)	25.6(3)
C12	-2037.7(13)	5669.6(13)	908.7(12)	25.7(3)
N10	279.6(10)	6915.3(11)	534.7(9)	25.1(3)
C15	-142.3(13)	7676.3(14)	-213.2(11)	26.2(3)

N11	-1323.1(10)	6414.8(11)	675.0(9)	25.6(3)
C18	1995.6(13)	7405.7(14)	377.6(12)	28.7(4)
C3	-239.7(13)	5088.1(13)	2305.9(11)	24.1(3)
C4	1026.8(13)	4779.7(13)	1490.9(11)	25.2(3)
C19	590.9(13)	7786.6(15)	-851.0(12)	29.2(4)
C9	-2005.3(12)	5249.4(13)	1798.1(12)	25.4(3)
C16	-2887.5(13)	5428.2(15)	220.9(13)	30.3(4)
C17	-3653.2(14)	4415.6(16)	1277.9(15)	37.7(4)
C13	-2817.9(14)	4636.4(14)	1976.3(14)	32.6(4)
C20	-3678.4(13)	4792.6(16)	396.5(14)	35.0(4)
C22	2268.6(15)	8341.6(16)	-985.3(14)	37.3(4)
C5	2215.8(15)	3271.5(16)	2335.3(13)	35.8(4)
N2	-1142.9(11)	5464.6(12)	2509.6(10)	26.3(3)
C1A	-351.4(12)	6266.6(13)	922.3(11)	23.3(3)
01	-1607.8(12)	9949.5(11)	-767.2(9)	40.0(3)
O2	-2572.8(10)	8117.0(11)	-244.6(9)	36.9(3)
C1	-3411.9(19)	8363(2)	164.0(16)	47.6(6)
C1c	-5827.0(17)	8444(2)	-2700.1(18)	54.4(6)
C1d	-5335.1(19)	9306(3)	-2025.5(17)	55.6(6)
C1e	-5113(2)	7869(2)	-3214(2)	64.1(7)
C1h	-4409(3)	8341(3)	-634(3)	31.3(8)
C1i	-4350(3)	9252(3)	-1342(2)	31.1(7)
C1j	-4622(4)	8458(4)	-1255(4)	48.2(11)
C1k	-4106(3)	9130(4)	-453(3)	45.3(10)