

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA MIKOLIČ

PRIPRAVA IN VREDNOTENJE KRISTALOV KLARITROMICINA
PREPARATION AND EVALUATION OF CLARITHOMYCIN
CRYSTALS

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm. Meritve rentgenske praškovne difrakcije in NMR v trdnem so opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici izr. prof. dr. Anamariji Zega, mag. farm. za vso strokovno pomoč in vodenje pri izdelavi magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Odonu Planinšku, mag. farm. za pomoč in nasvete pri DSC analizah. Hvala asist. dr. Zoranu Lavriču za nasvete pri DSC analizah in izr. prof. Gregorju Maliju za meritve NMR v trdnem.

Posebna zahvala gre Alešu, bratu, dedku in predvsem mojima staršema za vso podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Anamarije Zega, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK.....	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1 UVOD	1
1.1 KRISTALNO STANJE	1
1.2 POLIMORFIZEM IN PSEVDOPOLIMORFIZEM	1
1.3 KRISTALIZACIJA IZ RAZTOPIN	1
1.4 KLARITROMICIN (KMC)	2
1.5 INSTRUMENTALNE METODE ZA ANALIZO KRISTALNIH OBLIK.....	4
1.5.1 Spektroskopske metode	4
1.5.2 Termične analizne metode.....	10
1.5.3 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)	12
1.6 KEMOMETRIČNA METODA ZA KVANTITATIVNO ANALIZO – METODA REGRESIJE VEČDIMENZIONALNIH PODATKOV NA OSNOVI VSOTE NAJMANJŠIH KVADRATOV (PLS)	13
2 NAMEN DELA	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI.....	16
3.2 METODE	16
3.2.1 Infrardeča (IR) spektroskopija.....	16
3.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	17
3.2.3 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)	17
3.2.4 Jedrska magnetna resonanca v trdnem (SS NMR)	17
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	18
4.1 PRIPRAVA RAZLIČNIH KRISTALNIH OBLIK KLARITROMICINA (KMC)	18
4.1.1 Priprava kristalne oblike 0 (solvat).....	18
4.1.2 Priprava kristalne oblike I.....	18
4.1.3 Priprava kristalne oblike II	19
4.2 PRIPRAVA DVO- IN TROKOMPONENTNIH ZMESI ZA KVANTITATIVNO ANALIZO Z INFRARDEČO (IR) SPEKTROSKOPIJO... 20	

4.2.1	Priprava dvokomponentnih zmesi	20
4.2.2	Priprava trokomponentnih zmesi.....	21
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	22
5.1	REKRISTALIZACIJA KLARITROMICINA (KMC)	22
5.1.1	Kristalna oblika 0 (solvat)	22
5.1.2	Kristalna oblika I	25
5.1.3	Kristalna oblika II.....	27
5.2	KVANTITATIVNA ANALIZA ZMESI Z INFRARDEČO (IR) SPEKTROSKOPIJO	31
5.2.1	Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi z mikrokristalno celulozo (MCC) s tehniko razpršene odbojnosti (DR) v bližnjem infrardečem območju (NIR)	31
5.2.2	Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi z mikrokristalno celulozo (MCC) s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti (ATR) v srednjem infrardečem območju (MID)	36
5.2.3	Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi s kristalno obliko klaritromicina (KMC) II in mikrokristalno celulozo (MCC) s tehniko razpršene odbojnosti (DR) v bližnjem infrardečem območju (NIR).....	40
5.2.4	Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi s kristalno obliko klaritromicina (KMC) II in mikrokristalne celuloze (MCC) s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti (ATR) v srednjem infrardečem območju (MID)	45
5.2.5	Primerjava rezultatov.....	50
6	SKLEP	51
7	LITERATURA	52

POVZETEK

Snov v trdnem agregatnem stanju se lahko nahaja v eni ali več kristalnih oblikah (polimorfi), za katere je značilno, da imajo enako kemijsko sestavo, vendar različno ureditev gradnikov v prostoru. Polimorfi imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti, zato polimorfizem zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi pomembno vpliva na njihovo obnašanje v tehnološkem procesu priprave zdravila, na sproščanje učinkovine iz farmacevtske oblike, njeno biološko uporabnost in na stabilnost končnega izdelka. Namen magistrskega dela je bila priprava različnih kristalnih oblik makrolidnega antibiotika klaritromicina (KMC) in njihovo vrednotenje z izbranimi instrumentalnimi metodami.

V okviru eksperimentalnega dela smo uspeli pripraviti tri kristalne oblike KMC, obliko 0, I in II. Dobljene kristalne oblike smo primarno ovrednotili z infrardečo (IR) spektroskopijo z uporabo tehnike oslabiljene popolne odbojnosti (*ang. attenuated total reflectance*, ATR) v srednjem infrardečem območju (*ang. middle infrared*, MID). Dobljene rezultate smo nato potrdili z diferenčno dinamično kalorimetrijo (*ang. differential scanning calorimetry*, DSC), rentgensko praškovo difrakcijo (*ang. X-ray powder diffraction*, XRPD) in jedrsko magnetno resonanco v trdnem (*ang. solid state nuclear magnetic resonance*, SS NMR). Preverili smo tudi, ali je IR spektroskopija primerna za kvantitativno analizo kristalne oblike KMC I v zmesi s kristalno obliko KMC II in mikrokristalno celulozo (*ang. microcrystalline cellulose*, MCC). Za ta namen smo izbrali dve IR tehniki in dve spektralni območji, ATR tehniko v MID območju in tehniko razpršene odbojnosti (*ang. diffuse reflectance*, DR) v bližnjem infrardečem območju (*ang. near infrared*, NIR). Meritve kalibracijskih in validacijskih standardov zmesi polimorfov KMC in MCC z obema tehnikama smo analizirali z metodo regresije večdimenzionalnih podatkov na osnovi vsote najmanjših kvadratov (*ang. partial least squares*, PLS). Pri obeh tehnikah je Pearsonov koeficient korelacije (r) pokazal na močno linearno povezanost spremenljivk v postavljenih modelih. DR tehnika v NIR območju je izkazala večji indeks učinkovitosti metode (*ang. performance index*, PI), zato lahko zaključimo, da je ta tehnika bolj primerna za kvantitativno analizo naših zmesi.

Ključne besede

Polimorfizem, klaritromicin, infrardeča spektroskopija.

ABSTRACT

A substance in a solid state may either exist in a single crystal form or in multiple (polymorphs), which have the same chemical composition but a different arrangement of the molecules in the crystal lattice. Polymorphs have different physical-chemical properties and therefore polymorphism of active ingredients and excipients has a significant impact on their behavior in the technological process, on releasing of the active ingredient from a pharmaceutical form, its bioavailability and on the stability of the finished product. The purpose of the master thesis was a preparation of different crystalline forms of a macrolide antibiotic clarithromycin (KMC) and their evaluation with selected instrumental methods.

During the experimental work we succeeded to prepare three crystalline forms of KMC, form 0, I and II. The resulting crystalline forms were primarily evaluated with an infrared (IR) spectroscopy using an attenuated total reflectance technique (ATR) in the middle infrared range (MID). The obtained results were then confirmed by differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffraction (XRPD) and solid state nuclear magnetic resonance (SS NMR). We also checked whether the IR spectroscopy is suitable for the quantitative analysis of the crystalline form KMC I in admixture with crystalline form KMC II and microcrystalline cellulose (MCC). Two techniques and two IR spectral ranges were selected for this purpose, ATR technique in the MID and diffuse reflectance technique (DR) in the near infrared range (NIR). The measurements of calibration and validation standards of KMC polymorphs and MCC by both techniques have been analyzed using the regression method of multidimensional data based on the sum of the partial least squares (PLS). Pearson correlation coefficient (r) showed a strong linear correlation of variables in the models for both techniques. DR technique in the NIR range has proven a higher performance index (PI) of the method and therefore it can be concluded that this technique is more suitable for quantitative analysis of our compounds.

Keywords

Polymorphism, clarithromycin, infrared spectroscopy.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATR (*ang. attenuated total reflectance*) – oslabljena popolna odbojnost

B₀ – zunanje statično magnetno polje

DR (*ang. diffuse reflectance*) – razpršena odbojnost

DSC (*ang. differential scanning calorimetry*) – diferenčna dinamična kalorimetrija

IR – infrardeče

KMC – klaritromicin

MCC (*ang. microcrystalline cellulose*) – mikrokristalna celuloza

MID (*ang. middle infrared*) – srednje infrardeče območje

NIR (*ang. near infrared*) – bližnje infrardeče območje

NMR (*ang. nuclear magnetic resonance*) – jedrska magnetna resonanca

PI (*ang. performance index*) – indeks učinkovitosti metode

PLS (*ang. partial least squares*) – metoda regresije večdimenzionalnih podatkov na osnovi vsote najmanjših kvadratov

r – Pearsonov koeficient korelacije

RMSEC (*ang. root mean square error of calibration*) – standardni odmik/odklon/deviacija kalibracije

SS NMR (*ang. solid state nuclear magnetic resonance*) – jedrska magnetna resonanca v trdnem

THF – tetrahidrofuran

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

1 UVOD

1.1 KRISTALNO STANJE

Kristal je trdna snov, katere gradniki tvorijo najvišjo stopnjo urejenosti. Gradniki kristala so lahko atomi, ioni in molekule, ki v prostoru tvorijo periodično ponavljajoče se vzorce (osnovne celice) v vse smeri in tako nastane kristalna mreža. Osnovna celica je paralelepiped (geometrijsko telo s tremi pari vzporednih ploskev), ki pri premiku po strukturi zapolni ves prostor. Trdna snov se lahko nahaja v eni kristalni obliki (samo ena prostorska razporeditev gradnikov), v različnih kristalnih oblikah (več različnih razporeditev gradnikov v prostoru) ali pa v amorfni obliki. Za amorfno obliko trdne snovi je značilno, da strukturni elementi v prostoru niso urejeni, do določene stopnje urejenosti pride le na kratkih razdaljah (1).

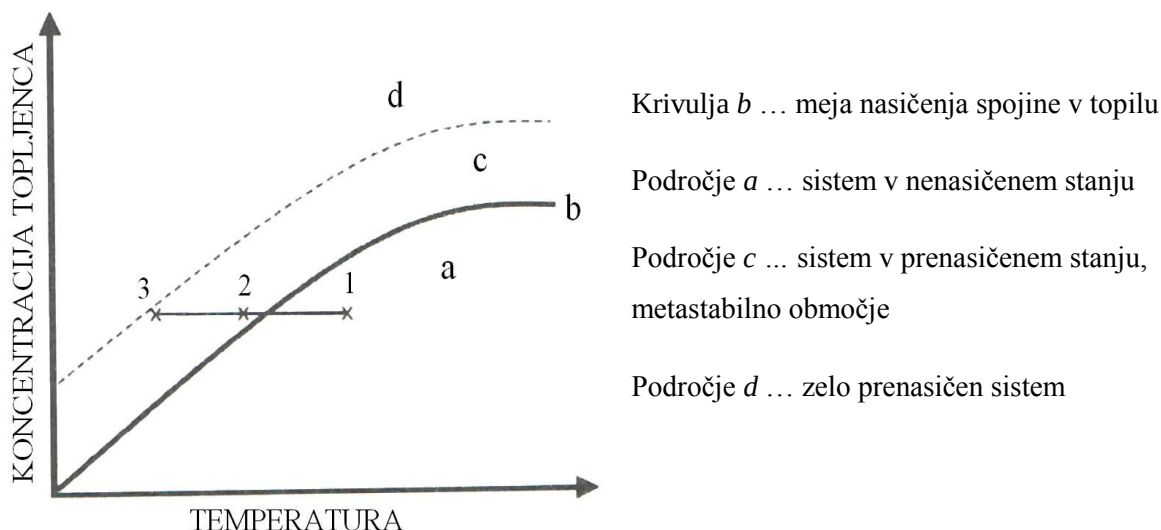
1.2 POLIMORFIZEM IN PSEVDOPOLIMORFIZEM

Polimorfne trdne snovi imajo enako kemijsko sestavo, vendar drugačno prostorsko ureditev gradnikov, kar se kaže v različnih fizikalno-kemijskih lastnostih, kot so: hitrost raztapljanja, topnost, gostota, trdnost, stisljivost, stabilnost, zunanja oblika kristala, lomni količnik, higroskopnost, temperatura taljenja in sublimacije, parni tlak nad trdno snovjo itd. Pri polimorfih zdravilne učinkovine in pomožnih snovi imata velik pomen razlika v topnosti in hitrosti raztapljanja, ki vplivata na biološko uporabnost in terapevtski učinek. Njihove fizikalne lastnosti (oblika, velikost, porazdelitev velikosti, gostota, specifična površina, poroznost) lahko pomembno vplivajo na proces izdelave farmacevtskih oblik. O psevdopolimorfizmu govorimo, ko so v osnovno celico kristala poleg osnovnih gradnikov vgrajene tudi molekule enega ali več topil, kar ima za posledico drugačno ureditev notranje strukture. Take kristalne oblike imenujemo solvati, če pa je topilo voda, govorimo o hidratih, ki so s farmacevtskega vidika najpomembnejši. Pri uporabi organskih topil v tehnološkem procesu izdelave zdravila so solvati problematični, če topilo spada v razred 1 ali 2 rezidualnih topil (1, 2).

1.3 KRISTALIZACIJA IZ RAZTOPIN

Različne kristalne oblike lahko pripravimo na več različnih načinov, kot so kristalizacija iz plina, taline, topila, zmesi topil, kristalizacija v prisotnosti aditivov, kristalizacija pri sublimaciji, termičnem postopku, desolvataciji solvatov, kristalizacija ob hitri spremembi pH. Zdravilne učinkovine najpogosteje pridobivamo s kristalizacijo iz raztopin. Pri procesu

kristalizacije je zelo pomembna kristalna struktura, izkoristek, velikost in zunanji videz kristalov. Pri kristalizaciji iz raztopin je za tvorbo in rast kristalov potrebna prenasíčenost raztopine, kar je prikazano na sliki 1 (1).

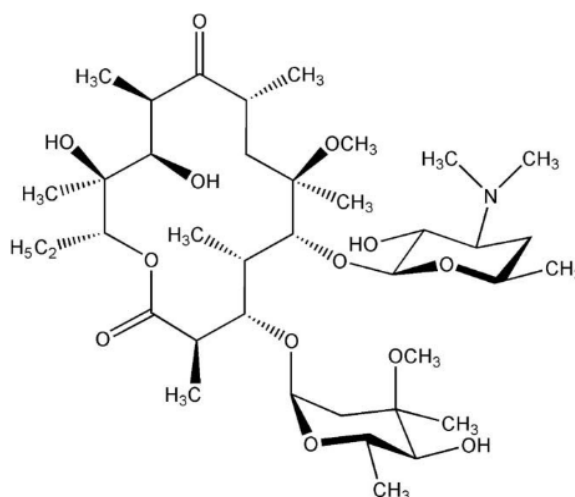


Slika 1: Primer topnostnega diagrama za kristalizacijo spojin (prirejeno po viru 1).

Za nastanek in rast kristalov moramo iz področja *a*, ki predstavlja sistem v nenasičenem stanju, preseči mejo nasičenja spojin v topilu (krivulja *b*) ter preiti v področje *c* in *d*, kjer presežemo topnost snovi in je raztopina v kemijskem neravnovesju. V področju *a* ni nukleacije in rasti kristalov, v področju *c* poteka rast kristalov, v področju *d* pa potekata nukleacija in rast kristalov. Prenasičenost raztopine lahko zagotovimo z zvišanjem koncentracije topljenca (npr. odparevanje topila) in z zmanjšanjem topnosti topljenca (ohlajanje, ki je prikazano na sliki 1 od točke 1 do točke 3; sprememba pH ter dodatek netopila, pomožnih snovi, ionov, ki zmanjšajo topnost) (1).

1.4 KLARITROMICIN (KMC)

Klaritromicin (KMC) (slika 2) je polysintezni makrolidni antibiotik, za katere je značilen makrociklični laktonski obroč, na katerega so vezane sladkorne komponente (3). Ima dobro protibakterijsko delovanje na gram-negativne ter gram-pozitivne bakterije, anaerobne bakterije, mikoplazme, klamidijo in ga uporabljamo za zdravljenje okužb dihal (4, 5, 6, 7, 8). Poznamo 8 kristalnih (polimorfnih) oblik KMC: kristalna oblika 0, I, II, III, IV, V, hidrokloridna sol in metanolni solvat (4, 9). V nadaljevanju smo opisali načine priprav kristalnih oblik 0, I in II, ki smo jih v okviru naše naloge poskušali rekristalizirati iz različnih topil.



Slika 2: Molekula KMC (9).

Kristalna oblika 0 (solvat)

Kristalno obliko 0 (solvat) pripravimo z rekristalizacijo KMC iz etanola, izopropilacetata, izopropanola in tetrahidrofurana (THF). S segrevanjem pri temperaturi 0-50 °C se kristalna oblika 0 pretvori v kristalno obliko I in s segrevanjem v vakuumskem sušilniku pri temperaturi 70-110 °C v kristalno obliko II (5).

Kristalna oblika I

Kristalno obliko I pripravimo z rekristalizacijo KMC iz:

- topil: etanol, izopropilacetat, THF, izopropanol
- mešanice topil: topilo iz točke a) in topilo, ki spada v eno izmed naštetih skupin: polarna aprotična topila, halogeni, ogljikovodiki s 5-12 C atomi, itd. Primeri: izopropilacetat-heptan, THF-heptan, etanol-heptan, izopropanol-heptan, izopropilacetat-N,N-dimetilformamid (6).

Dobljene kristale sušimo pri temperaturi 40-50 °C. Pripravimo jo lahko tudi s sušenjem kristalne oblike 0 pri temperaturi 0-50 °C (5). Kristalna oblika I ima trikrat večjo hitrost raztapljanja kot oblika II in posledično večjo biološko uporabnost. Kristalna oblika I se s segrevanjem v vakuumskem sušilniku pri temperaturi nad 80 °C pretvori v bolj stabilno kristalno obliko II (7).

Kristalna oblika II

Kristalno obliko II lahko pripravimo:

- a) z rekristalizacijo KMC iz topil: aceton, heptan, toluen, metil terc-butil eter, N,N-dimetilformamid, etilacetat, ksilen, izopropanol-vida, THF-voda, etanol-voda, etileter, amilacetat, izopropilacetat-metanol, diizopropileter, izopropilbutirat, izopropilamin, metanol-etanol, itd (7).
- b) s segrevanjem kristalne oblike 0 v vakuumskem sušilniku pri temperaturi 70-110 °C (5).
- c) s segrevanjem kristalne oblike I v vakuumskem sušilniku nad 80 °C (7).

1.5 INSTRUMENTALNE METODE ZA ANALIZO KRISTALNIH OBLIK

Različne kristalne oblike in amorfna oblika zdravilne učinkovine se lahko močno razlikujejo v fizikalnih in kemijskih lastnostih, kar ima lahko signifikanten vpliv na stabilnost, biološko uporabnost, terapevtski učinek in proces izdelave farmacevtske oblike. Zdravilno učinkovino in/ali pomožne snovi je zato potrebno natančno kvalitativno in kvantitativno spremljati med samo sintezo ter tudi izdelavo farmacevtske oblike. Za proučevanje trdnih snovi najpogosteje uporabljamo naslednje analize metode: rentgenska praškovna difrakcija (*ang. X-ray powder diffraction*, XRPD), diferenčna dinamična kalorimetrija (*ang. differential scanning calorimetry*, DSC), infrardeča (IR) spektroskopija v srednjem infrardečem (*ang. middle infrared*, MID) in bližnjem infrardečem območju (*ang. near infrared*, NIR), različne mikroskopske metode, ramanska spektroskopija, termogravimetrična analiza, jedrska magnetna resonanca v trdnem (*ang. solid state nuclear magnetic resonance*, SS NMR) (10).

V okviru naše naloge smo za kvalitativno vrednotenje kristalnih oblik KMC uporabili IR spektroskopijo v bližnjem in srednjem območju, DSC, XRPD in SS NMR. Za kvantitativno vrednotenje kristalne oblike KMC I v zmesi s kristalno obliko KMC II in mikrokristalno celulozo (*ang. microcrystalline cellulose*, MCC) smo izbrali IR spektroskopijo.

