

Karakterizacija polimorfnih formi odabrane aktivne farmaceutske supstance

Pavišić, Marijana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:388311>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marijana Pavišić

**KARAKTERIZACIJA POLIMORFNIH FORMI ODABRANE
AKTIVNE FARMACEUTSKE SUPSTANCE**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica

dr. sc. Sanja Matečić Mušanić

Zagreb, srpanj 2019.

Veliko hvala mentoru izv. prof. dr. sc. Šimi Ukiću na pomoći i stručnim savjetima tijekom pisanja rada. Također, hvala na svom prenesenom znanju i korisnim savjetima tokom studiranja.

Hvala voditeljima i cijelom odjelu Fizikalne karakterizacije TAPI R&D-a u PLIVA Hrvatska d.o.o. što su me prihvatili u svoj tim i omogućili mi da steknem znanje i radno iskustvo te odradim eksperimentalni dio rada koristeći aktivnu farmaceutsku supstancu i kompletnu instrumentaciju. Hvala kolegama i kolegicama na svakoj pomoći i savjetu te pozitivnoj radnoj atmosferi.

Veliko hvala dr. sc. Sanji Matečić Mušanić na susretljivosti i stručnim savjetima kojima mi je pomogla pri izradi diplomskog rada.

Najveću zaslugu za sve postignuto pripisujem svojoj obitelji koja je uvijek vjerovala u mene i bodrila me u dobrim i lošim trenucima. Hvala na bezgraničnoj ljubavi i žrtvi.

Posebno hvala Mladenu što je u svemu bio uz mene, na strpljenju, podršci i ljubavi, bez njega sve ne bi bilo potpuno.

Hvala svim prijateljima što su mi studentski život učinili lakšim, ljepšim i zabavnijim.

SAŽETAK

U sklopu ovog rada prikazane su metode fizikalne karakterizacije i pretraživanja polimorfnihi formi aktivne farmaceutske supstance (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*) te određena stabilnost, higroskopna i morfološka svojstva. Zbog politike tvrtke Pliva Hrvatska d.o.o., kroz rad se ne navodi točan naziv aktivne farmaceutske supstance, već se koristi skraćenica API.

Za potrebe fizikalne karakterizacije API-ja primijenjene su rendgenska difrakcijska analiza, diferencijalna pretražna kalorimetrija i termogravimetrijska analiza.

Higroskopna svojstva API-ja praćena su njegovim izlaganjem uvjetima relativne vlažnosti na 25 °C te primjenom metode dinamićke sorpcije vlage, dok su za praćenje morfoloških svojstava primijenjene optićka mikroskopija i skenirajuća elektronska mikroskopija.

Pretraživanje polimorfnihi formi ispitivanog API-ja provedeno je njegovim izlaganjem parama otapala kao i izlaganjem otapalima u suspenziji. Također, praćena je i polimorfna stabilnost API-ja tijekom izlaganja različitim stresnim testovima: povišenim temperaturama, povišenim tlačnim silama, mljevenju u kugličnom mlinu i u tarioniku.

Fizikalnom karakterizacijom polazne API forme utvrđeno je da je ona stabilna tijekom izlaganja uvjetima relativne vlažnost na sobnoj temperaturi te prilikom izlaganja mehanićkom djelovanju poput tlačnih sila, mljevenja u tarioniku i mehanićkom mlinu.

Pretraživanje polimorfnihi formi API-ja, provedeno izlaganjem polazne API forme različitim otapalima, rezultiralo je dobivanjem tri nove solvatne forme: 2-metil THF solvata, *p*-ksilen solvata te *n*-butanol solvata.

Ključne rijeći: aktivna farmaceutska supstanca, fizikalna karakterizacija, pretraživanje polimorfnihi formi

SUMMARY

This work presents the methods of physical characterization and search of Active Pharmaceutical Ingredient and its polymorphs and determination of its stability, hygroscopic and morphological properties. The exact name of the Active Pharmaceutical Ingredient is not mentioned in the work, due to the policy of Pliva Hrvatska d.o.o.; instead abbreviation API is used.

