

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

MARTINA PLESEC

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2012

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



MARTINA PLESEC

**VPLIV MLETJA KARVEDILOLA S POMOŽNIMI SNOVMI NA
POLIMORFNE TRANSFORMACIJE IN NJIHOVO STABILNOST**

**THE IMPACT OF MILLING CARVEDIOL WITH EXCIPIENTS ON
POLYMORPHIC TRANSFORMATIONS AND THEIR STABILITY**

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Odona Planinška, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Odonu Planinšku za pomoč, nasvete in vodenje pri izdelavi diplomske naloge ter ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi po potrebi priskočili na pomoč.

Še posebno pa se zahvaljujem Robertu in sinu Mateju za potrpežljivost in vzpodbudo tekom izdelave diplomske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Odona Planinška, mag. farm..

Martina Plesec

VSEBINA

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
SEZNAM OKRAJŠAV	III
1 UVOD	1
1.1 KRISTALNA IN AMORFNA OBLIKA SNOVI	1
1.2 MLETJE ZDRAVILNE UČINKOVINE	3
1.3 VPLIV POMOŽNIH SNOVI NA LASTNOSTI ZU PRI MLETJU.....	5
1.3.1 MLETJE UČINKOVIN Z NEUSILINOM US2	6
1.3.2 MLETJE INDOMETACINA S SYLISIJO 350	10
1.3.3 MLETJE UČINKOVIN Z OSTALIMI ANORGANSKIMI OKSIDI	10
1.3.4 MLETJE UČINKOVIN Z ORGANSKIMI POMOŽNIMI SNOVMI.....	11
1.4 VPLIV MLETJA NA KRISTALNE PRETVORBE.....	13
1.5 KARVEDIOL	15
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.2 METODE	19
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	23
ANALIZA VZORCEV IZHODNEGA NEMLETEGA KARVEDIOLA	23
ANALIZA VZORCEV MLETEGA KARVEDIOLA BREZ TOPILA	25
KARVEDIOL MLET Z ETANOLOM.....	27
KARVEDIOL+TIROZIN MLETJE BREZ TOPILA	29
KARVEDIOL+TIROZIN MLETJE Z ETANOLOM	31
FIZIKALNA ZMES KARVEDIOLA S TIROZINOM	33
KARVEDIOL+SERIN MLETJE BREZ TOPILA	35
KARVEDIOL+SERIN MLETJE S TOPILOM.....	37
FIZIKALNA ZMES KARVEDIOLA S SERINOM	39
MLETJE KARVEDIOLA Z NEUSILINOM US2	41
FIZIKALNA ZMES KARVEDIOLA Z NEUSILINOM US2	43
MLETJE KARVEDIOLA S SYLISIJO 350.....	45
FIZIKALNA ZMES KARVEDIOLA S SYLISIJO 350	47
5 SKLEP	49
6 LITERATURA	51

POVZETEK

Nove metode odkrivanja ZU, kot so kombinatorna kemija in visokozmogljive metode rešetanja spojin, so pripeljale do učinkovin, ki so slabo topne v vodi, slaba vodotopnost pa je omejujoč dejavnik za njihovo biološko uporabnost. Izboljšanje vodotopnosti lahko dosežemo na različne načine, med drugim z zmanjšanjem velikosti delcev ali s spremembami kristalne oblike učinkovine, še boljše rezultate pa lahko dosežemo z njeno amorfizacijo.

Mletje je pogosta metoda za zmanjševanje velikosti delcev zdravilnih učinkovin, poleg tega pa lahko med procesom mletja prihaja tudi do sprememb v kristalni obliki učinkovine ali do njene amorfizacije, kar se odraža v spremembah biofarmacevtskih lastnosti, kot so topnost, hitrost raztapljanja in biološka uporabnost.

V prvem delu diplomske naloge smo zdravilno učinkovino karvedilol mleli v zmesi z dvema aminokislinama, tirozinom ozziroma serinom in sicer brez topila in z dodatkom etanola kot topila. Dokazali smo, da pri mletju s topilom v obeh primerih pride do popolne pretvorbe karvedilola iz kristalne oblike II v kristalno obliko I. S testom stabilnosti smo ugotovili, da je dobljena kristalna oblika I pri 21°C/8% RH stabilna najmanj 6 tednov, pri 40°C/75% RH pa je v primeru mletja s tirozinom stabilna najmanj 6 tednov, v primeru serina pa le 4 tedne. Naredili smo tudi test sproščanja in ugotovili, da se kristalna oblika I iz zmesi z uporabljenimi aminokislino hitreje sprošča od oblike II.

V drugem delu smo poskušali z mletjem karvedilola z dvema poroznima pomožnima snovema, Neusilin® US2 ozziroma Sylisia® 350 izdelati stabilno amorfno obliko učinkovine in s tem izboljšati sproščanje. Z obema pomožnima snovema smo dosegli veliko izboljšanje sproščanja učinkovine iz trdnih disperzij. Ugotovili smo, da nastala amorfna oblika v disperziji z Neusilinom pri 40°C/75% RH že po dveh tednih rekristalizira, medtem ko se v disperziji s Sylisijo bistveno ne spreminja. Pri obeh disperzijah smo s staranjem disperzij ugotovili upočasnjevanje hitrosti sproščanja učinkovine.

V primeru mletja samega karvedilola s topilom ozziroma brez topila ni prišlo do izboljšanja raztapljanja. Pri mletju brez topila je del učinkovine amorfiziral, medtem ko je pri mletju z etanolom prišlo do nastanka zmesi kristalnih oblik I in II.

ABSTRACT

New methods of discovering active pharmaceutical ingredients, such as combinatorial chemistry and high throughput screening have led to an increase in the number of poorly water-soluble drug candidates. Their poor water solubility is the limiting factor of their bioavailability. There are different ways to improve water solubility of a drug, among others by size reduction or by changing the crystal form of drug. But we can achieve even better results by converting the drug into its amorphous form.

Milling is a commonly used process for particle size reduction of a drug. Besides that, milling can also induce polymorphic transformations or amorphisation of drug, that are reflected in biopharmaceutical properties, such as solubility, dissolution rate and bioavailability.

In the first part of this work we milled carvedilol with two amino acids, tyrosine and serine respectively. We milled the mixture without the solvent and with the addition of ethanol as a solvent. We demonstrated that milling with addition of ethanol brings about complete transformation of carvedilol form II into form I in both cases of amino acids. We tested the stability of milled samples and found out that carvedilol crystal form I, obtained by milling, is stable for at least 6 weeks at 21°C/8% RH. At 40°C/75% RH, it is stable for at least 6 weeks in the case of milling with tyrosine, but in the case of milling with serine it is stable for 4 weeks. The dissolution test that we also carried out showed that carvedilol form I from milled mixture with used amino acid has a better dissolution than carvedilol form II.

In the second part of the work, we tried to improve the dissolution of carvedilol by preparing a stable amorphous form of the drug by milling it with two porous excipients: Neuselin® US2 and Sylisia® 350 respectively. We achieved a big improvement in dissolution of the drug from solid dispersions in the both cases of excipients. We found out that amorphous form of carvedilol in solid dispersion with Neuselin reverses to crystalline form after just two weeks at 40°C/75% RH, while in dispersion with Sylisia it does not change significantly. In both cases of solid dispersions we discovered decrease of dissolution rate by aging the dispersion.

In the case of milling pure carvedilol without the solvent or with solvent respectively, we were not able to improve dissolution. Milling pure carvedilol without solvent lead to amorphization of part of a sample, while milling the drug with small amount of ethanol resulted in mixture of crystalline form I and II.

SEZNAM OKRAJŠAV

AMF	- mikroskopija na atomsko silo (Atomic Force Microscopy)
Cp	- specifična toplotna kapaciteta
DSC	- diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential Scanning Calorimetry)
EtOH	- etanol
FTIR	- infrardeča spektroskopija s fourierjevo transformacijo (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
GBP	- gabapentin
HBCD	- visoko razvejan ciklični dekstrin (highly branched cyclic dextrin)
HPLC	- tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high-performance liquid chromatography)
HPMC	- hidroksipropilmetil celuloza
MC	- mikrokalorimetrija (Microcalorimetry)
MCC	- mikrokristalna celuloza
MTDSC	- dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature (Modulated Temperature DSC)
PEG	- polietilenglikol
PVP	- polivinilpirolidon
RH	- relativna zračna vлага (relative humidity)
SEM	- vrstični elektronski mikroskop (scanning electron microscope)
SS-NMR	- jedrska magnetna resonanca v trdem stanju (Solid-State NMR)
T _g	- temperatura steklastega prehoda
T _t	- temperatura tališča
XRPD	- rentgenska praškovna difrakcija (X-ray Powder Diffraction)
ZU	- zdravilna učinkovina

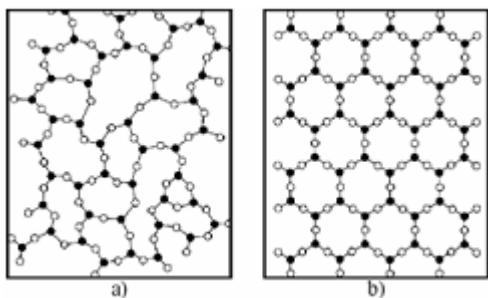
1 UVOD

Znano je, da obstajajo zdravilne učinkovine (ZU) v različnih trdnih oblikah: kristalni in amorfni. Veliko ZU uporabljamo v kristalni obliki zaradi stabilnosti in lažjega rokovanja pri različnih stopnjah proizvodnje zdravil (1). Vendar pa je v zadnjem času več pozornosti deležna tudi amorfna oblika ZU. Nove metode odkrivanja ZU, kot so kombinatorna kemija in visokozmogljive metode rešetanja spojin, so namreč pripeljale do kandidatov, ki so slabo vodotopni. To pomeni, da se pri peroralnem jemanju raztopi premajhna količina ZU in je potrebno iskati rešitve za boljšo topnost (2). Amorfna oblika naj bi imela predvsem večjo hitrost raztopljanja in posledično večjo biološko uporabnost od kristalne oblike zaradi dejstva, da je pri amorfni obliki potrebno manj energije za ločitev molekul kot pri kristalni oblikih (3). Hancock in Park sta primerjala topnost amorfne oblike s topnostjo kristalne oblike različnih ZU. Ugotovila sta, da je pri griseofulvinu amorfna oblika 1,4 krat bolj topna od kristalne, pri indometacinu je bilo to razmerje 4,5 in pri glibenklamidu celo 14 (4).

1.1 KRISTALNA IN AMORFNA OBLIKA SNOVI

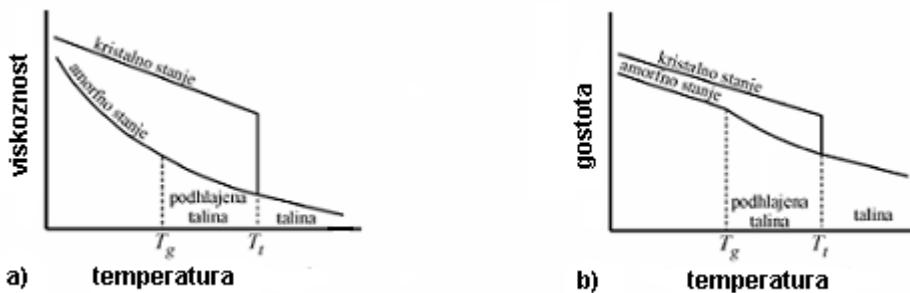
Za kristale je značilno, da so njihovi gradniki urejeno razporejeni po prostoru, pravimo, da imajo red dolgega dosega. Atomi in molekule tvorijo strukturne enote, imenovane osnovne celice, ki se periodično ponavljajo v vse tri prostorske dimenzije. Osnovna celica ima določeno orientacijo in obliko, ki jo določajo trije translacijski vektorji a , b in c , torej ima tudi določen volumen (V). Glede na dolžino robov osnovne celice (a , b in c) ter kotov med njimi (α , β in γ), ločimo sedem kristalnih sistemov. Zgradbo določenega kristala se da uvrstiti v enega od sedmih kristalnih sistemov, 14 Bravaisovih mrež in 230 prostorskih skupin (1).

Amorfne spojine imajo za razliko od kristalnih red kratkega dosega, ki je omejen le na najbližje sosede. Kratki red ponazarja slika 1 na primeru spojine A_3B_2 . Vsak temen krožec (B) je obdan s tremi svetlimi krožci (A), vsak svetel pa z dvema temnima. Vsak istovrstni krožec ima podobno okolico, ne pa enake. Razdalje med krožci in koti med vezmi se namreč razlikujejo in ni reda dolgega dosega (5).



Slika 1: Ponazoritev razporaditve gradnikov (a) amorfne snovi, (b) kristalne snovi (5)

Bistvena razlika med kristalno in amorfno obliko je v spremenjanju viskoznosti in gostote v odvisnosti od temperature (slika 2). Čista snov kristalizira pri temperaturi tališča T_t , pri tem iz reda kratkega dosega nastane red dolgega dosega. Viskoznost se nenadoma močno poveča. Talino, ki ne more prenašati strižnih obremenitev, zamenja toga trdna snov. V nasprotju s tem se pri amorfni snovi viskoznost zvezno povečuje ob zniževanju temperature. Če je hitrost ohlajanja dovolj velika, da se izognemo kristalizaciji, dobimo talino pod tališčem T_t , ki se imenuje podhlajena talina. Pri temperaturi steklastega prehoda (T_g) se viskoznost toliko poveča, da se atomi v talini ne morejo več premikati drug proti drugemu in snov lahko prenaša strižne obremenitve. Tako dobimo amorfno ali stekalsto stanje (5). Temperatura steklastega prehoda je temperaturni interval, v katerem med segrevanjem snov prehaja iz trdnega steklastega stanja v razmehčano stanje. Amorfne snovi so pod temperaturo steklastega prehoda relativno stabilne, medtem ko so nad njo občutljive na mehanske in termične obremenitve. Pod omenjeno temperaturo se molekule upočasnjeno gibljejo, kar ima za posledico tudi spremnjanje lastnosti med staranjem amorfnegra vzorca (6).



Slika 2: Spreminjanje a) viskoznosti in b) gostote amorfne in kristalne snovi v odvisnosti od temperature (5)

Najbolj znani načini priprave amorfne oblike spojin so: hitra ohladitev taline, hitroobarjanje z dodatkom netopila, sušenje z zamrzovanjem (liofilizacija), sušenje z razprševanjem in dodatek nečistot, amorfne snovi pa lahko nastanejo tudi v trdnih disperzijah. V procesih, pri katerih prihaja do mehanske ali kemijske aktivacije (mletje, vlažno granuliranje), lahko pride do popolne ali delne amorfizacije vzorca.

1.2 MLETJE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Mletje je eden najpogosteje uporabljenih procesov za zmanjševanje velikosti kristalnih delcev ZU. Poleg zmanjševanja velikosti delcev pa lahko pri mletju pride tudi do sprememb strukturnih lastnosti, kar se odraža v spremembah biofarmacevtskih lastnosti, kot so topnost, hitrost raztopljanja in biološka uporabnost. Poleg tega pride tudi do sprememb praškovnih lastnosti, kot so stisljivost in pretočnost praškov (4, 7-9).

Za določanje vsebnosti amorfne oblike spojine uporabljamo različne analizne metode: rentgensko praškovno difrakcijo (XRPD, angl. X-ray Powder Diffraction); kalorimetrične metode (diferenčna dinamična kalorimetrija -DSC, angl. Differential Scanning Calorimetry, differenčna dinamična kalorimetrija z modulacijo temperature -MTDSC, angl. Modulated Temperature DSC, mikrokalorimetrija -MC, angl. Microcalorimetry); gravimetrične metode in spektroskopske metode (infrardeča spektroskopija s fourierjevo transformacijo -FTIR, angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy) in jedrsko magnetno resonanco v trdem stanju (SS-NMR, angl. Solid-State Nuclear Magnetic Resonance). Vsem je enako to, da izrabljajo razlike v določenih fizikalno kemijskih lastnostih med kristalno in amorfno obliko. Rentgenska praškovna difracija izkorišča zmanjšanje ostrine ali intenzivnosti uklonskih črt zaradi zmanjšanja urejenosti molekul v amorfni obliki spojine. Kalorimetrične metode temeljijo na termodinamskih značilnostih, kot so razlika v entalpiji kristalizacije, entalpiji raztopljanja, toplotni kapaciteti itd. S spektroskopskimi metodami zaznamo razlike v vibraciji vezi (FTIR) in kemijskem okolju atomov in funkcionalnih skupin (NMR), ki so posledica različne molekulske razporeditve v obeh oblikah (kristalni in amorfni) (10). Vsaka od teh analiznih metod ima svoje prednosti in slabosti, odločitev, katero bomo izbrali, pa je odvisna od vzorca, ki ga analiziramo.

Transformacija iz kristalne v amorfno obliko je lahko delna ali popolna. Amorfizira lahko celotni kristal ali pa sprememba zajame samo površino kristalov ali le posamezne točke na površini. V literaturi predlagajo, da naj bi mehanična aktivacija z mletjem povzročila nastanek tanke amorfne plasti na delcih (11,12). Elamin in sodelavci (13) so potrdili to hipotezo. Pokazali so, da mletje povzroča amorfizacijo površine pri griseofulvinu do globine 40-50 nm, kar predstavlja 5.8% mase vzorca. Metode, ki se uporabljajo za določanje porazdelitve amorfne snovi po površini kristalov, so mikroskopija na atomsko silo (AMF, angl. Atomic Force Microscopy) in Ramanska mikroskopija (14,15).

Učinkovitost mletja je odvisna predvsem od lastnosti spojine, temperature mletja (16), morfologije delcev (17), časa mletja in vložene energije. Ustrezna kombinacija naštetih parametrov lahko povzroči poleg zmanjšanja velikosti delcev tudi amorfizacijo vzorca. Če uporabimo krajše časovne intervale mletja, so amorfizirane regije skoncentrirane le na površini delcev (18,19). Za popolno amorfizacijo je potrebno od manj kot 20 minut za indometacin pri temperaturi tekočega dušika (20), pa tja do 100 ur za trehalozo pri sobni temperaturi (21). Amorfno stanje snovi na molekularni ravni je navadno potrjeno z detekcijo steklastega prehoda (sprememba C_p (specifične topotne kapacitete) detektirana na DSC krivulji) (21).

Zniževanje temperature mletja pod T_g poveča težnjo po amorfizaciji. Mletje spojin pri temperaturi globoko pod njihovimi T_g navadno pripelje do popolne amorfizacije neodvisno od njihovega začetnega kristalnega stanja. Primeri so indometacin (20,22), ursodeoksiholna kislina (23), trehaloza (16), laktoza (16) in budesonid (16). Mletje čiste kristalne oblike indometacina γ pri sobni temperaturi blizu T_g (42°C) povzroči transformacije v zmes kristalne oblike α in amorfne oblike (22). Ko meljemo pri temperaturi nad T_g , je življenska doba amorfiziranih frakcij kratka, temu pa sledi hitra kristalizacija v začetno kristalno obliko ali v drugo polimorfno obliko (21,24).

Za amorfizacijo kot posledico mletja sta predlagana dva mehanizma. Po prvem mehanizmu mletje povzroči lokalno taljenje spojine, ki mu sledi hitra ohladitev (25). Po drugem mehanizmu do amorfizacije pride zaradi velikega kopičenja poškodb na kristalu in s tem povečanja Gibbsove proste entalpije (26). Nekateri zapisi kažejo, da je možno z uporabo različnih metod izdelati amorfne vzorce iste spojine z različnimi lastnostmi (27). Razlike v fizikalno kemijskih lastnostih so našli med dvema amornima oblikama simvastatina, ki so jih

pripravili na dva različna načina: z mletjem in s hitro ohladitvijo taline (28). Savolainen in sodelavci (27,29) so na primeru indometacina pokazali, da pri mletju nastane amorfna oblika, ki ima večjo variabilnost kot amorfna oblika, pridobljena z hitro ohladitvijo taline. Craig in sodelavci so predstavili koncept rigidne amorfne frakcije (RAF, angl. Rigid amorphous fraction), ki naj bi bila vmesni člen med kristalno in amorfno fazo. Ker je RAF bolj podobna kristalnemu stanju, pri temperaturi steklastega prehoda ne pride do spremembe C_p (30).

1.3 VPLIV POMOŽNIH SNOVI NA LASTNOSTI ZU PRI MLETJU

Amorfna oblika spojine je termodinamično nestabilna in jo moramo največkrat stabilizirati. V ta namen jo lahko hranimo pri znižani temperaturi, vsaj 50°C pod temperaturo steklastega prehoda (T_g), kar je uporabno le za spojine, ki imajo T_g nad 80°C . Iste tehnike kot za izdelavo amorfnih učinkovin, uporabljamo tudi za njihovo stabilizacijo tako, da dodamo pomožne snovi in izdelamo trdne disperzije, ki z učinkovino tvorijo fizikalne in kemijске vezi ali pa delujejo protimehčalno (31).

Tradicionalno so amorfne učinkovine stabilizirali z organskimi polimeri. Predstavljenih je bilo že veliko mehanizmov, s katerimi naj bi ti stabilizirali amorfno obliko. Vsi ti mehanizmi vsebujejo neko fizikalno interakcijo, kot je vodikova vez ali van der Walls-ove sile. Poleg tega, polimer lahko služi kot difuzijska ovira za rekristalizacijo. Tako bo obseg mešanja faz in stopnja fizikalnih interakcij med učinkovino in polimerom določal fizikalno stabilnost amorfne učinkovine (32).

Anorganski polimeri, kot so silikati, so bili tudi navedeni, da stabilizirajo amorfno obliko. V nasprotju z organskimi polimeri, imajo anorganski poleg fizikalnih interakcij, kot so vodikova vez in dipol-dipol interakcije, možnost tvorbe soli s kislimi učinkovinami. Ta tvorba soli lahko dodatno stabilizira amorfno obliko. Primer: čisti amorfni sulindak kristalizira v 24 urah pri sobnih pogojih, sulindak-polivinilpirolidon (PVP) amorfna disperzija kristalizira pri $40^{\circ}\text{C}/75\%$ RH (relativne zračne vlage) v dveh tednih, medtem ko amorfne zmesi sulindaka s poroznim $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1.7\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Neusilinom) ostajajo stabilne pri istih pogojih tudi po 3 mesecih (32).

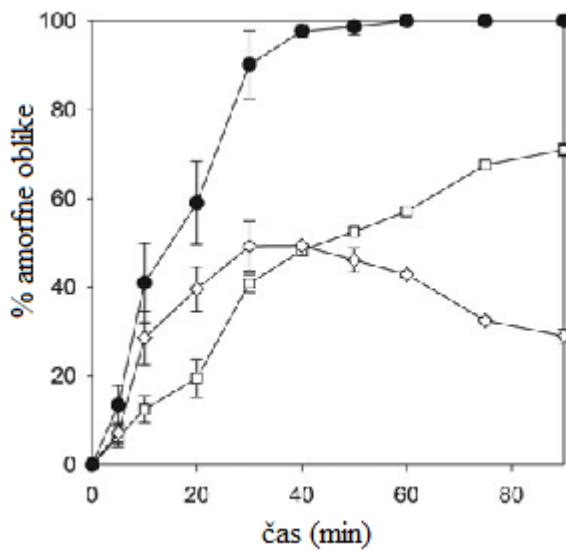
1.3.1 MLETJE UČINKOVIN Z NEUSILINOM US2

Neusilin® US2 je amorfen granulat bele barve in porozne strukture. Kemijsko je snov sestavljena iz magnezijevega oksida, aluminijevega oksida in silicijevega dioksida, kemijska formula je $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{MgO} \cdot 1.7\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Porazdelitev velikosti granul sega od 44 do 177 μm , specifična površina je $300\text{m}^2/\text{g}$, povprečna velikost por pa 15 nm. Neusilin® US2 je praktično netopen v vodi, pH 4% (ut/vol) raztopine pa je 7,4, kar kaže na nevtralne lastnosti. Zaradi svojih fizikalno kemijskih lastnosti Neusilin® US2 in druge oblike Neusilina uporabljamo kot pomožno snov pri direktnem tabletiranju, izboljšanju pretočnih lastnosti, preprečevanju zlepiljenja higroskopnih praškov, kot stabilizator in antacid. Neusilin je komercialno na voljo v različnih oblikah, ki variirajo v nasipni gostoti, vsebnosti vode, pH suspenzije in obliki delcev (33).

Vadher in sodelavci (34) so Neusilin mleli z aceklofenakom v razmerju 1:5 20 ur s krogličnim mlinom. Vzorce mlete zmesi so jemali vsakih 5 ur in jih analizirali z XRPD (praškovno difrakcijo), DSC in IR spektroskopijo. Analize so pokazale, da je prišlo do pretvorbe kristalne oblike aceklofenaka v amorfno obliko. Ugotovili so, da je prišlo do kislo-bazične reakcije med aceklofenakom in Neusilinom, nastala je amorfna sol. Elektrostatske sile med COO^- skupino aceklofenaka in Mg^{2+} in Al^{3+} , ki sta prisotna pri Neusilinu, so odgovorne za nastanek amorfne soli preko vodikovih vezi. Te naj bi bile odgovorne za amorfizacijo učinkovine. Hitrost sproščanja aceklofanaka iz mletih zmesi je bila signifikantno višja v primerjavi s hitrostjo raztplavljanja čistega aceklofenaka. Izvedli so tudi pospešeno študijo stabilnosti. Vzorce so hranili 4 tedne pri 40°C in 75% RH. Ugotovili so, da ni prišlo do rekristalizacije učinkovine.