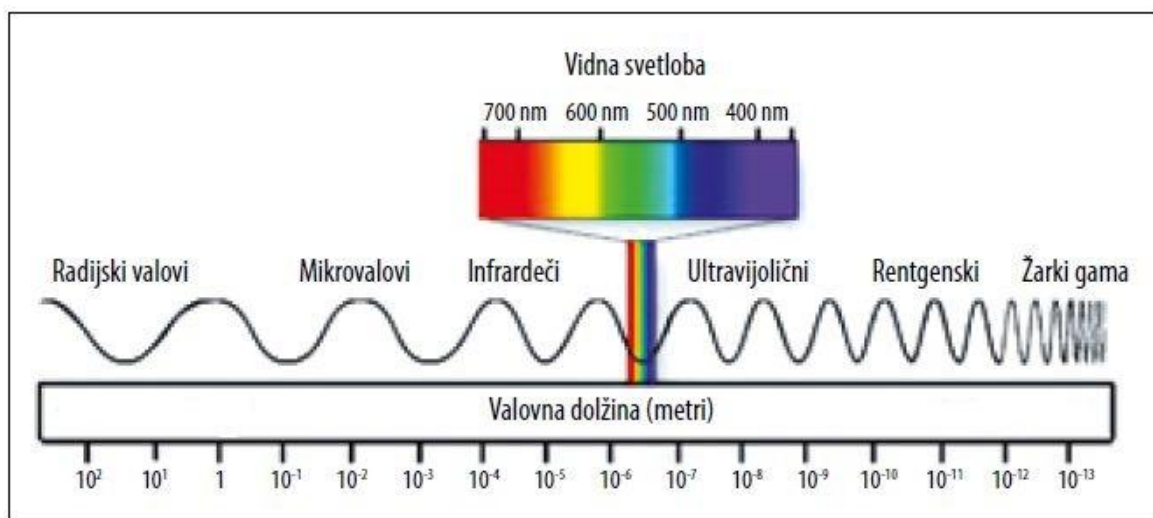
1.5.1 Spektroskopske metode

Spektroskopija je veda, ki preučuje interakcije elektromagnetnega valovanja s snovjo (11). Za analizo polimorfov lahko uporabimo več spektroskopskih metod: IR spektroskopija v MID in NIR območju, SS NMR spektroskopija, ramanska spektroskopija in teraherčna

pulzna spektroskopija (10). V naši nalogi smo za analizo različnih polimorfnih oblik KMC uporabili IR spektroskopijo in SS NMR spektroskopijo.

Infrardeča (IR) spektroskopija

Svetloba je elektromagnetno valovanje, ki ga sestavljata električno in magnetno polje. Polji oscilirata pravokotno druga na drugo in pravokotno na smer razširjanja valovanja. Spekter elektromagnetnega valovanja, prikazan na sliki 3, zajema radiofrekvenčne valove, mikrovalove, IR svetlobo, vidno svetlobo, ultravijolično svetlobo, rentgenske žarke in gama žarke (12, 13).



Slika 3: Spekter elektromagnetnega valovanja (prirejeno po viru 14).

Elektromagnetno valovanje okarakteriziramo z valovno dolžino λ in frekvenco ν (število nihanj na enoto časa) (enačba 1). c v enačbi 1 predstavlja hitrost elektromagnetnega valovanja (12).

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad \text{Enačba 1}$$

Pri opisu elektromagnetnega valovanja lahko uporabimo valovno število $\bar{\nu}$ (število nihanj na enoto dolžine) (enačba 2), ki je premo sorazmerno s frekvenco ν in obratno sorazmerno s hitrost c ter valovno dolžino λ elektromagnetnega valovanja. Pri IR spektroskopiji uporabljamo tako valovno število $\bar{\nu}$ kot tudi valovno dolžino λ (12).

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Enačba 2}$$

Energija elektromagnetnega valovanja E (enačba 3) je obratno sorazmerna z valovno dolžino λ , premo sorazmerna s frekvenco ν in hitrostjo c elektromagnetnega valovanja ter premo sorazmerna s Planckovo konstanto h , katere vrednost je $6,626 \cdot 10^{-34}$ Js (12).

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Enačba 3}$$

Če snov izpostavimo viru svetlobe, se bo del svetlobe absorbiral, del svetlobe pa bo snov prešla v nespremenjeni obliki. Podobno se zgodi, ko neko snov izpostavimo IR svetlobi, kjer merimo transmitanco T , ki je merilo zmanjšanja intenzitete sevanja pri določeni valovni dolžini. Transmitanca T (enačba 4) je razmerje med intenziteto prepuščene svetlobe I in intenziteto vpadle svetlobe I_0 na vzorec (12, 13).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Enačba 4}$$

Poleg transmittance T pa lahko uporabljamo tudi absorbanco A (enačba 5) (12).

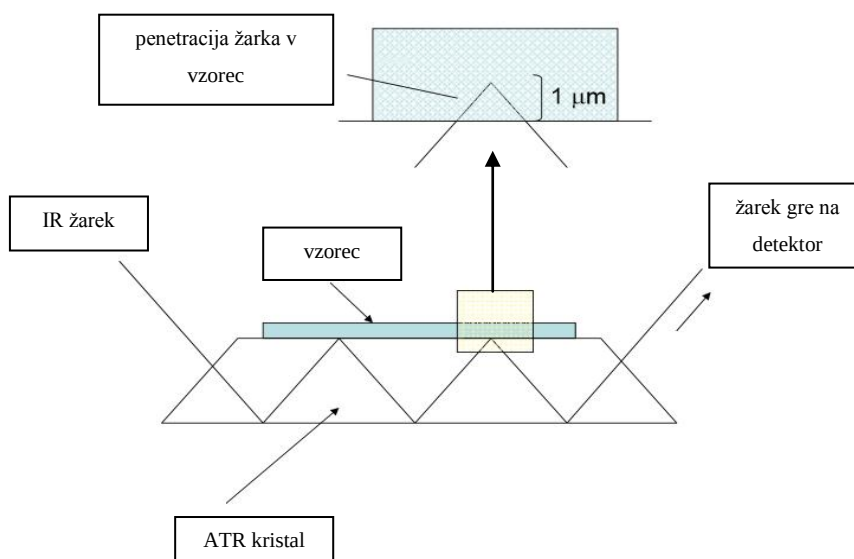
$$A = -\log_{10} T \quad \text{Enačba 5}$$

Ko je frekvenca IR svetlobe enaka naravni nihajni ali rotacijski frekvenci molekule, pride pri molekulah, ki imajo dipolni moment, do absorpcije energije in spremembe amplitude nihanja ali rotacije molekule. V farmaciji se največ uporablja MID IR, ki obsega območje valovnih števil med $4000 - 200 \text{ cm}^{-1}$ in NIR, ki obsega območje valovnih števil med $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ (12, 15).

IR spektroskopijo, ki zajema MID del spektra elektromagnetnega valovanja, uporabljamo predvsem za kvalitativno analizo trdnih, tekočih in plinastih vzorcev. V NIR spektralnem območju opazujemo nadtone in absorpcijske pasove kombinacij vezi: C – H, N – H in O – H. (12, 15). Signali v NIR območju so zelo nespecifični, zato spektri, posneti v NIR območju, postanejo uporabni z uporabo kemometrije, ki z uporabo matematičnih in statističnih metod ustvari povezavo med posnetimi spektri in kemijsko sestavo ali fizikalnimi lastnostmi vzorca ter se uporablja za reševanje kvalitativnih in kvantitativnih analiznih problemov (12). NIR spektroskopijo v zadnjem času pogosto uporabljamo za in-line in on-line spremljanje polimorfne transformacije (10). Dodatna prednost NIR spektroskopije je, da steklo prepušča svetlobo NIR območja (16). Žarek v NIR območju prodre v vzorec veliko globlje kot žarek v MID območju, zato je ta metoda zelo uporabna

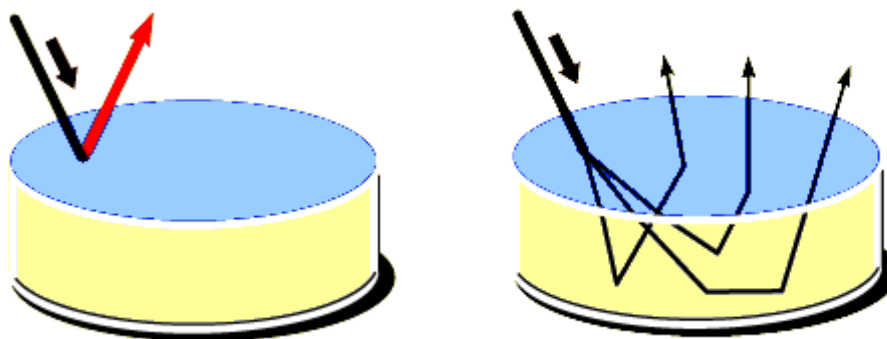
za kontrolo cele mase (17). NIR spektroskopija nam poleg kemijskih informacij poda tudi fizikalne informacije o vzorcu (18). V farmacevtski industriji se predvsem uporablja za določevanje: vsebnosti zdravilne učinkovine, vsebnosti vlage, velikosti delcev, trdote, nasipne gostote, homogenosti praškovne mešanice, segregacije praškovne mešanice, polimorfne oblike (18, 19).

V naši nalogi smo za analizo trdnih vzorcev uporabili refleksijski tehniki, ATR tehnika v MID območju in tehniko razpršene odbojnosti (*ang. diffuse reflectance, DR*) v NIR območju. ATR tehnika je zelo hitra in enostavna, saj je predpriprava vzorca minimalna oz. ni potrebna in je zato zelo primerna za rutinske analize. Primerna je za vzorce, ki so zelo debeli ali pa premočno absorbirajo in jih zato ne moremo analizirati s transmisijsko tehniko. Tehnika temelji na optičnem pojavu, popolnemu odboju. Glavni element je kristal z visoko optično gostoto oz. velikim lomnim količnikom (ZnSe, Ge, diamant), skozi katerega potuje IR žarek. Ko žarek, ki je usmerjen na kristal pod določenim kotom, prehaja iz optično gostejšega materiala (kristal) v material z manjšo optično gostoto (vzorec), se na meji med materialoma v celoti odbije nazaj v kristal. Vendar pri popolnem odboju del vpadnega žarka prodre v optično redkejši material, torej v vzorec. Globina penetracije žarka je odvisna od vpadnega kota žarka, od valovne dolžine svetlobe in lomnih količnikov dveh medijev in je pri ATR spektroskopiji 1 do 4 μm . To predstavlja prednost za ATR tehniko, ki omogoča meritve debelih in močno absorptivnih vzorcev. Ta t.i. evanescentni žarek, ki prodre v vzorec, nadaljuje pot do detektorja in nosi informacijo o absorpcijskih lastnosti vzorca (12, 13, 15). Princip ATR tehnike je prikazan na sliki 4.



Slika 4: Shematski prikaz principa ATR spektroskopske tehnike (prirejeno po viru 20).

Za analizo trdnih vzorcev lahko uporabimo tudi DR tehniko. Metoda je zelo hitra, saj predpriprava vzorca ni potrebna oz. je minimalna. IR svetloba, s katero obsevamo vzorec, lahko z njim interagira na dva načina: na površini vzorca se svetloba lahko zrcalno odbije ali pa prodre v vzorec in pride do razpršene odbojnosti. Običajno sta prisotni obe interakciji. Do zrcalne odbojnosti (slika 5) pride, ko ima vzorec velik lomni količnik. V tem primeru moramo vzorec pomešati s komponento, ki omogoči razpršeni odboj (npr. KBr). Pri razpršeni odbojnosti (slika 5) IR svetloba prodre v vzorec in se odbije na površini delcev. Ker so površine delcev naključno usmerjene, pride do odboja svetlobe v vseh smereh. Razpršeno svetlobo, ki vsebuje informacijo o absorpcijskih lastnosti vzorca, zbirajo zrcala in jo usmerijo na detektor (12, 13, 15).



Slika 5: Zrcalna odbojnost (levo) in razpršena odbojnost (desno) IR svetlobe pri DR tehniki IR spektroskopije (prirejeno po viru 13).

Jedrska magnetna resonančna (NMR) spektroskopija

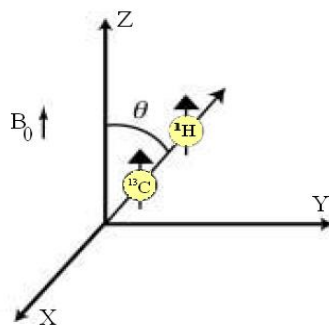
Jedrska magnetna resonančna (*ang. nuclear magnetic resonance*, NMR) spektroskopija je spektroskopska analizna metoda, pri kateri opazujemo jedra atomov, ki imajo jedrski spin (imajo liho število protonov ali nevtronov ali pa obeh hkrati) (21). Posledica naboja in vrtenja jedra je magnetni moment in okoli jedra se ustvari majhno magnetno polje. Pomembna NMR aktivna jedra, ki jih pogosto uporabljamo v organski kemiji, so ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P in imajo vrednost jedrskega spinskega števila $m = 1/2$, ki ima lahko vrednost $+1/2$ ali $-1/2$. Ko na vzorec apliciramo zunanje statično magnetno polje ($B_0 \neq 0$), se jedrski spini orientirajo paralelno ali antiparalelno s smerjo B_0 in jedra precesirajo okoli svoje osi z Larmorjevo frekvenco. Ko vzorec izpostavimo radiofrekvenčnim valovom s frekvenco, ki ustreza Larmorjevi, jedra iz nižjega energijskega stanja vzbudimo v višje energijsko stanje. Vračanje vzbujenih jeder v osnovno stanje v spektrometru beleži tuljava, dobljeni signal pa

računalnik spektrometra z matematično operacijo pretvori iz časovne v frekvenčno odvisnost, v NMR spekter (15, 22, 23).

Jedrska magnetna resonanca v trdnem (SS NMR)

Pri analizi naših vzorcev smo uporabili SS NMR, ki se uporablja za identifikacijo in za strukturno analizo organskih trdnih vzorcev in tudi za kvantitativno analizo. Zaradi slabe resolucije ^1H SS NMR spektrov se pri SS NMR analizi najpogosteje analizira jedra z nizkim giromagnetnim razmerjem γ kot so ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P in ^{29}Si , ki imajo vrednost jedrskega spinskega števila $1/2$. Pri snemanju spektra trdnega vzorca z isto aparaturo, ki jo uporabljamo za raztopine, dobimo zaradi heteronuklearne in homonuklearne dipolarne sklopitve ter anizotropije kemijskega premika neprimerne spektre s prekritimi in zelo širokimi signali (24).

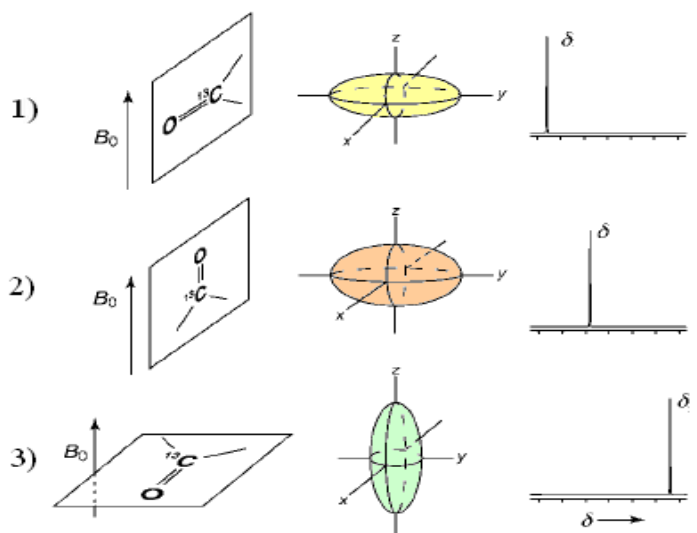
Heteronuklearna dipolarna sklopitev nastane zaradi interakcije med jedrskima magnetnima momentoma dveh različnih jedrskih spinov. ^1H - ^{13}C dipolarna sklopitev je prevladujoča interakcija, ki jih občuti ^{13}C jedro. Dipolarna sklopitev dveh jeder je odvisna od giromagnetnega razmerja obeh jeder, razdalje med jedroma in kota θ (slika 6), ki poda orientacijo obeh jeder glede na B_0 (24).



Slika 6: Kot θ med obema jedroma in B_0 (prirejeno po viru 24).

V raztopinah je reorientacijski čas molekul hitrejši od časa, ki je potreben za nastanek dipolarne sklopitve. Zato je heteronuklearna dipolarna sklopitev v povprečju 0. V trdnem polikristaliničnem vzorcu so molekule naključno usmerjene in prostorsko fiksirane, vektorji jeder se s časom ne spreminjajo in zato pride do heteronuklearne dipolarne sklopitve (24).

Anizotropija kemijskega premika (slika 7) je posledica nesferične razporeditve elektronov v okolici jedra. V odvisnosti od tega, kako je elektronski oblak okoli jedra usmerjen glede na B_0 , dobimo signal pri različnih vrednostih kemijskega premika. Spekter trdnega polikristaliničnega vzorca, v katerem so molekule naključno usmerjene in prostorsko fiksirane, je sestavljen iz superpozicije linij, ki predstavljajo vse možne usmeritve in torej resonančne frekvence in rezultat so široki signali (24).



Slika 7: Shematski prikaz anizotropije kemijskega premika. Odvisnost kemijskega premika δ , od usmerjenosti elektronskega oblaka okoli opazovanega jedra ^{13}C glede na B_0 (prirejeno po viru 24).

Za izboljšanje ločljivosti pri SS NMR uporabljamo tehniko vrtenja pod magičnim kotom (MAS) $\theta = 54,74^\circ$, pri kateri izločimo oba zgoraj opisana pojava. Z vrtenjem pod magičnim kotom dosežemo, da postane povprečna orientacija molekul približno enaka magičnemu kotu, to pa zoži signale v SS NMR spektrih. Za izboljšanje signala redkih jeder (npr. ^{13}C , ^{15}N) uporabljamo tudi tehniko navzkrižna polarizacija (CP), ki omogoča prenos polarizacije običajno od pogostih ^1H jeder z visoko polarizacijo na jedra z nizko polarizacijo ^{13}C . S kombinacijo metod navzkrižne polarizacije in vrtenjem pod magičnim kotom (CP MAS) lahko posnamemo ^{13}C SS NMR spektre z visoko občutljivostjo in visoko resolucijo (24).

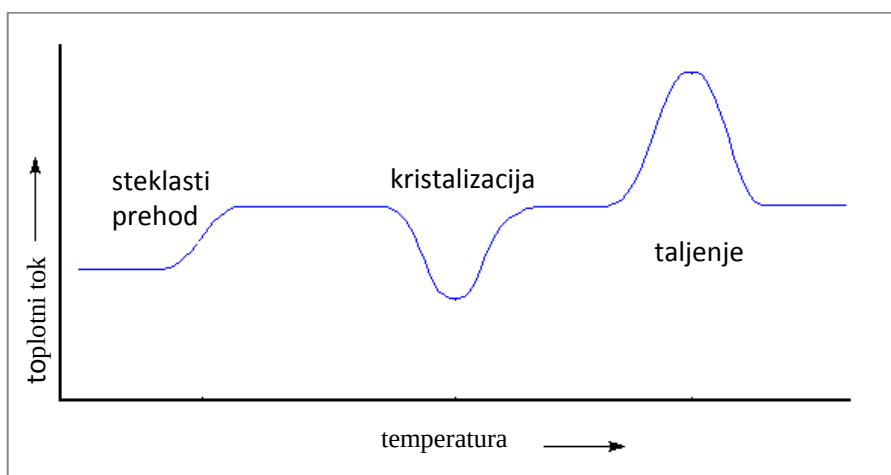
1.5.2 Termične analizne metode

Pri termičnih analizah merimo fizikalno-kemijske lastnost vzorca kot funkcijo temperature. Med analizo je vzorec izpostavljen kontroliranemu temperaturnemu programu. Za termično analizo vzorcev poznamo številne metode, ki nam dajo različne informacije o

vzorcu: DSC, diferenčna termična analiza (DTA), termogravimetrija (TG), termomehanska analiza (TMA), termično optična analiza (TOA), itd (2, 25). Za analizo naših vzorcev različnih polimorfnih oblik KMC smo uporabili termično analizno metodo DSC.

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Izmed termičnih analiznih metod v farmacevtski industriji najpogosteje uporabljamo DSC. V farmaciji se DSC pogosto uporablja za določevanje čistosti surovin (15). Je najbolj uporabna metoda za detekcijo amorfnosti, kjer na termogramu opazimo steklasti prehod (10). Pri tej metodi opazujemo toplotni tok, ki gre v ali iz vzorca, kot funkcijo temperature in časa. Uporabljamo jo za analizo zdravilnih učinkovin, pomožnih snovi, pri kontroli farmacevtskih procesov in analizah farmacevtskih oblik ter pri kompatibilnostnih študijah. Vzorec, ki ga analiziramo, se lahko nahaja v inertni ali oksidirajoči atmosferi. Iz analize pridobimo informacijo o eksotermnih, endotermnih spremembah vzorca in spremembah toplotne kapacitete C_p (energija, ki jo moramo dovesti 1 gramu ali molu snovi za dvig temperature 1 K). Pri meritvi uporabimo dva aluminijasta lončka, v enem je zatehtan vzorec, drugi pa je referenčni lonček brez vzorca. Oba hkrati sta izpostavljena določenemu temperaturnemu programu in kalorimeter meri razliko toplotnih tokov med njima. Rezultat DSC analize je termogram, iz katerega lahko razberemo eksotermne in/ali endotermne procese v vzorcu, ki je bil izpostavljen določenemu temperaturnemu programu. Z DSC analizo lahko proučujemo polimorfizem, določamo vsebnost nečistot, merimo temperaturo tališča, temperaturo steklastega prehoda, temperaturo kristalizacije, termično stabilnost, delež kristaliničnosti, sublimacijo, razpad, toplotno kapaciteto itd (2, 15, 26). Na sliki 8 je termogram, na katerem so prikazani steklasti prehod, kristalizacija in taljenje vzorca.