X-Ray diffraction analysis, differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis were applied for physical characterization of the API.

The API's hygroscopic properties were monitored by exposing the sample to relative humidity conditions at room temperature and by using the dynamic vapor sorption method. Morphological properties were determined by optical microscopy and scanning electron microscopy.

Screening for polymorphic forms of the API was performed by exposing API to solvent's vapor and solvent in suspensions. Also, polymorphic stability of the API was monitored while exposed to various stress tests: exposure to high temperatures and high pressure, milling in ball mill and mortar.

Physical characterization of the initial API form indicated its stability during the exposure to relative humidity at room temperature and mechanical actions such as high pressure, milling in mortar and ball mill.

Three solvated forms were obtained as a result of the screening process: 2-methyl THF solvate, *p*-xylene solvate and *n*-butanol solvate.

Key-words: active pharmaceutical ingredient, physical characterization, searching for polymorph forms

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Pretraživanje polimorfnih formi API-ja.....	3
2.1.1. Polimorfi	3
2.1.2. Solvati i hidrati.....	4
2.1.3. Soli i kokristali.....	5
2.2. Amorfni oblici	6
2.3. Fizikalna karakterizacija API-ja	7
2.3.1. Rendgenska difrakcijska analiza.....	7
2.3.2. Termička analiza API-ja	8
2.4. Higroskopnost i stabilnost API-ja.....	12
2.4.1. Dinamička sorpcija vodene pare	13
2.5. Morfološka svojstva API-ja.....	14
2.5.1. Optički mikroskop	15
2.5.2. Skenirajući elektronski mikroskop	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Kemikalije.....	17
3.2. Oprema i eksperimentalni uvjeti provođenja eksperimenta	17
3.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza.....	18
3.2.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	18
3.2.3. Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija	18
3.2.4. Termogravimetrijska analiza	18
3.2.5. Dinamička sorpcija vodene pare	18

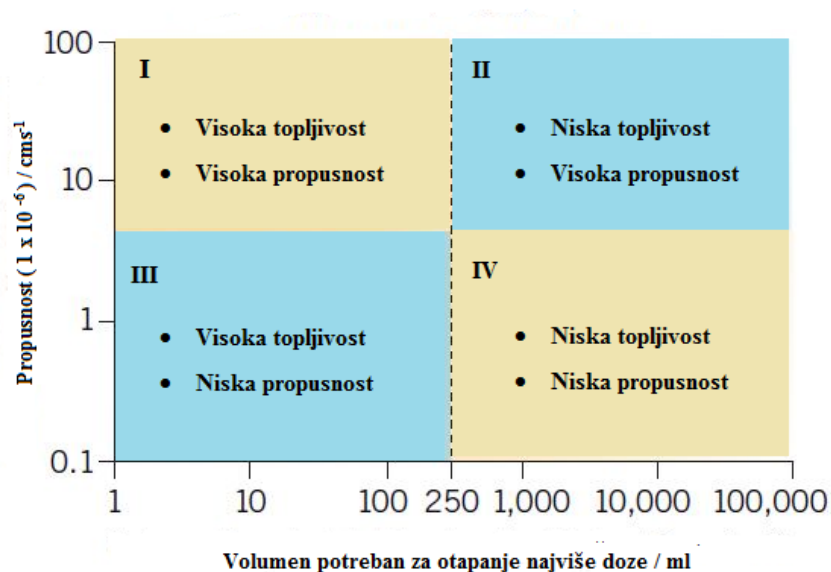
3.2.6. Optički mikroskop	19
3.2.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija	19
3.3. Ispitivanja topljivosti API-ja	20
3.3.1. Ispitivanje topljivosti uzorka u otapalima.....	20
3.3.2. Ispitivanje topljivosti u otopinama različite kiselosti	20
3.4. Pretraživanja polimorfnih formi	20
3.4.1. Suspenzije s otapalima.....	20
3.4.2. Izlaganje parama otapala.....	21
3.5. Ispitivanja stabilnosti uzoraka izlaganjem stres testovima.....	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Fizikalna karakterizacija forme X	22
4.1.1. Higroskopnost forme X.....	24
4.1.2. Morfološka svojstva forme X	25
4.1.3. Topljivost forme X u otopinama različitih kiselosti	28
4.1.4. Pretraživanje polimorfnih formi	28
4.1.5. Stabilnost forme X izlaganjem stres testovima i mehaničkim djelovanjima.....	29
4.2. Fizikalna karakterizacija amorfne forme	30
4.2.1. Higroskopnost amorfne forme	33
4.2.2. Morfološka svojstva čestica amorfne forme	34
4.2.3. Topljivosti amorfne forme u otopinama različite kiselosti.....	34
4.2.4. Pretraživanje polimorfnih formi	35
4.2.5. Ispitivanje stabilnosti izlaganjem stresnim i mehaničkim uvjetima	35
4.3. Fizikalna karakterizacija solvatnih formi	36
4.3.1. Forma Ya	36
4.3.2. Forma Yb	41
4.3.3. Forma Yc	46