Tong in sodelavci (35) so pokazali, da lahko močnejše elektrostaticne interakcije med indometacinom in protioni (Na^+ , K^+) povišajo temperaturo steklastega prehoda (T_g) amorfne soli, kar rezultira v večji fizikalni stabilnosti soli v primerjavi s kislino (indometacinom) pri določeni temperaturi shranjevanja. T_g soli indometacina z enovalentnim litijem (139°C) je bila mnogo višja kot pri samem amorfiziranem indometacINU (44°C). Predlagali so, da naj bi bila T_g še višja pri soleh z dvovalentnim magnezijem, prisotnim pri Neusilinu, in tako bi bila amorfna oblika še bolj fizikalno stabilna. Podobno hipotezo se da uporabiti tudi pri aceklofenaku, in sicer, da je T_g amorfne učinkovine, povezane z Neusilinom, višja od temperature tališča čiste učinkovine in s tem je izboljšana fizikalna stabilnost mlete zmesi.

V literaturi je objavljen tudi primer izdelave trdne disperzije Neusilina s sulindakom, ki so jo izvedli Maclean in sodelavci (32). Samo učinkovino so mleli 60 min in ni prišlo do fazne spremembe. Pokazalo se je le zmanjšanje velikosti delcev. Do amorfizacije ni prišlo, ker so mleli pri sobni temperaturi, ki je blizu T_g sulindaka. Ko so mleli kriogeno (pri znižani temperaturi), je prišlo do amorfizacije, vendar nastala amorfna oblika ni bila stabilna. Nato so mleli še zmes sulindaka in Neusilina v razmerju 1:1 60 min pri sobni temperaturi in z XRPD potrdili amorfnost učinkovine. Z jedrsko magnetno resonanco so odkrili, da je prišlo do kislobazične reakcije med učinkovino in Neusilinom. Kinetiko pretvorbe kristalnega sulindaka v amorfno obliko ponazarja slika 3. Ugotavliali so jo tako, da so naredili časovno študijo. Vzorce so mleli različna časovna obdobja in na vsaki časovni točki naredili analizo z ^{13}C SS-NMR. Ugotovili so, da sta v vzorcu prisotna dva tipa amorfnega sulindaka: prost amorfni sulindak in kompleks amorfni sulindak-Neusilin. Kinetika amorfizacije je dvofazna, prvih 90% učinkovine se pretvori v prvih 30 minutah, ostalih 10% pa med 30 in 60 minuto. Prosti amorfni sulindak doseže svoj maksimalen delež v 40 minutah, nato njegov delež pada, medtem ko delež kompleksa sulindak-Neusilin narašča tekom celotnega procesa mletja. To pomeni, da se od 40 min dalje prosti sulindak pretvarja v kompleks.



Slika 3: Delež amorfne faze v odvisnosti od časa mletja: (●) celotna količina amorfneg materiala, (◊) količina prostega amorfneg sulindaka, (□) količina amorfneg sulindaka v kompleksu z Neusilinom (32)

Stabilnost: vzorce so shranili pri $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$ in jih analizirali z XRPD. Vzorci so pri teh pogojih ostali amorfni 3 mesece, pri sobnih pogojih ($25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH}$) pa so ostali stabilni več kot eno leto. Analizirali so jih tudi s HPLC in ugotovili, da ni prišlo do kemijskih sprememb (razgradnje). Dokazali so torej, da mletje zagotavlja fizikalno in kemijsko stabilnost amorfne spojine. Njihova dognanja glede stabilnosti so primerljiva z ostalimi, ki so mleli kisle učinkovine: indometacin (2,35), aceklofenak (34) z Neusilinom. To pomeni, da nastanek kompleksa med učinkovino in Neusilinom pomaga stabilizirati amorfno obliko. Ugotovili so, da se je učinkovina iz kompleksa učinkovina-Neusilin vedno tudi hitreje sproščala v primerjavi s čisto kristalno učinkovino.

Gupta s sodelavci (36) je poročal o mletju Neusilina s ketoprofenum, indometacinem, progesteronom in naproksenom z namenom povzročiti pretvorbo učinkovin iz kristalne v amorfno obliko. Mleli so same učinkovine 48 ur, in do amorfizacije ni prišlo. Z XRPD so potrdili, da je prišlo do amorfizacije pri mletju z Neusilinom. Pri učinkovinah, ki vsebujejo karboksilne kisline, se je kristalna kislina z Neusilinom spremenila v amorfno sol, progesteron pa je očitno interagiral z Neusilinom preko vodikovih vezi (H-vez med karbonilno skupino progesterona in silanolno skupino Neusilina). Preučili so tudi fizikalno stabilnost učinkovin. Vzorce so hranili 4 tedne pri $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$. Analize so pokazale, da ni prišlo do pretvorb v kristalno obliko. Ugotovili so, da je za popolno amorfizacijo ketoprofena potrebnih 4-6 ur mletja, medtem ko za ostale tri (naproksen, indometacin, progesteron) 18-24 ur. Temperatura tališča teh treh je signifikantno višja od ketoprofena. Analogno temperaturi, potrebni za prekinitev kristalne mreže pri taljenju kristala, mehanična energija pelje k amorfizaciji med mletjem. Zato se zdi razumljivo, da spojina z višjo temperaturo tališča potrebuje več časa za amorfizacijo pri mletju.

Bahl in Bogner (37) sta hotela ovrednotiti vpliv razmerja med indometacinem in Neusilinom ter odstotka vlage tekom mletja na kinetiko amorfizacije, poleg tega sta tudi onadva določala stabilnost in naravo interakcij. V odsotnosti Neusilina ni prišlo do amorfizacije učinkovine po 14 dneh mletja niti pri 0% RH, niti pri 75% RH. Nato sta mlela vzorce v različnih razmerjih indometacin:Neusilin (1:1 do 1:5). Ugotovila sta, da je povečan delež Neusilina napram indometacinnu zmanjšal čas amorfizacije in da je povečana vlaga med mletjem olajšala proces amorfizacije, kar se je bolj poznalo pri vzorcih z nižjim deležem učinkovine. Zaključila sta, da sta procesna vlaga in masno razmerje učinkovine in Neusilina pomembna faktorja pri procesu

mletja s krogličnim mlinom, ki vplivata na amorfizacijo. Pri nekaterih delno amorfiziranih vzorcih, shranjenih pri 40°C/75% RH sta opazila nadaljnjo amorfizacijo. Spontana amorfizacija indometacina z Neusilinom nakazuje na to, da je kemijski potencial indometacina v mletih zmesih nižji kot v čistem indometacinu. Z FTIR sta določala interakcije, ugotovila sta prisotnost vodikovih vezi in površinskih interakcij med kovinskimi ioni Neusilina ter učinkovino.

Tako kot Mclean (32), sta tudi onadva ugotovila, da proces poteka v dveh fazah: začetni hitri fazi, ki ji sledi faza počasnejše amorfizacije. Pri večjih deležih Neusilina je bila ta prva faza bolj izrazita. To naj bi kazalo na obstoj visoko-energetskih lokacij na površini Neusilina (angl. high energy sites). Ugotovila sta tudi najmanjši delež, kjer je še mogoče doseči popolno amorfizacijo, to je 1 (indometacin):0,3 (Neusilin).

Ista avtorja sta naredila še eno raziskavo z indometacinom (2). Raziskala sta povečanje sproščanja učinkovine, mlete z Neusilinom, v različnih medijih (0,1N HCl, voda, fosfatni pufer, pH=6,8). Ugotovila sta, da je pri mletju z Neusilinom prišlo do zelo velikega povečanja sproščanja (500 krat v vodi, 3,7 krat v fosfatnem pufru). Vendar pa tega povečanja ne pripisujeta le dejству, da je med mletjem učinkovina amorfizirala, ampak naj bi bili za povečanje sproščanja krivi tudi drugi dejavniki. Namreč, ko sta pri testu sproščanja v medij dodala učinkovino in Neusilin v enakem razmerju, se je koncentracija raztopljene učinkovine povečala. Zaključila sta, da k povečanju sproščanja lahko bistveno pomagajo tudi sprememba pH medija sproščanja (Neusilin naj bi deloval kot pufer, njegova 4% ut/vol raztopina ima pH 7,4) ter sproščanje ionov (Mg^{2+} , Al^{3+}) in silicijeve kisline iz Neusilina. Zaradi tega tudi pravita, da silikatov ni mogoče obravnavati kot popolnoma inertne snovi.

Manj je znanega o uporabi Neusilina pri učinkovinah, ki nimajo kislih funkcionalnih skupin. V literaturi je bilo že opisano, da silikati stabilizirajo nekisle ZU, kot npr. progesteron (36). Prednost pri uporabi silikatov namesto organskih polimerov pri nekislih spojinah ni očitna, ker ni dodatne stabilizacije s tvorbo soli. Čeprav je pri silikatih, ki vsebujejo druge kovinske ione, kot so Mg^{2+} in Al^{3+} , možnost tvorbe ion-dipol interakcij, ki dodatno stabilizirajo kompleks. Torej je treba gledati na prednost uporabe Neusilina za vsako učinkovino posebej (32).

1.3.2 MLETJE INDOMETACINA S SYLISIJO 350

Porozni silicijev dioksid Syllisia® 350 je bel, mikroniziran amorfni prašek z visoko poroznostjo in veliko specifično površino približno $280 \text{ m}^2/\text{g}$, ki se uporablja kot pomožna snov v farmacevtski, prehrambeni in kozmetični industriji (38). Izdelan je iz kemijsko inertnega amorfnega silicijevega dioksida visoke čistote (99,7% SiO_2). Povprečna velikost delcev znaša od 3,1 do 20,0 μm , povprečna velikost por pa je 25 nm. Je pomemben dodatek pri tabletirjanju za izboljšanje pretočnih lastnosti in stisljivosti zmesi za tabletiranje (39).

Watanabe in sodelavci (40) so mleli indometacin s SiO_2 z vibracijskim mlinom. Amorfizacija učinkovine v prisotnosti SiO_2 je potekala hitreje kot brez nje. Stabilnost tako narejene trdne disperzije so primerjali s stabilnostjo disperzije, narejene z metodo hitre ohladitve taline učinkovine. Opazovali so stopnjo rekristalizacije indometacina pri obeh vzorcih pri 30°C in 11% RH. Ugotovili so večjo stabilnost amorfne indometacina, pridobljenega z mletjem kot pa tistega s hitro ohladitvijo taline. Za analizo interakcij med učinkovino in SiO_2 , do katerih prihaja med mletjem, so uporabili ^{29}Si in ^{13}C NMR. Ugotovili so, da mletje omogoča tvorbo tako imenovanih mehansko induciranih kemijskih interakcij površine indometacina s silanolnimi skupinami SiO_2 in mehansko poškodovanimi siloksanskimi vezmi. Na ta način pride do omejevanja mobilnosti molekul učinkovine in stabilizacije amorfne strukture. Zaradi omejevanja mobilnosti daje mletje bolj stabilno obliko kot hitra ohladitev taline. Amorfna oblika indometacina v zmletih zmeseh je bila bolj stabilna kot pri čistem amorfnom indometacinu. Poleg tega so bile razlike v stabilnosti različno dolgo mletih zmesi zelo velike, saj naj bi prisotni mikrokristali učinkovine v ne dovolj zmletih vzorcih predstavljalii jeda za kristalizacijo.

1.3.3 MLETJE UČINKOVIN Z OSTALIMI ANORGANSKIMI OKSIDI

Mallick in sodelavci so se ukvarjali z mletjem ibuprofena z aluminijevim hidroksidom (41) in kaolinom (hidratiran aluminijev silikat) (42). Ko so mleli čisti ibuprofen, ni prišlo do amorfizacije. Z obema pomožnima snovema so učinkovino mleli v razmerjih 1:0,1, 1:0,5, 1:1 in 1:2. Analizirali so interakcije, stabilnost ter sproščanje. XRPD in SEM analize so pokazale, da je v obeh primerih prišlo do kislinsko-bazne reakcije med karboksilno skupino ibuprofena

in pomožno snovjo. Popolna amorfizacija je bila dosegrena pri razmerju 1:2. Stabilnost so preverjali pri 40°C/75% RH. Po desetih tednih ni bilo opaziti nobene pretvorbe v kristalno obliko. Največje izboljšanje sproščanja so dosegli pri razmerju učinkovina:AlOH 1:0,5 in 1:0,1. Pri razmnerju 1:2 so nastali vlažni aglomerati, kar je zmanjšalo sproščanje. Dobili so naslednje zaporedje hitrosti sproščanja: 1:0,5 > 1:0,1 > čisti ibuprofen mleti > kristalni ibuprofen > 1:1 > 1:2. Pri mletju s kaolinom pa ni prihajalo do tvorbe aglomeratov in so bili rezultati sproščanja taki, kot so jih pričakovali: 1:2 > 1:1 > 1:0,5 > 1:0,1 > čisti ibuprofen mleti > kristalni ibuprofen.

Naslednja spojina, s katero so delali raziskave z mletjem, je aluminijev oksid Al_2O_3 , ki so ga mleli z učinkovinama piroksikam in meloksikam (43). Med mletjem so prišli do tvorbe stabilnih sestavov učinkovine z aluminijevim hidroksidom, ki so vsebovali učinkovino v amorfнем stanju. Učinkovina se je razporedila po površini oksida in prišlo je do nastanka metastabilnega sistema. Opažene spremembe v IR spektru mletih zmesi kažejo na interakcije učinkovine z aktivnimi površinskimi mesti aluminijevega oksida. Za vezi so odgovorne naslednje skupine: amid, sulfat, enolna skupina in N iz piridila/tiazola. Uporabili so tudi dodatno analizo XPS (ang. x-ray photoelectron spectroscopy), s katero so lahko ocenili debelino filma učinkovine na površini oksida.

1.3.4 MLETJE UČINKOVIN Z ORGANSKIMI POMOŽNIMI SNOVMI

Študija mletja z organskimi pomožnimi snovmi je bila narejena tudi na karvedilolu, opravili so jo Swamy in sodelavci (44). Z mletjem karvedilola z različnimi pomožnimi snovmi so poskušali izboljšati njegovo sproščanje. Uporabili so naslednje pomožne snovi: laktoza, koruzni škrob, obdelan agar in mikrokristalno celulozo (MCC). Učinkovino (karvedilol) in pomožne snovi so mleli v masnih razmerjih 1:1, 1:3, 1:4 in 1:9. Mletim zmesem so nato določevali vsebnost učinkovine, sproščanje, stabilnost in interakcije med učinkovino in pomožnimi snovmi. Ugotovili so, da zmesi karvedilol in mikrokristalna celuloza v razmerju 1:9 ter karvedilol in obdelan agar v razmerju 1:9 dajejo najboljše rezultate, saj se sproščanje občutno poveča. Kartkoročne stabilnostne študije so pokazale, da so mlete zmesi stabilne pri 40°C/75% RH vsaj tri mesece. Test raztopljanja je pokazal, da se čista učinkovina raztoplja počasi, v fizikalnih zmeseh s pomožnimi snovmi se je pokazalo manjše izboljšanje v

primerjavi s čisto učinkovino. Mlete zmesi pa so pokazale veliko povečanje hitrosti sproščanja. Ugotovili so, da je hitrost sproščanja odvisna od razmerja učinkovina:pomožna snov in sicer se je s povečanim deležem pomožne snovi povečala hitrost sproščanja. Največje povečanje hitrosti sproščanja so dobili pri MCC in obdelanem agarju, kar so pripisali njuni vodotopnosti in povečani močljivosti mikroniziranih delcev ZU. Z IR spektroskopijo so ugotovili, da do interakcij učinkovina-pomožna snov ni prišlo.

Toshiro in sodelavci so uspeli povečati topnost učinkovine glibenklamid z mletjem z visoko razvejanim cikličnim dekstrinom (angl. highly branched cyclic dextrin-HBCD) (45). Molekularno stanje glibenklamida so analizirali z XRPD in DSC. Ugotovili so, da največji vzrok za povečanje topnosti ni pretvorba v drugo kristalno obliko, ampak amorfizacija učinkovine, povzročena z mletjem zmesi s HBCD. Do povečanja topnosti je prišlo tudi pri ročnem mešanju v terilnici, vendar je pri tem postopku prihajalo do agregacije praškov in po 15 minutah je nastala lepljiva gmota.

Sugimoto in sodelavci so povečali topnost nifedipina (46). Naredili so sistem ZU-PEG6000-HPMC, učinkovino so vmešali v staljen polietilenglikol in dodali hidroksipropilmetil celulozo, ohladili na sobni temperaturi in strjeno maso mleli v krogličnem mlinu. Najprej so mleli brez dodatka topila in ugotovili, da je prišlo do le majhnega povečanja topnosti. Nato pa so mleli še ob dodatku vode. Količina dodane vode je bila 40% skupne teže mletega vzorca. Dodatek vode kot topila med mletjem je povzročil veliko povečanje topnosti izdelane zmesi. Z XRPD so ugotovili, da učinkovina ni v celoti amorfizirala, ampak da je del ostal v kristalnem stanju. Analizirali so velikost delcev, ta je v odsotnosti vode 300-400 nm, v prisotnosti pa 50-200 nm. To pojasnjuje veliko razliko topnosti ob dodatku vode med mletjem.

Shakhtsneider in sodelavci so z mehansko aktivacijo pridobili trdno disperzijo ibuprofena in polietilenglikola (PEG) (47). PEG so raztalili, zmešali z ZU, ohladili in dali na mlin. Ugotovili so, da je hitrost sproščanja učinkovine odvisna od molekulske mase nosilca disperzije in od deleža nosilca. Najvišja hitrost sproščanja je bila dosežena v sistemih, ki vsebujejo ekvimolarne količine učinkovine in PEG 4000 ali PEG 6000. Z IR-spektroskopijo so dokazali, da z mletjem povečamo interakcije (vodikove vezi) med učinkovino in PEG, z XRPD pa, da pride do amorfizacije ZU, pri čemer mora biti delež PEG dovolj velik za popolno amorfizacijo.

Kot zelo primerna snov za stabilizacijo amorfne oblike učinkovine v obliki trdnih disperzij se je izkazal polivinilpirolidon (PVP). Z njim so uspešno mleli ibuprofen, sulfatiazol, fenotiazin, akridin, kloranil in vitamin K (48-50).

Mura in sodelavci so proučevali trdne disperzije glizentida in PVP, namen njihove raziskave je bil izboljšati topnost in hitrost sproščanja učinkovine (51). Mleli so samo učinkovino in učinkovino z dodatkom polivinilpirolidona (PVP). Pretvorbo v amorfno obliko so dokazovali z DSC analizo. Ugotovili so, da se z mletjem tudi čisti glizentid spremeni v amorfno obliko, vendar se ta čas pretvorbe ob dodatku PVP skrajša z 180 minut za čisto ZU na 30 minut pri zmesi s PVP pri enaki intenzivnosti mletja. Amorfni vzorci v disperziji so bili stabilni najmanj 4 meseca pri sobni temperaturi. Pri testu raztpljanja so prišli od ugotovitev, da se hitrost raztpljanja poveča že pri mletju čiste ZU, kar se povečuje z intenziteto mletja. Vzrok za povečano hitrost raztpljanja je v zmanjšanju velikosti delcev in v amorfizaciji ZU. Pri zmehi ZU in PVP so ugotovili še dodatno izboljšanje hitrosti sproščanja že pri fizikalni zmesi, kar je posledica boljše močljivosti zaradi hidrofilnih lastnosti PVP, še bolj pa pri mleti zmesi, kar je posledica obeh dejavnikov: amorfizacije in povečane močljivosti.

1.4 VPLIV MLETJA NA KRISTALNE PRETVORBE

Poleg amorfizacije spojine pride lahko pri mletju tudi do spremembe kristalne oblike. Pride do pretvorbe iz enega polimorfa v drugega ali v zmes dveh ali večih polimorfov. Različni polimorfi lahko pomembno vplivajo na fizikalno kemijske lastnosti, razvoj formulacije zdravila in izdelavo zdravila, kar pripelje do razlik v sproščanju, stabilnosti in biološki uporabnosti zdravila. Zato je pomembno izbrati stabilen polimorf, ki zagotavlja stabilnost in učinkovitost končne farmacevtske oblike.

Chieng in sodelavci so se ukvarjali s proučevanjem vpliva mletja na polimorfno stabilnost ranitidin hidroklorida oblike 1 kot funkcijo časa in temperature mletja (52). Za primerjavo so mleli tudi obliko 2. Mleli so vzorce ranitidin hidroklorida oblike 1 in 2 v časovnih obdobjih od 30 do 240 minut pri treh različnih temperaturah: 4°C, 12°C in 35°C. Med mletjem so merili temperaturo mletega vzorca z infrardečim termometrom. Po določenem času mletja so odprli mlin in brez dotika vzorca izmerili temperaturo. Ugotovili so, da je temperatura vzorca med

mletjem drastično naraščala prvih 30 minut, do 60. minute pa je dosegla plato. Maksimalne končne temperature mletih vzorcev so bile 36°C pri temperaturi mletja 4°C, 45°C pri temperaturi mletja 12°C in 62°C pri temperaturi mletja 35°C. Pri mletju oblike 1 pri 4°C je bila končna temperatura vzorca 36°C in se je spremenil v popolnoma amorfno obliko. Pri temperaturi mletja 12°C (temperatura vzorca 45°C) in pri 35°C (temperatura vzorca 62°C) se je pokazala napredna pretvorba oblike 1 preko amorfne oblike v obliko 2. DSC mletih vzorcev je pokazal steklast prehod pri 13-30°C in kristalizacijski eksotermni vrh (T_c) med 30 in 65°C, če je vzorec vseboval amorfno obliko. Odkrili so, da je obnašanje vzorca odvisno od razmerja med končno temperaturo vzorca in T_c ; pri temperaturi praška pod T_c se pojavi pretvorba v amorfno obliko, medtem ko do pretvorbe v obliko 2 ne pride. Pri temperaturah blizu T_c se v začetni fazi poveča delež amorfne oblike, ki z nadaljnjim mletjem prehaja v obliko 2. Pri temperaturah, veliko višjih od T_c , pa je v vmesni fazi opaziti manj amorfne oblike spojine, poleg tega pa tudi obe kristalni oblici, medtem ko nadaljnje mletje privede do čiste oblike 2. Pri mletju oblike 2 ni pri nobenih pogojih potekla pretvorba v obliko 1.

Namen raziskave Lina in sodelavcev je bil proučiti vpliv mletja na polimorfno transformacijo gabapentina (GBP) (53). GBP obstaja v 4 oblikah: I, II, III, IV. Oblika I je monohidrat, ostale tri pa anhidrati. Najbolj stabilna je oblika II. Ta je tudi komercialno dostopna, zato so uporabili kar to komercialno. Ostale tri so pripravili po predpisanih postopkih. Vsako obliko posebej so mleli 120 minut, vzorce so analizirali z FTIR. Ugotovili so naslednje pretvorbe: GBP I je najprej dehidriral, nato pa se pretvoril v obliko II. GBP II se je najprej spremenil v obliko III, nato pa v končno obliko IV. GBP III se je najprej pretvoril v GBP II, nato v GBP III in končno v GBP IV. Obliko II so mleli tudi z različnimi pomožnimi snovmi. Ugotovili so, da pri dodatku pomožnih snovi manitol, koruzni škrob, magnezijev stearat in β -ciklodekstrin ni prišlo do polimorfne pretvorbe. Pri uporabi dekstrina, hidroksipropil β -ciklodekstrina, hidroksipropilmetil celuloze ali gelatina pa je prišlo do pretvorbe v obliko IV. Zaključili so, da je polimorfna transformacija GBP II pri mletju s pomožnimi snovmi odvisna od tipa pomožne snovi.

Cheng in sodelavci pa so določali polimorfno pretvorbo famotidina med mletjem in preučevali sinergijo vplivov mletja in segrevanja na ta proces (54). Famotidin tvori dva polimorfa: obliko A in obliko B. Material, ki so ga mleli, je bila oblika B, ki so je pripravili s prekristalizacijo iz metanola. Pretvorbo so določali z ramansko spektroskopijo. Oblika A ima vrh pri 2920 cm⁻¹,

oblika B pa pri 2897 cm^{-1} . Intenziteta vrha pri 2897 cm^{-1} je tekom mletja padala, medtem ko je pri 2920 cm^{-1} ta postopoma naraščala. To kaže na pretvorbo famotidina iz oblike B v obliko A. Ugotovili so, da sta bili obe obliki enakomerno razporejeni po vzorcu. Ko so greli čisto obliko B do 150°C , ni prišlo do pretvorbe v obliko A. Dvig temperature med mletjem pa je sinergistično pospešil polimorfno pretvorbo. Določili so tudi kritično temperaturo, kjer se je ta sinergizem drastično povečal, to je 130 stopinj pri 10 minutnem mletju in 110 stopinj pri 30 minutnem mletju.