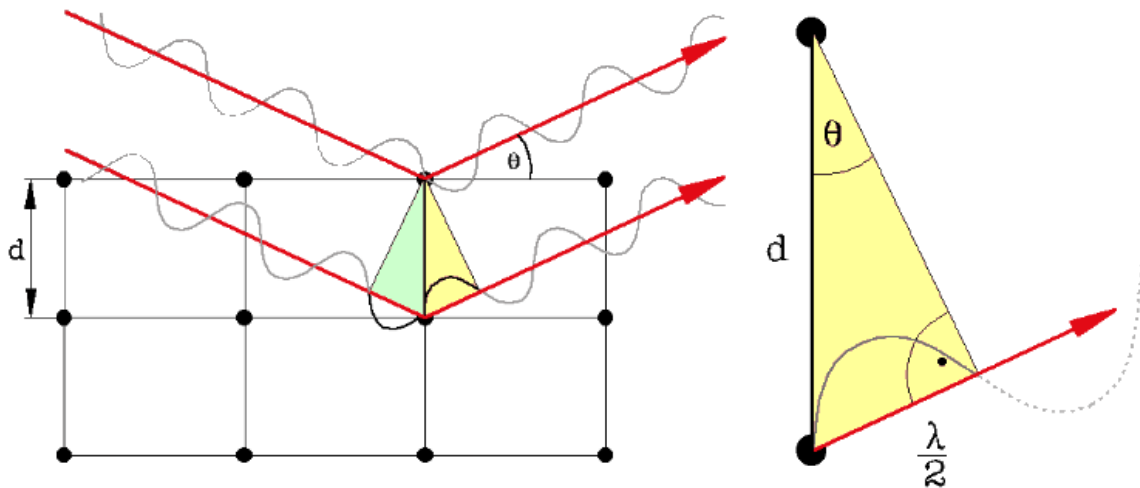
Slika 8: DSC krivulja s tipičnimi faznimi spremembami (prirejeno po viru 27).

1.5.3 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)

Z XRPD analizo proučujemo, kako so gradniki snovi urejeni v prostoru, in na podlagi tega določimo kristalno obliko. Ko pride rentgenski žarek v stik z vzorcem, ta zadane v atom in elektroni v atomu začnejo nihati z enako frekvenco, kot jo ima vpadni žarek, ter generirajo rentgenske žarke enake valovne dolžine. Temu pojavu rečemo koherentno sipanje rentgenske svetlobe. Sipana svetloba se ne porazdeli enakomerno v prostor. Ker so atomi v kristalu pravilno, enakomerno razporejeni, se sipana svetloba v določeni smeri okrepi (pride do interference), kar je vzrok nastanka uklonske črte na difraktogramu. Položaj uklonskih črt na difraktogramu je funkcija vrste atomov in njihove prostorske razporeditve. Do difrakcije pride, ko je izpolnjen Braggov pogoj, ki je zapisan z enačbo 6 (d - razdalja med ravninama v kristalu, n – celo število, red odboja, λ – valovna dolžina žarkov, θ – Braggov kot, kot med vpadnim rentgenskim žarkom in kristalno ravnino) in prikazan na sliki 9. Ko je vpadni kot primarnega žarka enak Braggovem kotu, pride do uklanjanja rentgenskih žarkov na kristalni ravnini (1, 28, 29, 30).

$$n * \lambda = 2 * d * \sin \theta$$

Enačba 6



Slika 9: Braggov pogoj (prirejeno po viru 31).

XRPD analiza je zelo pomembna pri identifikaciji kristalnih oblik. Difraktogram (intenzitete in položaji uklonskih vrhov) vzorca primerjamo z difraktogramom standarda ali pa za identifikacijo kristalne oblike uporabimo bazo podatkov (1, 30). Vsaka kristalna oblika snovi ima svoj edinstven difraktogram. Vzroka za spremembo v XRPD difraktogramu sta druga kristalna oblika (pojavi se ali izgine specifični difrakcijski vrh

določene kristalne oblike snovi) ali majhna sprememba v kristalni rešetki (npr. rahla neurejenost ali sprememba parametrov rešetke). XRPD analizna metoda se uporablja tudi za detekcijo amorfne snovi, pri kateri v difraktogramu ne dobimo difrakcijskih vrhov, ampak široki uklonski efekt (1, 10).

1.6 KEMOMETRIČNA METODA ZA KVANTITATIVNO ANALIZO – METODA REGRESIJE VEČDIMENZIONALNIH PODATKOV NA OSNOVI VSOTE NAJMANJŠIH KVADRATOV (PLS)

Kemometrija je področje znanosti, ki proučuje razvoj in uporabo matematičnih in statističnih metod za ugotavljanje pomembnih kemijskih informacij (32). Kemometrija z uporabo matematičnih in statističnih metod ustvari povezavo med eksperimentalnimi podatki in kemijsko sestavo ali fizikalnimi lastnostmi vzorca ter se uporablja za reševanje kvalitativnih in kvantitativnih analiznih problemov (12). V nalogi smo uporabili kemometrično metodo regresije večdimenzionalnih podatkov na osnovi vsote najmanjših kvadratov (*ang. partial least squares*, PLS) za kvantitativno analizo pripravljenih zmesi. Pripravljenim standardom (zmesi kristalne oblike KMC I, II in MCC) smo posneli IR spektre v MID in NIR območju in s PLS metodo postavili model za kvantitativno analizo kristalne oblike KMC I v dvo- in trokomponentni zmesi.

PLS metoda je statistični pristop za kvantitativno analizo, ki je zasnovan na osnovi algoritma vsote najmanjših kvadratov. Območja spektrov, ki jih izberemo za kvantitativno analizo, lahko uporabimo za kvantitativno analizo vseh komponent, prisotnih v zmesi, ali pa za analizo izbrane komponente. PLS metoda se uporablja pri analizi vzorcev z dvema komponentama ali več, katerih signali se med seboj prekrivajo, ter pri kvantitativni analizi posameznih komponent, ko je povezava med koncentracijo in absorbanco zelo kompleksna (33).

Za vrednotenje postavljenih modelov s PLS metodo smo uporabili sledeče parametre:

- **Pearsonov koeficient korelacije (r):** je številska vrednost, ki pove, kako sta spremenljivki linearno povezani med seboj. Bolj ko se r približuje vrednosti 1, bolj sta spremenljivki linearno povezani. Če je njegova vrednost 0,9, -0,99, pomeni, da sta spremenljivki zelo močno linearno povezani (33, 34).
- **Standardni odmik/odklon/deviacija kalibracijskega modela (*ang. root mean square error of calibration*, RMSEC):** nam pove, kakšna je napaka kalibracijskega modela (napaka modeliranja). Izračunamo ga po enačbi 7, kjer je n - št. standardov,

Y_i^{exp} – izmerjena vrednost standarda i , Y_i^{pred} – dejanska vrednost standarda i (33, 35, 36).

$$RMSEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i^{exp} - Y_i^{pred})^2}{n}} \quad \text{Enačba 7}$$

- **Indeks učinkovitosti metode (*ang. performance index, PI*):** za izračun PI so potrebni validacijski standardi. Vrednost PI je lahko od 0 do 100. Metoda je najbolj učinkovita, če je vrednost indeksa 100 (33).

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je priprava kristalnih oblik zdravilne učinkovine KMC in njihovo vrednotenje z izbranimi instrumentalnimi metodami: IR spektroskopija, DSC, XRPD in SS NMR.

Z rekristalizacijo KMC iz različnih, v literaturi že znanih, topil/kombinacij topil/kombinacij topil in netopila bomo pripravili kristalne oblike 0, I in II. Naš primarni cilj je, da različne kristalne oblike KMC kvalitativno ovrednotimo z IR spektroskopijo z ATR tehniko v MID območju. KMC bomo poskušali rekristalizirati tudi iz novih kombinacij topil in ga prav tako kvalitativno ovrednotiti z IR spektroskopijo z ATR tehniko v MID območju.

Izvedli bomo tudi DSC, XRPD in SS NMR analize in dobljene rezultate primerjali z rezultati IR spektroskopije.

Poskušali bomo ugotoviti tudi, ali je IR spektroskopija primerna za kvantitativno analizo zmesi polimorfnih oblik KMC I in II ter MCC. Pripravili bomo kalibracijske in validacijske standarde, katerim bomo posneli spektre z DR tehniko v NIR območju in z ATR tehniko v MID območju. Spektre bomo pretvorili v prve in druge odvode in z uporabo PLS metode postavili kvantitativni model. Na podlagi vrednosti parametrov r , RMSEC in PI bomo ocenili, katera metoda je bolj primerna za kvantitativno vrednotenje naših zmesi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali zdravilno učinkovino, pomožno snov in topila:

- Klaritromicin, Sigma-Aldrich, Nemčija
- mikrokristalna celuloza (Avicel PH 101), FMC BioPolymer, USA
- aceton, Merck KGaA, Nemčija
- acetonitril, J.T.Baker, Nemčija
- etanol (96 vol%), Merck KGaA, Nemčija
- metanol, Sigma-Aldrich, Nemčija
- tetrahidrofuran, Merck KGaA, Nemčija
- destilirana voda

Pri pripravi vzorcev smo uporabljali naslednje aparature in pripomočke:

- vakuumška pečica, BUCHI Glass Oven B-580, Švica
- ročna mešalka Manual-Mini-Inversina, Bioengineering, Švica
- sita velikosti 50 μm in 125 μm , Retsch
- analitska tehtnica AG245, Metler Toledo, Švica
- precizna tehtnica METTLER PM480 Delta Range, Švica

3.2 METODE

3.2.1 Infrardeča (IR) spektroskopija

Pri snemanju IR spektrov smo uporabili FTIR spektrometer NICOLET Nexus, proizvajalec Thermo. Za snemanje spektrov z ATR tehniko v MID območju smo uporabili nastavek Smart iTR. Za snemanje spektrov z DR tehniko v NIR območju smo uporabili nastavek Near-IR UpDRIFT, vzorce pa smo pripravili v steklene vialke za plinsko kromatografijo. Za snemanje spektrov smo uporabili računalniški program Omnic 5.2, za obdelavo spektrov pa program Omnic 9.1 in TQ Analyst 9.1.17. V preglednici 1 so navedeni pogoji merjenja z ATR in DR tehniko.

Preglednica 1: Pogoji snemanja IR spektrov z ATR in DR tehniko.

TEHNIKA	ATR	DR
OZADJE	zrak	zrak
ŠTEVILO PONOVI TEV SNEMANJA	16	32
OBMOČJE SNEMANJA	4000cm ⁻¹ – 600 cm ⁻¹	10000cm ⁻¹ – 4000 cm ⁻¹
LOČLJIVOST	8 cm ⁻¹	8 cm ⁻¹
KONČNI FORMAT	absorbanca/transmitanca	absorbanca/transmitanca
DETEKTOR	DTGS KBr	InGaAS
IZVOR SVETLOBE	IR	White Light
DELILEC ŽARKA	ZnSe	ZnSe

3.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Pri DSC analizi vzorcev smo uporabili diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30, Švica. Vzorce smo natehtali v aluminijaste lončke (~7 g) in jih segrevali od 0 °C do 250 °C s hitrostjo segrevanja 20 °C/min v inertni atmosferi s pretokom dušika 50 mL/min.

3.2.3 Rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)

Pri XRPD analizi smo uporabili rentgenski praškovni difraktometer X'Pert PRO MPD, proizvajalec PANalytical, Nizozemska. Vzorce smo analizirali v kotnem območju od 5 do 40 °2θ. Integracijski čas ob uporabi detektorja X'Celerator je znašal 100 s (detektor je bil popolnoma odprt, 2,122 stopinje) in koraku 0.034 °2θ. Meritve smo opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.2.4 Jedrska magnetna resonanca v trdnem (SS NMR)

Pri SS NMR analizah smo uporabili NMR spektrometer Varian NMR System 600 MHz NMR spectrometer s statičnim magnetnim poljem $B_0 = 14.1$ T in merilno glavo 3,2 mm NB Double Resonance HX MAS Solids Probe. Meritve smo opravili na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 PRIPRAVA RAZLIČNIH KRISTALNIH OBLIK KLARITROMICINA (KMC)

4.1.1 Priprava kristalne oblike 0 (solvat)

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz tetrahidrofurana (THF)

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 4,3 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 60 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 2 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem (4, 6).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz acetonitrila

V 25 ml bučko smo natehtali 0,8 g KMC in dodali 15,0 ml acetonitrila. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 82 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 3 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 6).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz nove kombinacije topil tetrahidrofuran (THF)-metanol

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 7,5 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 66 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 7,5 ml metanola. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 3 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem (4, 7).

4.1.2 Priprava kristalne oblike I

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz tetrahidrofurana (THF)

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 4,3 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 60 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 2 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 6).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz kombinacije topil tetrahidrofuran (THF)-metanol

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 7,5 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 66 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 7,5 ml metanola. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 3 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 7).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz nove kombinacije topil tetrahidrofuran (THF)-etanol

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 7,5 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 66 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 7,5 ml etanola. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 3 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 7).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz nove kombinacije topil aceton-acetonitril

V 25 ml bučko smo natehtali 1,0 g KMC in dodali 15,0 ml acetona. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 15 min pri 56 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 15,0 ml acetonitrila. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 2 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 7).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz nove kombinacije topil aceton-etanol

V 25 ml bučko smo natehtali 1,0 g KMC in dodali 15,0 ml acetona. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 15 min pri 56 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 15,0 ml etanola. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 6 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 7)

4.1.3 Priprava kristalne oblike II**Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz acetona**

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 15,1 ml acetona. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 15 min pri 56 °C. Vročo in motno raztopino smo prefiltrirali v

50 ml bučko in pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 5 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 7).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz kombinacije topila in netopila tetrahidrofuran (THF)-voda

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 7,5 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 66 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 7,5 ml vode. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 5 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 8 h pri 50 °C (4, 7).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz kombinacije topil tetrahidrofuran (THF)-acetonitril

V 25 ml bučko smo natehtali 1,5 g KMC in dodali 7,5 ml THF. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 20 min pri 66 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 7,5 ml acetonitrila. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 5 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C (4, 7).

Rekristalizacija klaritromicina (KMC) iz kombinacije topila in netopila aceton-voda

V 25 ml bučko smo natehtali 1,0 g KMC in dodali 15 ml acetona. Raztopino smo mešali in segrevali pod refluxom 15 min pri 56 °C. Vročo in bistro raztopino smo prefiltrirali v 50 ml bučko in raztopini počasi dodali 15 ml vode. Raztopino smo pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 5 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 8 h pri 50 °C (4, 7).

4.2 PRIPRAVA DVO- IN TROKOMPONENTNIH ZMESI ZA KVANTITATIVNO ANALIZO Z INFRARDEČO (IR) SPEKTROSKOPIJO

4.2.1 Priprava dvokomponentnih zmesi

Kristalno obliko KMC I smo pripravili z rekristalizacijo KMC iz THF. Kristale KMC, ki smo jih strli v terilnici, in MCC smo presejali skozi siti velikosti 50 µm in 125 µm. Za pripravo zmesi smo uporabili delce obeh komponent velikosti od 50 µm do 125 µm. Pripravili smo 11 standardov z vsebnostjo KMC od 0 % do 100 % s postopnim večanjem deleža KMC v zmesi za 10 % in postopnim manjšanjem deleža MCC za 10 %. 100 mg

celotne zmesi smo natehtali v steklene vial. Z DR tehniko v NIR območju smo določili čas mešanja vzorcev, ki je potreben, da dosežemo homogen vzorec. Nato smo homogeno premešane standarde analizirali z IR spektroskopijo in za vsak standard posneli 3 spektre z DR tehniko v NIR območju in 3 spektre z ATR tehniko v MID območju.

4.2.2 Priprava trokomponentnih zmesi

Kristalno obliko KMC I smo pripravili z rekristalizacijo KMC iz THF, kristalno obliko KMC II pa smo pripravili z rekristalizacijo KMC iz acetona. Kristale kristalne oblike KMC I in II, ki smo jih posamezno strli v terilnici, ter MCC smo presejali skozi siti velikosti 50 μm in 125 μm . Za pripravo zmesi smo uporabili delce vseh komponent velikosti od 50 μm do 125 μm . Pripravili smo 11 standardov s konstantno vsebnostjo 50 % MCC in s 50 % vsebnostjo mešanice kristalnih oblik KMC I ter II, s postopnim večanjem deleža kristalne oblike II v zmesi za 5 % in s postopnim manjšanjem deleža kristalne oblike I v zmesi za 5 %. 100 mg celotne zmesi smo natehtali v steklene vial. Z DR tehniko v NIR območju smo določili čas mešanja vzorcev, ki je potreben, da dosežemo homogen vzorec. Nato smo homogeno premešane standarde analizirali z IR spektroskopijo. Vsakemu standardu smo posneli 3 spektre z DR tehniko v NIR območju in 3 spektre z ATR tehniko v MID območju.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 REKRISTALIZACIJA KLARITROMICINA (KMC)

V preglednici 2 so navedena topila/kombinacija topil/kombinacija topila in netopila, iz katerih smo rekrystalizirali KMC ter ustrezne nastale kristalne oblike. KMC smo rekrystalizirali iz že znanih topil/kombinacij topil/kombinacije topila in netopila in iz novih kombinacij topil.

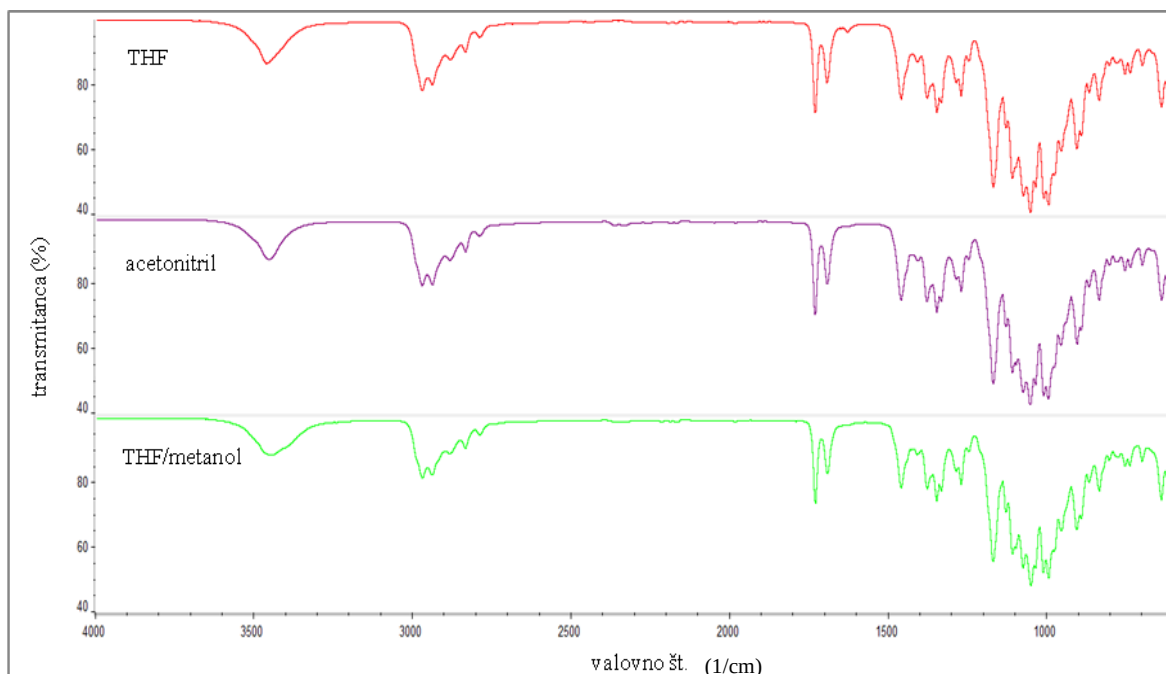
Preglednica 2: Nastale kristalne oblike KMC rekrystaliziranega iz topil/kombinacij topil/kombinacije topila in netopila.

TOPILO/NETOPILO	KRISTALNA OBLIKA
ŽE ZNANO	
THF	oblika 0 (solvat)
acetonitril	oblika 0 (solvat)
THF	oblika I
THF-metanol	oblika I
aceton	oblika II
THF-voda	oblika II
THF-acetonitril	oblika II
aceton-voda	oblika II
NOVO	
THF-metanol	oblika 0 (solvat)
THF-etanol	oblika I
aceton-acetonitril	oblika I
aceton-etanol	oblika I

5.1.1 Kristalna oblika 0 (solvat)

Kristalno obliko KMC 0 smo uspeli pripraviti po že objavljenem postopku z rekrystalizacijo iz THF in iz nove kombinacije topil THF-metanol. V obeh primerih kristalov nismo sušili v vakumski pečici, ampak le na zraku. Pri rekrystalizaciji KMC iz acetonitrila smo dobili kristalno obliko 0, Liu s sodelavci (8) kristalno obliko III, De Jager (37) pa kristalno obliko II. Pri pripravi kristalne oblike 0 smo mi vročo bistro raztopino prefiltrirali in matičnico pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 3 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C. Izolirali smo kristalno obliko 0. Liu in sodelavci (8) pa so prefiltrirano raztopino ohladili na sobno temperaturo (20-25 °C) in nato ohladili na temperaturo 0-5 °C, da so se izločili kristali. Kristale so prefiltrirali. Vlažne kristale, kristale posušene na zraku, in kristale, ki so jih 5

dni sušili pri temperaturi 40-45 °C, so analizirali z XRPD analizno metodo, ki je v vseh primerih pokazala na kristalno obliko III. Podrobnejši opis postopka, po katerem je De Jager (37) dobila iz acetonitrila kristalno obliko II, ni dostopen. IR spektri naših vzorcev kristalne oblike KMC 0, posneti z ATR tehniko v MID območju, so prikazani na sliki 10.