5. ZAKLJUČAK	52
6. LITERATURA.....	53
ŽIVOTOPIS	57

1. UVOD

Aktivne farmaceutske supstance (eng. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) su krute tvari koje mogu postojati u različitim oblicima. [1]

Vrlo je važna priprava lijeka s željenim fizikalnim svojstvima bitnim za transport lijeka kroz ljudski organizam. Veličina čestica API-ja je bitno svojstvo koje se mora pratiti te je važno čestice održavati jednolikim. Kako bi ispunio svoju ulogu, lijek se mora apsorbirati u ljudskom krvotoku te pritom mora biti otopljen. Također je važno napomenuti, da se različiti lijekovi moraju apsorbirati na različitim mjestima i različitim brzinama u ljudskom organizmu. Pri tome je topljivost API-ja jedan od najkritičnijih i najvažnijih parametara koji utječu na bioraspoloživost lijeka u konačnici. [1,2] Topljivost API-ja definira se u Biofarmaceutskoj klasifikaciji (eng. *Biopharmaceutics Classification Systems*, BCS) prema topljivosti najviše doze lijeka s trenutnim oslobađanjem API-ja. [2]



Slika 1. BCS klasifikacija API-ja prema topljivosti i propusnosti [2]

Prema BSC klasifikaciji [2] API je slabo topljiv ako najveća dozvoljena doza nije topljiva u 250 ml vodenog medija u okviru pH od 1,0–7,5 pri temperaturi 37 °C. Takvi API-ji spadaju u BSC klasifikaciju II pri čemu su slabo topljivi, ali imaju visoku propusnost u probavnom sustavu (slika 1). Unatoč visokoj propusnosti takvi spojevi imaju nisku bioraspoloživost jer se slabo otapaju u probavnim tekućinama. Lijek se smatra vrlo topljivim kada je najviša doza topiva u volumenu vodenog medija od 250 ml (ili manje) u rasponu pH vrijednosti od 1,0–7,5 na 37 °C. Permeabilnost API-ja, odnosno svojstvo prolaznosti stijenke

probavnog sustava, ispituje se u in vivo studijama u ljudi ili na životinjskim modelima, odnosno u in vitro uvjetima. Smatra se da djelatna tvar udovoljava kriterij visoke permeabilnosti ako apsolutna bioraspoloživost iznosi $\geq 90\%$. U suprotnom, smatra se da je tvar nisko permeabilna. [2]

Razumijevanje svojstava i ponašanja API-ja je od temeljne važnosti za razvoj, obradu, kliničke studije, proizvodnju i skladištenje, odnosno tijekom cijelog životnog ciklusa lijeka, jer konverzija između različitih oblika može imati značajan utjecaj na fizikalno-kemijska svojstva koja u konačnici utječu na cijelu bioraspoloživost lijeka. [1]

U ranoj fazi istraživanja API-ja jedna od važnijih stavki je i ispitavanje fizikalnih svojstava API-ja, što uključuje pretraživanje polimorfnih formi te njihovu fizikalnu karakterizaciju. Na odabir polimorfne forme koja će se odabrati za kasniju proizvodnju te plasman na tržištu utječe više faktora; primjerice je li patentno slobodna, kakva je njena stabilnost, topljivost te druga potrebna svojstva.