1.5 KARVEDILOL

Karvedilol je bela ali skoraj bela kristalinična snov. Je zelo težko topen v vodi, zmerno topen v alkoholu ter zelo težko topen v razredčenih kislinah. Izkazuje polimorfizem.

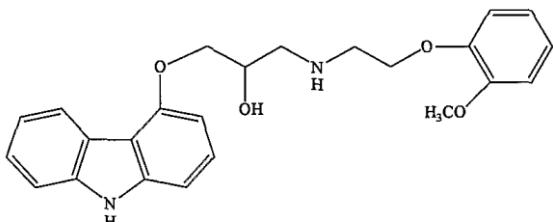
Karvedilol je antihipertenzivna učinkovina, neselektivno inhibira β -adrenergične receptorje ter selektivno α_1 -adrenergične receptorje. Ima vazodilatacijski učinek (širi žile, s tem pa zniža krvni tlak). Ima tudi antioksidativne in antiproliferativne lastnosti.

Učinkovina je racemat, enantiomera se razlikujeta po učinkih in po presnovi. Enantiomer S (–) zavira adrenergične receptorje alfa1 in beta, enantiomer R (+) pa zavira le receptorje alfa1. Karvedilol se po zaužitju hitro in skoraj v celoti absorbira. V plazmi se skoraj v celoti veže na beljakovine. Biološko uporabne je le približno 30 % zaužite količine karvedilola, saj se zelo hitro presnavlja že pri prvem prehodu skozi jetra (predvsem s pomočjo jetrnih encimov CYP2D6 in CYP2C9). Pri tem nastanejo tudi trije aktivni presnovki, ki zavirajo adrenergične receptorje beta; eden izmed njih (4'hidroksifenilni derivat) kar 13-krat močneje kot karvedilol. Aktivni presnovki delujejo v primerjavi s karvedilolom le šibko vazodilatacijsko. Presnova je stereoselektivna, zato je plazemska koncentracija karvedilola R (+) dva- do trikrat večja od karvedilola S. Razpolovni čas izločanja je različen: 5 do 9 ur za karvedilol R (+) in 7 do 11 ur za karvedilol S (–), izloča se predvsem z blatom. Priporočeni največji odmerek je $2\times25\text{ mg}$ na dan.

Karvedilol se uporablja pri zdravljenju zvišanega krvnega tlaka (hipertenzije) ter za preprečevanje napadov za prsnico (angina pektoris). Uporablja se tudi za zmanjšanje smrtnosti pri bolnikih z levo ventrikularno disfunkcijo, ki sledi miokardnemu infarktu (55).

OSNOVNI PODATKI

IUPAC poimenovanje: 1-karbazol-4-iloksi-3-[2-(2-metoksifenoksi)etilamino]propan-2-ol



Struktorna formula:

Molekulska formula: C₂₄H₂₆N₂O₄

Molekulska masa: 406,48 g/mol

POLIMORFNE OBLIKE KARVEDILOLA

Različne polimorfne oblike karvedilola so predstavljene v preglednici I. Poleg polimorfov karvedilol tvori tudi solvate (npr. karvedilol etil acetat solvat, karvedilol dihidrogen metanol solvat) in hidrate (karvedilol dihidrogenfosfat dihidrat).

Preglednica I: Polimorfne oblike karvedilola in temperature tališča, povzeto po (56)

Oblika	DSC odziv
oblika I	temperatura tališča 123-126°C
oblika II	temperatura tališča 114-115°C
oblika III	temperatura tališča 92-95°C, nato rekristalizacija pri 105°C, 114°C (temperatura tališča oblike II)
oblika IV	temperatura tališča 104°C
oblika V	67°C (rekristalizacija), 115°C (tališče)
oblika VII	73°C (polimorfna modifikacija v obliko II), 114°C (temperatura tališča oblike II)

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je preučiti vpliv mletja karvedilola s pomožnimi snovmi na njegovo kristalno obliko in lastnosti. V prvem sklopu naloge se bomo oprli na diplomsko nalogo Mateje Čurič (56), ki je z mletjem karvedilola z različnimi aminokislinami poskušala narediti kokristale. Dokazala je, da je prišlo pri mletju z aminokislinama tirozin in serin do popolnega prehoda karvedilola iz kristalne oblike II v obliko I. Ta eksperiment bomo ponovili in proučili fizikalno stabilnost nastale kristalne oblike pri 40°C/75% RH oziroma 21°C/8% RH ter vpliv kristalnih pretvorb na sproščanje učinkovine. V drugem sklopu pa smo si za mletje izbrali še dve anorganski porozni pomožni snovi Neusilin® US2 in Sylisia® 350 z namenom pridobitve stabilne amorfne oblike karvedilola z izboljšanim sproščanjem.

Pripravili bomo fizikalne zmesi v različnih stehiometrijskih razmerjih učinkovine in pomožne snovi ter jih različno dolgo mleli v krogličnem mlinu. Z aminokislinami bomo mleli brez topila in z dodatkom majhnih množin etanola, z Neusilinom in s Sylisiijo pa samo brez topila. Lastnosti mletih zmesi bomo primerjali s fizikalnimi zmesmi učinkovine in pomožne snovi.

Izdelane vzorce bomo analizirali z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije (DSC), nato pa jih bomo shranili pri dveh različnih pogojih: 40°C/75 % relativni vlažnosti zraka ter 21°C/8 % relativni vlažnosti zraka. Po dveh, štirih in šestih tednih jih bomo ponovno analizirali z DSC in na podlagi dobljenih rezultatov ocenili njihovo stabilnost.

Ob času priprave vzorcev in po šestih tednih shranjevanja bomo opravili za vse vzorce tudi test sproščanja, s čimer bomo ugotovili, kako mletje vpliva na hitrost sproščanja karvedilola in kako na sproščanje vpliva shranjevanje pri različnih pogojih.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Učinkovina:

- karvedilol (Krka, Slovenija)

Pomožne snovi:

- serin (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- tirozin (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija)
- Sylisia[®] 350 (Fuji, Japonska)
- Neusilin[®] US2 (Fuji, Japonska)

Topila:

- etanol (Merck, Nemčija)
- etilacetat (Merck, Nemčija)

Reagenti za pripravo medija za test sproščanja:

- natrijev dihidrogenfosfat dihidrat, NaH₂PO₄×2H₂O (Merck, Nemčija)
- natrijev hidroksid, NaOH (Merck, Nemčija)
- prečiščena voda

Reagenti za pripravo pogojev za test stabilnosti:

- NaCl
- KOH

Laboratorijski pribor:

- čolnički za tehtanje
- spatule, žličke
- pipete
- patena
- steklovina (čaše, bučke, meritni valji, epruvete)
- eksikator
- brizga, igle, filtri (RC 0.45 µm: Minisart[®] RC 25, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija)

Aparature:

- Tehnica A&D Instruments LTD, GH-300-EC, Italija
- Analizna tehnica Mettler Toledo AG 245, Švica
- Vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija
- Diferenčni dinamični kalorimeter: Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljen s programsko opremo STARe Software v9.30, Švica
- Naprava za merjenje pH vrednosti raztopin: pH METER, Mettler Toledo MA235, Švica
- Naprava za test sproščanja: Erweka DT6 , Nemčija
- Spektrofotometer: Hewlett Packard, HP 8453, UV-Visible spectroscopy system, Nemčija
- Osebni računalnik Hewlett Packard Vectra XA povezan z UV spektrofotometrom

3.2 METODE**Mletje vzorcev:**

Vzorce smo mleli z vibracijskim mlinom Pulverisette 0 (slika 4). Učinkovino in pomožno snov smo natehtali v določenem razmerju in prenesli v možnar. Tam smo zmes s spatulo premešali, mlin zaprli in nastavili čas mletja. Sestava praškov in pogoji mletja so predstavljeni v preglednici II.

Preglednica II: Pregled mletih vzorcev

pripravljeni vzorci	masa ZU (mg)	masa pom. snovi (mg)	topilo	čas mletja
karvedilol	400	/	/	30 min
karvedilol	400	/	100 µl EtOH	30 min
karvedilol:tirozin (1:1)*	276,6	123,4	/	30 min
karvedilol:tirozin (1:1)*	276,6	123,4	200 µl EtOH	60 min
karvedilol:serin (1:1)*	317,8	82,2	/	30 min
karvedilol:serin (1:1)*	317,8	82,2	200 µl EtOH	60 min
karvedilol:Neusilin US2 (1:2)**	133,3	266,7	/	120 min
karvedilol:Sylisia 350 (1:2)**	133,3	266,7	/	120 min

*(1:1) je stehiometrijsko razmerje med karvedilolom in pomožno snovjo

**(1:2) je masno razmerje med karvedilolom in pomožno snovjo

Vsi vzorci so imeli skupno maso 400 mg. Najprej smo mleli čisti karvedilol, nato pa še z dodatkom 100 µl etanola kot topila. Pri mletju karvedilola z aminokislinami smo pripravili vzorce v stehiometrijskem razmerju 1:1, pri mletju s Sylisijo in Neusilinom pa v masnem razmerju 1:2. Z aminokislinami smo mleli brez in z dodatkom topila. Tega smo dodali 100 µl pred mletjem in še 100 µl po 30 minutah mletja, nato smo nadaljevali z mletjem še 30 min. S Sylisijo in Neusilinom smo mleli 120 min brez prekinitve in brez dodatka topila.



Slika 4: Vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch

Vibracijski mlin melje prašek s trenjem, drgnjenjem in zadevanjem krogle ob vzorec v možnarju. Možnar vibrira elektromagnento, s pomočjo elektromotorja, vibracije pa se prenesejo iz krogle na mleti material in obratno. Na začetku mletja je manjšanje grobih delcev posledica udarcev krogle ob delce, kasneje pa so drobni delci zmleti z drgnjenjem materiala med kroglo in dnem možnarja. Material se nenehno poseda zaradi vibracij, zato se tudi dobro premeša. Energijo udarca in trka krogle ob steno možnarja lahko poljubno nastavljam, kar dovoljuje precizno prilagajanje pogojev mletja vzorca, ki ga meljemo (57).

Priprava fizikalnih zmesi:

Za pripravo fizikalnih zmesi smo natehtali enake mase učinkovine in pomožnih snovi kot pri pripravi vzorcev za mletje. Zatehtane količine smo prenesli v pateno in mešali s spatulo 15 minut.

Diferenčna dinamična kalotimetrija (DSC):

DSC analiza vzorcev je bila opravljena z diferenčnim dinamičnim kalorimetrom iMettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.30 na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi (pretok dušika je znašal 50 ml/min). Hitrost segrevanja je znašala 10 K/min.

Test fizikalne stabilnosti:

Za test stabilnosti smo shranili vzorce pri dveh različnih pogojih, pri 40°C/75% RH ter pri 21°C/8% RH. Pogoje s povišano temperaturo in vlažnostjo zraka smo zagotovljali v električnem sušilniku z nasičeno raztopino NaCl, medtem ko smo nizko relativno vlažnost zraka pridobili v eksikatorju pri sobni temperaturi z nasičeno raztopino KOH. Vzorce smo analizirali z DSC analizo po dveh, štirih in šestih tednih. Poleg vseh mletih vzorcev smo shranili tudi čisti nemleti karvedilol, čisti serin in tirozin ter pripravljene fizikalne zmesi.

Preskus sproščanja:

Preskus sproščanja smo izvedli po Ph. Eur. 7thEd, pri čemer smo uporabili napravo z vesli Erweka DT6 na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Pripravili smo tolikšno maso vzorca, ki je vsebovala 25 mg učinkovine, kar ustrezava enkratnemu odmerku te učinkovine. Za preskus sproščanja smo uporabili fosfatni pufer s pH 6,8. Ta medij smo izbrali, ker je zdravilna učinkovina pri tem pH-ju slabše topna in je videti večje razlike med mletimi in nemletimi vzorci. Pri nižjem pH-ju je dobro topna in rezultati ne bi bili tako diskriminatorni.

Ob določenih časovnih intervalih (1, 2, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min) smo ročno z brizgo odvzeli 10 ml vzorca iz raztopine ter ga filtrirali z uporabo filtra Minisart® RC 25 0,45µm (Sartorius, Nemčija). Volumna odvzetega vzorca nismo nadomeščali, zato smo pri računanju upoštevali izgubo volumna. Poskus smo izvedli v dveh paralelah, volumen medija je bil 900 ml, temperatura medija je znašala 37±0,5 °C, hitrost mešanja pa 50 obratov na minuto.

Koncentracijo učinkovine iz odvzetih vzorcev smo določili spektrofotometrično z UV-VIS spektrofotometrom Hewlett Packard, HP8453 (Nemčija) na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani z merjenjem absorbance pri 332 nm in računanjem na osnovi umeritvene premice. Absorbanco smo pomerili v kivetih iz kvarčnega stekla in potjo žarka 1,0 cm.

Izdelava umeritvene premice:

Natehtali smo približno 10 mg karvedilola in si zapisali točno vrednost za nadaljnje računanje. Nato smo dodali 10 ml metanola, da se je vsa učinkovina raztopila, in dopolnili s prečiščeno vodo do 250 ml. Iz tako pripravljene raztopine smo pripravili razredčitve 2/10, 2,5/10, 3/10, 4/10, 4,5/10 in 5/10, ter jih pomerili s spektrofotometrom. Opisan postopek smo naredili v dveh paralelah. Na podlagi rezultatov spektrofotometričnih meritev je program izračunal umeritveno premico.

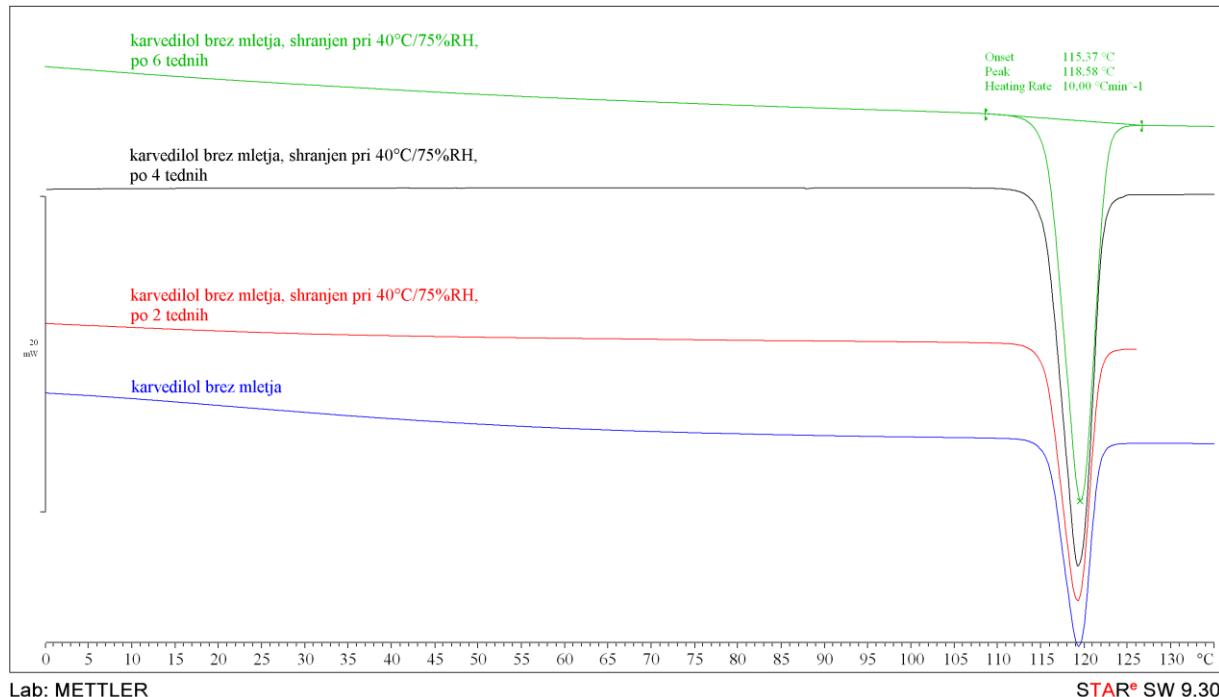
Priprava medija za sproščanje:

Fosfatni pufer (pH 6,8): v 1000 ml bučo smo natehtali 6,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in dodali 900 ml prečiščene vode. pH smo uravnali z raztopino 0,9 g NaOH v 100 ml vode. pH smo merili s pH metrom Mettler Toledo MA235 (Švica).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

ANALIZA VZORCEV IZHODNEGA NEMLETEGA KARVEDILOLA

^{^exo}

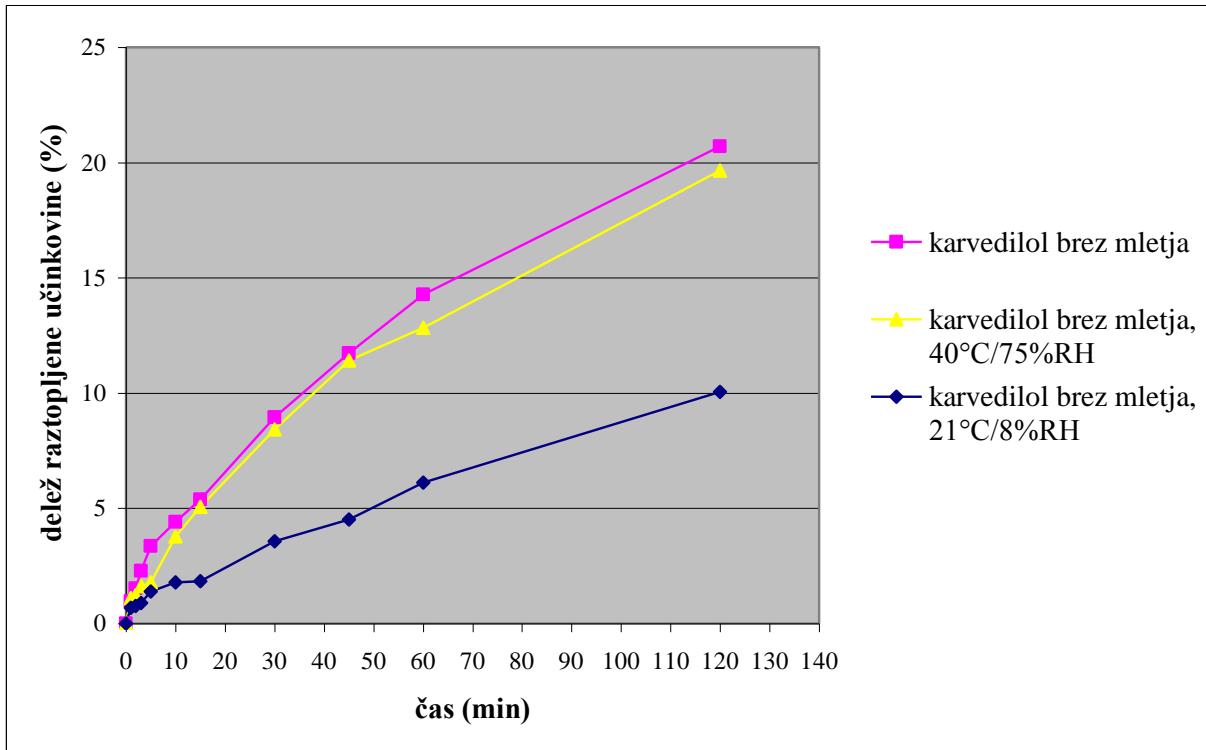


Slika 5: DSC krivulje izhodnega karvedilola, shranjenega pri 40°C/75% RH, v času 0 ter po 2,4 in 6 tednih

^{^exo}



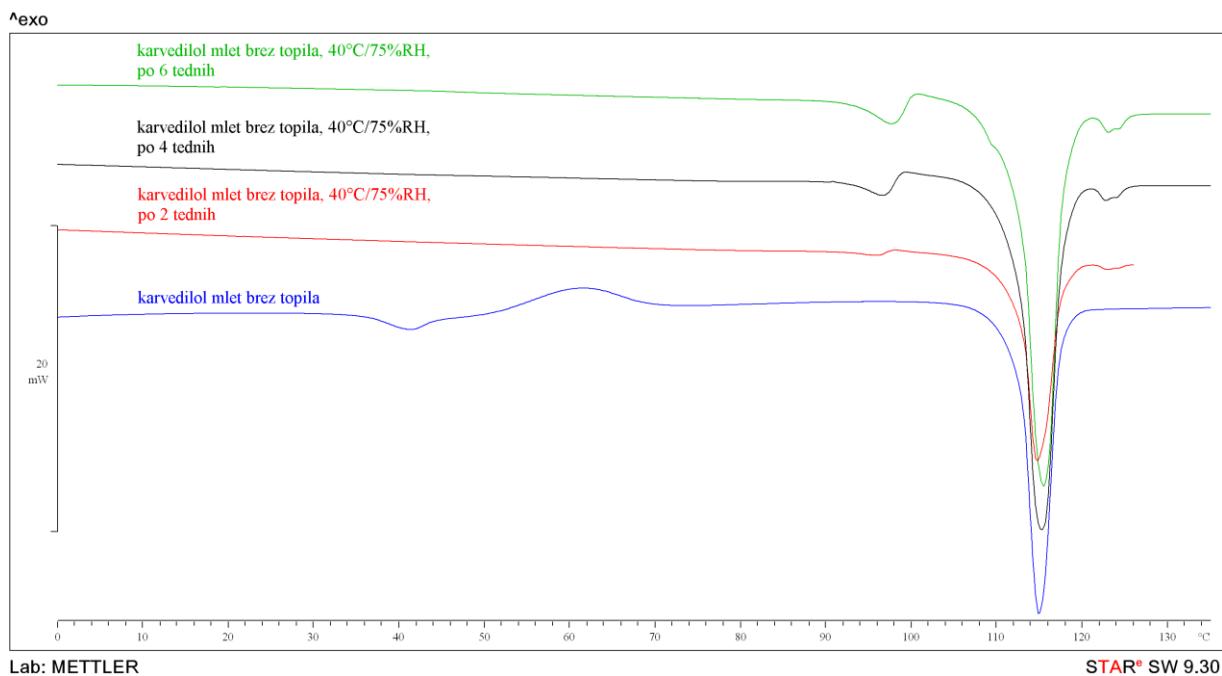
Slika 6: DSC krivulje izhodnega karvedilola, shranjenega pri 21°C/8% RH, v času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



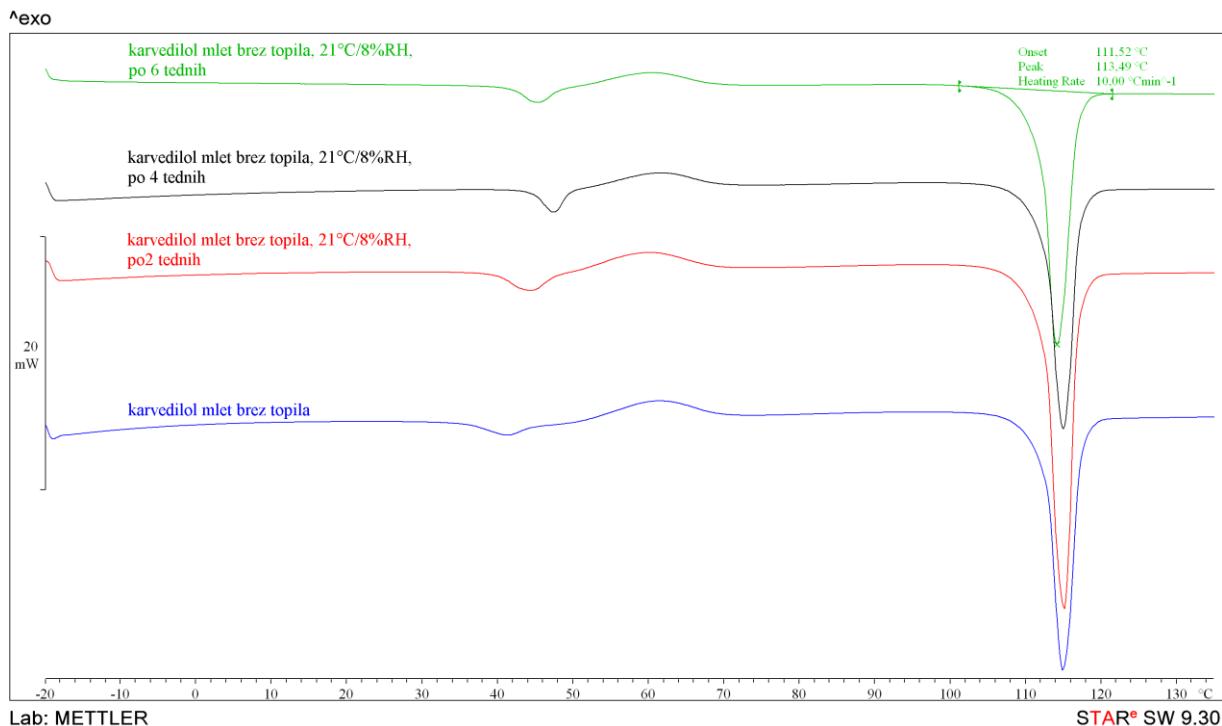
Slika 7: Diagram razapljanja izhodnega karvedilola brez mletja, karvedilola brez mletja po 6 tednih pri 40°C/75% RH in izhodnega karvedilola 6 tednih pri 21°C/8% RH

Slike 5 in 6 predstavlja DSC krivulje čistega nemletnega izhodnega karvedilola, slika 7 pa diagram razapljanja le tega. Na DSC vidimo endotermen vrh pri 115°C, kar predstavlja taljenje karvedilola oblike II. Opazimo lahko tudi, da se krivulje po 2, 4 in 6 tednih pri obeh pogojih shranjevanja ne razlikujejo v številu, obliku ali poziciji vrhov, torej sklepamo, da je čisti karvedilol stabilen tako pri povišani temperaturi in vlagi kot tudi pri sobni temperaturi in znižani zračni vlagi. Na diagramu razapljanja vidimo, da se v dveh urah raztopi 21% učinkovine, pri vzorcu, ki je bil 6 tednov shranjen pri 40°C/75% RH, je bilo razapljanje podobno (19%). Karvedilol, ki je bil 6 tednov shranjen pri nizki zračni vlagi, pa je imel kar za polovico slabše razapljanje (10% raztopljene učinkovine v dveh urah). To je lahko posledica tega, da se je pri znižani relativni vlažnosti zraka voda desorbirala s površine delcev, s čimer so ti postali bolj hidrofobni in manj močljivi.