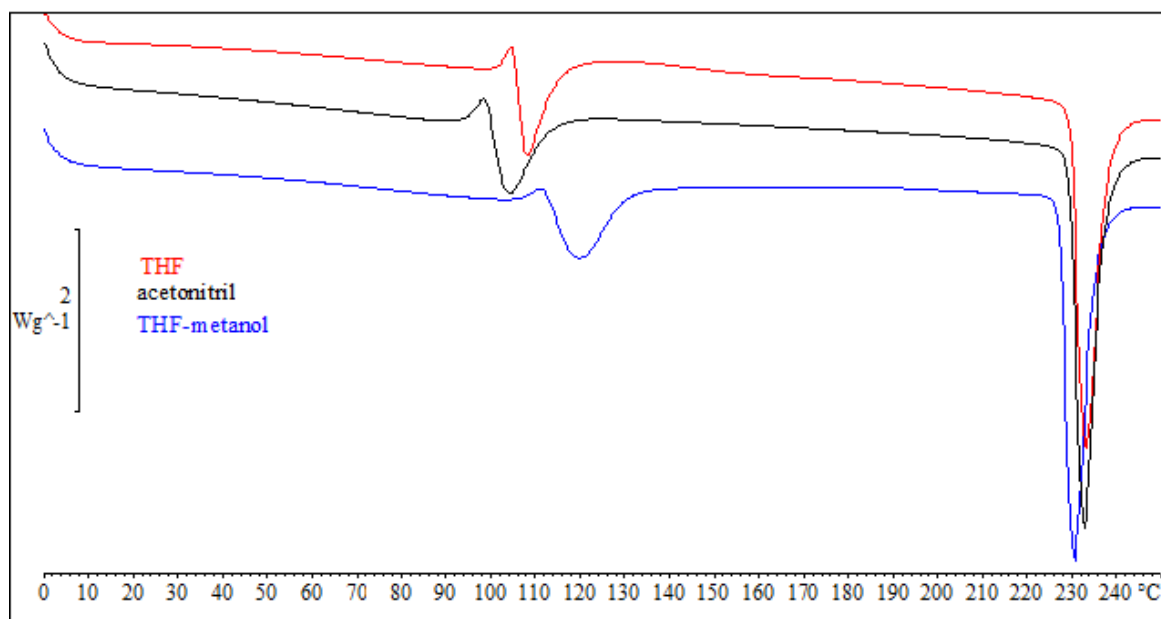


Slika 10: IR spektri kristalne oblike KMC 0, posneti z ATR tehniko v MID območju.

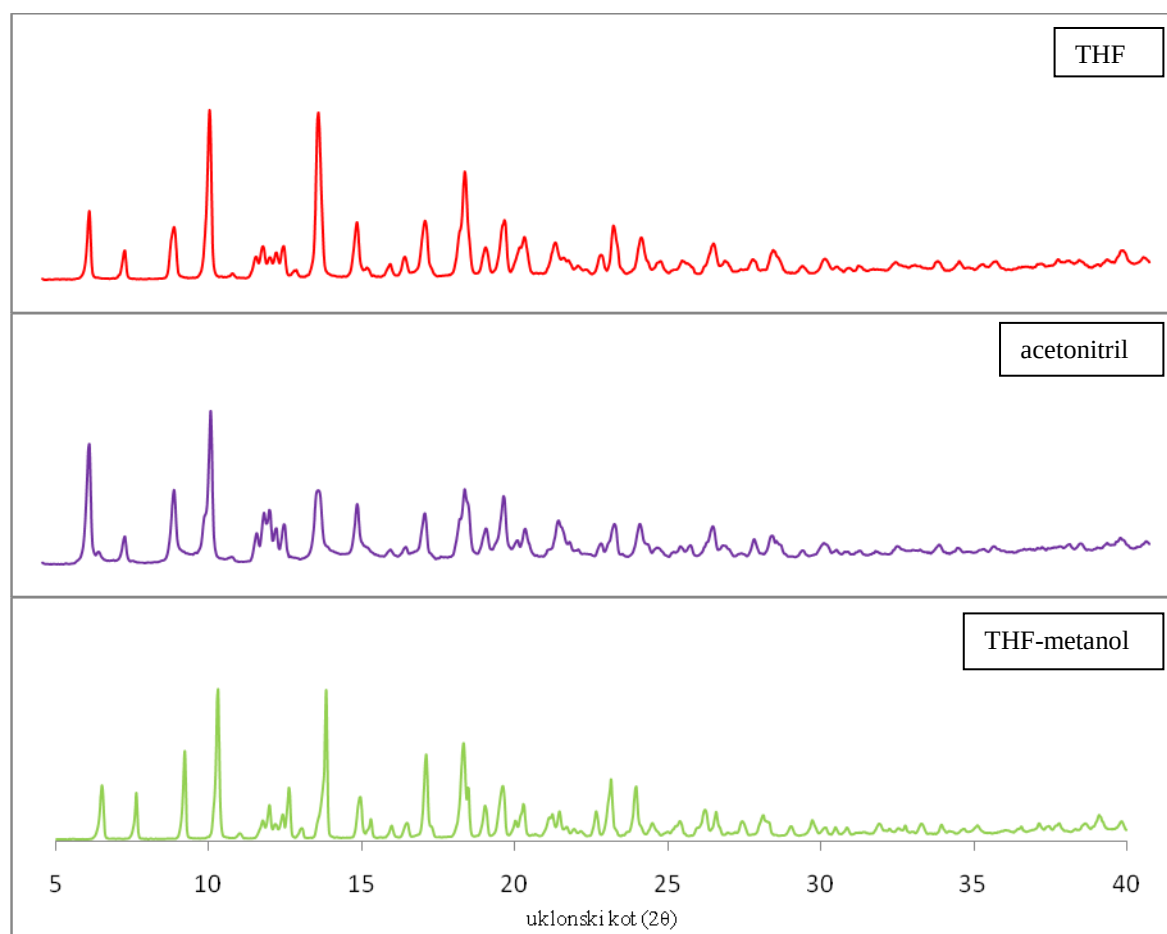
DSC termogrami, ki so prikazani na sliki 11, se ujemajo s termogrami kristalne oblike 0, ki jih je posnela De Jager (37). Na njih je najprej opazen majhen eksotermen rekristalizacijski vrh, nato sledi endotermen vrh desolvatacije in endotemen vrh taljenja KMC. Temperature eksotermnih in endotermnih vrhov so navedene v preglednici 3. Vsem vzorcem smo posneli tudi XRPD difraktograme, ki so prikazani na sliki 12.

Preglednica 3: Temperature eksotermnih in endotermnih vrhov kristalne oblike KMC 0.

Vzorec	Eksotermen vrh (°C)	Endotermen vrh 1 (°C)	Endotermen vrh 2 (°C)
THF	101,17	105,22	228,98
Acetonitril	93,60	99,71	228,61
THF-metanol	106,03	112,72	226,63



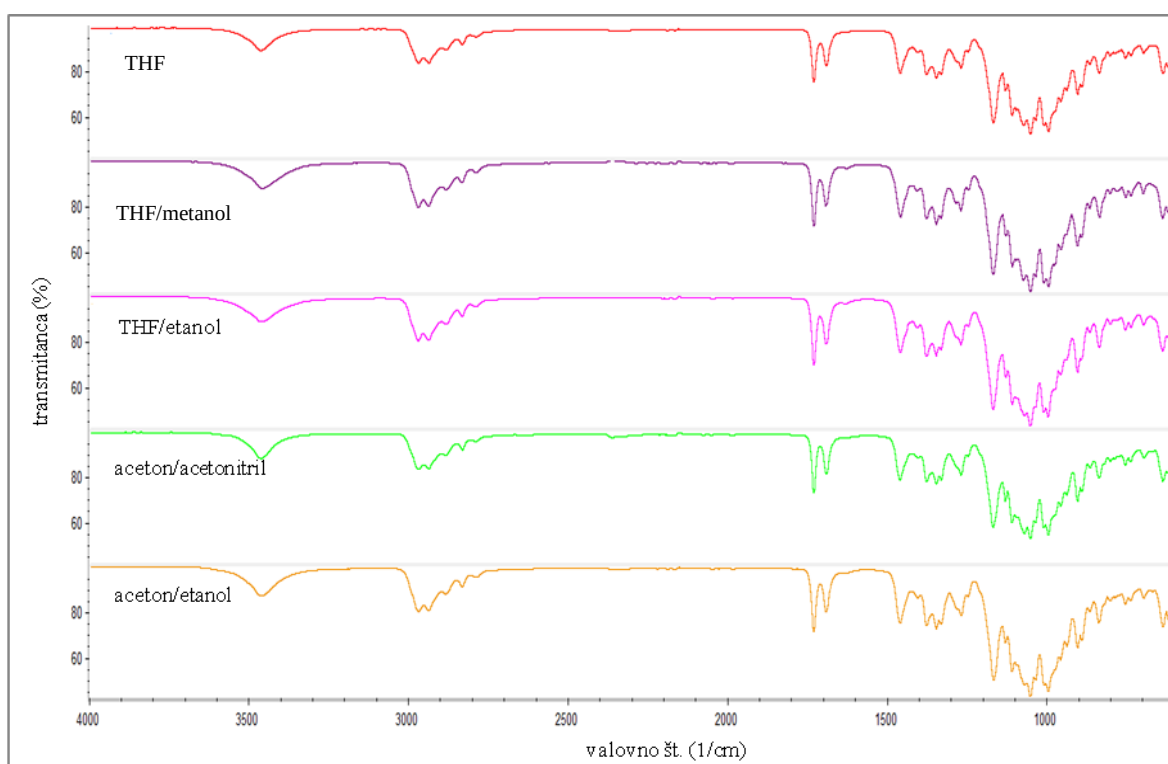
Slika 11: DSC termogrami kristalne oblike KMC 0, posneti v temperaturnem območju od 0 do 250 °C in v dušikovi atmosferi.



Slika 12: Praškovni difraktogrami kristalne oblike KMC 0.

5.1.2 Kristalna oblika I

Kristalno obliko KMC I smo rekristalizirali iz THF in kombinacije topil THF-metanol, izpadle kristale smo sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C. Pri kombinaciji topil THF-metanol smo dobili kristalno obliko I, Liu in Riley (7) sta dobila kristalno obliko II. Pri pripravi kristalov smo mi vročo bistro raztopino prefiltrirali in matičnico pustili na sobnih pogojih (25 °C, 1 bar) 3 dni. Kristale smo odfiltrirali s presesavanjem in jih sušili v vakuumski pečici 4 h pri 50 °C. Dobili smo kristalno obliko I. Liu in Riley (7) pa sta prefiltrirano raztopino ohladila na sobno temperaturo (20-25 °C) in dodatno ohladila v ledeni kopeli. Kristale sta prefiltrirala in jih sušila v vakuumski pečici pri temperaturi 20-50 °C. Dobila sta kristalno obliko II. Kristalno obliko KMC I smo rekristalizirali tudi iz novih kombinacij topil: THF-etanol, aceton-acetonitril in aceton-etanol. Vsem izpadlim kristalom smo posneli IR spektre z ATR tehniko v MID območju. Spektri so prikazani na sliki 13 in se ujemajo s spektrom kristalne oblike KMC I, ki ga je objavil Liu s sodelavcema (6).



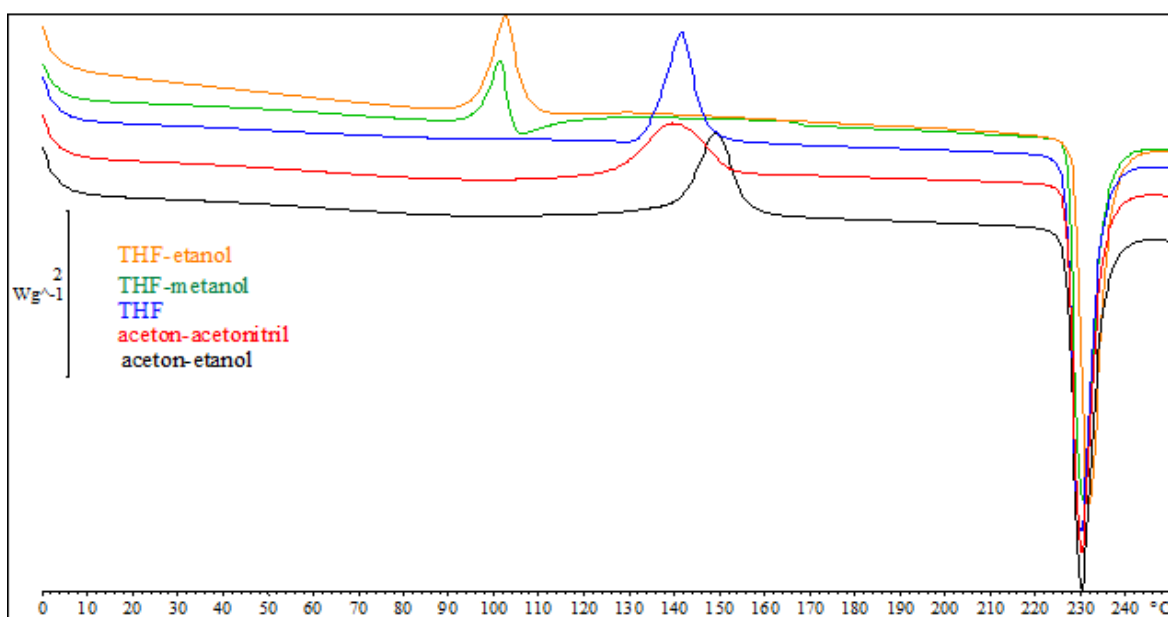
Slika 13: IR spektri kristalne oblike KMC I, posneti z ATR tehniko v MID območju.

Na sliki 14 so prikazane DSC krivulje, na katerih opazimo najprej eksotermne vrhove, kar predstavlja polimorfno transformacijo trdno-trdno, prehod kristalne oblike KMC I v termodinamsko najbolj stabilno kristalno obliko KMC II. Liu s sodelavcema (6) je

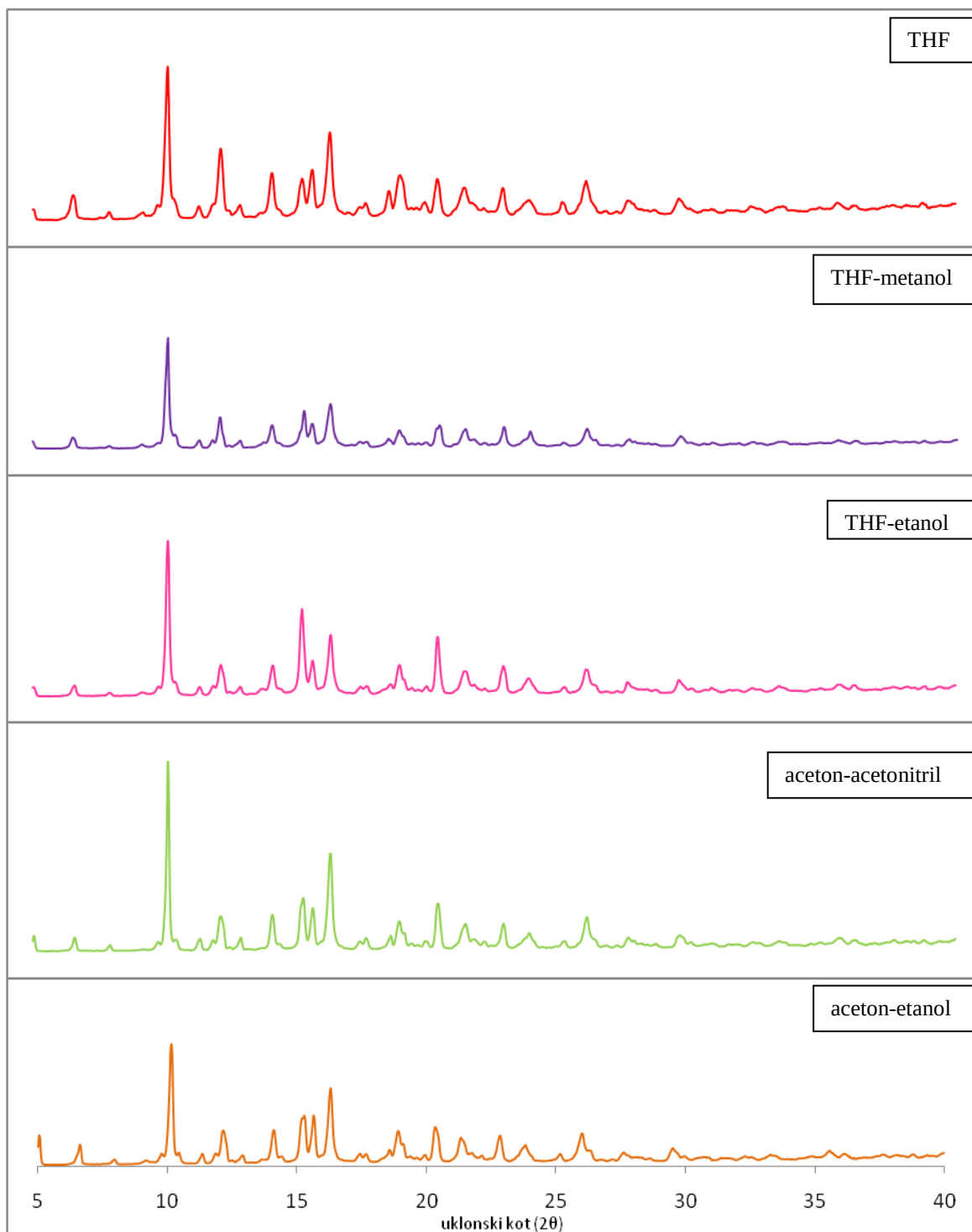
polimorfno transformacijo trdno-trdno navedel pri temperaturi 132,2 °C. Temperature polimorfne transformacije naših vzorcev so navedene v preglednici 4. Eksotermnemu vrhu sledi endotermen vrh, ki predstavlja taljenje KMC. Na sliki 15 so prikazani XRPD difraktogrami, ki se ujemajo z difraktogramom kristalne oblike KMC I, ki ga je objavil Liu s sodelavcema (6).

Preglednica 4: Temperature eksotermnih in endotermnih vrhov kristalne oblike KMC I.

Vzorec	Eksotermen vrh (°C)	Endotermen vrh (°C)
THF	133,83	225,87
THF-metanol	96,02	226,38
THF-etanol	96,02	227,59
Aceton-acetonitril	127,08	226,10
Aceton-etanol	141,07	225,96



Slika 14: DSC termogrami kristalne oblike KMC I, posneti v temperaturnem območju od 0 do 250 °C in v dušikovi atmosferi.

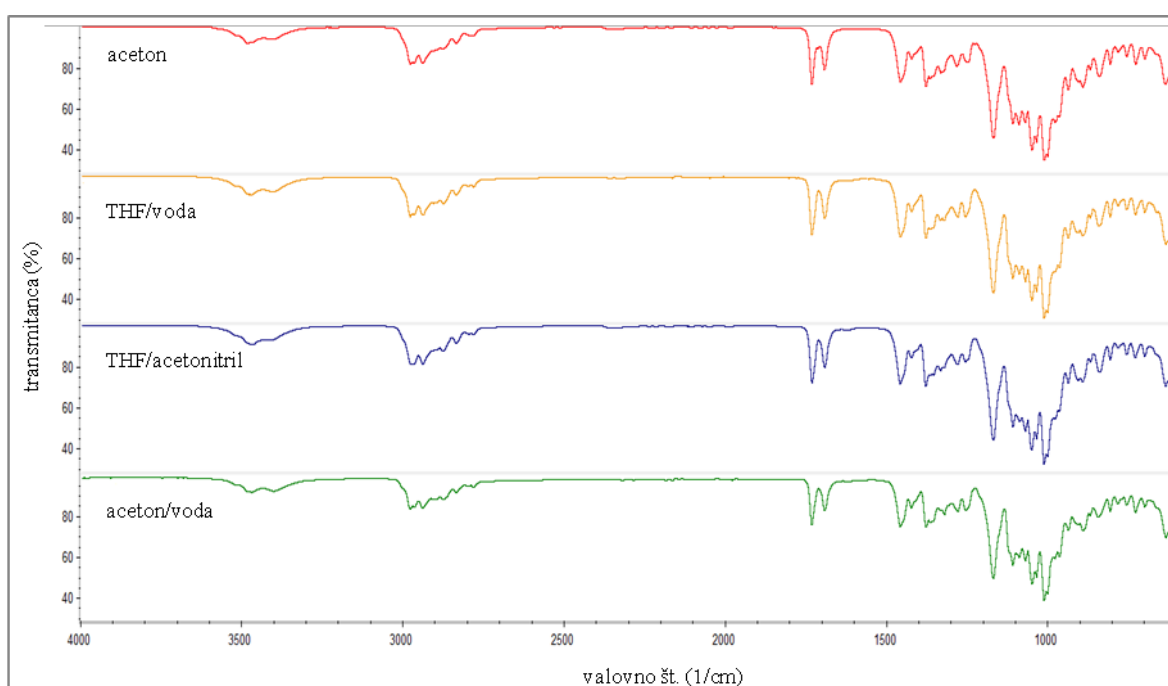


Slika 15: Praškovni difraktogrami kristalne oblike KMC I.