2. OPĆI DIO

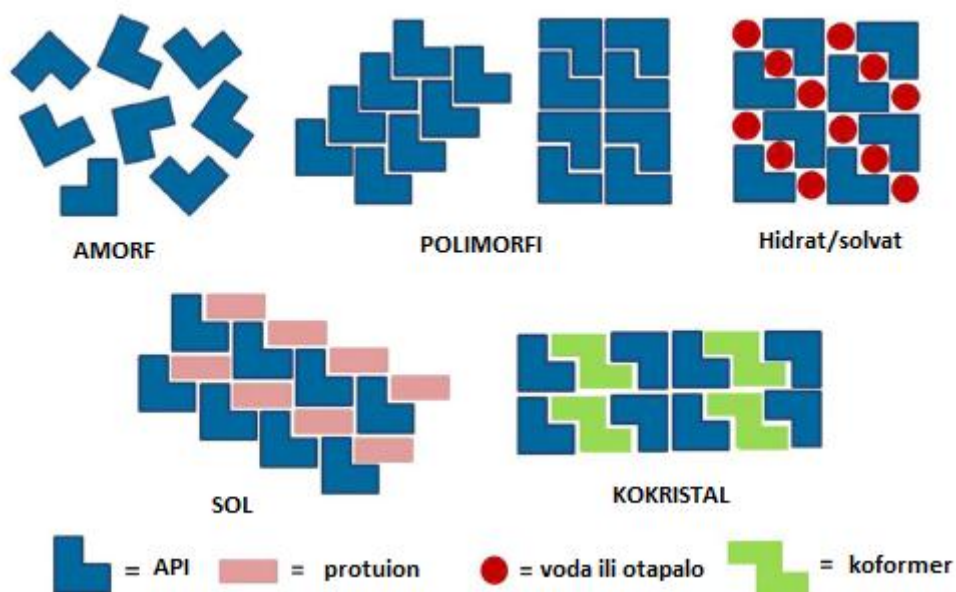
2.1. Pretraživanje polimorfnih formi API-ja

Na poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava API-ja može se utjecati promjenom različitih fizičkih oblika API-ja kao što s polimorfi, hidrati, solvati, kokristali, soli i amorfi. [3]

2.1.1. Polimorfi

Polimorfi (slika 2) su različiti kristalni oblici iste molekule ili molekula, dok se hidrati, solvati i kokristali sastoje od dvije vrste molekula, od kojih je jedna API-ja, a druga može biti voda (hidrat), organsko otapalo (solvat) ili neka druga kristalna krutina (kokristali). [3]

Polimorfizam je od izuzetne važnosti u farmaceutskoj industriji te se neizbježno javlja tijekom procesa istraživanja i razvoja te kasnijeg proizvodnog procesa API-ja. [4]



Slika 2. Strukture različitih polimorfnih oblika i amorfa [5]

Polimorfne forme API-ja mogu imati različita fizikalno-kemijska svojstva, uključujući morfologiju, higroskopnost, točku taljenja, kemijsku reaktivnost, topljivost, kinetiku otapanja, optička i mehanička svojstva, tečljivost, nasipnu gustoću, kompresibilnost te kemijsku i polimorfnu stabilnost. [6] Ta svojstva mogu imati značajan utjecaj na proces proizvodnje API-ja, kao i na stabilnost konačnog lijeka, njegovu topljivost i bioraspoloživost. Prema tome,

polimorfizam može utjecati ne samo na kvalitetu, sigurnost i djelotvornost lijeka, već i na proizvodni proces. [7]