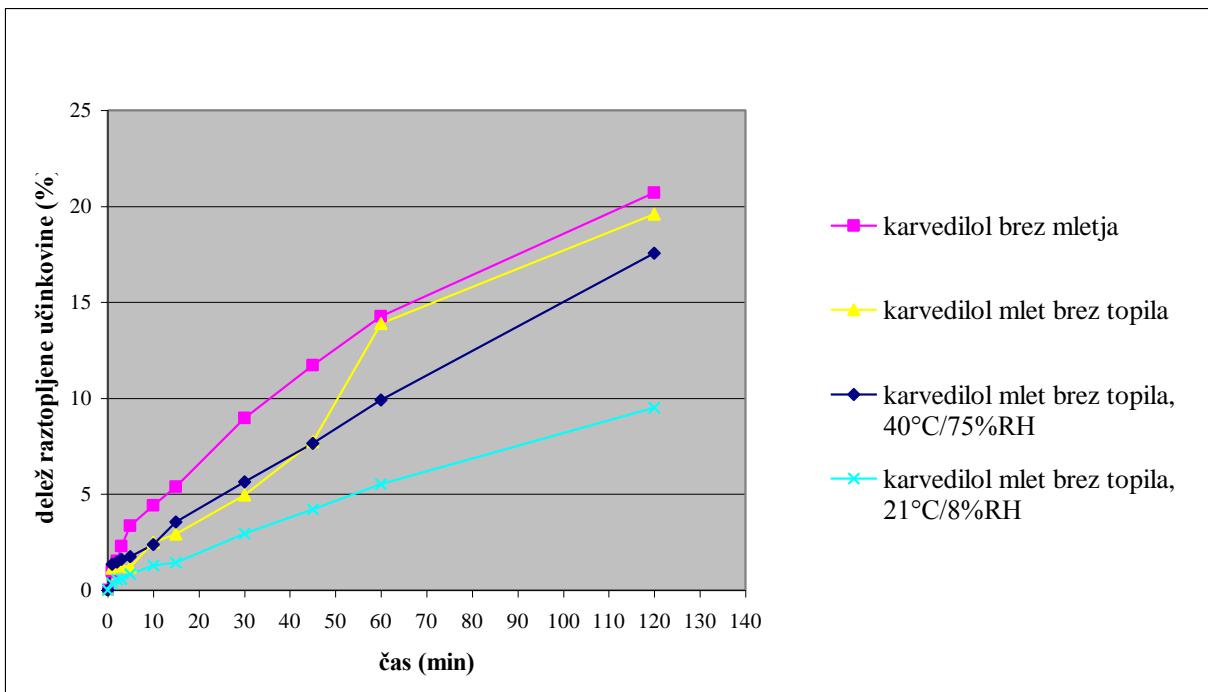
ANALIZA VZORCEV MLETEGA KARVEDILOLA BREZ TOPILA



Slika 8: DSC krivulje karvedilola, mletega brez topila in shranjenega pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



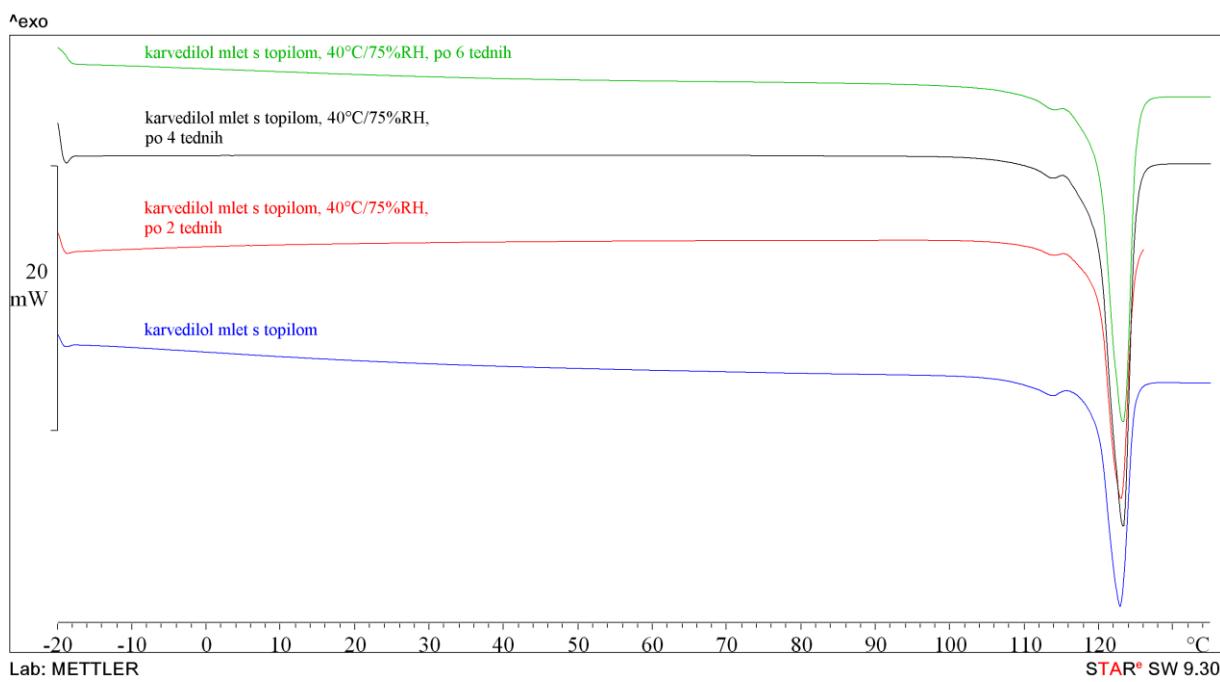
Slika 9: DSC krivulje karvedilola, mletega brez topila in shranjenega pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



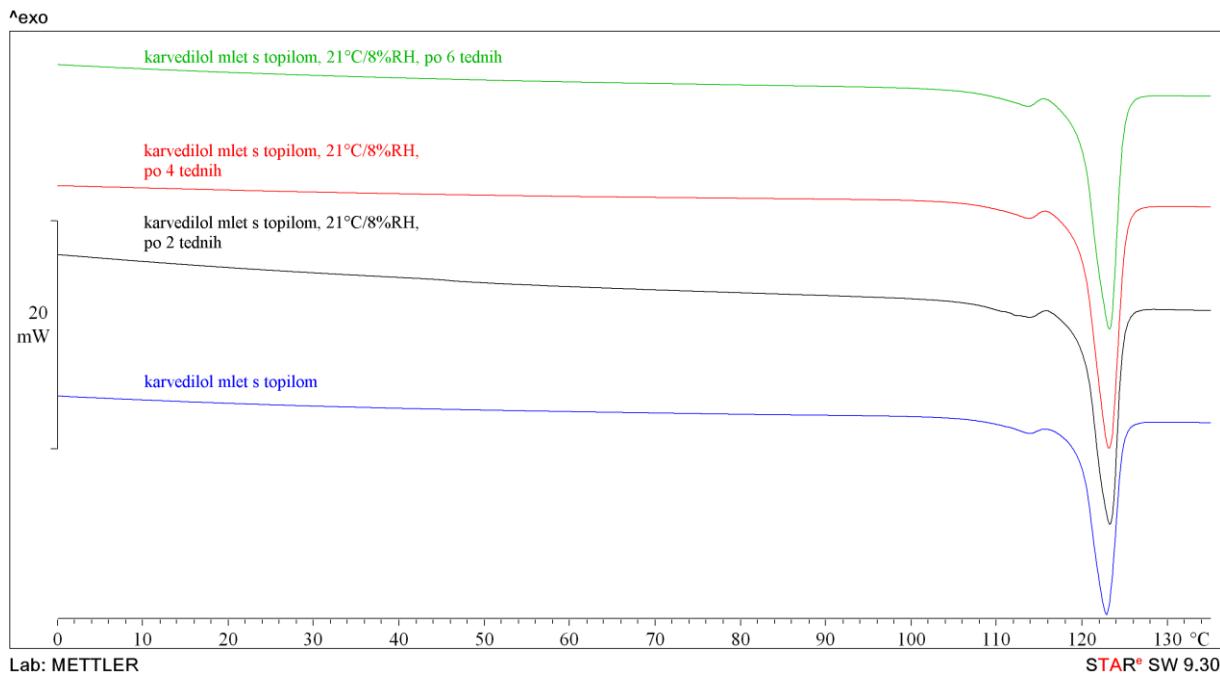
Slika 10: Diagram raztpljanja karvedilola brez mletja, karvedilola mletega brez topila ter karvedilola mletega brez topila in hranjenega 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

Na slikah 8 in 9 vidimo, da sta se pri mletju karvedilola brez topila na DSC krivulji pojavila dodatni endotermni vrh pri 39°C in eksotermni vrh pri 60°C. Gre za steklast prehod, ki mu sledi rekristalizacija. Pri mletju je torej prišlo do amorfizacije dela oziroma celega vzorca učinkovine. Na DSC krivuljah vzorca, shranjenega pri 40°C/75% RH, že po dveh tednih prva dva vrhova izgineta, pojavit pa se dva nova, endotermen vrh pri 95°C in pri 125°C. Predvidevamo, da amorfna oblika v največji meri kristalizira v obliko II, deloma pa tudi v obliki I ($T_t=123^{\circ}\text{C}-126^{\circ}\text{C}$) in III ($T_t=92^{\circ}\text{C}-95^{\circ}\text{C}$). Pri 21°C/8% RH (slika 9), pretvorbe ni opaziti, ker so DSC krivulje enake kot ob času 0. Endotermni vrh taljenja karvedilola se je v primerjavi z nemletim karvedilolom (sliki 5, 6) premaknil k nižji temperaturi (z 115°C na 112°C) zaradi zmanjšanja velikosti delcev, kar je posledica mletja.

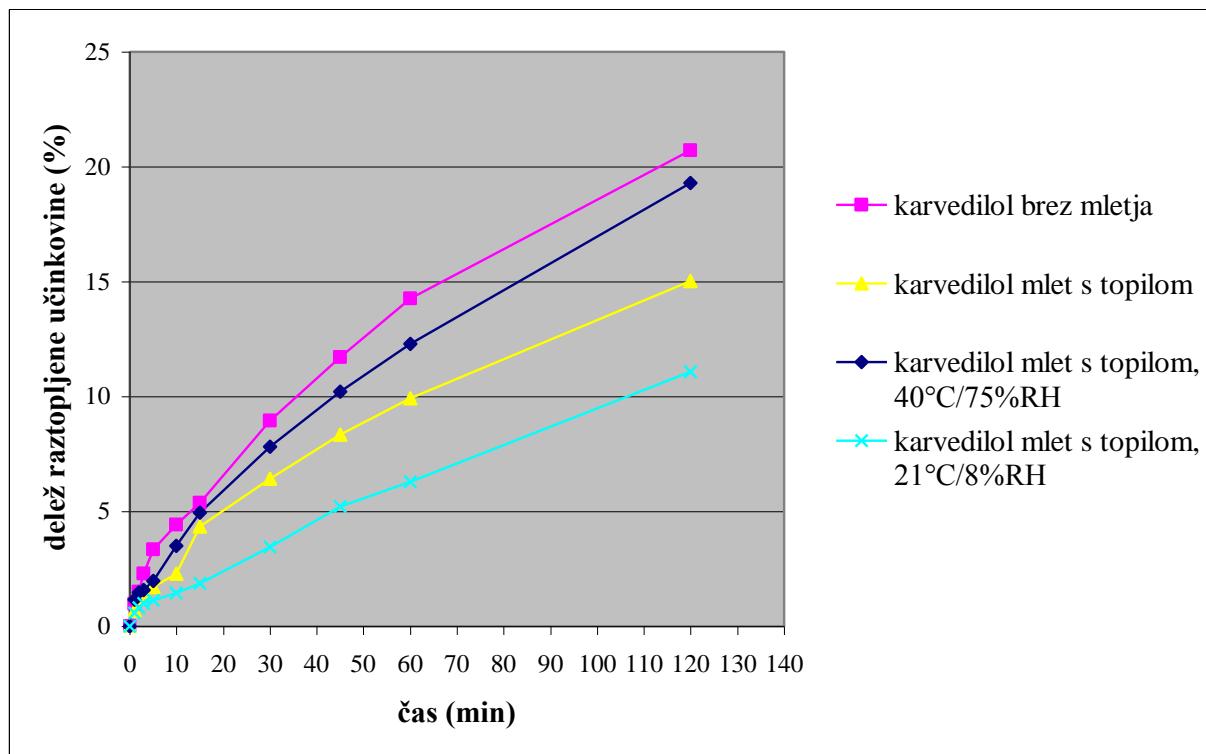
Raztpljanje karvedilola se je z mletjem nekoliko poslabšalo, kar je znano že iz literature (58) (slika 10), tudi shranjevanje pri 40°C/75% RH je v majhni meri vplivalo na znižanje raztpljanje, medtem ko se je raztpljanje mletega vzorca, hranjenega pri 21°C/8% RH, bistveno poslabšalo. Rezultat je podoben kot pri nemletem vzorcu (slika 7), kar potrjuje hipotezo povečane hidrofobnosti posušenih delcev.

KARVEDILOL MLET Z ETANOLOM

Slika 11: DSC krivulje karvedilola, mletega z etanolom in shranjenega pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih

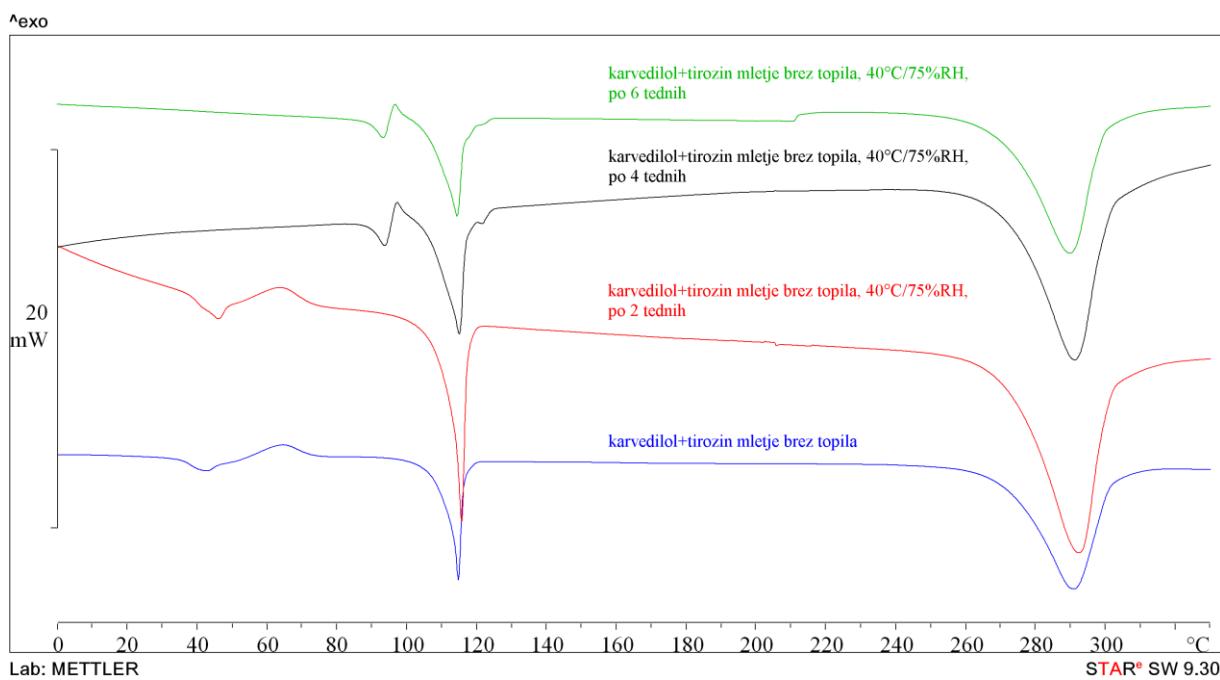


Slika 12: DSC krivulje karvedilola, mletega z etanolom in shranjenega pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih

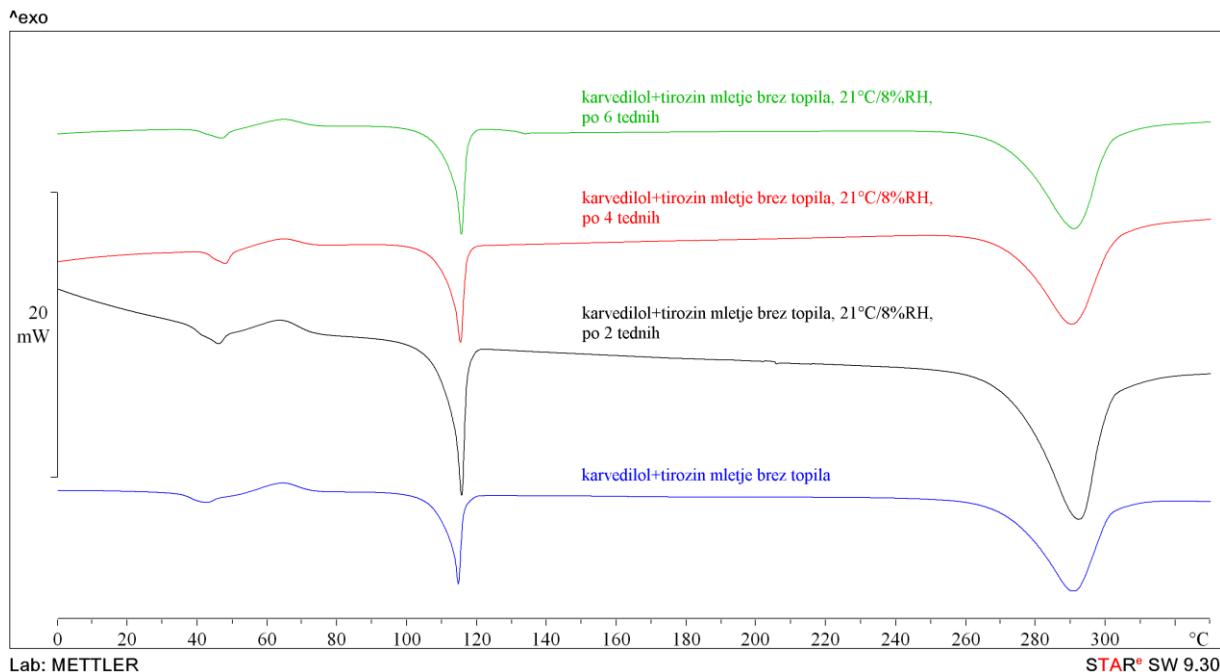


Slika 13: Diagram raztpljanja karvedilola brez mletja, karvedilola mletega s topilom ter karvedilola mletega s topilom in hranjenega 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

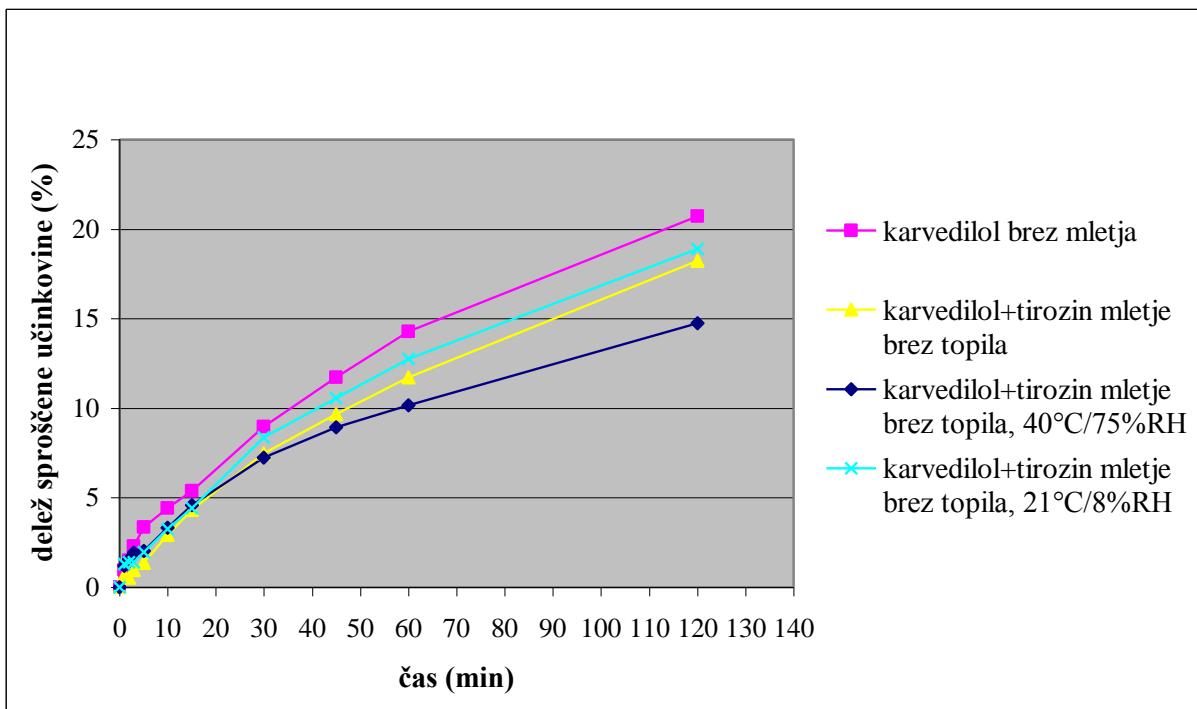
Na slikah 11 in 12 so predstavljene DSC krivulje karvedilola, mletega z EtOH. Tališče karvedilola se je glede na izhodno obliko premaknilo k višji temperaturi 120°C, en majhen vrh pa je ostal pri 115°C. Ocenjujemo, da je prišlo do nastanka zmesi kristalnih oblik I in II. DSC krivulje se po shranjevanju niso spremenile, zato sklepamo, da je kristalna oblika I, ki je nastala v mnogo večjem deležu kot oblika II, stabilna. Slika 13 kaže, da je mletje s topilom povzročilo znižanje raztpljanja karvedilola (15% raztopljenega po 2 urah). Ko smo ta isti vzorec pustili pri 40°C/75% RH, se je raztpljanje znova izboljšalo (19,5%). Tako kot že v prejšnjih primerih se je vzorec, shranjen pri 21°C/8% RH, bistveno slabše raztpljal od ostalih.