5.1.3 Kristalna oblika II

Kristalno obliko KMC II smo rekristalizirali iz acetona in kombinacije topila in netopila THF-voda. Kristalno obliko KMC II smo dobili tudi pri rekristalizaciji iz kombinacije topil THF-acetonitril, medtem ko je Liu s sodelavcema (6) iz te kombinacije topil izoliral

kristalno obliko I. IR spektri, posneti z ATR tehniko v MID območju, DSC termogrami in XRPD difraktorami vseh naših vzorcev se ujemajo z rezultati, ki sta jih navedla Liu in Riley (7) in potrjujejo kristalno obliko II. Izjema je KMC, rekristaliziran iz kombinacije topila in netopila aceton-voda, saj IR in DSC analize potrjujejo kristalno obliko II, XRPD difraktogram pa ni popolnoma identičen ostalim difraktogramom naših vzorcev kristalne oblike KMC II. Zato smo ta vzorec analizirali s SS NMR in posnet spekter primerjali s spektri kristalne oblike KMC 0, I, II. Na sliki 16 so prikazani IR spektri vseh naših vzorcev kristalne oblike KMC II, posneti z ATR tehniko v MID območju. Posneti spektri se ujemajo s spektrom kristalne oblike KMC II, ki sta ga objavila Liu in Riley (7).

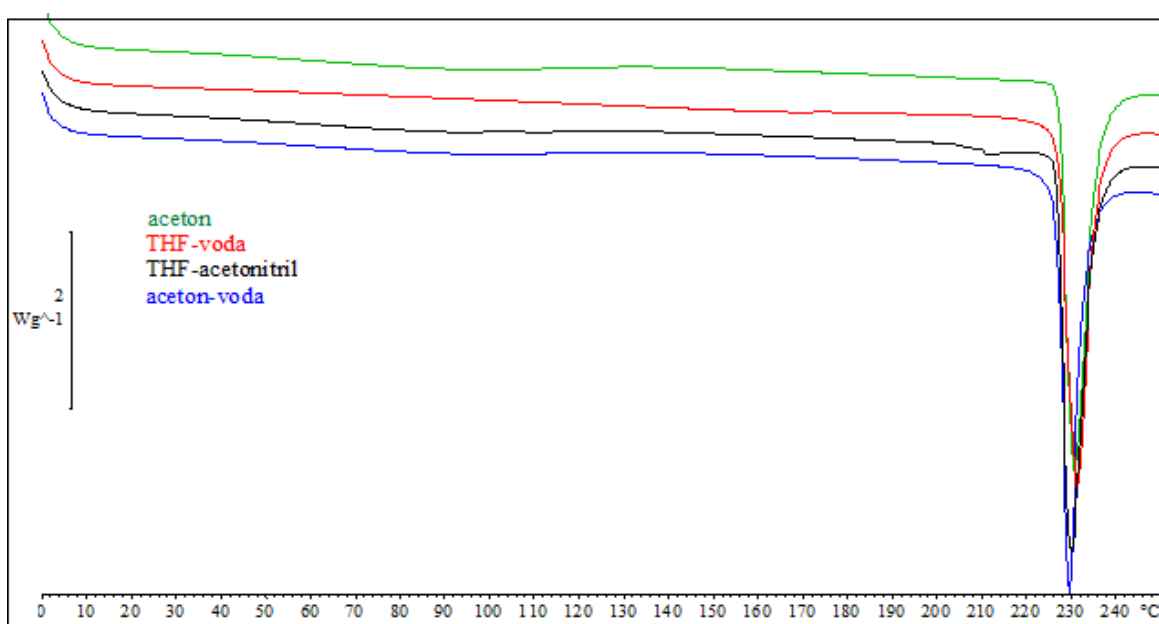


Slika 16: IR spektri kristalne oblike KMC II, posneti z ATR tehniko v MID območju.

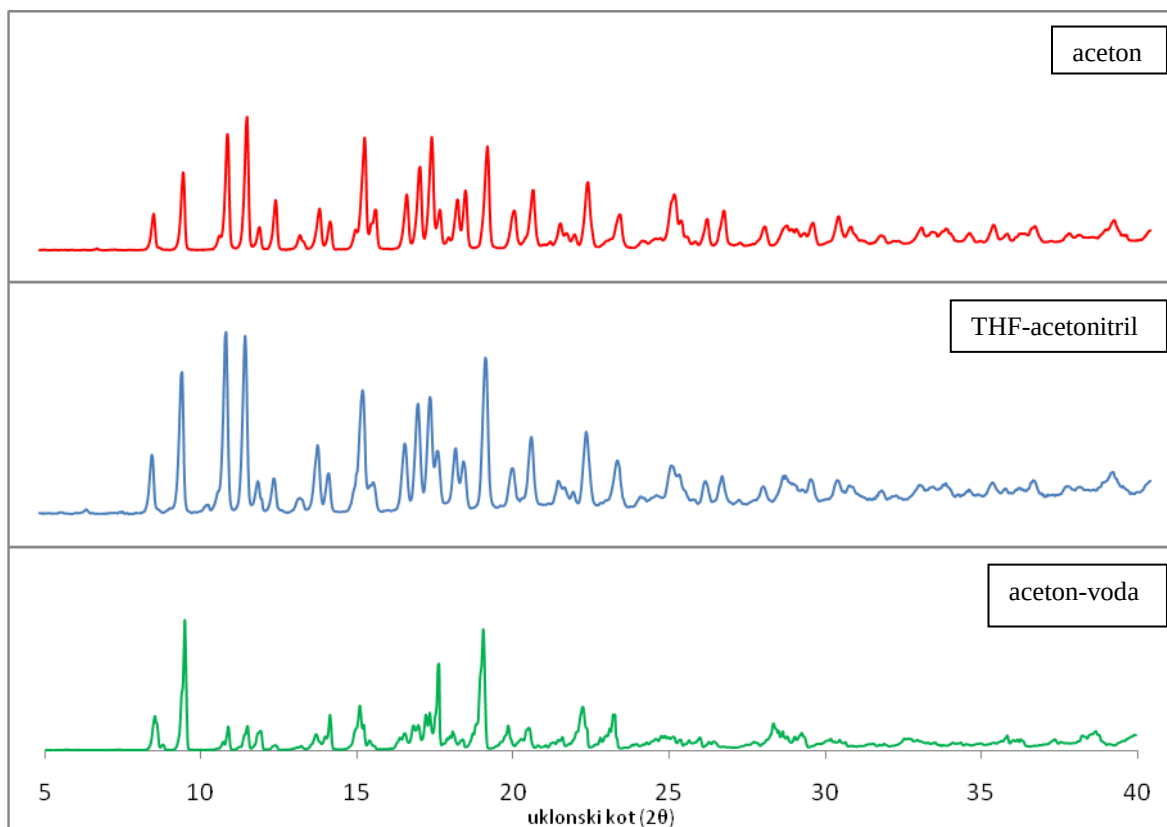
Na sliki 17 so prikazane DSC krivulje. Endotermen vrh predstavlja tališče KMC, ki sta ga za kristalno obliko KMC II Liu in Riley (7) navedla pri temperaturi 223,4 °C. V preglednici 5 so navedene temperature endotermnih vrhov naših vzorcev.

Preglednica 5: Temperature endotermnih vrhov kristalne oblike KMC II.

Vzorec	Endotermen vrh (°C)
acetone	226,54
THF-voda	226,24
THF-acetonitril	225,99
Aceton-voda	225,83

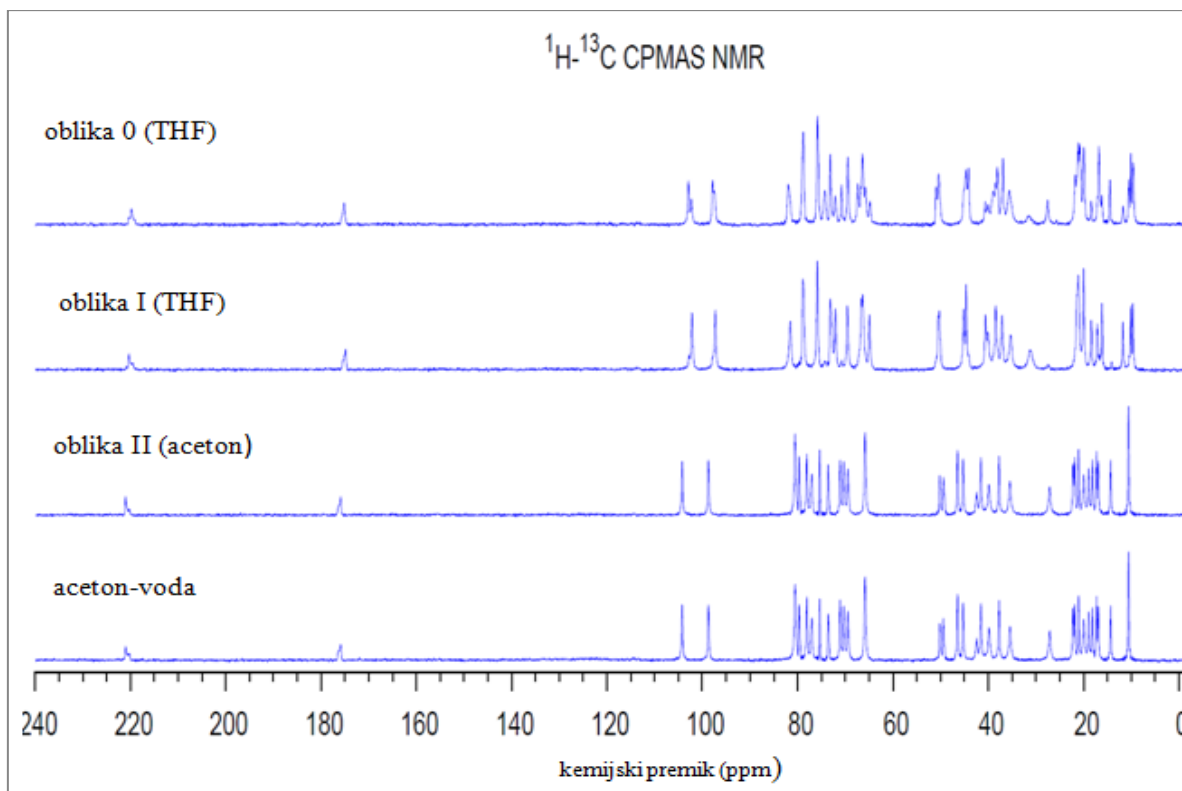
**Slika 17:** DSC termogrami kristalne oblike KMC II, posneti v temperaturnem območju od 0 do 250 °C in v dušikovi atmosferi.

Na sliki 18 so prikazani XRPD difraktogrami naših vzorcev, ki se ujemajo z difraktogramom kristalne oblike KMC II, ki sta ga objavila Liu in Riley (7). Izjema je XRPD difraktogram kombinacije topila in netopila aceton-voda, ki se malo razlikuje od posnetih difraktogramov KMC rekristaliziranega iz topla acetone in kombinacije topil THF-acetonitril.



Slika 18: Praškovni difraktogrami kristalne oblike KMC II in difraktogram KMC rekristaliziranega iz topila acetone-voda.

Na sliki 19 so prikazani SS NMR spektri kristalne oblike KMC 0, I, II in KMC rekristaliziranega iz kombinacije topila in netopila acetone-voda. Spektri kristalne oblike KMC 0, I in II se med seboj razlikujejo. Spekter KMC rekristaliziranega iz kombinacije topil acetone-voda je identičen spektru kristalne oblike KMC II in tako smo s SS NMR analizo potrdili rezultate IR spektroskopije (ATR tehnika v MID območju) in DSC analize.



Slika 19: SS NMR spektri kristalne oblike 0, I in II ter KMC rekristaliziranega iz kombinacije topila in netopila acetona-voda.

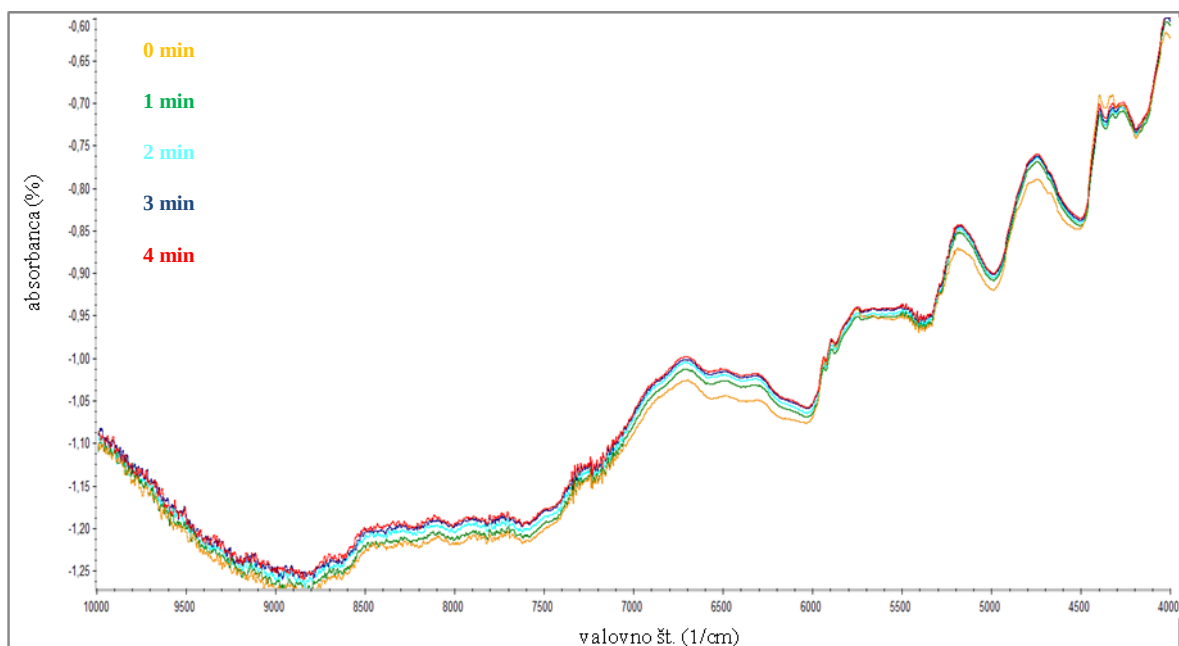
5.2 KVANTITATIVNA ANALIZA ZMESI Z INFRARDEČO (IR) SPEKTROSKOPIJO

5.2.1 Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi z mikrokristalno celulozo (MCC) s tehniko razpršene odbojnosti (DR) v bližnjem infrardečem območju (NIR)

S tem eksperimentom smo želeli ugotoviti, ali je DR tehnika v NIR območju primerna za kvantitativno analizo naše zmesi.

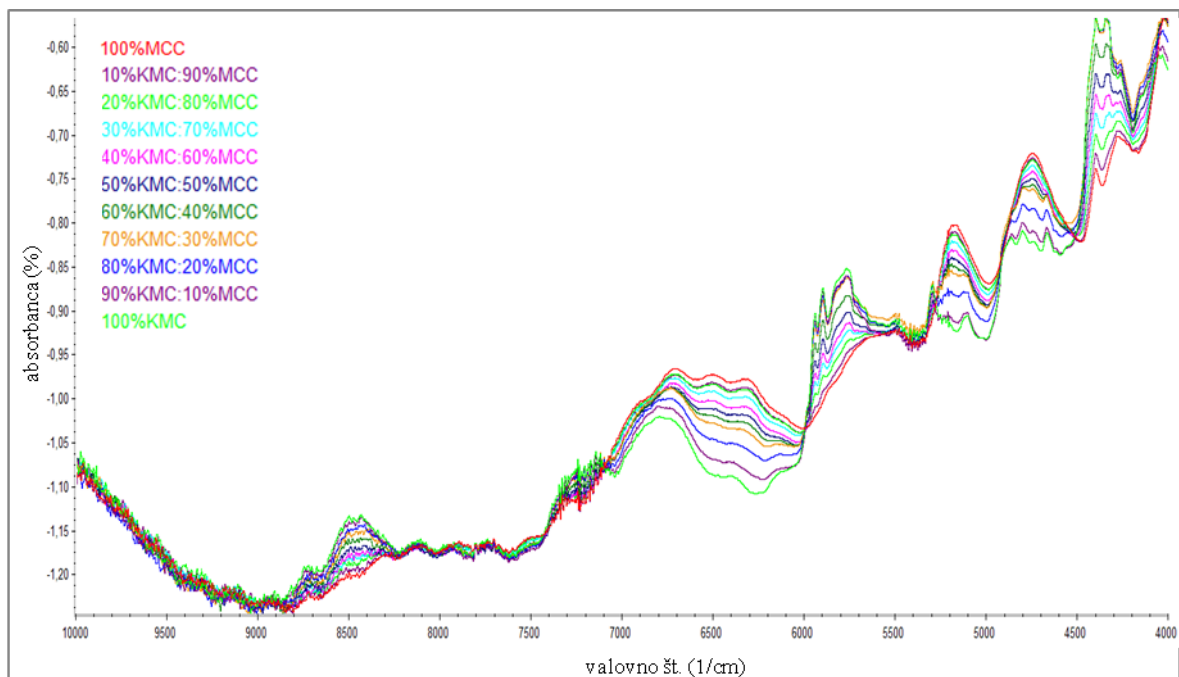
V ta namen smo pripravili 11 standardov z vsebnostjo kristalne oblike KMC I od 0 % do 100 % s postopnim večanjem deleža v zmesi za 10 % in s postopnim manjšanjem deleža MCC v zmesi za 10 %. Pri pripravi zmesi je zelo pomembno, da je vzorec homogen. Dobro mešanje posameznih komponent med seboj smo najprej zagotovili s poenotenjem velikosti delcev posameznih komponent. KMC, katerega kristale smo predhodno strli v terilnici, in MCC smo presejali skozi siti velikosti 50 μm in 125 μm in uporabili frakcijo velikosti od 50 μm do 125 μm . 100 mg posamezne zmesi smo natehtali v steklene vial in jih mešali z ročno mešalko. Proces homogenizacije smo spremljali z DR tehniko v NIR območju. Po vsaki minuti mešanja smo posneli spekter zmesi in ugotovili, da je za

doseganje homogenosti potreben čas mešanja 3 minute. Na sliki 20 vidimo, da se spekter po 3 minutah mešanja ne spreminja več, kar pomeni, da je zmes homogena.



Slika 20: IR spektri (DR tehnika v NIR območju) dvokomponentne zmesi, posneti po 1., 2., 3. in 4. minutah mešanja z ročno mešalko.

Pripravljenim homogenim standardom smo posneli spektre z DR tehniko v NIR območju, ki so prikazani na sliki 21. Za vsak standard smo posneli 3 spektre.



Slika 21: IR spektri dvokomponentne zmesi 11 standardov, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

Za validacijo metode, ki je pokazatelj kakovosti metode, smo pripravili 5 validacijskih standardov, pri katerih smo prav tako izvedli 3 meritve za vsak standard. Z računalniškim programom Omnic 9.1 smo spektre vseh standardov spremenili v 1. in 2. odvod ter nato z računalniškim programom TQ Analyst 9.1.17 s PLS metodo kvantitativno analizirali podatke, ki so prikazani v preglednici 7. Za kvantitativno analizo smo izbrali območja valovnih števil, ki so navedena v preglednici 6.