Kako bi se na najmanju moguću mjeru smanjila eventualna mogućnost konverzije odabrane polimorfne forme API-ja za vrijeme procesa proizvodnje lijeka te kasnije tijekom skladištenja lijeka, kao najpoželjnija polimorfna forma bira se ona forma koja je termodinamički i procesno najstabilnija. Ako to iz nekih razloga nije moguće (primjerice nije patentno slobodna) može se koristiti i manje stabilna forma, no pri tome treba biti svjestan uvjeta pri kojima je ta forma stabilna (npr. do 60 RH/25 °C) te se s obzirom na to trebaju prilagoditi uvjeti njenog skladištenja, manipulacije s API-jem tijekom proizvodnog procesa i pripreme adekvatne formulacije s kojom se osigurava njena kasnija stabilnost u lijeku. [7,8]

2.1.2. Solvati i hidrati

Solvati pokazuju širok raspon ponašanja koja ovise o interakciji između otapala i kristalne strukture, slika 3. Otapalo može biti dio kristalne strukture (povezan vodikovim vezama unutar kristalne strukture) te su takvi solvati vrlo stabilni i teško ih je desolvatirati. Kada se takve kristalne strukture ipak desolvatiraju, rekristaliziraju u novom kristalnom obliku. Nazivamo ih polimorfnim solvatima. Međutim, postoje i pseudo-polimorfni solvati kod kojih otapalo nije dio kristalne strukture, nego se prostire u šupljinama kristala. Takvi solvati lakše gube otapalo, a desolvatacijom ne dolazi do urušavanja kristalne strukture. [1,4]



Slika 3. Solvatna/hidratna struktura [6]

Zbog česte prisutnosti vode u okolišu i njezine uporabe u smjesama otapala tijekom procesa kristalizacije, uobičajeno je stvaranje hidriranih API-ja. Molekula vode je mala i formira vodikove veze pa se stoga lako uklapa u kristalnu rešetku API-ja, zauzima prostor te stabilizira strukturu. Obzirom na broj ugrađenih molekula vode, hidrati mogu postojati u obliku monohidrata, dihidrata, trihidrata... [9,10]

Ovisno o prirodi hidrata, sadržaj vode može se mijenjati tijekom vremena s relativnom vlažnošću okoline, temperaturom ili drugim uvjetima obrade. Slično kao i solvati, hidrati mogu biti stehiometrijski ili nestehiometrijski. Stehiometrijski hidrati pokazuju stupanj slične

vrste sorpcijskih/desorpcijskih izoterma koje karakterizira fiksni sadržaj vode u određenom rasponu relativne vlažnosti te nakon dehidracije konvertiraju u amorfnu ili kristanu formu. Kristalna voda obično ima ključnu ulogu u stabilizaciji kristalne strukture stehiometrijskog hidrata. [11,12]

S druge strane, nestehiometrijski hidrati imaju kontinuirano varijabilan sastav unutar određenog raspona relativne vlažnosti (RH) koji nije povezan sa značajnom promjenom kristalne rešetke. Dehidriranje nestehiometrijskog hidrata može rezultirati izomorfnim dehidratom, jednokomponentnom fazom koja pokazuje glavne strukturne značajke svoje roditeljske faze. [11,12]

Općenito, nepoželjno je koristiti solvate jer je prisutnost organskih otapala u većini slučajeva toksična za ljudski organizam. Granične vrijednosti za dopušteno dnevno izlaganje ostatnim otapljima u formuliranom lijeku propisane su propisima. [8]

Hidrati su od posebnog interesa u farmaceutskoj industriji jer voda nije toksična i time je prihvatljiva u formuliranom proizvodu. [6]