KARVEDILOL+TIROZIN MLETJE BREZ TOPILA

Slika 14: DSC krivulje zmesi karvedilola in tirozina, mlete brez topila in shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



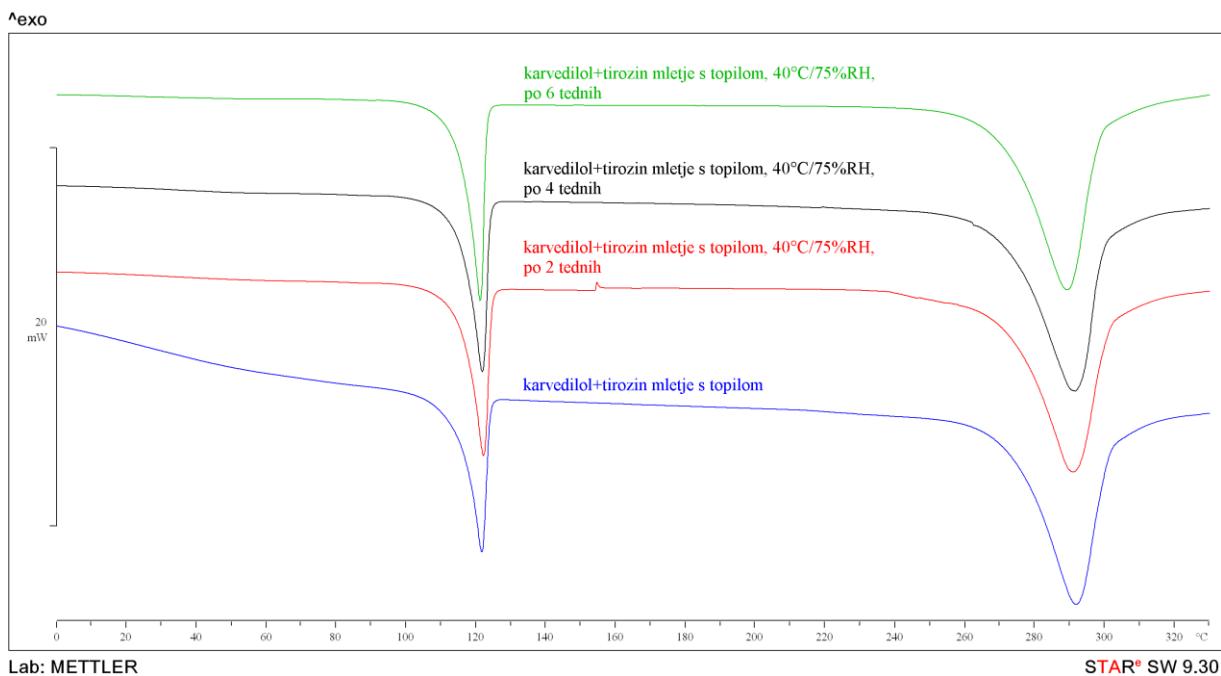
Slika 15: DSC krivulje zmesi karvedilola in tirozina, mlete brez topila in shranjene pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



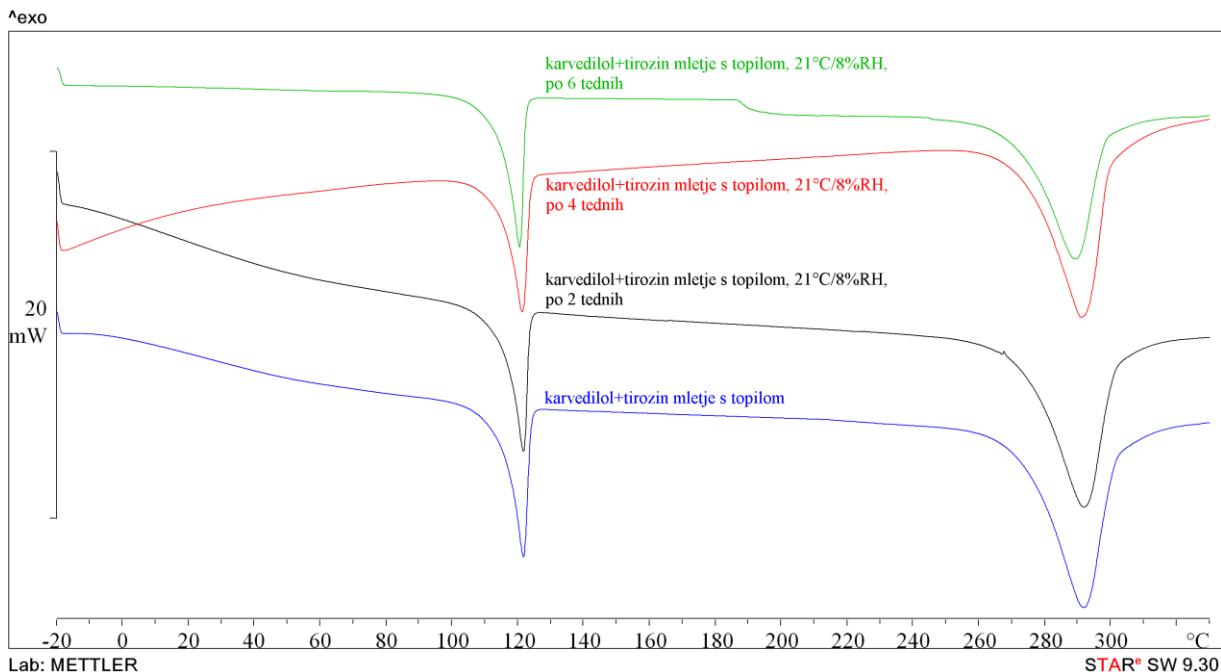
Slika 16: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, zmesi karvedilola in tirozina, mlete brez topila ter te mlete zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

Slike 14 in 15 predstavljata DSC krivulje zmesi karvedilola in tirozina, mlete brez topila. Iz teh krivulj opazimo, da je prišlo do amorfizacije določenega dela karvedilola (steklast prehod pri 39°C in rekristalizacija pri 60°C). Po 4 tednih shranjevanja pri 40°C/75% RH sta ta dva vrhova izginila, pojavila pa sta se dva nova: endotermni pri 95°C in eksotermni pri 105°C. Predvidevamo, da gre za taljenje kristalne oblike III, ki ji sledi rekristalizacija v obliko II. Pri shranjevanju pri 21°C/8% RH sta vrhova pri 39°C in 60°C ostala. Iz tega lahko sklepamo, da je za pretvorbo amorfne oblike v kristalno potrebna ustrezna relativna vlažnost zraka. Endotermni vrh pri 280°C predstavlja taljenje mletega tirozina.

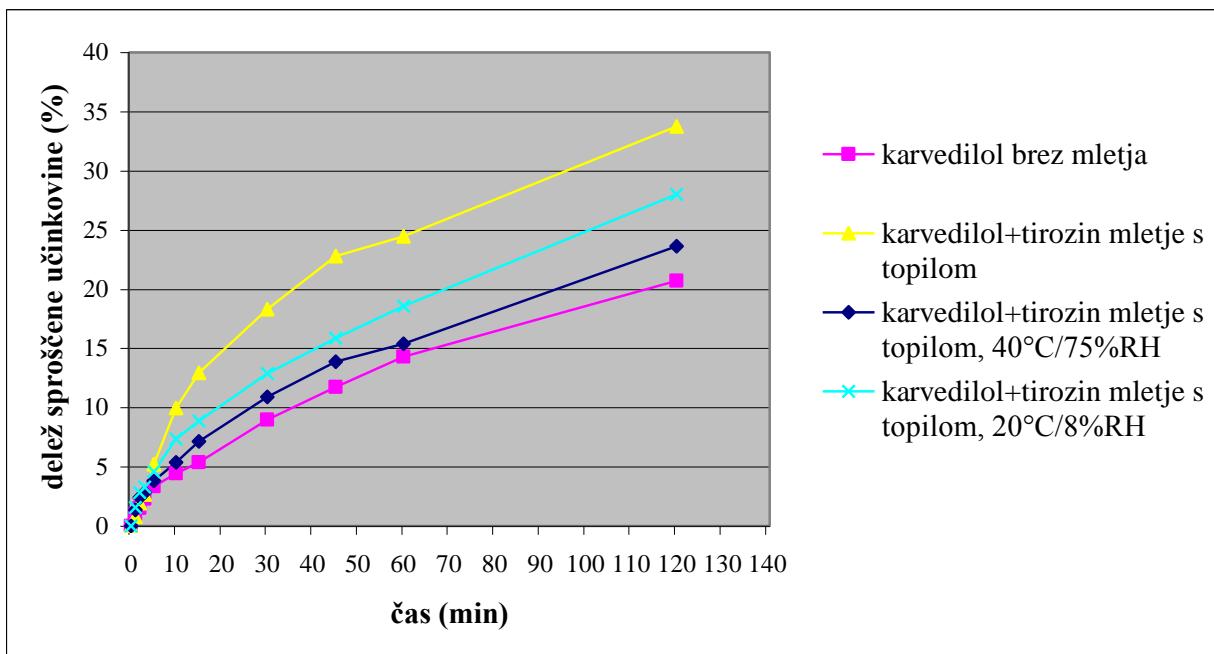
Na sliki 16 vidimo, da mletje karvedilola s tirozinom brez topila sproščanje glede na izhodni karvedilol nekoliko poslabša, kar je presenetljivo, saj smo iz DSC krivulj videli, da je prišlo do tvorbe amorfne oblike učinkovine. Za razliko od primerov s samim karvedilolom, shranjevanje pri nizki vlagi ne vpliva bistveno na sproščanje. Majhen vpliv tirozina na sproščanje lahko pripisemo slabi vodotopnosti (0,45 mg/ml) te aminokisline v vodi (59).

KARVEDILOL+TIROZIN MLETJE Z ETANOLOM

Slika 17: DSC krivulje zmesi karvedilola in tirozina, mlete z etanolom in shranjene pri $40^{\circ}\text{C}/75\%$ RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



Slika 18: DSC krivulje zmesi karvedilola in tirozina, mlete s topilom in shranjene pri $20^{\circ}\text{C}/8\%$ RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih

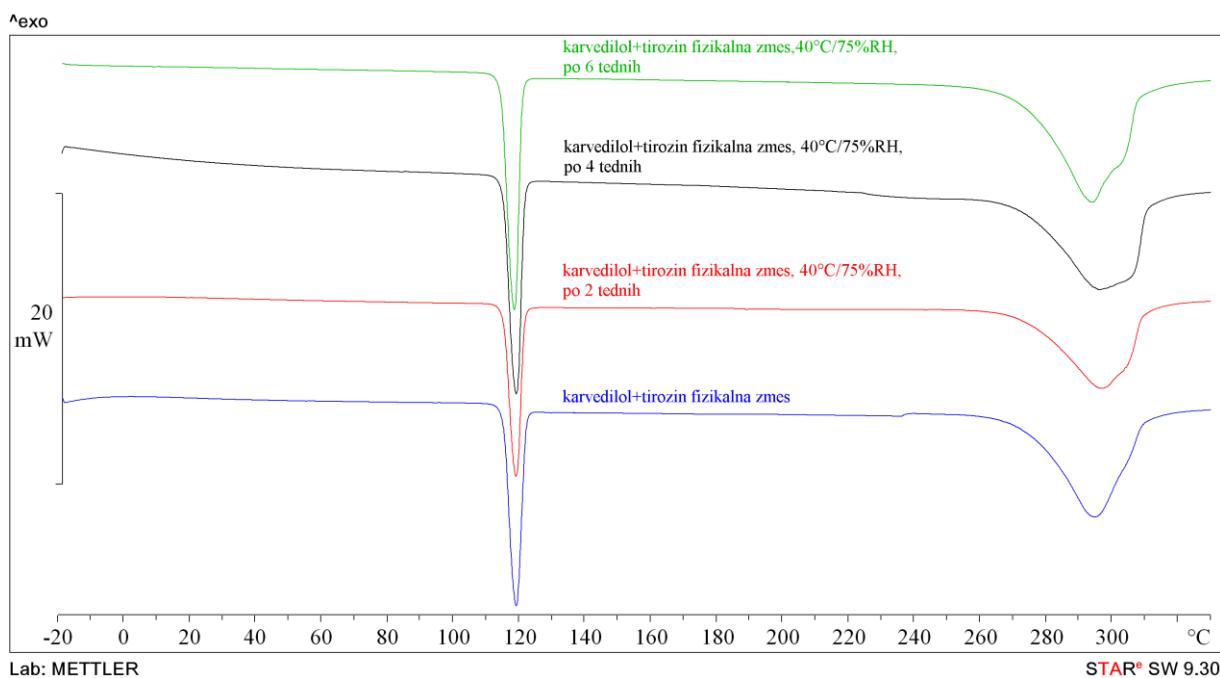


Slika 19: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, zmesi karvedilola in tirozina, mlete s topilom ter te mlete zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

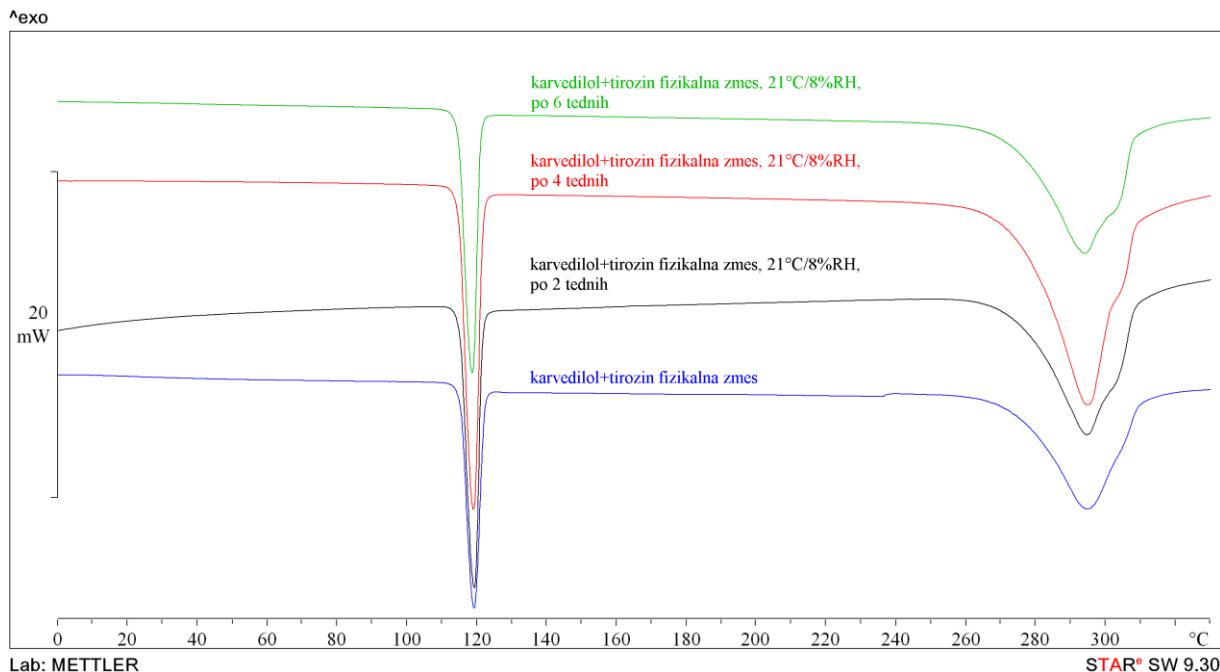
Slike 17 in 18 nam kažeta, da je pri mletju zmesi karvedilola in tirozina ob dodatku etanola prišlo do premika endoternmoga vrha taljenja karvedilola s 115°C na 120°C, kar kaže na popoln prehod v kristalno obliko I, kot je v svojem diplomskem delu dokazala že Mateja Čurič (56). S shranjevanjem pri različnih pogojih smo dokazali, da je kristalna oblika I ostala stabilna po 6 tednih ne glede na pogoja shranjevanja.

Diagram sproščanja na sliki 19 prikazuje, da se je po mletju sprostilo 34% učinkovine v 2 urah, kar predstavlja povečanje v primerjavi s karvedilolom brez mletja (21%). Iz tega lahko sklepamo, da se kristalna oblika I karvedilola v zmesi s tirozinom bolje sprošča od oblike II. Po 6 tednih se je sproščanje karvedilola iz zmesi poslabšalo (24% pri povišani vlagi, 28% pri znižani vlagi), vendar je ostalo še vedno nekoliko višje kot pri nemletem karvedilolu. Lahko, da ima vpliv na te spremembe postopna vezava vlage na vzorec. Pojav bi bilo smiselno raziskati.

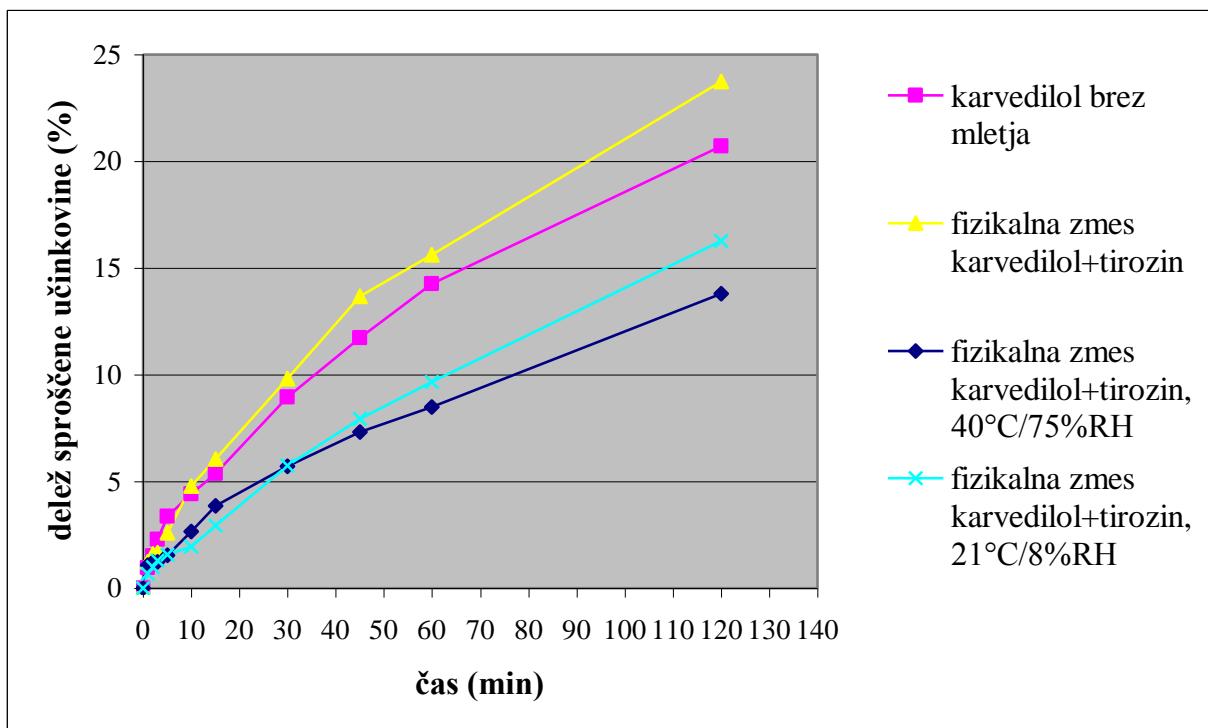
FIZIKALNA ZMES KARVEDILOLA S TIROZINOM



Slika 20: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in tirozina, shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih



Slika 21: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in tirozina, shranjene pri 20°C/8% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih

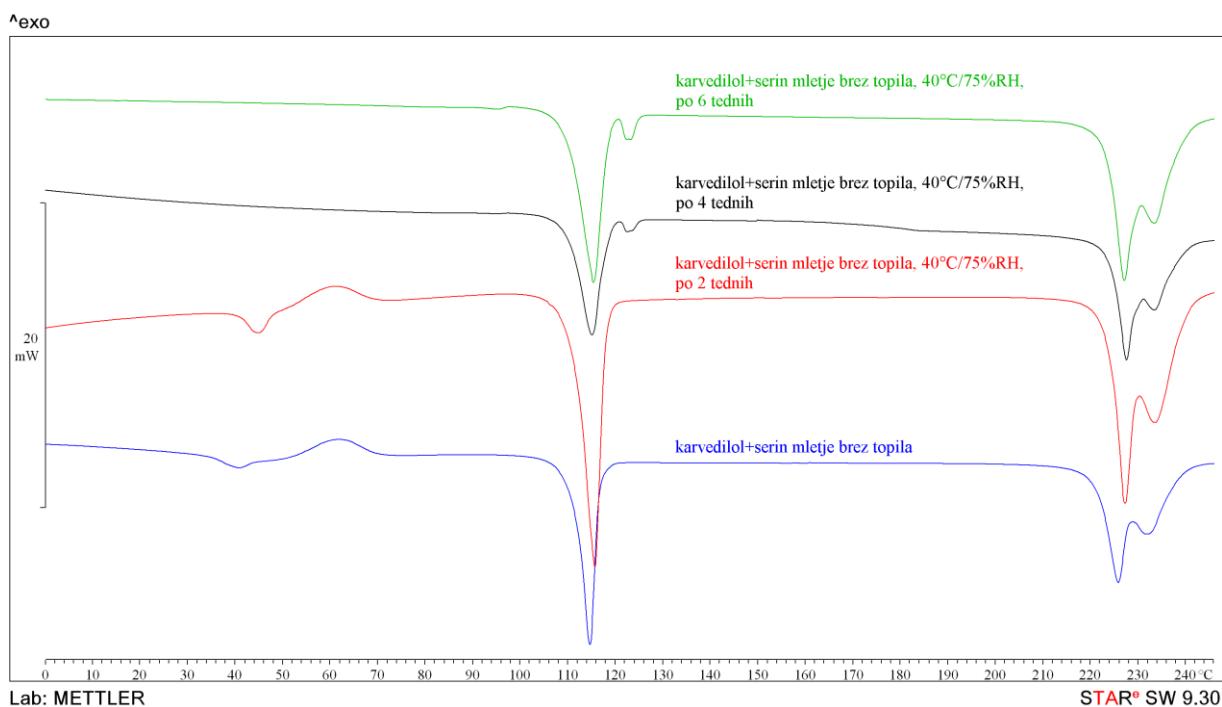


Slika 22: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, fizikalne zmesi karvedilola in tirozina, ter te fizikalne zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

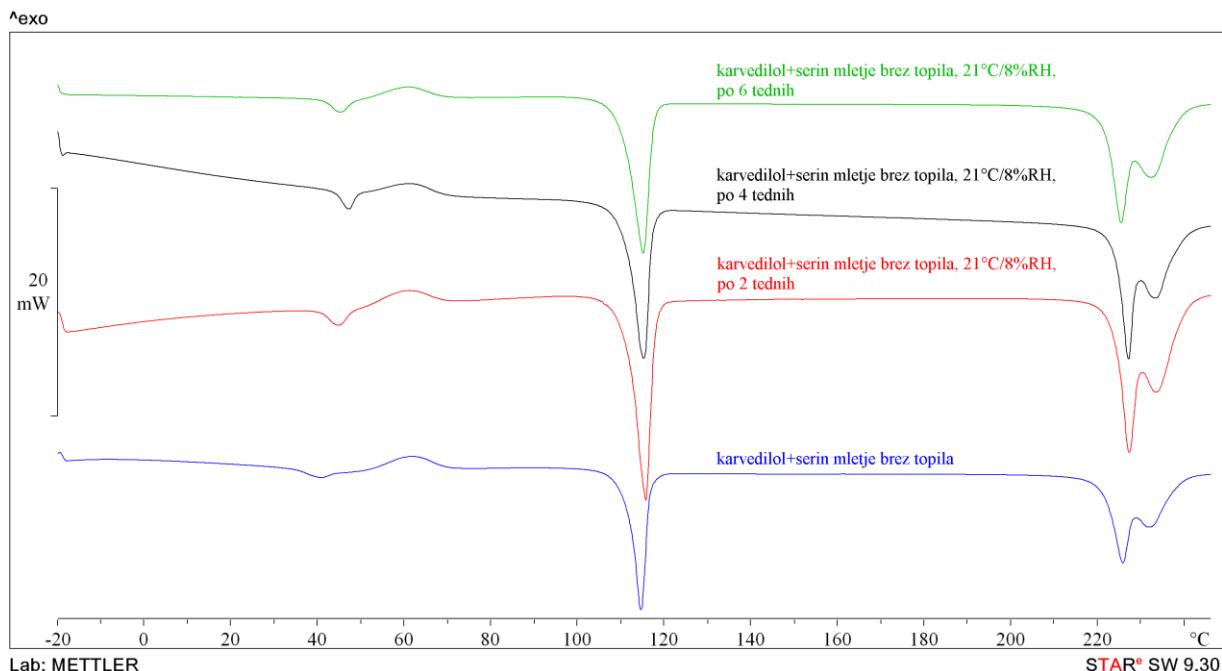
Ker smo se hoteli prepričati o vplivu samega mletja zmesi karvedilola in pomožnih snovi na lastnosti karvedilola, smo analizirali fizikalne zmesi te učinkovine v zmesi s tirozinom. DSC krivulji (slike 20 in 21) kažeta, da pri mešanju zmesi s spatulo v terilnici ne pride do spremembe kristalne oblike izhodnega karvedilola. Dokazali smo torej, da je za spremembo v kristalni obliki potreben proces mletja in da samo mešanje ni dovolj.

To dokazuje tudi diagram sproščanja učinkovine iz fizikalne zmesi (slika 22), kjer je sproščanje karvedilola v fizikalni zmesi sicer nekoliko boljše od samega karvedilola, vendar ne tako izrazito kot pri mletju karvedilola in tirozina s topilom (slika 19).