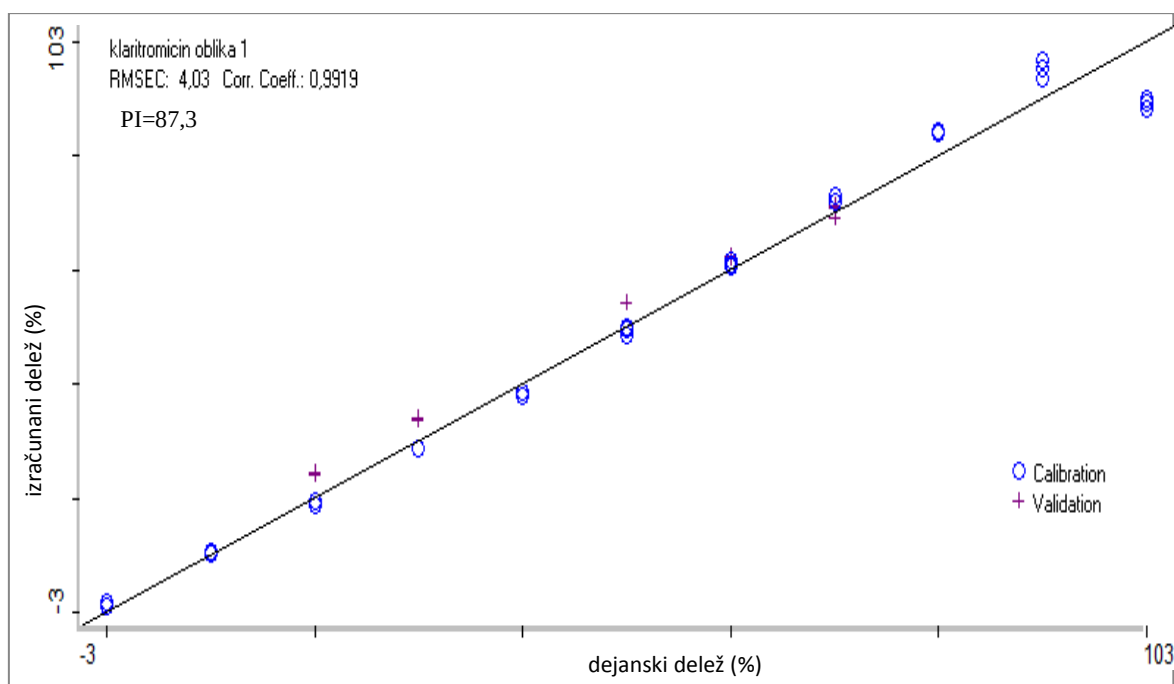
Preglednica 6: Območja valovnih števil za kvantitativno analizo spektrov dvokomponentne zmesi, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

Valovno št. (cm ⁻¹)	
1. odvod	2. odvod
4018,11 – 4128,20	4070,94 – 4169,13
4156,60 – 4191,68	4428,63 – 4453,93
4454,58 – 4629,73	4749,73 – 4774,04
4821,17 – 4900,22	4812,40 – 4846,78
5215,32 – 5298,24	5286,38 – 5309,16
5633,02 – 5762,36	5721,52 – 5773,46
5989,83 – 6058,95	5859,87 – 5881,90

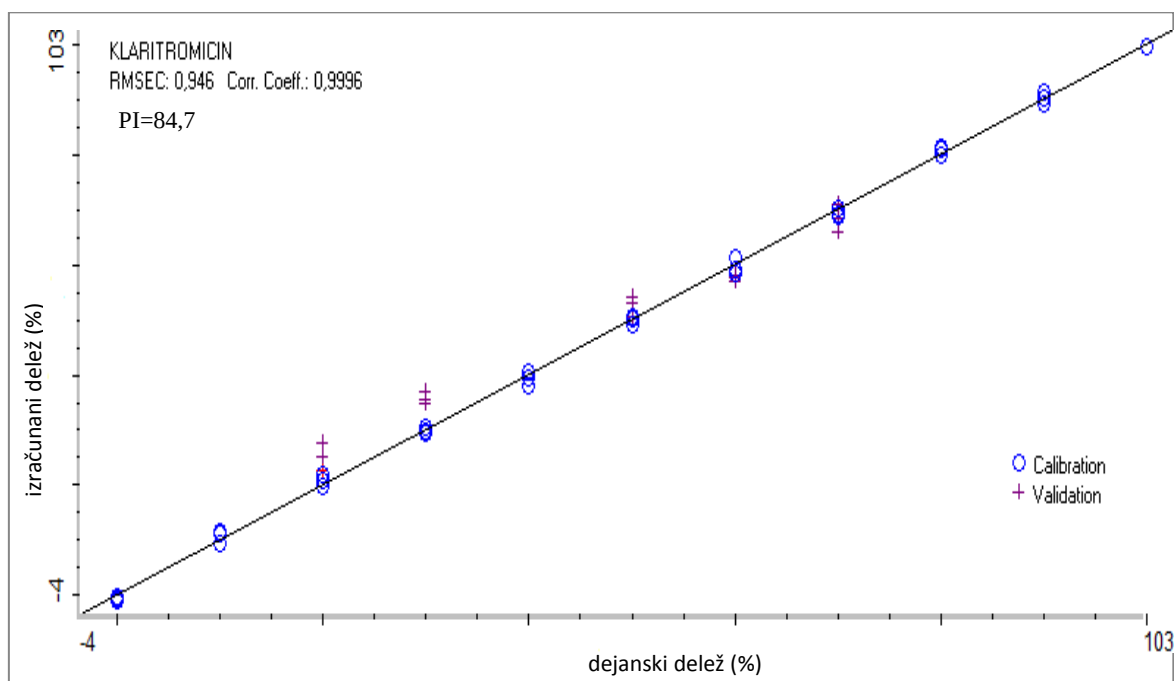
Preglednica 7: Validacijski in kalibracijski rezultati za kristalno obliko KMC I prvih in drugih odvodov spektrov dvokomponentne zmesi, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

NIR-2 KOMPONENTI		KMC KRISTALNA OBLIKA I				
		dejanski delež KMC I (%)	1. odvod		2. odvod	
št. standarda	validacija/kalibracija		izračunani delež (%)	razlika (%)	izračunani delež (%)	razlika (%)
1	validacija	20	24,50	4,50	22,55	2,55
		20	24,50	4,50	27,81	7,81
		20	24,23	4,23	25,33	5,33
2	validacija	30	33,86	3,86	34,74	4,74
		30	34,20	4,20	37,12	7,12
		30	34,17	4,17	35,69	5,69
3	validacija	50	54,24	4,24	50,52	0,52
		50	54,31	4,31	54,10	4,10
		50	54,38	4,38	53,11	3,11
4	validacija	60	62,53	2,53	57,56	-2,44
		60	62,05	2,05	58,14	-1,86
		60	61,91	1,91	56,89	-3,11

5	validacija	70	71,33	1,33	71,14	1,14
		70	71,06	1,06	66,08	-3,92
		70	68,98	-1,02	68,56	-1,44
1	kalibracija	0	1,73	1,73	-0,73	-0,73
		0	1,87	1,87	-0,32	-0,32
		0	1,22	1,22	-1,00	-1,00
2	kalibracija	10	10,72	0,72	11,22	1,22
		10	10,82	0,82	11,68	1,68
		10	10,27	0,27	9,40	-0,60
3	kalibracija	20	18,80	-1,20	20,71	0,71
		20	19,61	-0,39	21,80	1,80
		20	18,83	-1,17	19,75	-0,25
4	kalibracija	30	28,79	-1,21	29,90	-0,10
		30	28,62	-1,38	29,57	-0,43
		30	28,81	-1,19	30,53	0,53
5	kalibracija	40	38,08	-1,92	40,58	0,58
		40	38,67	-1,33	39,63	-0,37
		40	38,57	-1,43	37,95	-2,05
6	kalibracija	50	48,74	-1,26	50,64	0,64
		50	49,52	-0,48	50,24	0,24
		50	49,94	-0,06	49,06	-0,94
7	kalibracija	60	61,59	1,59	61,18	1,18
		60	60,97	0,97	59,13	-0,87
		60	60,51	0,51	58,46	-1,54
8	kalibracija	70	73,14	3,14	69,33	-0,67
		70	71,86	1,86	70,19	0,19
		70	72,09	2,09	68,92	-1,08
9	kalibracija	80	84,08	4,08	79,77	-0,23
		80	84,11	4,11	81,07	1,07
		80	84,49	4,49	81,49	1,49
10	kalibracija	90	96,86	6,86	90,14	0,14
		90	95,25	5,25	91,53	1,53
		90	93,59	3,59	89,33	-0,67
11	kalibracija	100	90,21	-9,79	99,77	-0,23
		100	89,48	-10,52	99,45	-0,55
		100	88,16	-11,84	99,63	-0,37



Slika 22: Grafični prikaz dejanskega in izračunanega deleža kristalne oblike KMC I v dvokomponentnih zmesih pri obdelavi spektrov 1. odvoda, posnetih z DR tehniko v NIR območju.



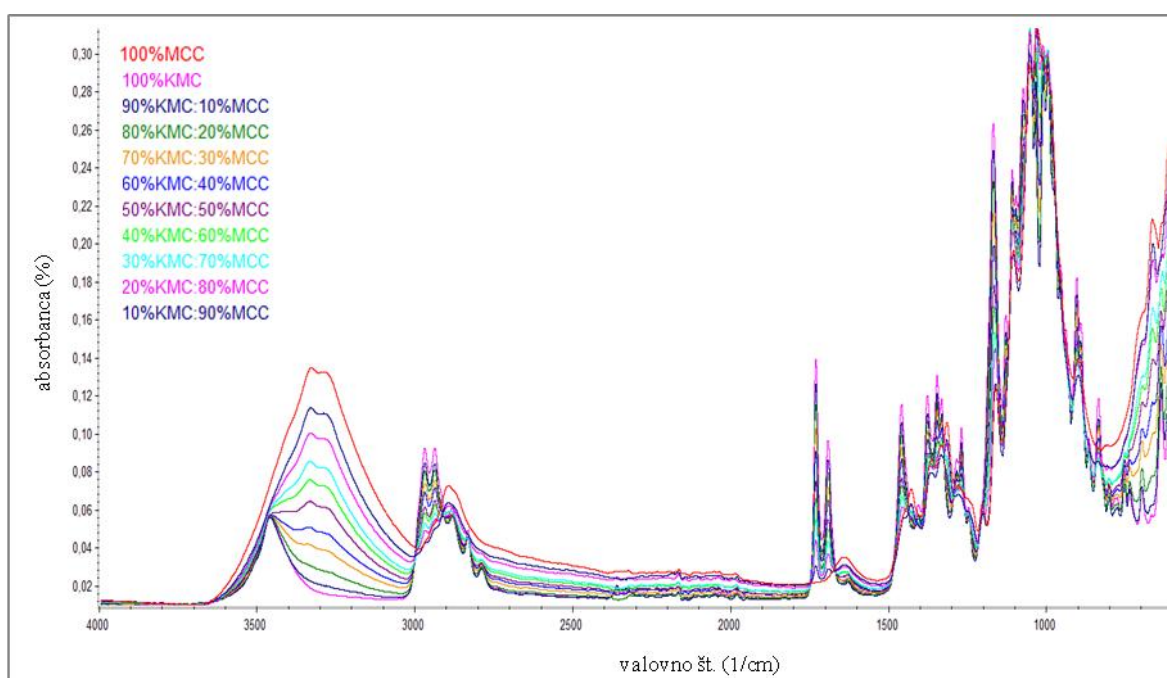
Slika 23: Grafični prikaz dejanskega in izračunanega deleža kristalne oblike KMC I v dvokomponentnih zmesih pri obdelavi spektrov 2. odvoda, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

Pri prvem odvodu spektrov, ki smo jih posneli z DR tehniko v NIR območju, je vrednost r 0,9919, RMSEC 4,03 in PI metode 87,3 (slika 22). Pri drugem odvodu spektrov pa so rezultati boljši, saj je vrednost r 0,9996, RMSEC 0,946 in PI metode 84,7 (slika 23).

5.2.2 Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi z mikrokristalno celulozo (MCC) s tehniko oslabljene popolne odbojnosti (ATR) v srednjem infrardečem območju (MID)

S tem eksperimentom smo želeli ugotoviti, kako je ATR tehnika v MID območju primerna za kvantitativno analizo naše zmesi.

S to metodo smo posneli spektre 11 standardom (slika 24), ki smo jih predhodno analizirali z DR tehniko v NIR območju. Za vsak standard smo posneli 3 spektre.



Slika 24: IR spektri dvokomponentne zmesi 11 standardov, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

Za validacijo metode, ki je pokazatelj kakovosti metode, smo posneli tri serije spektrov 5 validacijskim standardom. Z računalniškim programom Omnic 9.1 smo vse spektre spremenili v 1. in 2. odvod ter nato z računalniškim programom TQ Analyst 9.1.17 s PLS metodo kvantitativno analizirali podatke, ki so prikazani v preglednici 9. Za kvantitativno analizo smo izbrali območja valovnih števil, ki so navedena v preglednici 8.

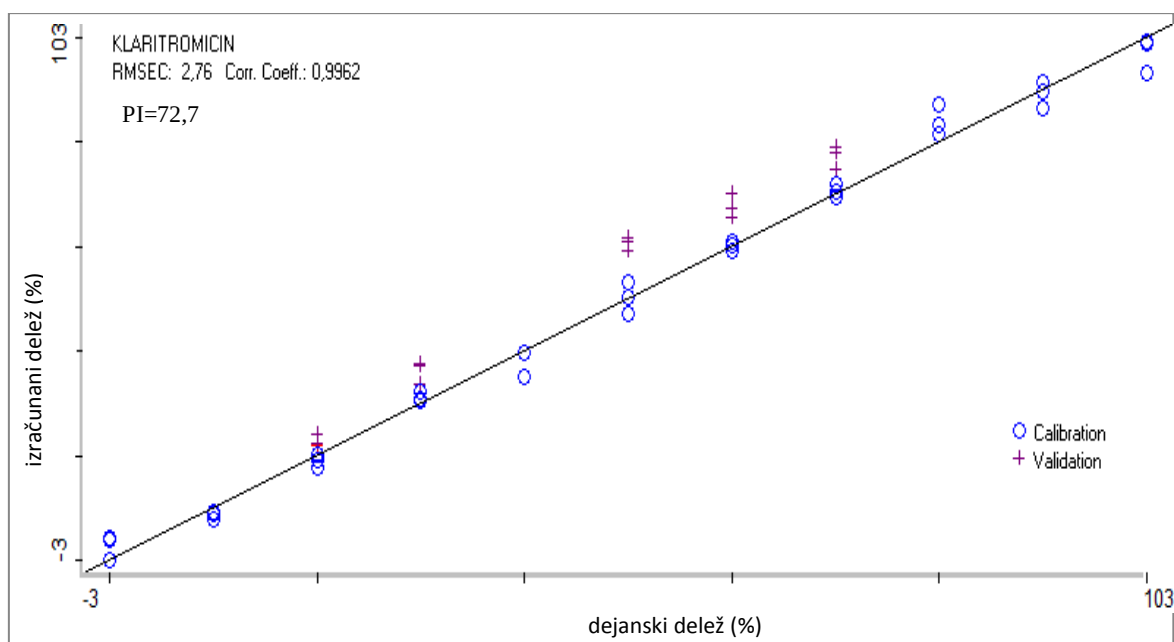
Preglednica 8: Območja valovnih števil za kvantitativno analizo spektrov dvokomponentne zmesi, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

Valovno št. (cm ⁻¹)
3021,17 – 2762,67
1758,76 – 1659,64
1488,78 – 1405,76
1396,21 – 1336,72
1330,66 – 1285,97
1203,61 – 1173,12
1021,87 – 1008,70
834,84 – 810,00

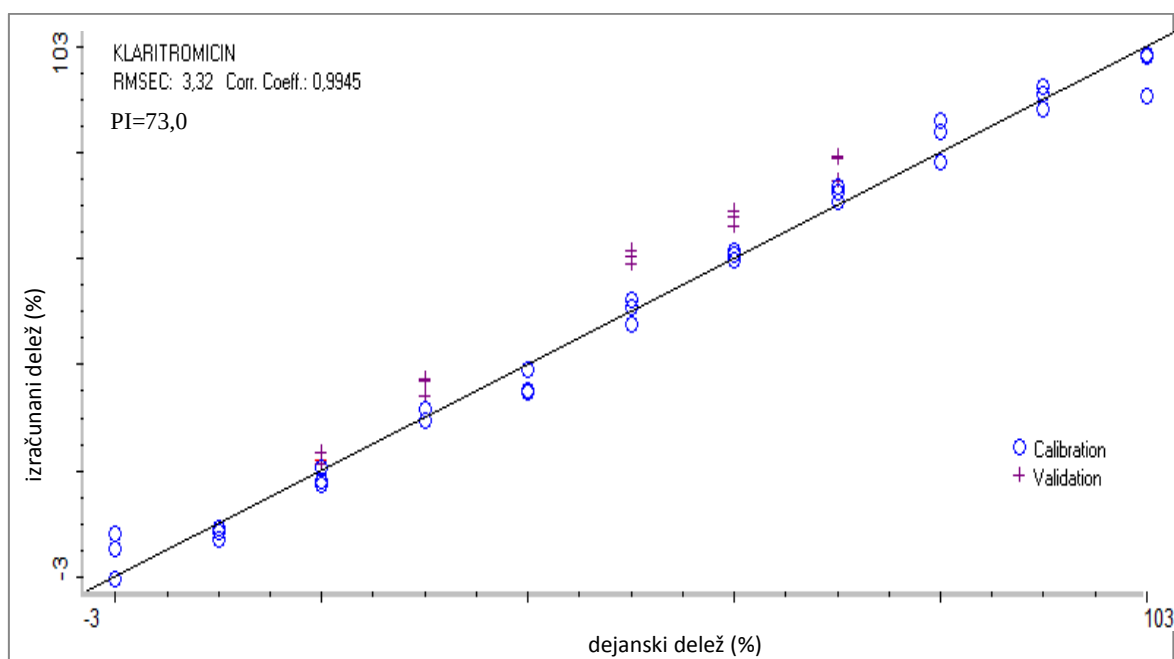
Preglednica 9: Validacijski in kalibracijski rezultati za kristalno obliko KMC I prvih in drugih odvodov spektrov dvokomponentne zmesi, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

ATR – 2 KOMPONENTI		KMC KRSTALNA OBLIKA I				
		dejanski delež KMC I (%)	1. odvod		2. odvod	
št. standarda	validacija/kalibracija		izračunani delež (%)	razlika (%)	izračunani delež (%)	razlika (%)
1	validacija	20,00	22,17	2,17	21,9	1,90
		20,00	22,52	2,52	21,27	1,27
		20,00	24,25	4,25	23,55	3,55
2	validacija	30,00	37,25	7,25	37,26	7,26
		30,00	37,54	7,54	36,81	6,81
		30,00	33,83	3,83	34,27	4,27
3	validacija	50,00	61,54	11,54	61,63	11,63
		50,00	59,30	9,30	59,15	9,15
		50,00	60,89	10,89	60,32	10,32
4	validacija	60,00	70,05	10,05	68,94	8,94
		60,00	67,39	7,39	68,03	8,03
		60,00	65,69	5,69	66,12	6,12
5	validacija	70,00	78,01	8,01	78,79	8,79
		70,00	74,73	4,73	74,77	4,77
		70,00	79,00	9,00	79,31	9,31
1	kalibracija	0,00	4,25	4,25	8,06	8,06
		0,00	4,04	4,04	5,26	5,26
		0,00	0,17	0,17	0,46	0,46
2	kalibracija	10,00	9,24	-0,76	9,27	-0,73
		10,00	9,05	-0,95	8,6	-1,40
		10,00	7,77	-2,23	7,01	-2,99
3	kalibracija	20,00	20,39	0,39	20,51	0,51

		20,00	17,58	-2,42	17,21	-2,79
		20,00	19,04	-0,96	18,23	-1,77
4	kalibracija	30,00	30,79	0,79	29,45	-0,55
		30,00	30,58	0,58	29,54	-0,46
		30,00	32,26	2,26	31,46	1,46
		40,00	39,83	-0,17	38,94	-1,06
5	kalibracija	40,00	35,22	-4,78	35,25	-4,75
		40,00	35,27	-4,73	34,79	-5,21
		50,00	47,04	-2,96	47,50	-2,50
6	kalibracija	50,00	53,02	3,02	52,1	2,10
		50,00	50,32	0,32	50,84	0,84
		60,00	59,25	-0,75	59,83	-0,17
7	kalibracija	60,00	60,85	0,85	61,43	1,43
		60,00	60,42	0,42	60,71	0,71
		70,00	69,35	-0,65	70,75	0,75
8	kalibracija	70,00	70,70	0,70	72,61	2,61
		70,00	72,11	2,11	73,57	3,57
		80,00	83,15	3,15	83,83	3,83
9	kalibracija	80,00	81,67	1,67	78,21	-1,79
		80,00	87,31	7,31	86,26	6,26
		90,00	91,52	1,52	92,61	2,61
10	kalibracija	90,00	86,47	-3,53	88,09	-1,91
		90,00	89,82	-0,18	91,08	1,08
		100,00	93,34	-6,66	90,65	-9,35
11	kalibracija	100,00	98,94	-1,06	98,62	-1,38
		100,00	99,23	-0,77	98,18	-1,82



Slika 25: Grafični prikaz dejanskega in izračunane deleža kristalne oblike KMC I v dvokomponentnih zmesih pri obdelavi spektrov 1. odvoda, posnetih z ATR tehniko v MID območju.