2.1.3. Soli i kokristali

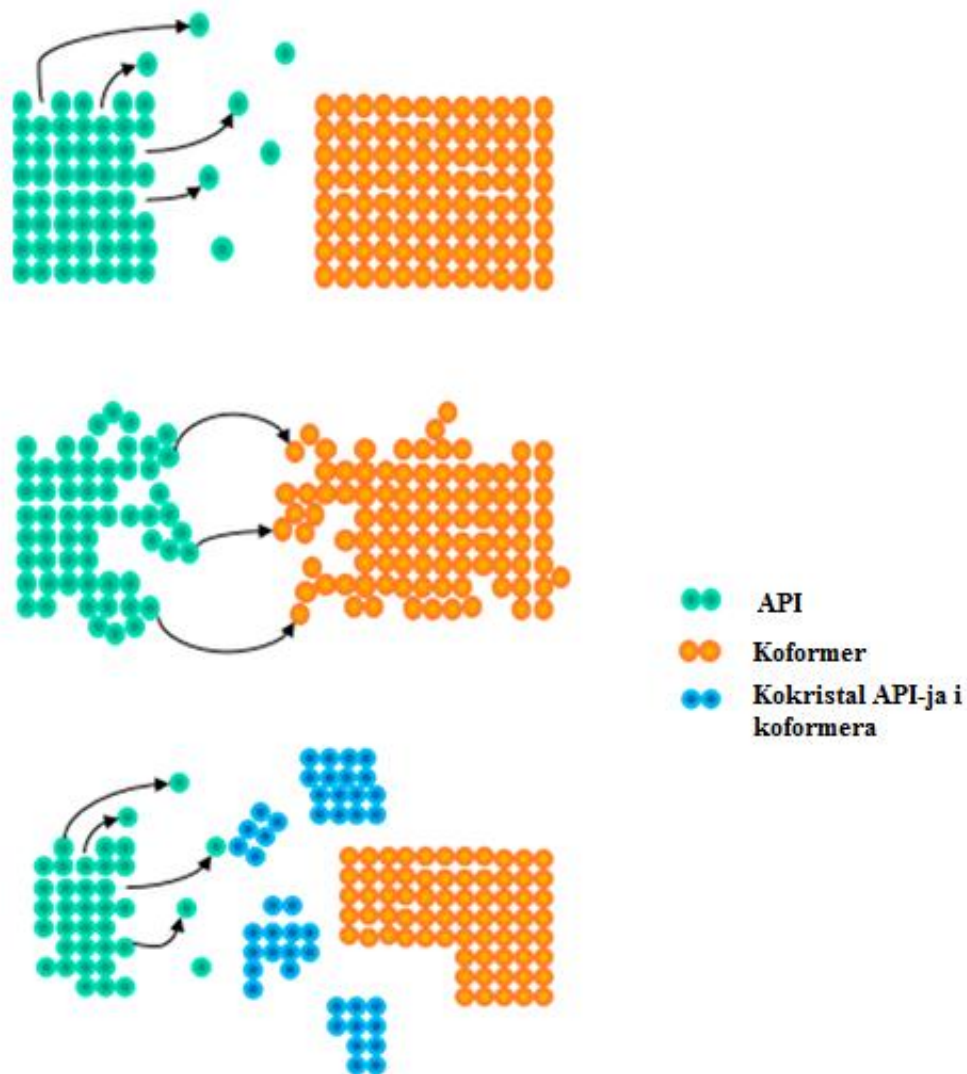
Soli su spojevi koji nastaju potpunim prijenosom protona iz jednog spoja u drugi. Soli i kokristali razlikuju se na temelju prijenosa protona sa kiseline na bazu. Potpun prijenos protona odvija se između parova kiselina - baza, dok tijekom formiranja kokristala ne dolazi do prijenosa protona. [13]

Kokristali su definirani kao kristalni materijali s dvije ili više različitih molekula: API-ja i koformera, koji se nalaze u istoj kristalnoj rešetki. [14] Zbog svoje sposobnosti utjecanja na fizikalno-kemijska svojstva lijeka, kokristali imaju veliku važnost u farmaceutskoj industriji. [15]