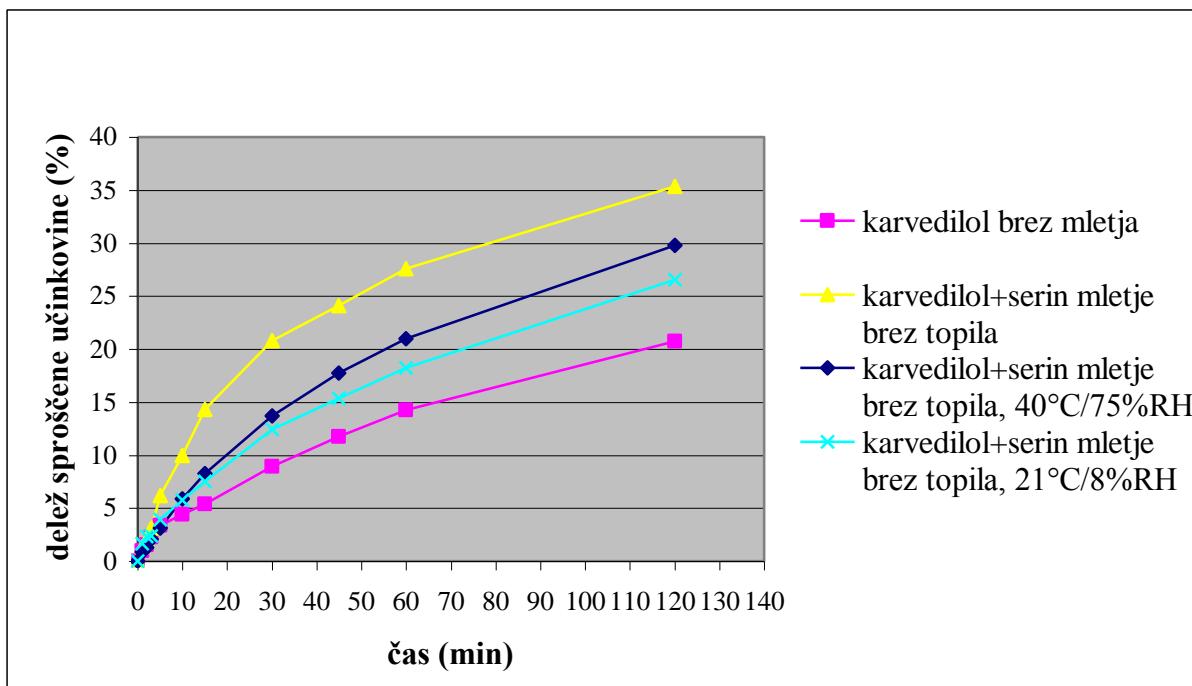
Tudi pri shranjevanju pri 40°C/75% RH oziroma 21°C/8% RH ni prišlo do sprememb v DSC krivuljah, medtem ko se je sproščanje poslabšalo.

KARVEDILOL+SERIN MLETJE BREZ TOPILA

Slika 23: DSC krivulje zmesi karvedilola in serina, mlete brez topila in shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



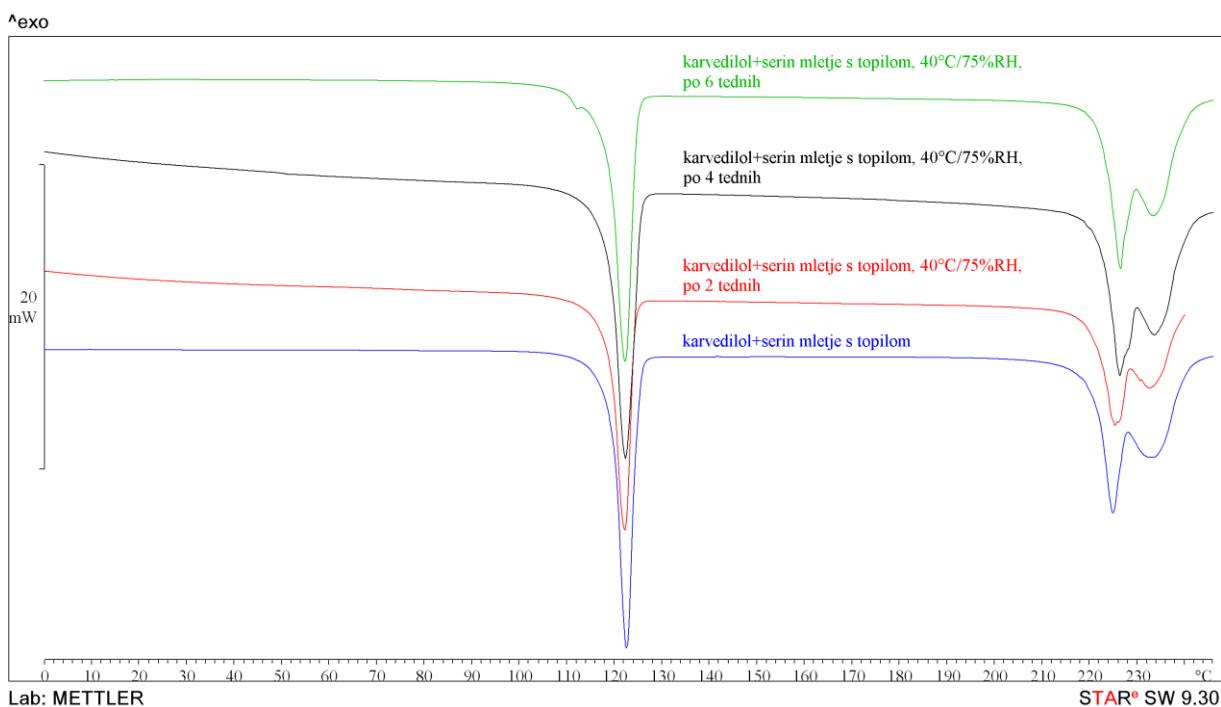
Slika 24: DSC krivulje zmesi karvedilola in serina, mlete brez topila in shranjene pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



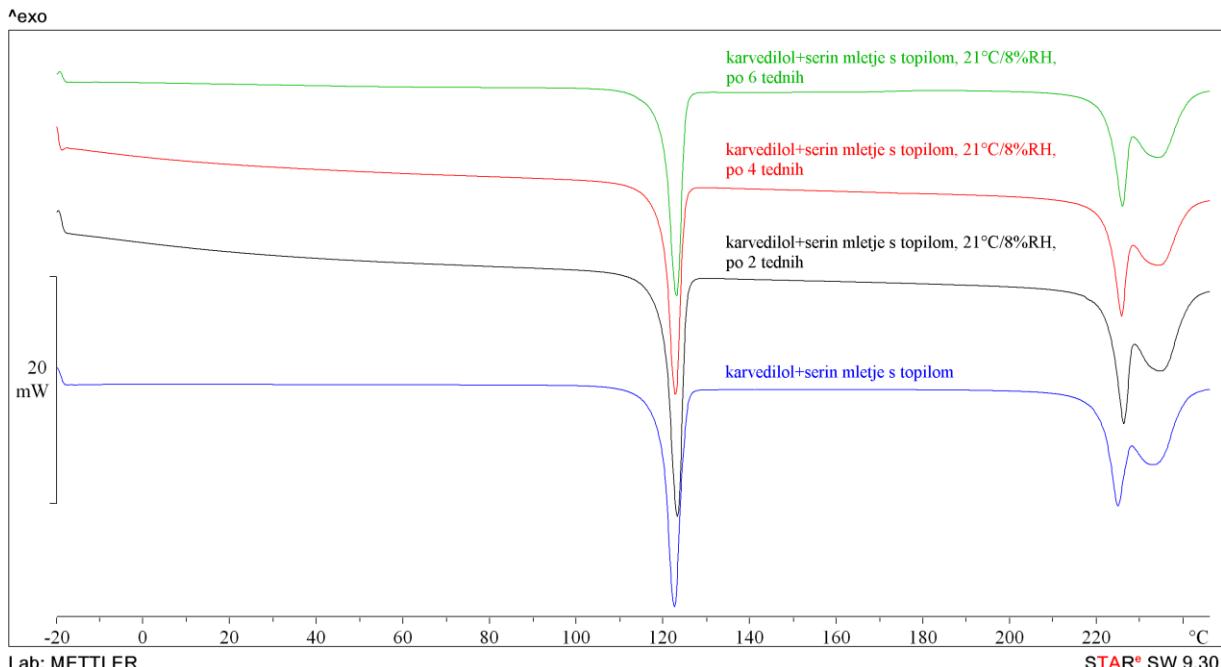
Slika 25: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, zmesi karvedilola in serina, mlete brez topila ter te mlete zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

Na sliki 23 lahko vidimo, da je pri mletju zmesi karvedilola in serina prišlo do tvorbe amorfne oblike učinkovine, saj sta na krivuljah prisotna pri 39°C endotermni vrh steklastega prehoda in pri 60°C eksotermni vrh kristalizacije v obliko II. Po 4 tednih pri 40°C in 75% RH steklastega prehoda ni več zaznati, se pa pojavi majhen endotermni vrh pri 120°C. Predidevamo, da se je amorfni karvedilol pretvoril v kristalno obliko I. Na sliki 24 pa je vidno, da ta amorfna oblika pri 21°C/8% RH ostane stabilna tudi po 6 tednih.

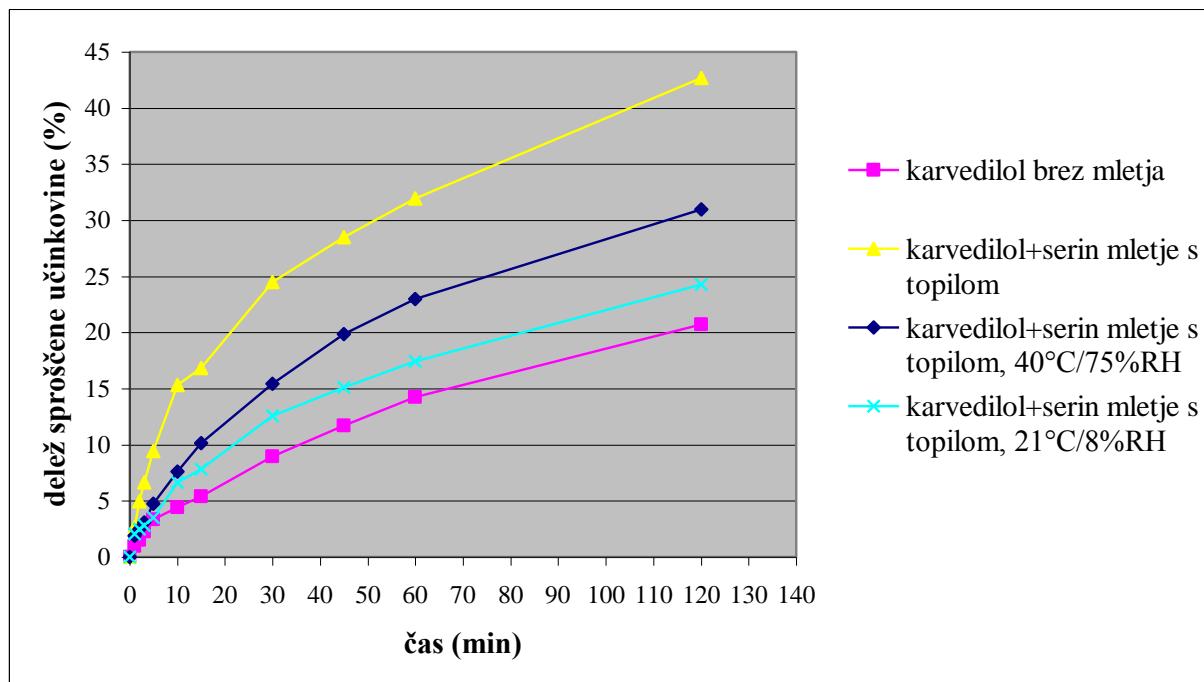
Za razliko od mletja s tirozinom (slika 16), kjer se sproščanje karvedilola zmanjša, pa pri mletju s serinom (slika 25) opisane spremembe v kristalni obliko povečajo sproščanje. Tako se v dveh urah sprosti kar 35% učinkovine. To povečanje lahko razložimo z večjim sproščanjem amorfne oblike v primerjavi s kristalno obliko, poleg tega ima serin v primerjavi s tirozinom nekoliko boljšo topnost (50 mg/ml) (60). Zanimivo je, da staranje vzorca pri obeh uporabljenih pogojih zniža hitrost sproščanja. Pri milejših pogojih je to znižanje večje, čeprav je učinkovina še vedno amorfna.

KARVEDILOL+SERIN MLETJE S TOPILOM

Slika 26: DSC krivulje zmesi karvedilola in serina, mlete s topilom in shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



Slika 27: DSC krivulje zmesi karvedilola in serina, mlete s topilom in shranjene pri 20°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih

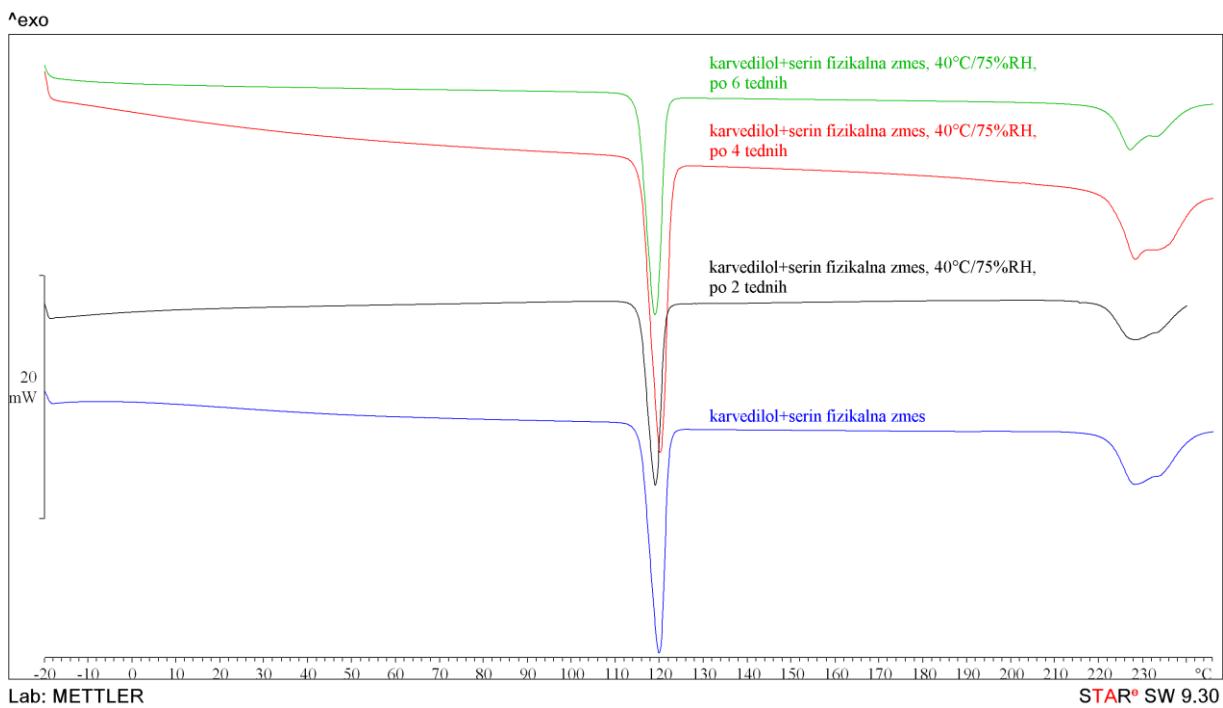


Slika 28: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, zmesi karvedilola in serina, mlete s topilom ter te mlete zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

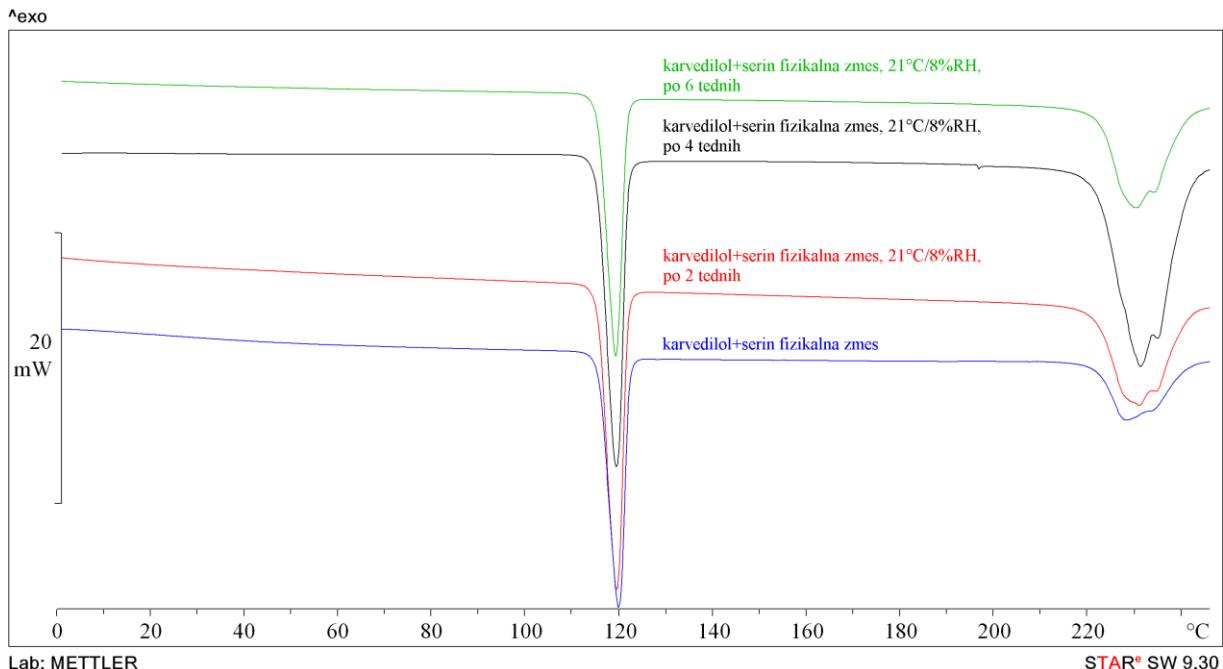
Na slikah 26 in 27 vidimo, da je pri mletju zmesi karvedilola in serina ob dodatku etanola prišlo do premika endoternnega vrha taljenja karvedilola s 115°C na 120°C, kar kaže na popoln prehod v kristalno obliko I. Tako smo uspešno ponovili poskus Mateje Čurič (56). Pri shranjevanju pri 40°C/75% RH se po 6 tednih nakazuje prehod oblike I v obliko II, medtem ko pri 21°C/8% RH tudi po 6 tednih oblika I ostane stabilna.

Mletje je zelo povečalo sproščanje karvedilola, kot lahko vidimo na sliki 28. Ob času priprave vzorcev se je sprostilo 43% učinkovine v 2 urah. Ta odstotek pa kljub stabilnosti dobljene kristalne oblike po shranjevanju 6 tednov pri obeh pogojih pada (pri 40°C/75% RH na 31%, pri 21°C/8% RH pa celo na 24%). Spet je rezultat verjetno povezan z adsorbiranim topilom na površino delcev. Lahko, da vrsta adsorbiranega topila na površino delcev vpliva na močenje.

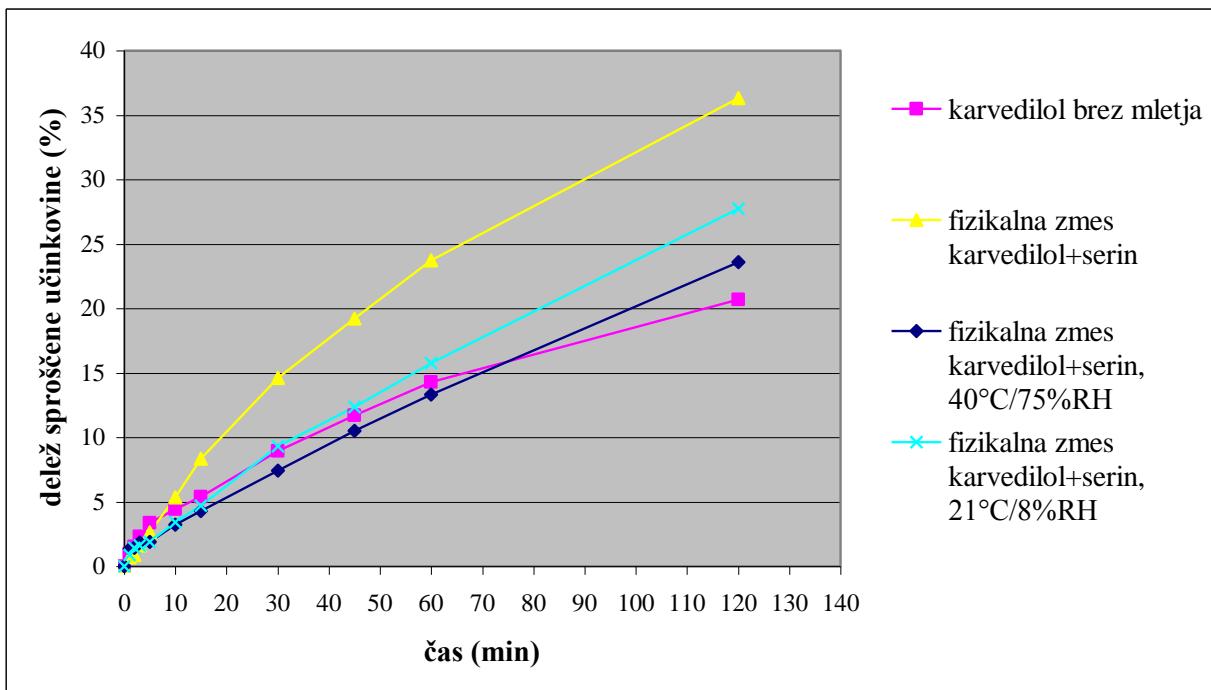
FIZIKALNA ZMES KARVEDILOLA S SERINOM



Slika 29: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in serina, shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih

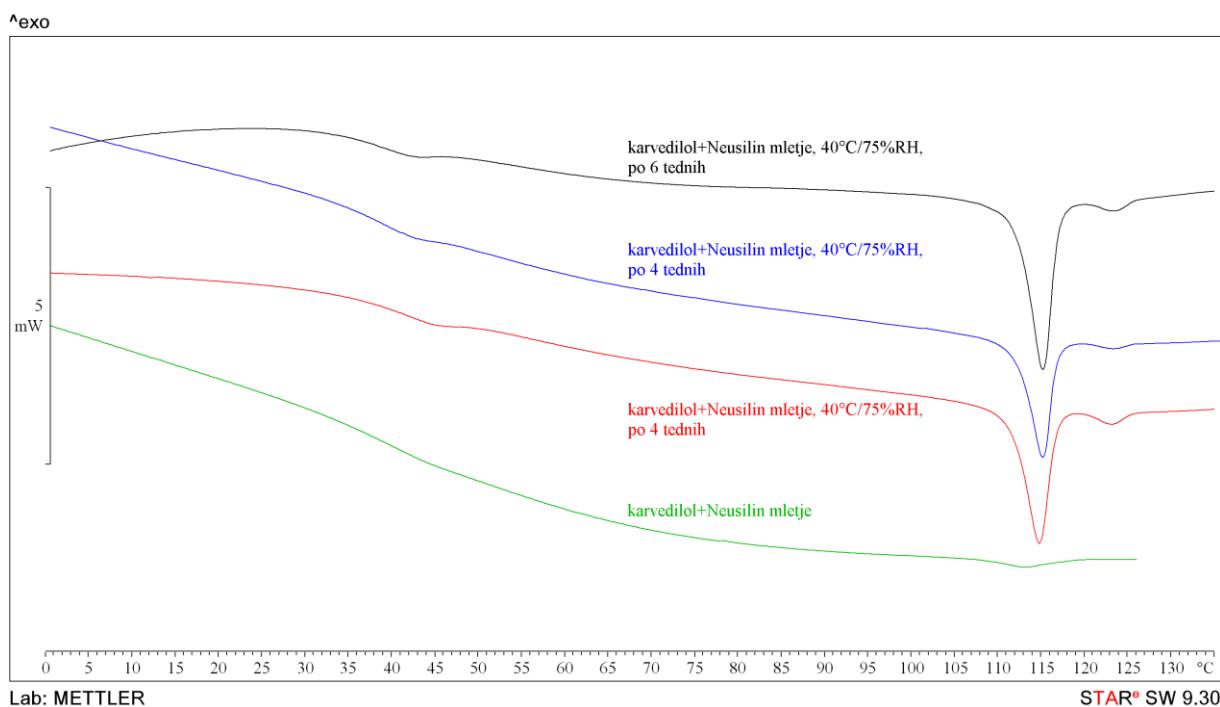


Slika 30: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in serina, shranjene pri 20°C/8% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih



Slika 31: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, fizikalne zmesi karvedilola in serina, ter te fizikalne zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

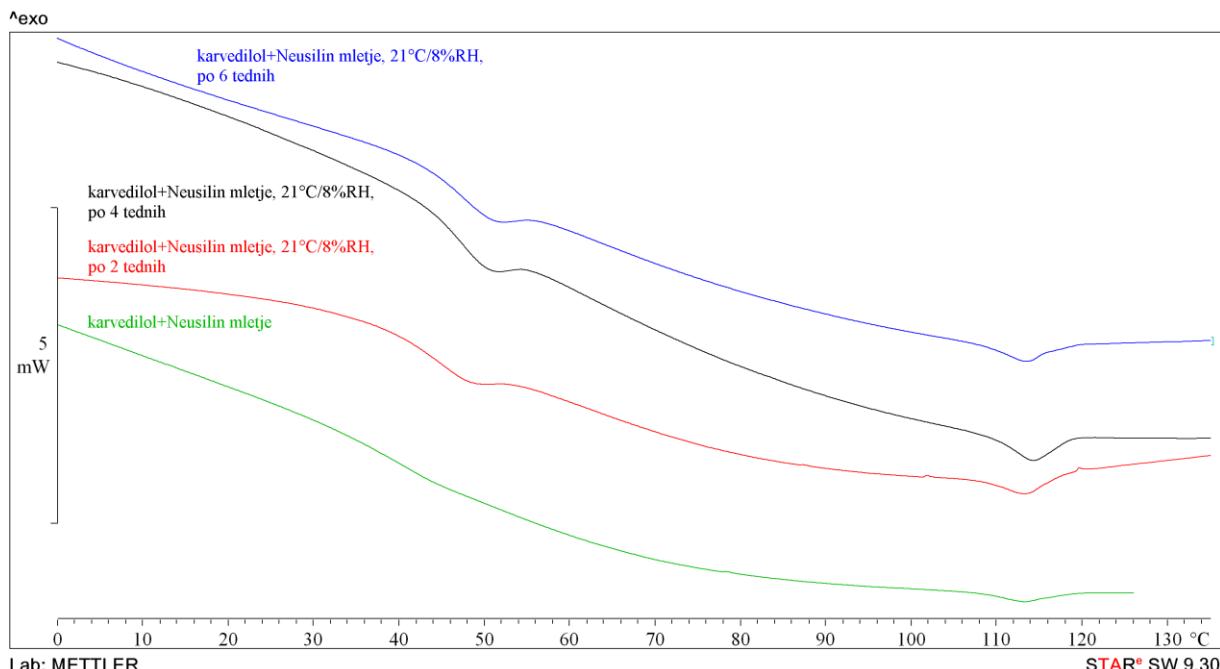
Slike 29 in 30 kažeta, da pri pripravi fizikalne zmesi med karvedilolom in serinom z mešanjem v paten ni prišlo do interakcij oziroma do spremembe strukture spojin. Temperatura taljenja karvedilola je v primerjavi z mletimi vzorci nekoliko višja, kar je posledica večjih delcev v primerjavi z mletimi. Kljub temu, da pri DSC krivuljah ni videti sprememb, pa je prisotnost serina v vzorcu fizikalne zmesi povečala sproščanje, kot vidimo na sliki 31. Spet s staranjem zmesi hitrost sproščanja učinkovine pade, kar rahko razložimo z adsorbirano količino vode na površini delcev.