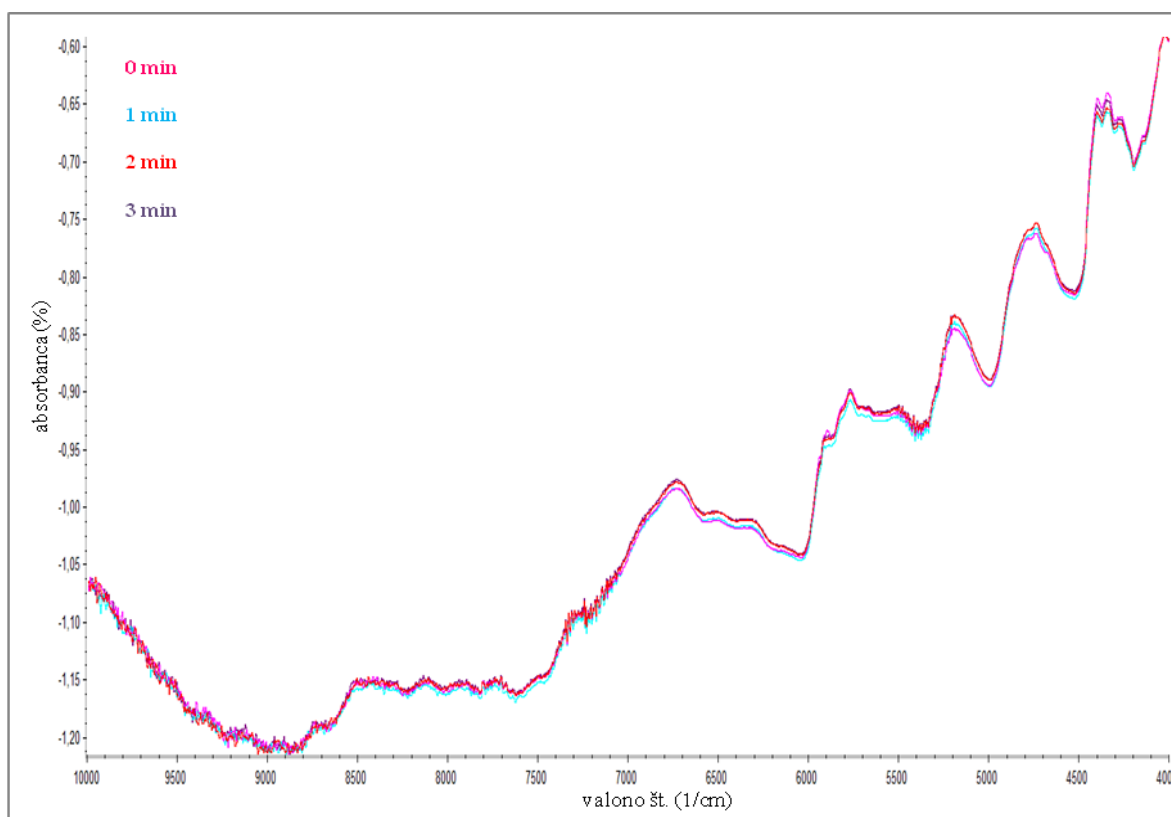
Slika 26: Grafični prikaz dejanskega in izračunane deleža kristalne oblike KMC I v dvokomponentnih zmesih pri obdelavi spektrov 2. odvoda, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

Pri obdelavi prvih odvodov spektrov, ki smo jih posneli z ATR tehniko v MID območju, s PLS metodo smo dobili vrednost r 0,9962, RMSEC 2,76 in PI metode 72,7 (slika 25). Pri obdelavi drugih odvodov spektrov s PLS metodo pa je vrednost r 0,9945, RMSEC 3,32 in PI metode 73,0 (slika 26).

5.2.3 Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi s kristalno obliko klaritromicina (KMC) II in mikrokristalno celulozo (MCC) s tehniko razpršene odbojnosti (DR) v bližnjem infrardečem območju (NIR)

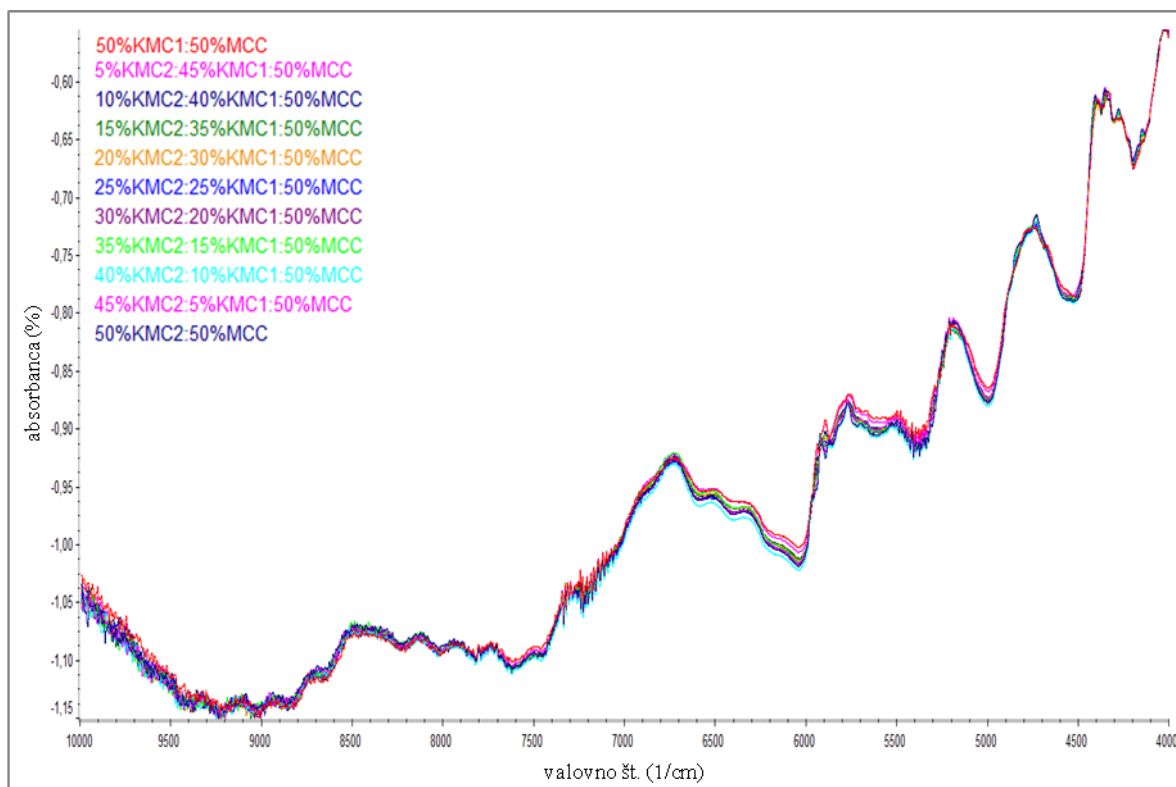
S tem eksperimentom smo želeli ugotoviti, kako je DR tehnika v NIR območju primerna za kvantitativno analizo naše zmesi.

V ta namen smo pripravili 11 standardov z vsebnostjo kristalne oblike KMC II od 0 % do 50 % s postopnim večanjem deleža v zmesi za 5 % in kristalne oblike KMC I od 50 % do 0 % s postopnim manjšanjem deleža v zmesi za 5 % ter s konstantno vsebnostjo MCC 50 %. Za doseganje homogenosti vzorca smo kristalne oblike KMC I in II, katerih kristale smo predhodno strli v terilnici, in MCC presejali skozi siti velikosti 50 μm in 125 μm ter uporabili frakcijo velikosti od 50 μm do 125 μm . 100 mg posamezne zmesi smo natehtali v steklene vialle in jih mešali z ročno mešalko. Proces homogenizacije smo spremljali z DR tehniko v NIR območju. Po vsaki minuti mešanja smo zmesi posneli spekter in ugotovili, da je za doseganje homogenosti potreben čas mešanja 3 minute. To je razvidno iz slike 27, saj se spektra, posneta po 2. in 3. minuti mešanja, prekrivata.

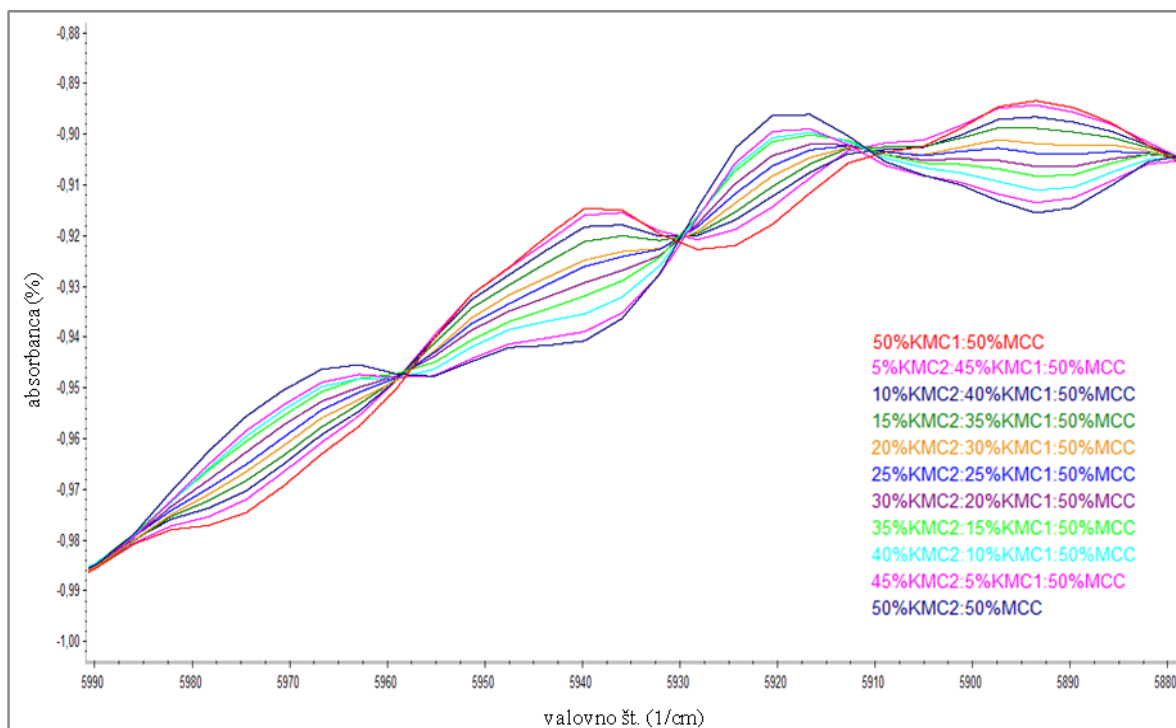


Slika 27: IR spektri (DR tehnika v NIR območju) trokomponentne zmesi, posneti po 1., 2. in 3. minuti mešanja z ročno mešalko.

Pripravljenim homogenim standardom smo posneli spektre z DR tehniko v NIR območju kar je prikazano na sliki 28. Na sliki 29 so prikazani isti spektri v območju od 5990 cm^{-1} do 5880 cm^{-1} , kjer se lepo vidijo razlike med standardi. Za vsak standard smo posneli 3 spektre.



Slika 28: IR spektri trokomponentne zmesi 11 standardov, posnetih z DR tehniko v NIR območju.



Slika 29: IR spektri trokomponentne zmesi 11 standardov v območju od 5990 cm^{-1} do 5880 cm^{-1} , posnetih z DR tehniko v NIR območju.

Pripravili smo tudi 5 validacijskih standardov. Za vsak standard smo izvedli 3 meritve. Z računalniškim programom Omnic 9.1 smo spektre spremenili v 1. in 2. odvod ter nato z računalniškim programom TQ Analyst 9.1.17 s PLS metodo kvantitativno analizirali podatke, kar je prikazano v preglednici 11. Za kvantitativno analizo smo izbrali območja valovnih števil, ki so navedena v preglednici 10.

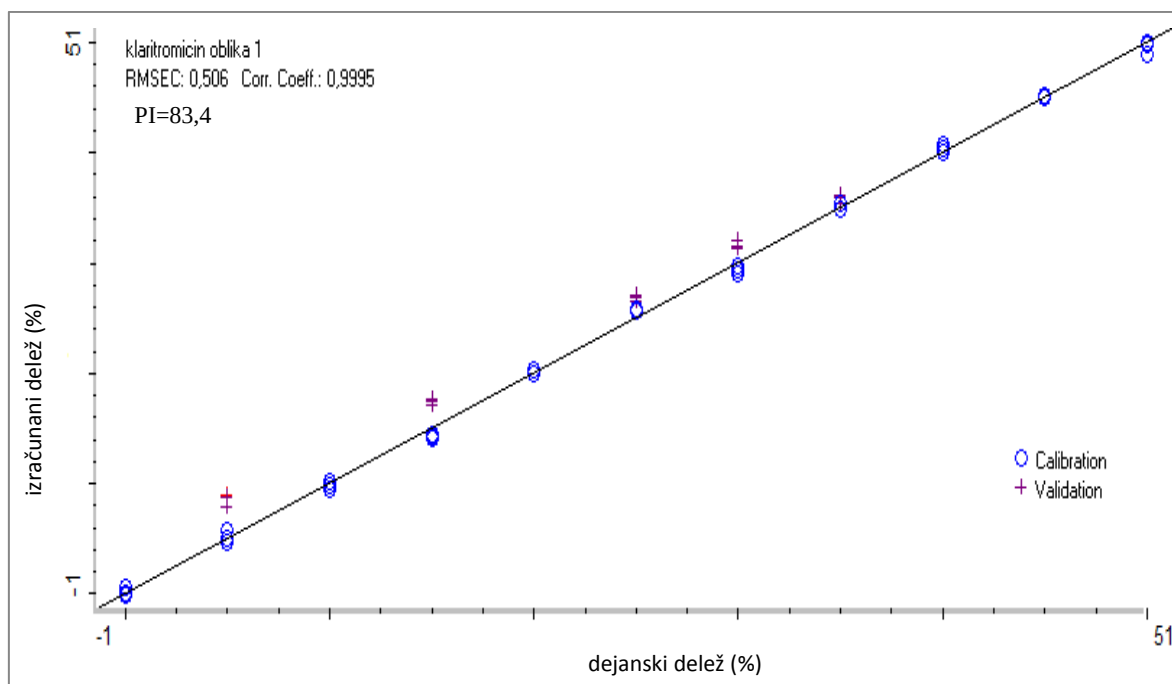
Preglednica 10: Območja valovnih števil za kvantitativno analizo spektrov trokomponentne zmesi, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

Valovno št. (cm^{-1})
4613,00 – 4927,00
5102,00 – 5146,00
5844,00 – 5985,00
5318,00 – 5268,00

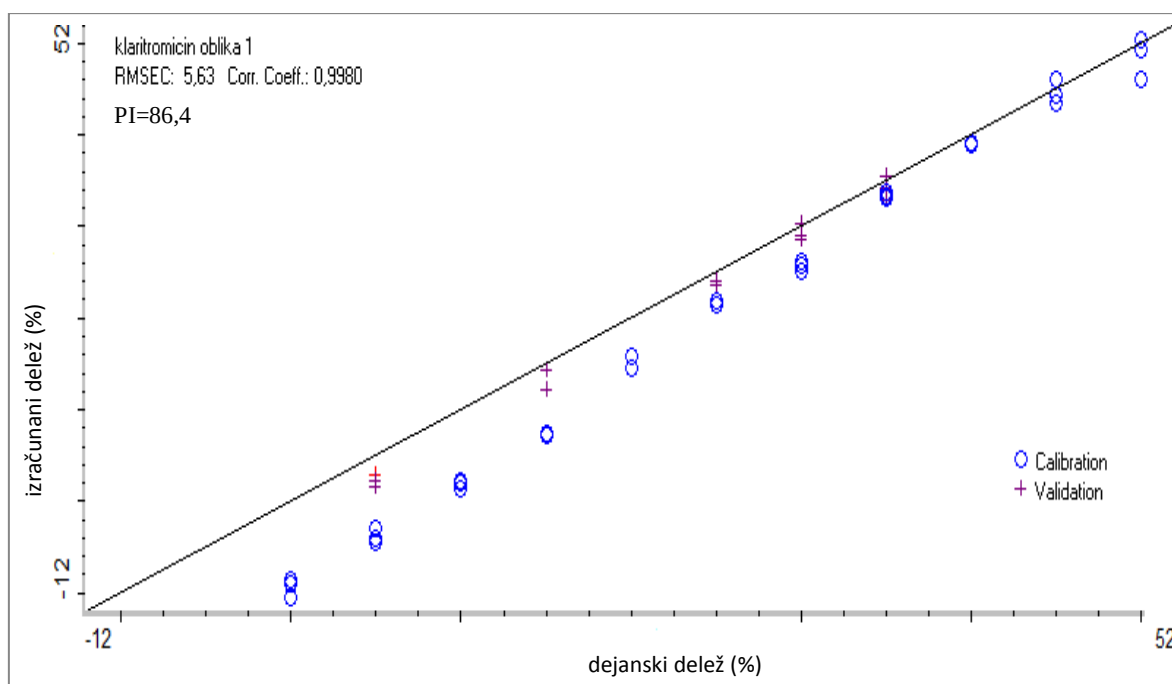
Preglednica 11: Validacijski in kalibracijski rezultati za kristalno obliko KMC I prvih in drugih odvodov spektrov trokomponentne zmesi, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

DR- 3 KOMPONENTE		KMC KRSTALNA OBLIKA I				
		dejanski delež KMC I (%)	1. odvod		2. odvod	
št. standarda	validacija/kalibracija		izračunani delež (%)	razlika (%)	izračunani delež (%)	razlika (%)
1	validacija	5	9,03	4,03	2,94	-2,06
		5	7,96	2,96	1,53	-3,47
		5	8,69	3,69	2,30	-2,70
2	validacija	15	17,54	2,54	14,36	-0,64
		15	17,12	2,12	12,20	-2,80
		15	17,69	2,69	12,14	-2,86
3	validacija	25	26,52	1,52	23,57	-1,43
		25	26,90	1,90	24,12	-0,88
		25	27,06	2,06	24,05	-0,95
4	validacija	30	31,50	1,50	28,61	-1,39
		30	32,07	2,07	30,21	0,21
		30	31,38	1,38	28,98	-1,02
5	validacija	35	35,97	0,97	34,12	-0,88
		35	35,34	0,34	32,86	-2,14
		35	36,18	1,18	35,57	0,57
1	kalibracija	0	0,02	0,02	-8,91	-8,91
		0	-0,12	-0,12	-10,52	-10,52
		0	0,61	0,61	-8,57	-8,57
2	kalibracija	5	4,71	-0,29	-2,92	-7,92
		5	5,71	0,71	-3,98	-8,98
		5	5,02	0,02	-4,42	-9,42
3	kalibracija	10	9,85	-0,15	2,29	-7,71
		10	10,15	0,15	1,47	-8,53
		10	9,55	-0,45	2,10	-7,90
4	kalibracija	15	14,36	-0,64	7,28	-7,72
		15	14,42	-0,58	7,37	-7,63
		15	14,02	-0,98	7,49	-7,51
5	kalibracija	20	20,34	0,34	15,87	-4,13
		20	20,01	0,01	14,55	-5,45
		20	20,33	0,33	15,95	-4,05
6	kalibracija	25	25,81	0,81	21,45	-3,55
		25	25,66	0,66	21,96	-3,04
		25	25,70	0,70	21,82	-3,18
7	kalibracija	30	29,78	-0,22	26,25	-3,75
		30	29,30	-0,70	25,81	-4,19

		30	28,96	-1,04	25,12	-4,88
8	kalibracija	35	35,43	0,43	33,35	-1,65
		35	35,37	0,37	33,71	-1,29
		35	34,84	-0,16	33,09	-1,91
		35	34,84	-0,16	33,09	-1,91
9	kalibracija	40	40,69	0,69	39,09	-0,91
		40	40,34	0,34	39,00	-1,00
		40	40,12	0,12	39,26	-0,74
		40	40,12	0,12	39,26	-0,74
10	kalibracija	45	45,02	0,02	43,56	-1,44
		45	45,03	0,03	44,31	-0,69
		45	45,26	0,26	46,00	1,00
		45	45,26	0,26	46,00	1,00
11	kalibracija	50	48,99	-1,01	46,07	-3,93
		50	49,96	-0,04	50,41	0,41
		50	49,77	-0,23	49,24	-0,76
		50	49,77	-0,23	49,24	-0,76



Slika 30: Grafični prikaz dejanskega in izračunanega deleža kristalne oblike KMC I v trokomponentnih zmesih pri obdelavi spektrov 1. odvoda, posnetih z DR tehniko v NIR območju.



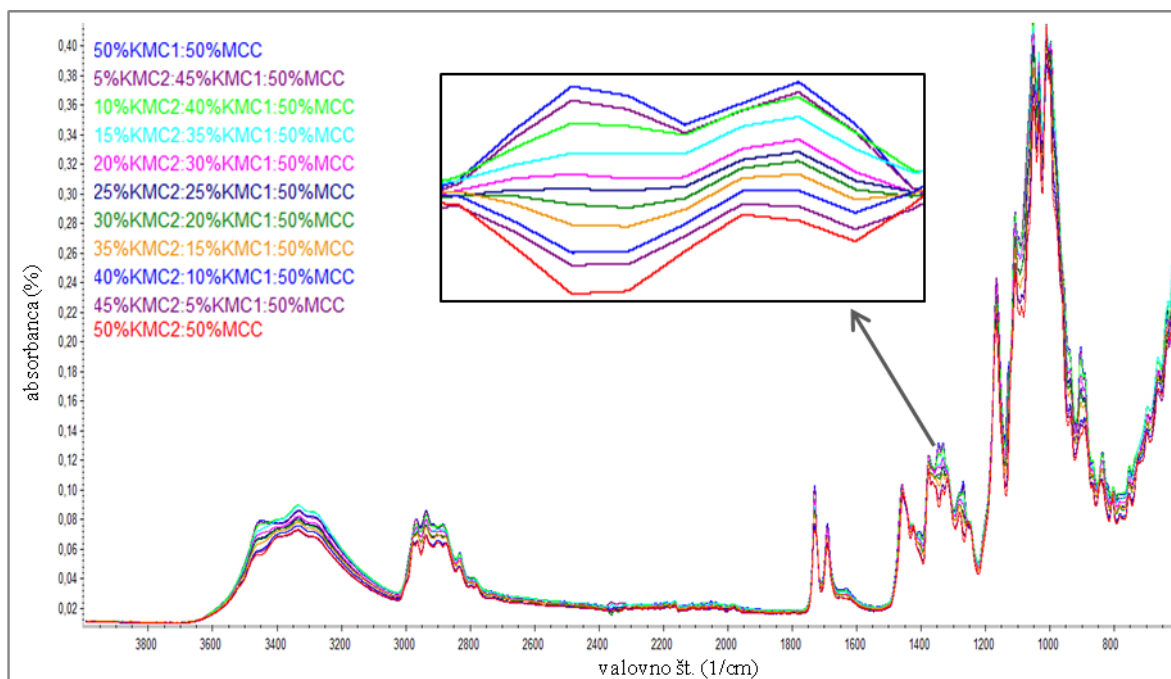
Slika 31: Grafični prikaz dejanskega in izračunanega deleža kristalne oblike KMC I v trokomponentnih zmesih pri obdelavi spektrov 2. odvoda, posnetih z DR tehniko v NIR območju.