MLETJE KARVEDILOLA Z NEUSILINOM US2

Lab: METTLER

STAR^e SW 9.30

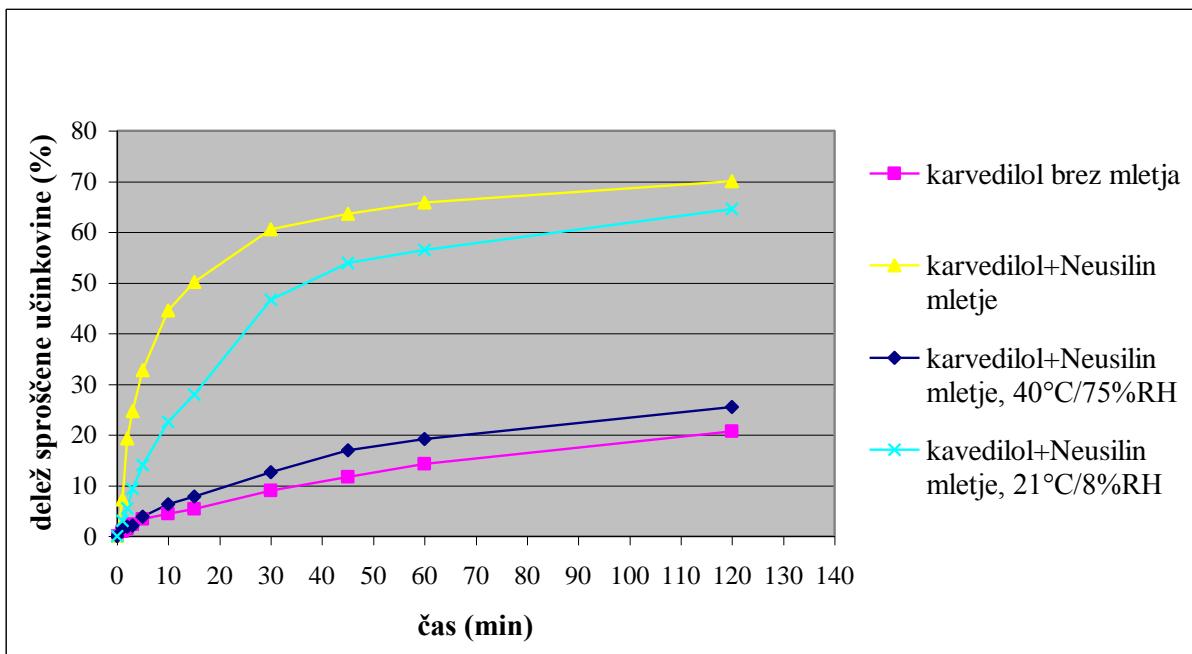
Slika 32: DSC krivulje zmesi karvedilola in Neusilina US2, mlete 2 uri, shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.30

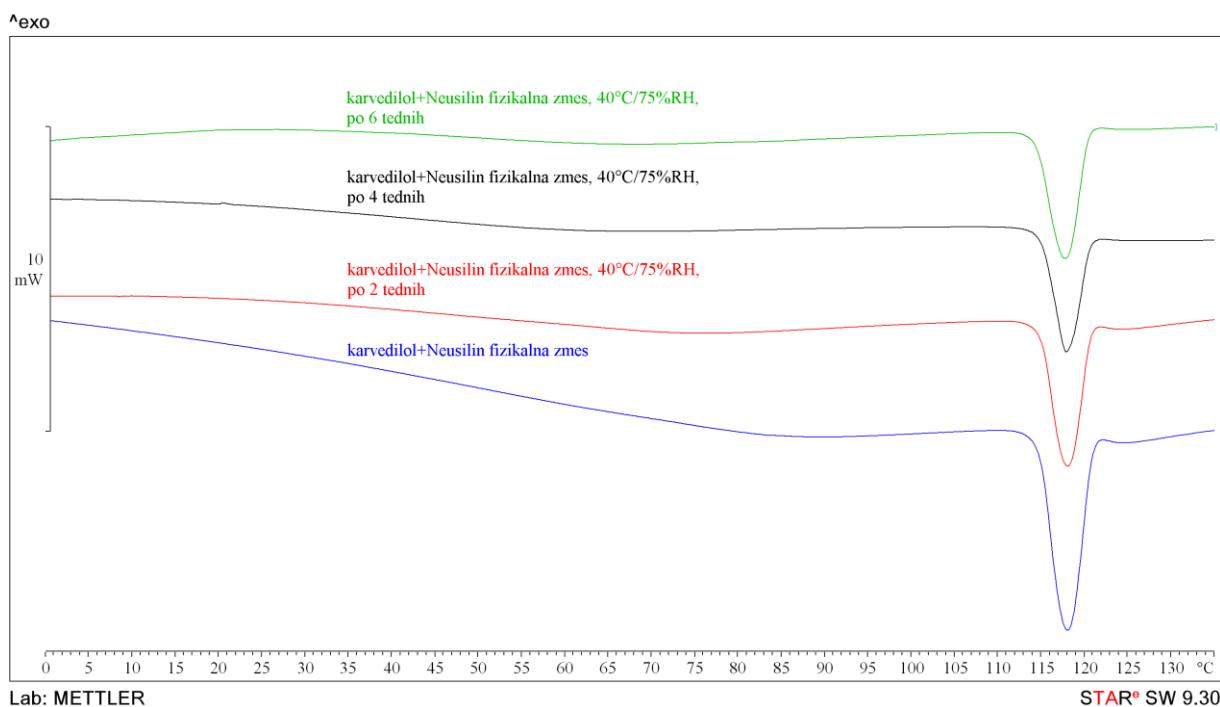
Slika 33: DSC krivulje zmesi karvedilola in Neusilina US2, mlete 2 uri, shranjene pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih



Slika 34: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, zmesi karvedilola in Neusilina US2, mlete 2 uri, ter te mlete zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

Slike 32 in 33 predstavljata DSC krivulje mletja zmesi karvedilola in Neusilina US2, ter spremembe mletih vzorcev, ko so izpostavljeni pogoju z visoko in nizko vlogo.

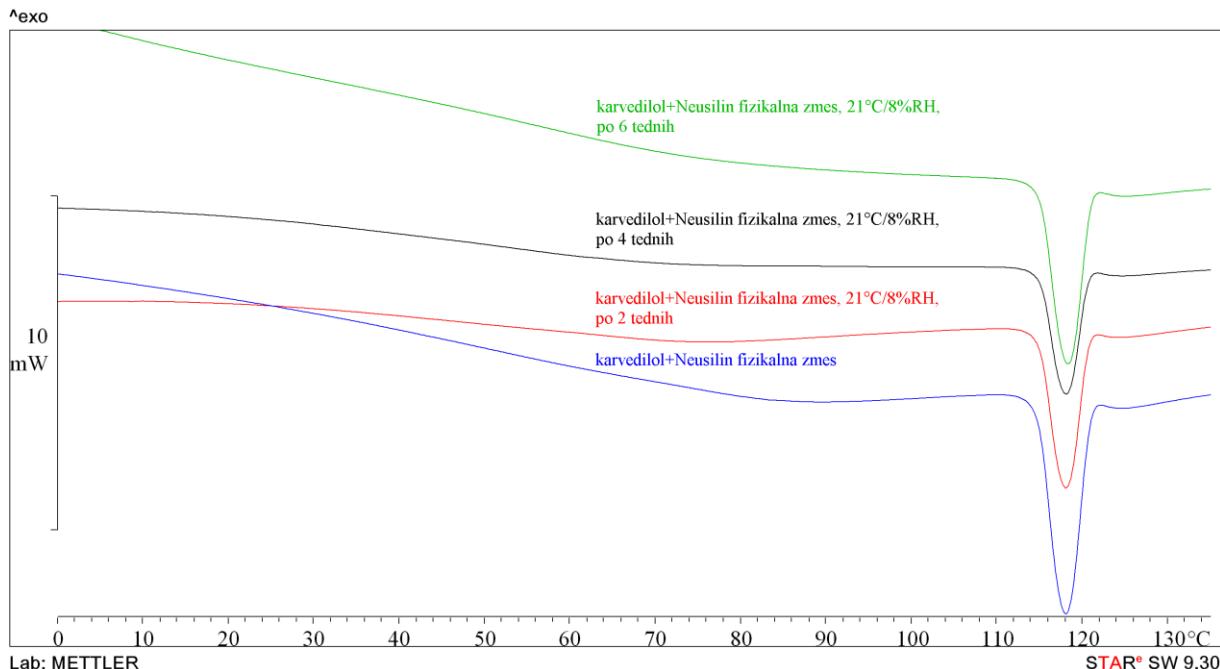
Pri mletju karvedilola z Neusilinom US2 vidimo, da je endotermni vrh taljenja kristalne oblike karvedilola skoraj povsem izginil, kar kaže na to, da smo uspeli pridobiti amorfno obliko spojine. Vendar pa se že po 2 tednih pri 40°C/75% RH ta endotermni vrh poveča. To pomeni, da ta amorfna oblika ni stabilna in je rekristalizirala. Možno je, da je nekaj karvedilola po mletju ostalo v kristalni obliki in da so ti delci delovali kot jedra, ki so rekristalizacijo pospešila. Pri vzorcu, ki je bil izpostavljen nizki zračni vlagi in sobni temperaturi, do rekristalizacije ni prišlo v tako velikem obsegu, endotermni vrhovi taljenja se namreč niso bistveno povečali. Z rezultati DSC analize sovpada tudi diagram sproščanja na sliki 34. S tvorbo amorfne oblike karvedilola smo uspeli zelo povečati sproščanje (70% raztopljljene ZU v 2 urah). Pri vzorcu, ki je bil shranjen pri 21°C/8% RH, kjer po 6 tednih ni prišlo do obširne rekristalizacije, je bilo sproščanje še vedno relativno dobro (64%), medtem ko je sproščanje karvedilola v vzorcu, shranjenem pri 40°C/75% RH, padlo skoraj na nivo čiste kristalne oblike karvedilola.

FIZIKALNA ZMES KARVEDILOLA Z NEUSILINOM US2

Lab: METTLER

STAR® SW 9.30

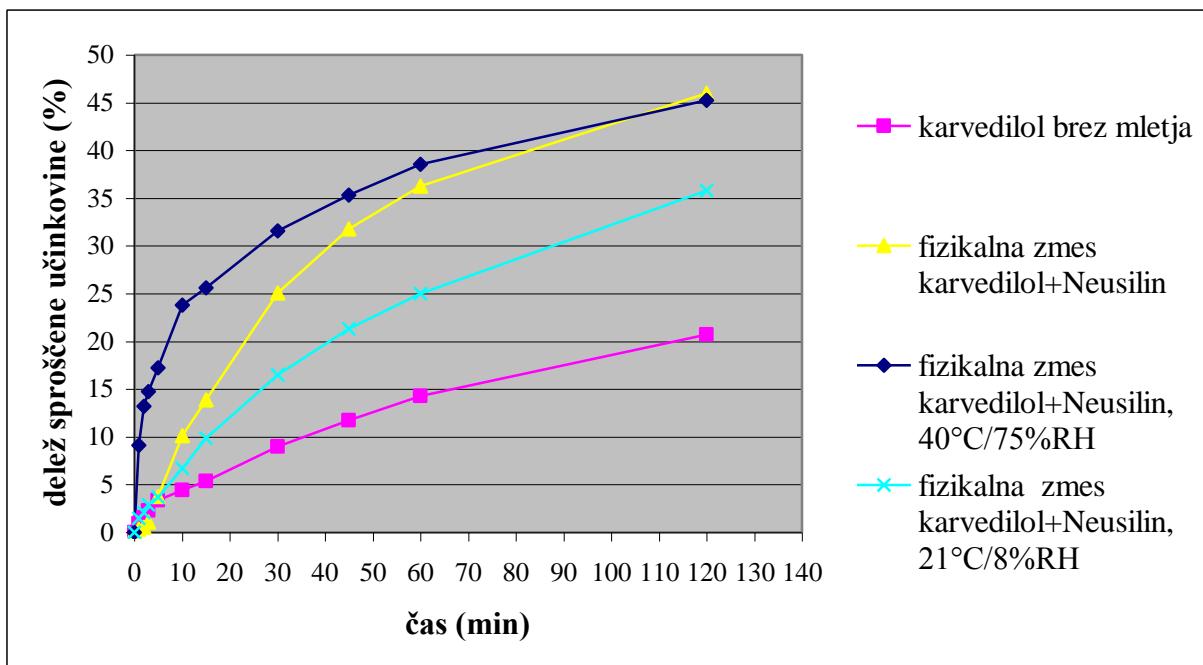
Slika 35: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in Neusilina US2, shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih



Lab: METTLER

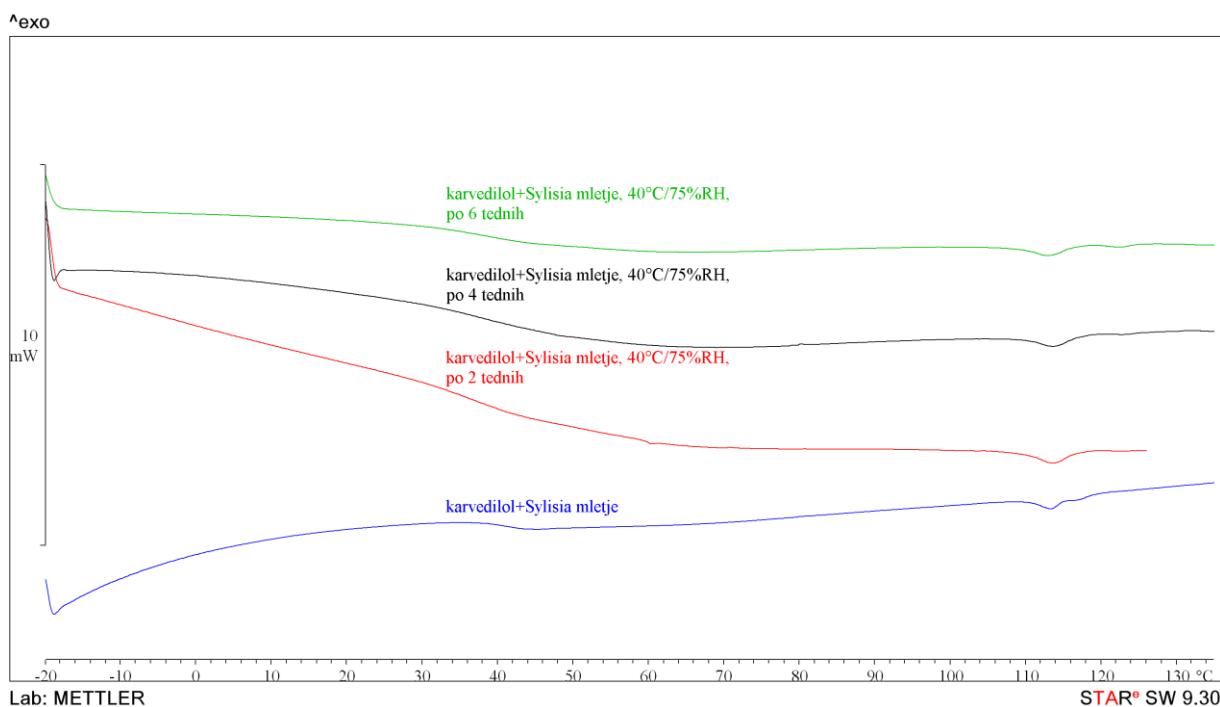
STAR® SW 9.30

Slika 36: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in Neusilina US2, shranjene pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih

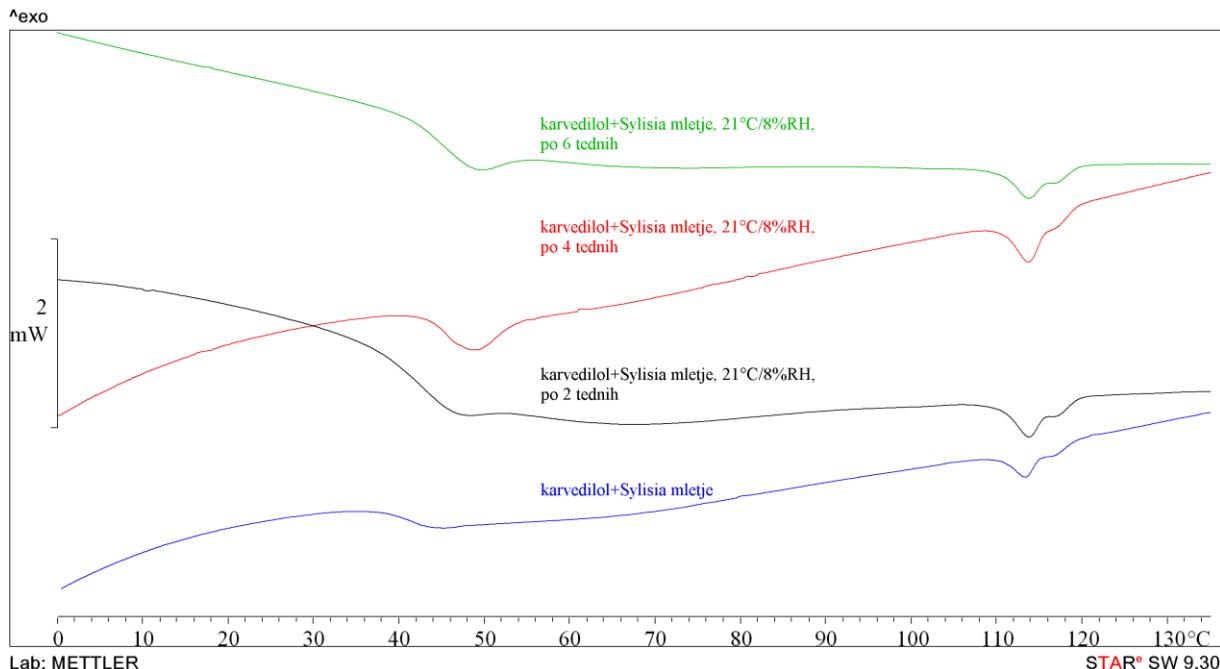


Slika 37: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, fizikalne zmesi karvedilola in Neusilina US2, ter fizikalne zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

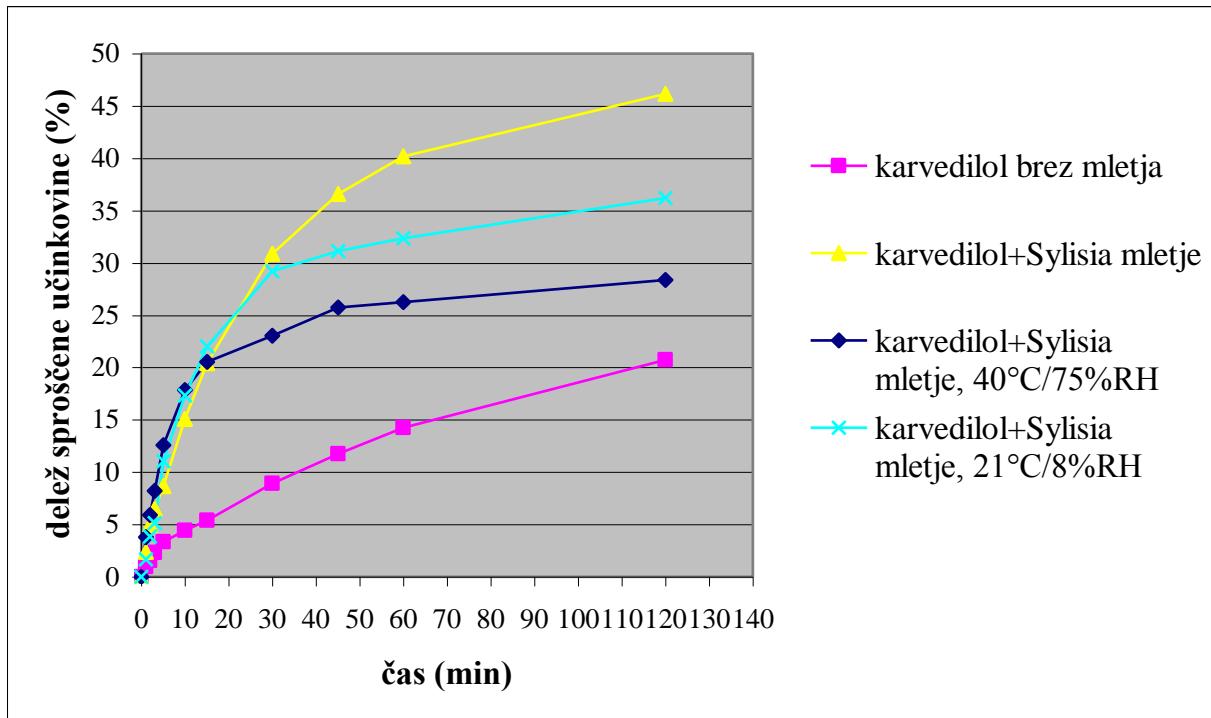
Iz slik 35 in 36 na DSC krivuljah ni videti, da bi med karvedilolom in Neusilinom US2 pri pripravi fizikalne zmesi prišlo do sprememb v termičnih lastnostih karvedilola, kljub temu pa na sliki 37 vidimo, da je prišlo do velikega izboljšanja sproščanja učinkovine iz fizikalne zmesi. To lahko pripisemo izboljšanju močenja zmesi zaradi hidrofilnih lastnosti Neusilina. S staranjem se je pri višji relativni vlažnosti zraka in temperaturi sproščanje še izboljšalo, pri nižji relativni vlažnosti zraka in temperaturi pa znižalo. Spet lahko te rezultate razlagamo s količino vezane vlage v vzorcu in s tem povezanim močenjem.

MLETJE KARVEDILOLA S SYLISIJO 350

Slika 38: DSC krivulje zmesi karvedilola in Sylisije 350, mlete 2 uri, shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih

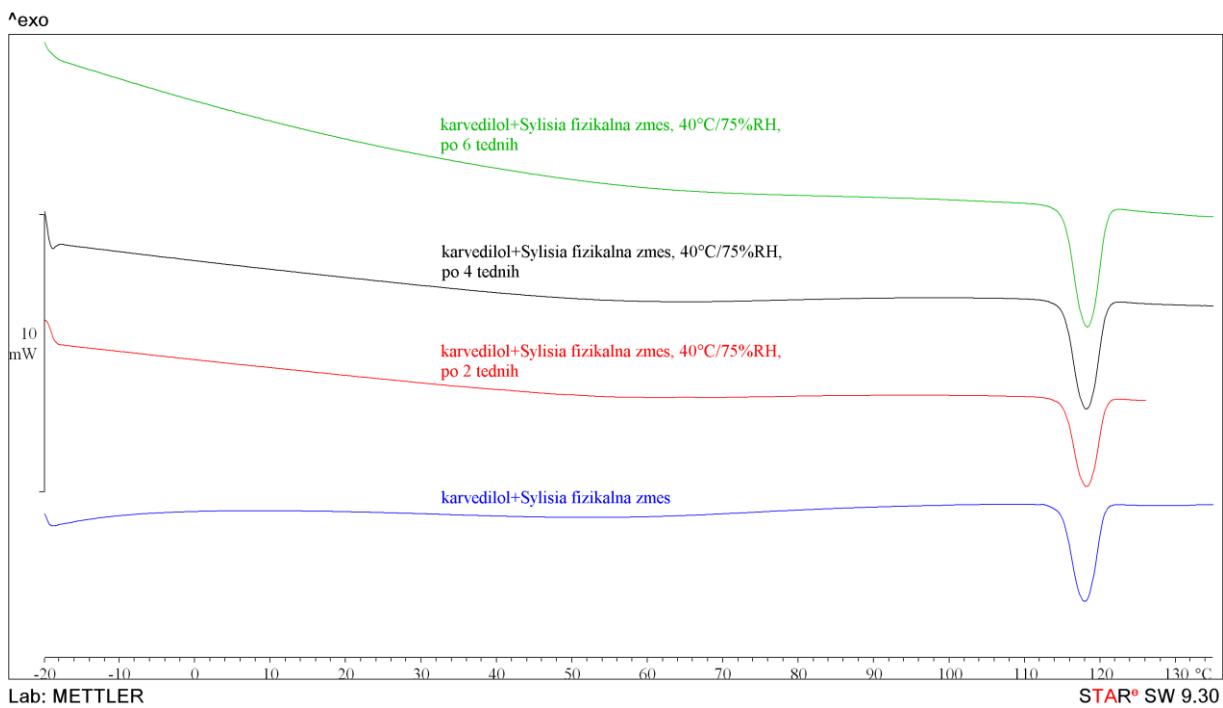


Slika 39: DSC krivulje zmesi karvedilola in Sylisije 350, mlete 2 uri, shranjene pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2, 4 in 6 tednih

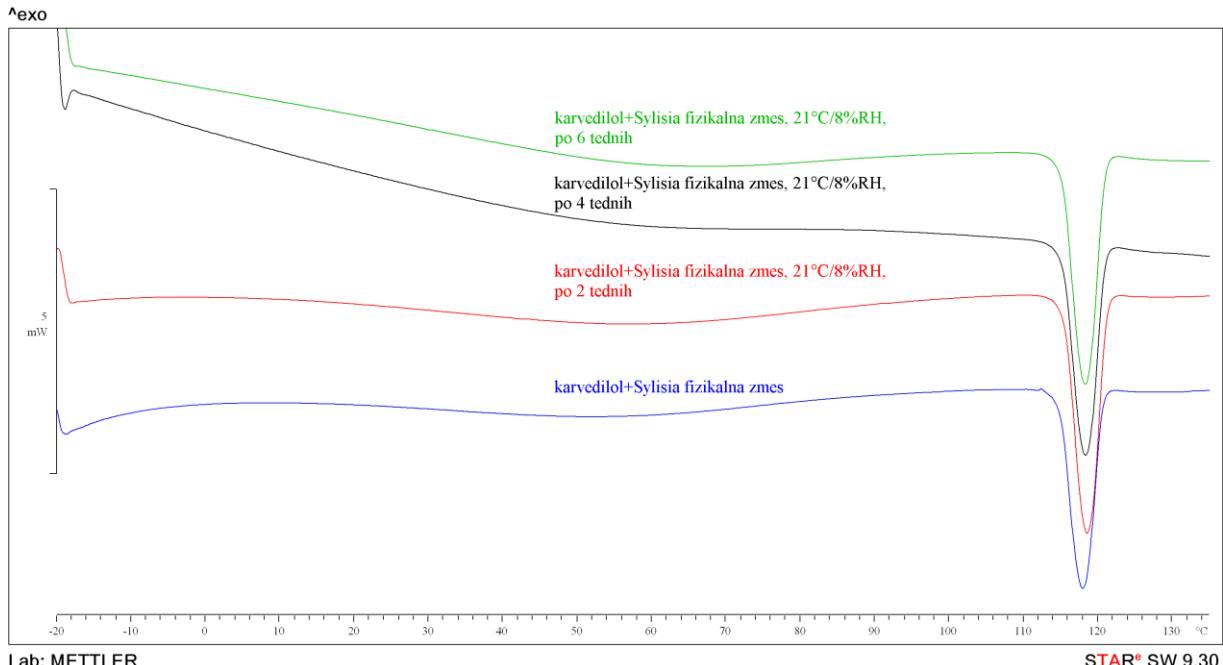


Slika 40: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, zmesi karvedilola in Sylysije 350, mlete 2 uri, ter te mlete zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih ($40^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}$, $21^{\circ}\text{C}/8\% \text{RH}$)

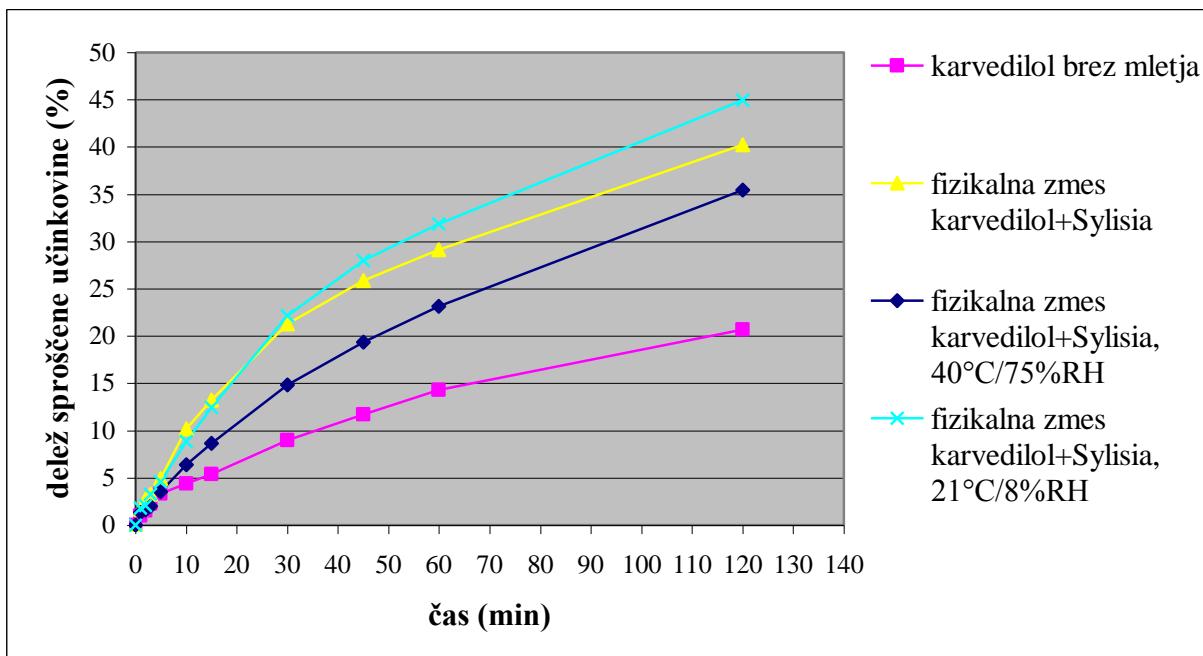
V primerjavi z mleto zmesjo karvedilola in Neusilina lahko v mleti zmesi karvedilola s Sylysijo vidimo, da jenastala amorfna oblika ZU bolj stabilna (sliki 38, 39). Pri shranjevanju pri povišani relativni vlažnosti zraka ne prihaja do rekristalizacije tako kot pri Neusilinu. Možna razloga za to je, da je voda iz zraka prešla v tiste pore Sylysije, kjer ni bilo učinkovine, se pravi, da je pri Sylysiji na razpolago več por kot pri Neusilinu, in da niso vse zasedene z učinkovino. Drug razlog pa je lahko ta, da Sylysija ne reagira tako močno z vlogo kot Neusilin, kar je vidno tudi pri sproščanju, ki je nižje kot pri mletju z Neusilinom (slika 40). Neusilin bolj poveča sproščanje, ker tvori močnejše interakcije z vodo in voda na hitro izpodrine učinkovino iz por, pri Sylysiji pa se to zaradi manjših interakcij odvija bolj počasi. S staranjem disperzij pri obeh pogojih se pri trdnih disperzijah s Sylysijo sproščanje karvedilola poslabša. Pri staranju pri ostrejših pogojih bolj, kot pri milejših.

FIZIKALNA ZMES KARVEDILOLA S SYLISIJO 350

Slika 41: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in Sylisije 350, shranjene pri 40°C/75% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih



Slika 42: DSC krivulje fizikalne zmesi karvedilola in Sylisije 350, shranjene pri 21°C/8% RH, ob času 0 ter po 2,4 in 6 tednih



Slika 43: Diagram sproščanja karvedilola brez mletja, fizikalne zmesi karvedilola in Sylisije 350, ter te fizikalne zmesi, shranjene 6 tednov pri dveh pogojih (40°C/75% RH, 21°C/8% RH)

Tako kot pri primeru Neusilina tudi pri fizikalni zmesi med karvedilolom in Sylisijo ni videti spremembe termičnih lastnosti učinkovine (sliki 41, 42), je pa tudi v tem primeru povečano sproščanje (slika 43), kar je spet posledica hidrofilnih lastnosti Sylisije. S staranjem pri milejših pogojih sproščanje karvedilola nekoliko naraste, pri ostrejših pogojih pa pade.

5 SKLEP

V diplomski nalogi smo mleli učinkovino karvedilol v čisti obliki in v zmeseh s štirimi pomožnimi snovmi: tirozinom, serinom, Neusilinom in Sylisijo. Mleli smo brez ali z majhnim dodatkom etanola in proučevali vpliv topila na kristalne pretvorbe zdravilne učinkovine. Ugotovili smo naslednje pretvorbe:

- mletje čistega karvedilola je povzročilo njegovo amorfizacijo, etanol pa je povzročil skoraj popolno pretvorbo karvedilola oblike II v obliko I,
- mletje karvedilola v zmesi s tirozinom ozziroma s serinom je brez dodatka topila povzročilo amorfizacijo učinkovine, mletje z etanolom pa pretvorbo oblike II v obliko I,
- mletje karvedilola v zmesi s Sylisijo in Neusilinom je povzročilo amorfizacijo učinkovine.

Mlete disperzije in fizikalne zmesi smo izpostavili ostrejšim ($40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$) in milejšim ($21^{\circ}\text{C}/8\% \text{ RH}$) pogojem shranjevanja in ugotovili:

- pri ostrejših pogojih shranjevanja vzorcev čistega karvedilola ($40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$) je amorfni del učinkovine po 2 tednih rekristaliziral v obliko II, deloma pa tudi v obliki I in III, medtem ko je zmes kristalnih oblik I in II, dobljena pri mletju z etanolom, ostala stabilna po 6 tednih. Pri milejših pogojih staranja vzorca ($21^{\circ}\text{C}/8\% \text{ RH}$) so vse nastale oblike ostale nespremenjene tudi po 6 tednih,
- v mletih zmeseh z obema aminokislinama je pri milejših pogojih shranjevanja amorfni del mletega čistega karvedilola ostal stabilen, medtem ko je pri ostrejših pogojih že po štirih tednih prišlo do rekristalizacije (pri tirozinu v kristalno obliko II, pri serinu pa v kristalno obliko I),
- pri mletju zmesi karvedilola in aminokislin ob prisotnosti etanola je v primeru tirozina nastala oblika I ostala stabilna po 6 tednih pri $40^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH}$, medtem ko je v primeru serina po 6 tednih majhen del karvedilola rekristaliziral v obliko II. Pri milejših pogojih je v obeh primerih aminokislin dobljena oblika ostala stabilna 6 tednov,
- v disperziji z Neusilinom pri ostrejših pogojih shranjevanja je amorfna oblika učinkovine že po dveh tednih rekristalizirala, pri milejših pogojih pa je rekristalizacija

potekla v manjšem obsegu. V dispreziji s Sylisijo se nastala amorfna oblika s staranjem vzorcev bistveno ni spreminja.

Proučevali smo še raztpljanje mletega karvedilola v čisti obliki in njegovo sproščanje iz zmesi s pomožnimi snovmi. Ugotovili smo:

- mletje čistega karvedilola negativno vpliva na raztpljanje. S staranjem mletih vzorcev pri milejših pogojih se raztpljanje še poslabša, kar je verjetno posledica povečanja hidrofobnosti posušenih delcev,
- sproščanje karvedilola iz zmesi s tirozinom se je glede na čisto učinkovino poslabšalo, kar je verjetno posledica slabe vodotopnosti tirozina. V primeru mletja s serinom se je sproščanje izboljšalo, vendar pa je s staranjem vzorca prišlo do njegovega poslabšanja,
- sproščanje karvedilola iz mletih zmesi z aminokislinama ob prisotnosti etanola se je precej povečalo, kar kaže na to, da se kristalna oblika I boljše sprošča od oblike II, vendar pa se je s staranjem vzorcev spet poslabšalo,
- sproščanje karvedilola iz disperzij z Neusilinom oziroma s Sylisijo se je bistveno povečalo, vendar pa se je tudi v tem primeru po 6 tednih poslabšalo. Tudi sproščanje karvedilola iz fizikalnih zmesi z obema poroznima pomožnima snovema se je zelo izboljšalo, kar je verjetno posledica hidrofilnih lastnosti Neusilina in Sylisije.

6 LITERATURA

1. Vippagunta SR, Brittain HG, Grant D.J.W. Crystalline solids. *Adv Drug Del Rev.* 2001; 48: 3-26.
2. Bahl Deepak, Bogner RH. Amorphization alone does not account for the enhancement of solubility of drug co-ground with silicate: The case of indomethacin. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2008; 9 (1): 146-153.
3. Ferraz HG, Carpentieri LN, Watanabe SP. Dissolution profile evaluation of solid pharmaceutical forms containing chloramphenicol marketed in Brazil. *Braz Arch Biol Technol.* 2007;50 (1):57-65.
4. Hancock BC, Parks M. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res.* 2000; 17: 397–404.
5. UNIVERZA V LJUBLJANI, FAKULTETA ZA MATEMATIKO IN FIZIKO, ODDELEK ZA FIZIKO, Izbrana poglavja iz uporabne fizike, Amorfni polprevodniki, Gregor Pohl, Mentor: doc. dr. Primož Ziherl, Ljubljana, maj 2007
6. Byrn SR, Pfeiffer RR, Stowell JG: Solid-state chemistry of drugs. 2nd ed. Indina: SSCI, 1999: 22-25, 249-258.
7. Corrigan OI, Holohan EM, Sabra K. Amorphous forms of thiazide diuretics prepared by spray-drying. *Int J Pharm.* 1984; 18: 195-200.
8. Fukuoka E, Makita M, Yamamura S. Glassy state of pharmaceuticals. II. Bioinequivalence of glassy and crystalline indomethacin. *Chem Pharm Bull.* 1987; 35: 2943-2948.
9. Vromans H, Bolhuis GK, Lerk CF, Biggelaar VD, Bosch H. Studies on tabletting properties of lactose. VII. The effect of variations in primary particle size and percentage of amorphous lactose in spray dried lactose products. *Int J Pharm.* 1987; 35: 29-37.
10. Shah B, Kumar Kakumanu V, Bansal AK. Analytical techniques for quantification of amorphous/crystalline phases in pharmaceutical solids. *J Pharm Sci.* 2006; 95: 1641-1665.
11. Hersey JA, Krycer I. Biopharmaceutical implications of technological change. *Int J Pharm Technol Prod Mfr.* 1980; 1: 18-21.
12. Hüttenrauch R. Modification of starting materials to improve tabletting properties. *Pharm Ind.* 1983; 45: 435-440.

13. Elamin AA, Ahlneck C, Alderborn G, Nyström C. Increased metastable solubility of milled griseofulvin, depending on the formation of a disordered surface structure. *Int J Pharm.* 1995; 111: 159-170.
14. Ward S, Perkins M, Zhang J, Roberts CJ, Madden CE, Luk SY, Patel N, Ebbens SJ. Identifying and mapping surface amorphous domains. *Pharm Res.* 2005; 22: 1195-1202.
15. Bérard V, Lesniewska E, Andrs C, Pertuy D, Laroche C, Pourcelot Y. Affinity scale between a carrier and a drug in DPI studied by atomic force microscopy. *Int J Pharm.* 2002; 147: 127-137.
16. Deschamps M, Willart JF, Dudognon E, Caron V. Transformation of pharmaceutical compounds upon milling and comilling. The role of Tg. *J Pharm Sci.* 2007; 96: 398-1407.
17. Chikhalia V, Forbes RT, Storey RA, Ticehurst M. The effect of crystal morphology and mill type on milling induced crystal disorder. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 27: 19-26.
18. Ward GH, Shultz RK. Process-induced crystallinity changes in albuterol sulphate and its effect on powder physical stability. *Pharm res.* 1995; 12: 773-779.
19. Begat P, Young PM, Edge S, Kaeger JS, Price R. The effect of mechanical processing on surface stability of pharmaceutical powders: Visualization by atomic force microscopy. *J Pharm Sci.* 2003; 92: 611-620.
20. Crowley K, Zografi G. Cryogenic grinding of indomethacin polymorphs and solvates: Assessment of amorphous phase formation and amorphous phase physical stability. *J Pharm Sci.* 2002; 91: 492-507.
21. Willart JF, Descamps M. Solid state amorphization of pharmaceuticals. *Mol Pharm.* 2008; 5: 905-920.
22. Otsuka M, Matsumoto T, Kaneniwa N. Effect of environmental temperature on polymorphic solid state transformation of indomethacin during grinding. *Chem Pharm Bull.* 1986; 34: 784-1793.
23. Oguchi T, Kazama K, Fukami T, Yonemochi E, Yamamoto K. Specific complexation of ursodeoxycholic acid with guest compounds induced by co-grinding. II. Effect of grinding temperature on the mechanochemical complexation. *Bull Chem Soc Jpn.* 2003; 76: 515-521.
24. Bauer-Brandl A. Polymorphic transitions of cimetidine during manufacture of solid dosage forms. *Int J Pharm.* 1996; 140: 195-206.

25. Okamoto PR, Lam NQ, Rehn LE. Physics of crystal-to-glass transformations. *Solid State Phys.* 1999; 52: 1-135.
26. Fecht HJ. Defect-induced melting and solid state amorphization. *Nature.* 1992; 356: 133-135.
27. Savolainen M, Heinz A, Strachan C, Gordon KC, Yliruusi J, Rades T, Sandler N. Screening for differences in the amorphous state of indomethacin using multivariate visualization. *Eur J Pharm Sci.* 2007; 30: 113-123.
28. Graeser KA, Strachan CJ, Paterson JE, Gordon KC, Rades T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. *Cryst Growth Des.* 2008; 8: 128-135.
29. Savolainen M, Jouppila K, Pajamo O, Cristiansen L, Strachan C, Karjalainen M, Ratanen J. Determination of amorphous content in the pharmaceutical process environment. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59: 161-170.
30. Craig DQM, Kett VL, Murphy JR, Pice DM. The measurement of small quantities of amorphous material-Should we be considering the rigid amorphous fraction? *Pharm res.* 2001; 18: 1081-1082.
31. Planinšek O. Nekatere metode stabilizacije amorfnih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2007; 58: 8-14.
32. Maclean J, Medina C, Daurio D, Alvares-Nunes F, Jona J. Manufacture and performance evaluation of a stable amorphous complex of an acidic drug molecule and neusilin. *J Pharm Sci.* 2011; 8: 3332-3344.
33. <http://www.neusilin.com/product/> (datum dostopa: 15.3.2012)
34. Vadher AH, Parikh JR, Parikh RH, Solanki AB. Preparation and characterization of co-grinded mixtures of aceclofenac and Neusilin US2 for dissolution enhancement of aceclofenac. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2009; 10: 606-614.
35. Tong P, Taylor LS, Zografi G. Influence of alkali metal counterions on the glass transition temperature of amorphous indomethacin salts. *Pharm Res.* 2002; 19: 629-654.
36. Gupta MK, Vanwert A, Bogner RH. Formation of physically stable amorphous drugs by milling with neusilin. *J Pharm Sci.* 2003; 92(3): 536-551.

37. Bahl D, Bogner RH. Amorphization of indomethacin by co-grinding with Neusilin US2: amorphization kinetics, physical stability and mechanism. *Pharm Res.* 2006; 23: 2317-2325.
38. Kovačič B, Vrečer F, Planinšek O. Solid dispersions of carvedilol with porous silica. *Chem Pharm Bull.* 2011; 59: 427-433.
39. Sylysia FCP, Fuji Sylysia Chemical Ltd. Product Information, Kozoji-cho, Kasugai-shi, Aichi-ken, Japan.
40. Watanabe T, Wakiyama N, Usui F et al. Stability of amorphous indomethacin compounded with silica. *Int J Pharm.* 2001; 226: 81-91.
41. Mallick S, Pattnaik S, Swain K. Physicochemical characterization of interaction of ibuprofen by solid-state milling with aluminum hydroxide. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008; 34: 726-734.
42. Mallick S, Pattnaik S, Swain K et al. Formation of physically stable amorphous phase of ibuprofen by solid state milling with kaolin. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008; 68: 346-351.
43. Shakhtshneider TP, Myz SA, Dykanova MA, Boldyrev VV et al. Mechanochemical preparation of organic-inorganic hybrid materials of drugs with inorganic oxides. *Acta Phys Polon.* 2011; 120: 272-278.
44. Swamy PV, Shilpa H, Shirasand SB, Gada SN, Kinagi MB. Role of cogrinding in enhancing the in vitro dissolution characteristics of carvedilol. *Int J Pharma Sci Res.* 2010; 1(5): 232-237.
45. Fukami T, Furuishi T, Suzuki T, Hidaka S et al. Improvement in solubility of poorly water soluble drug by cogrinding with highly branched cyclic dextrin. *J Incl Macrocycl Chem.* 2006; 56: 61-64.
46. Sugimoto M, Okagaki T, Narsawa S, Koida Y, Nakajima K. Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of poorly water-soluble drugs by novel cogrinding method using water-soluble polymer. *Int J Pharm.* 1998; 160: 11-19.
47. Shakhtshneider TP, Vasiltchenko MA, Politov AA, Boldyrev VV, The mechanochemical preparation of solid disperse systems of ibuprofen-polyethylene glycol. *Int J Pharm.* 1996; 130: 25-32.
48. Sekizaki H, Danjo K, Eguchi H, Yonezawa Y, Sunada H, Otsuka A. Solid-state interaction of ibuprofen with polyvinylpyrrolidone. *Chem. Pharm. Bull.* 1995; 43: 988-993.

49. Boldyrev VV, Shakhtshneider TP, Burleva LP, Severtsev VA. Preparation of the disperse systems of sulfathiazole polyvinylpyrrolidone by mechanical activation. Drug Dev. Ind. Pharm. 1994; 20: 1103-1114.
50. Kaneniwa N, Ikekawa A. Solubilization of water insoluble organic powders by ball milling in the presence of polyvinylpyrrolidone. Chem. Pharm. Bull. 1975; 23: 2973-2986.
51. Mura P, Cirri M, Faucci MT et al. Investigation of the effects of grinding and co-grinding on physicochemical properties of glisentide. J Pharm Biom Anal. 2002; 30: 227-237.
52. Chieng N, Zujovic Z, Bowmaker T, Rades, Saville D. Effect of milling conditions on the solid-state conversion of ranitidine hydrochloride form 1. Int J Pharm. 2006; 327: 36-44.
53. Lin SY, Hsu CH, Ke WT. Solid-state transformation of different gabapentin polymorphs upon milling and co-milling. Int J Pharm. 2010; 396: 83-90.
54. Cheng WT, Lin SY, Li MJ. Raman microspectroscopic mapping or thermal system used to investigate milling-induced solid-state conversion of famotidine polymorphs. J Ram Spect. 2007; 38: 1595-1601.
55. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC): Coryol, Baza podatkov o zdravilih, <http://www.zdravila.net/> (datum dostopa: 6.4.2012)
56. Mateja Č. Poskus izdelave kokristalov karvedilola z aminokislinami, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011
57. <http://www.fritsch-milling.com/products/milling/ball-mills/pulverisette-0/> (datum dostopa: 17.4.2012)
58. Pokharkar VB, Mandpe LP, Padamwar MN, Ambike AA, Mahadik KR, Paradkar A. Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug. Powder Technol. 2006; 167; 20-25.
59. http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/t3754pis.Par.0001.File.tmp/t3754pis.pdf (datum dostopa: 13.9.2012)
60. http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/s4500pis.Par.0001.File.tmp/s4500pis.pdf (datum dostopa: 13.9.2012)