Pri obdelavi prvih odvodov spektrov, ki smo jih posneli z DR tehniko v NIR območju, s PLS metodo smo dobili vrednosti parametrov r 0,9995, RMSEC 0,506 in PI metode 83,4. Pri drugem odvodu pa je vrednost r 0,9980, RMSEC 5,63 in PI metode 86,4.

5.2.4 Določanje vsebnosti kristalne oblike klaritromicina (KMC) I v zmesi s kristalno obliko klaritromicina (KMC) II in mikrokristalne celuloze (MCC) s tehniko oslabiljene popolne odbojnosti (ATR) v srednjem infrardečem območju (MID)

S tem eksperimentom smo želeli ugotoviti, kako je ATR tehnika v MID območju primerna za kvantitativno analizo naše zmesi.

S to metodo smo posneli spektre 11 standardom (slika 32), ki smo jih predhodno analizirali z DR tehniko v NIR območju. Za vsak standard smo posneli 3 spektre.



Slika 32: IR spektri trokomponentne zmesi 11 standardov, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

Posneli smo tudi tri serije spektrov 5 validacijskim standardom. Z računalniškim programom Omnic 9.1 smo vse spektre spremenili v 1. in 2. odvode ter nato z računalniškim programom TQ Analyst 9.1.17 s PLS metodo kvantitativno analizirali podatke, ki so prikazani v preglednici 13. Za kvantitativno analizo smo izbrali območja valovnih števil, ki so navedena v preglednici 12.

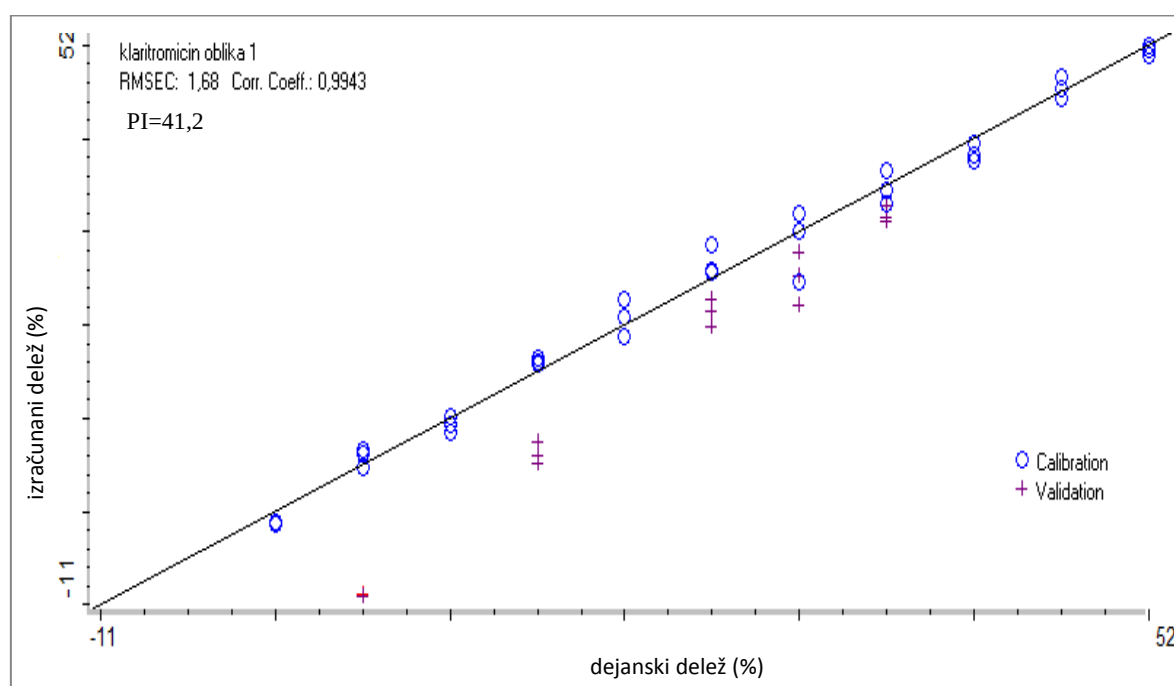
Preglednica 12: Območja valovnih števil za kvantitativno analizo spektrov trokomponentne zmesi, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

Valovno št. (cm ⁻¹)
892,00 – 921,02
986,37 – 1026,14
1055,98 – 1098,32
1116,16 – 1150,02
1249,42 – 1283,09
1315,53 – 1364,54
1417,95 – 1450,41
1708,35 – 1731,82
2946,54 – 3009,37

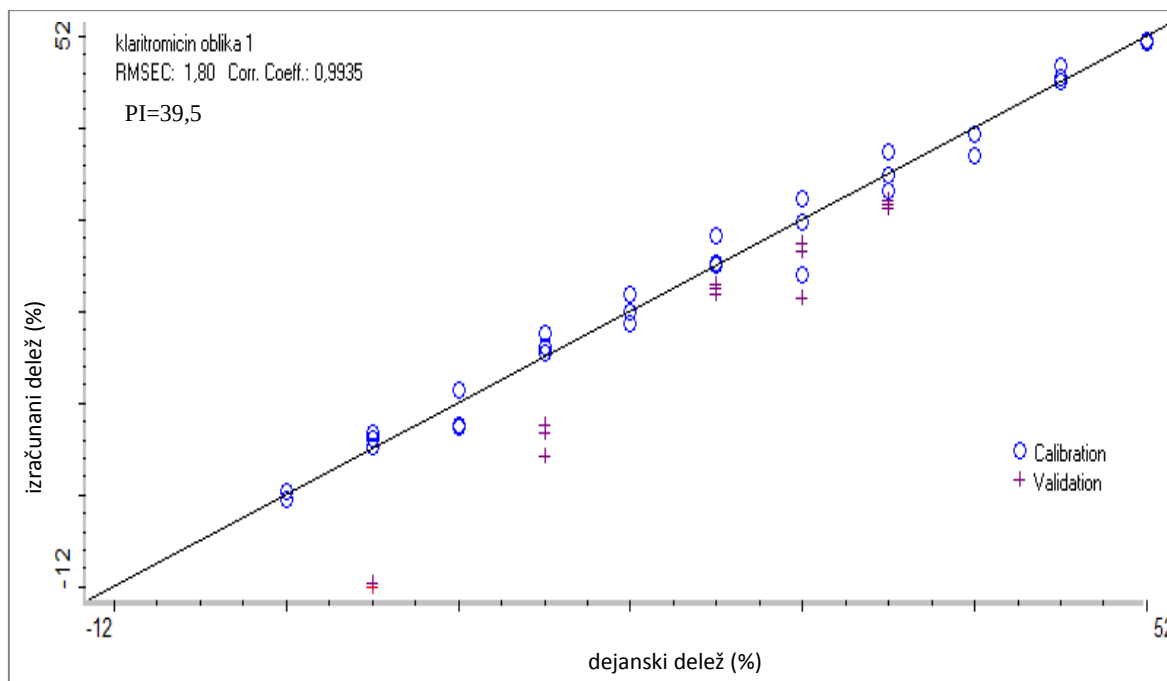
Preglednica 13: Validacijski in kalibracijski rezultati za kristalno obliko KMC I prvih in drugih odvodov spektrov trokomponentne zmesi, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

ATR - 3 KOMPONENTE		KMC KRSTALNA OBLIKA I				
			1. odvod		2. odvod	
št. standarda	validacija/ kalibracija	dejanski delež KMC I (%)	izračunani delež (%)	razlika (%)	izračunani delež (%)	razlika (%)
1	validacija	5	-8,76	-13,76	-10,07	-15,07
		5	-9,08	-14,08	-9,57	-14,57
		5	-8,97	-13,97	-9,67	-14,67
2	validacija	15	5,94	-9,06	6,76	-8,24
		15	5,12	-9,88	4,12	-10,88
		15	7,46	-7,54	7,67	-7,33
3	validacija	25	21,44	-3,56	21,82	-3,18
		25	19,83	-5,17	22,45	-2,55
		25	22,80	-2,20	22,86	-2,14
4	validacija	30	27,81	-2,19	27,38	-2,62
		30	25,35	-4,65	26,64	-3,36
		30	22,20	-7,80	21,48	-8,52
5	validacija	35	31,58	-3,42	32,18	-2,82
		35	31,14	-3,86	31,35	-3,65
		35	32,81	-2,19	31,66	-3,34
1	kalibracija	0	-1,15	-1,15	-0,57	-0,57
		0	-1,30	-1,30	-0,53	-0,53
		0	-1,03	-1,03	0,31	0,31
2	kalibracija	5	6,30	1,30	6,03	1,03
		5	4,79	-0,21	5,26	0,26
		5	6,66	1,66	6,68	1,68
3	kalibracija	10	8,54	-1,46	7,68	-2,32
		10	10,26	0,26	11,36	1,36
		10	9,40	-0,60	7,38	-2,62
4	kalibracija	15	16,09	1,09	16,13	1,13
		15	16,55	1,55	17,54	2,54
		15	15,83	0,83	15,60	0,60
5	kalibracija	20	22,73	2,73	21,93	1,93
		20	18,88	-1,12	18,73	-1,27
		20	20,94	0,94	19,88	-0,12
6	kalibracija	25	25,70	0,70	25,09	0,09
		25	28,73	3,73	28,30	3,30
		25	25,87	0,87	25,27	0,27
7	kalibracija	30	30,03	0,03	29,79	-0,21
		30	24,69	-5,31	24,09	-5,91

		30	32,04	2,04	32,28	2,28
8	kalibracija	35	32,95	-2,05	33,24	-1,76
		35	36,66	1,66	37,53	2,53
		35	34,52	-0,48	34,80	-0,20
		40	38,32	-1,68	39,24	-0,76
9	kalibracija	40	39,57	-0,43	39,36	-0,64
		40	37,64	-2,36	36,96	-3,04
		45	46,65	1,65	46,78	1,78
10	kalibracija	45	44,37	-0,63	45,47	0,47
		45	45,36	0,36	45,07	0,07
		50	48,87	-1,13	49,53	-0,47
11	kalibracija	50	49,58	-0,42	49,43	-0,57
		50	49,95	-0,05	49,37	-0,63



Slika 33: Grafični prikaz dejanskega in izračunanega deleža kristalne oblike KMC I v trokomponentni zmesi pri obdelavi spektrov 1. odvoda, posnetih z ATR tehniko v MID območju.



Slika 34: Grafični prikaz dejanskega in izračunanega deleža kristalne oblike KMC I v trokomponentni zmesi pri obdelavi spektrov 2. odvoda, posnetih z ATR tehniko v MID območju.

Pri obdelavi prvih odvodov spektrov, ki smo jih posneli z ATR tehniko v MID območju, s PLS metodo je vrednost r 0,9943, RMSEC 1,68 in PI metode 41,2 (slika 33). Pri drugem odvodu pa je vrednost r 0,9935, RMSEC 1,80 in PI metode 39,5 (slika 34). Rezultati obeh odvodov so kar primerljivi med seboj.

5.2.5 Primerjava rezultatov

V preglednici 14 so navedeni rezultati kvantitativne analize spektrov s PLS metodo.

Preglednica 14: Primerjava rezultatov kvantitativne analize spektrov (posnetih z ATR tehniko v MID območju in DR metodo v NIR območju) s PLS metodo.

Tehnika	Zmes	Odvod	r	RMSEC	PI
ATR (MID)	2-komponentna	1.	0,9962	2,76	72,7
		2.	0,9945	3,32	73,0
	3-komponentna	1.	0,9943	1,68	41,2
		2.	0,9935	1,80	39,5
DR (NIR)	2-komponentna	1.	0,9919	4,03	87,3
		2.	0,9996	0,946	84,7
	3-komponentna	1.	0,9995	0,506	83,4
		2.	0,9980	5,63	86,4

Pri obeh tehnikah, ATR tehnika v MID območju in DR tehnika v NIR območju, smo dobili visoke vrednosti r, v povprečju nekoliko višje pri DR tehniki v NIR območju. Vrednosti so visoke ($>0,99$) kar nam pove, da sta spremenljivki (izmerjena vrednost in dejanska vsebnost kristalne oblike KMC I v kalibracijskih standardih) zelo močno linearno povezani. Pri DR tehniki v NIR območju smo pri drugem odvodu spektrov dvokomponentne zmesi in prvem odvodu spektrov trokomponentne zmesi dobili majhne vrednosti standardnega odklona modela RMSEC (0,946 in 0,506), kar pomeni majhno odstopanje izmerjenih vrednosti od dejanske vsebnosti KMC I v kalibracijskih standardih. Pri ostalih postavljenih modelih pa smo dobili nekoliko višje vrednosti RMSEC. Na podlagi meritev validacijskih standardov smo dobili vrednosti indeksov učinkovitosti metode PI. Kvantitativni modeli, postavljeni na podlagi meritev DR tehnike v NIR območju, imajo višje vrednosti PI v primerjavi z modeli postavljeni na podlagi meritev z ATR tehniko v MID območju. Bolj kot se PI približuje vrednosti 100, bolj je učinkovita metoda. Zato lahko zaključimo, da je DR tehnika v NIR območju bolj primerna za kvantitativno analizo kristalne oblike KMC I v naših zmesih.

6 SKLEP

KMC smo rekristalizirali iz različnih topil/kombinacij topil/kombinacije topila in netopila, ki smo jih zasledili v literaturi: THF, acetonitril, THF-metanol, aceton, THF-voda, THF-acetonitril, aceton-voda. KMC smo rekristalizirali tudi iz novih kombinacij topil: THF-metanol (kristalna oblika 0), THF-etanol (kristalna oblika I), aceton-acetonitril (kristalna oblika I), aceton-etanol (kristalna oblika I). Uspelo nam je pripraviti 3 kristalne oblike KMC: kristalno obliko 0, I in II. Drugačne kristalne oblike KMC v primerjavi z že znano literaturo smo dobili z rekristalizacijo KMC iz acetonitrila (kristalna oblika II), iz kombinacij topil THF-metanol (kristalna oblika I) in THF-acetonitril (kristalna oblika II).

Vse pripravljene kristalne oblike KMC smo primarno kvalitativno ovrednotili z IR spektroskopijo z ATR tehniko v MID območju in rezultate potrdili z DSC, XRPD ter SS NMR analizo. ATR tehniko v MID območju smo uporabili, ker predpriprava vzorca ni potrebna in je zelo hitra analizna metoda. V našem primeru se je tehnika izkazala kot manj primerna za analizo polimorfnih oblik KMC, saj dajeta kristalni obliki KMC 0 in I enak spekter. Kristalni obliki smo uspeli med seboj ločiti z DSC, XRPD in SS NMR analizo.

Pri kvantitativni analizi dvo- in trokomponentnih zmesi z IR spektroskopijo, z ATR tehniko v MID območju in DR tehniko v NIR območju, smo dobili pri slednji boljše rezultate. Pri obeh tehnikah smo dobili visoko vrednost r , kar nam pove, da sta spremenljivki (izmerjena vrednost in dejanska vsebnost kristalne oblike KMC I v kalibracijskih standardih) močno linearno povezani. Pri DR tehniki v NIR območju smo dobili višje vrednosti indeksov učinkovitosti metode PI v primerjavi z ATR tehniko v MID območju. Bolj kot se PI približuje vrednosti 100, bolj je učinkovita metoda. Zato lahko zaključimo, da je DR tehnika v NIR območju bolj primerna za kvantitativno analizo naših zmesi.

7 LITERATURA

1. Planinšek O, Vrečer F, Vrbinc M, Ferlan A, Ukmar T, Kovačič B: Izbrana poglavja iz načrtovanja lastnosti delcev. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 9-11, 15-31, 33-35, 55-58, 68-70, 109.
2. Planinšek O, Zajc N, Srčič S: Uporaba diferenčne dinamične kalorimetrije v farmaciji. Farm Vestn 2001; 52: 173-185.
3. <https://en.wikipedia.org/wiki/Macrolide> (dostopano 10.06.2015)
4. Janković B, Škarabot M, Lavrič Z, Ilić I, Mušević I, Srčič S, Planinšek O: Consolidation trend design based on Young's modulus of clarithromycin single crystals. Int J Pharm 2013; 454: 324-332.
5. Spanton G S, Henry F R, Riley A D, Liu J-H: Crystal form 0 of clarithromycin. Unitet States Patent, Patent number 5945405 A, date of patent Aug. 31, 1999.
6. Spanton G S, Riley A D, Liu J-H: Crystal form I of clarithromycin. Unitet States Patent, Patent number 5858986 A, date of patent Jan. 12, 1999.
7. Riley A D, Liu J-H: Preparation of crystal form II of clarithromycin. Unitet States Patent, Patent number 5844105 A, date of patent Dec. 1, 1998.
8. Spanton G S, Henry F R, Riley A D, Liu J-H: 6-O-methylerythromycin A crystal form III. Unitet States Patent, Patent number 6627743 B1, date of patent Sep. 30, 2003.
9. Noguchi S, Miura K, Fujiki S, Iwao Y, Itai S: Clarithromycin form I determined by synchrotron X-ray powder diffraction. Acta Cryst 2012; C68: 041-044.
10. Chieng N, Rades T, Aaltonen J: An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. J Pharm Biomed Anal 2011; 55: 618-644.
11. <https://en.wikipedia.org/wiki/Spectroscopy> (dostopano 21.08.2015)
12. Günzler H, Gremlich H-U: IR Spectroscopy, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002: 9-18, 131, 135, 309-310.
13. Program OMNIC 9.1
14. <http://zasrce.si/clanek/elektromagnetna-sevanja-in-njihovi-ucinki-na-telo/> (dostopano 25.06.2015)
15. Skoog A D, Holler J F, Crouch R S: Principles of Instrumental Analysis, 6th edition, Thomson Brooks/Cole, Belmont, 2007: 431, 432, 455-476, 498-502, 895, 900-901, 904.

16. <http://www.raman.de/htmlEN/home/advantageEn.html> (dostopano 21.08.2015)
17. https://en.wikipedia.org/wiki/Near-infrared_spectroscopy (dostopano 21.08.2015)
18. Ciurczak W E, Drennen III K J: Pharmaceutical and Medical Applications of Near-Infrared Spectroscopy, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002: 34, 51.
19. Mantanus J: New pharmaceutical applications involving Near Infrared spectroscopy as a PAT compliant process analyzer. Doktorska disertacija. University of Liege, Faculty of medicine, 2011-2012.
20. http://www.niu.edu/analyticallab/ftir/ATR_lecture.pdf (dostopano 25.07.2015)
21. http://lizika.pfmb.uni-mb.si/biofizika/projekt/spektro_metode/nmr.htm (dostopano 19.07.2015)
22. Holzgrabe U, Wawer I, Diehl B: NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis, Linacre House, The Netherlands, 2008: 6, 70, 73.
23. <https://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/james.pdf> (dostopano 15.07.2015)
24. Jerschow A, Laws D D, Bitter L H-M: Solid-state NMR Spectroscopic Methods in Chemistry. Angew Chem Int Ed 2002; 41: 3096-3129.
25. <http://www.ssfs.si/download/Kng/Predstavitev%20Termometrija,%20oktober%2006.pdf> (dostopano 04.07.2015)
26. Clas S-D, Dalton R C, Hancock C B: Differential scanning calorimetry: applications in drug development. PSTT 1999; 2: 311-320.
27. <http://pslc.ws/macrog/dsc.htm> (dostopano 13.07.2015)
28. <http://old.vscht.cz/clab/RTG/dokumenty/thermo/xrd/Introduction%20to%20powder%20diffraction.pdf> (dostopano 05.07.2015)
29. Bob B H: Two-dimensional X-ray diffraction, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009: 13.
30. Fultz B, Howe J: Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials, 4th edition, Springer-Verlag, Berlin, 2013: 1-4.
31. <http://www.smcr.fisica.unam.mx/8temasutiles/articulosutiles/Bas-XRD.pdf> (dostopano 05.07.2015)
32. Zupan J: Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov. Inštitut Nove revije, Zavod za humanistiko in Kemijski inštitut Ljubljana, Slovenija, 2009: 11.
33. TQ Analyst 9.1.17

34. https://sl.wikipedia.org/wiki/Pearsonov_koeficient_korelacije (dostopano 25.06.2015)
35. Zhao Q, Yang K, Li W, Xing B: Concentration-dependent polyparameter linear free energy relationships to predict organic compound sorption on carbon nanotubes. *Scient Rep* 2014; 4: 1-7.
36. Esbensen K H: *Multivariate Data Analysis – in practice: An introduction to multivariate data analysis and experimental design*, 5th edition, CAMO, Norway, 2002: 157.
37. De Jager M-A: *Polymorphism and pseudopolymorphism of Clarithromycin*. Magistrska naloga. North-West University: Potchefstroom Campus, 2005.