Regulatorne agencije kao što su Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (USFDA) i Europska agencija za medicinu (EMA) dale su jasnu definiciju farmaceutskih kokristala. USFDA definira kokristale kao kristalne materijale sastavljene od dvije ili više molekula u istoj kristalnoj rešetki. [16,17] Prema EMA, kokristali su: „homogene kristalne strukture sastavljene od dvije ili više komponenti (slika 4) u određenom stehiometrijskom omjeru gdje raspored kristalne rešetke nije baziran na ionskim vezama, kao u solima. [17] Dvije komponente su međusobno povezane nekovalentnim interakcijama kao što su vodikove veze, π - π slaganje i van der Waalove sile. [13, 17]

Formiranje kokristala se može se predvidjeti pomoću vrijednosti ΔpK_a . Općenito je prihvaćeno da će se sol formirati ako je ΔpK_a vrijednost veća od 3, dok će ΔpK_a vrijednost

manja od 0 upućivati na stvaranje kokristala. Ovaj parametar ne može točno predvidjeti formiranje kokristala kod vrijednosti ΔpK_a između 0 i 3, no mogućnost stvaranja soli povećava se kada se ΔpK_a poveća. [13,17]



Slika 4. Formiranje kokristala pomoću API-ja i koformera [18]

2.1.4. Amorfni oblici

Za razliku od kristalnih struktura, u amorfnom stanju ne postoji periodično uređena trodimenzionalna struktura. Molekule amorfne tvari nalaze se u međusobno nasumičnom položaju, orijentirane u različitim smjerovima, slično kao u tekućinama. Međutim, amorfni posjeduju uređenost kratkog doseg na udaljenosti od samo nekoliko molekula. [19,20]

Amorfni uzorci neće difraktirati rendgenske zrake na koherentan način, već su rendgenski difraktogrami široki (halo), bez karakterističnih pikova. [10]

Također, za razliku od kristalnih tvari, amorfne tvari ne pokazuju endotermni pik taljenja na DSC (eng. *Differential Scanning Calorimetry*) termogramu, već temperaturu staklastog prijelaza, odnosno staklište (T_g). [19] Ponašanje amornih materijala može se objasniti promjenama termodinamičkih parametara (slobodni volumen, entalpija, entropija) s promjenom temperature. T_g se može definirati kao temperatura pri kojoj se materijal zagrijavanjem prelazi iz staklastog stanja u viskoelastično stanje ili obrnuto za vrijeme hlađenja, a manifestira se kao promjena vrijednosti toplinskog toka zbog naglih promjena u toplinskom kapacitetu tijekom grijanja/hlađenja. Stakleni prijelaz je povezan sa strukturnom relaksacijom amornog materijala, a ovisan je o brzini zagrijavanja, i sadržaju vode u amornom materijalu [19,20]

Amorfni API-ji imaju veću slobodnu Gibbsovu energiju od kristalne forme što kao rezultat ima veću topljivost, a time i veću bioraspoloživost. [10,22] Međutim, zbog prekomjerne entropije, entalpije i slobodne energije koja je odgovorna za bolju topljivost, amorfni uzorci su najčešće znatno nestabilni, veće reaktivnosti i imaju tendenciju rekristalizacije. Također su vrlo česti i znatno higroskopskiji u odnosu na kristalne. [23]

2.2. Fizikalna karakterizacija API-ja

Fizikalna karakterizacija uključuje identifikaciju API-ja i polimorfnih formi te praćenje njihovih fizikalnih svojstava poput točke taljenja, temperature razgradnje, higroskopsnosti, morfologije te stabilnosti.

Pri fizikalnoj karakterizaciji istraživanog API-ja i njegovih polimorfnih formi korištene su slijedeće metode: rendgenska difrakcija (XRPD), diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC), termogravimetrijska analiza (TGA), dinamička sorpcija vodene pare (DVS), te optička i skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) mikroskopija.

2.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Rendgensko zračenje je elektromagnetska radijacija u području od 10^{-7} m do 10^{-11} m (dio elektromagnetskog spektra između γ -zraka i ultraljubičastih zraka). [19] Ozračivanjem preparata rendgenskim zrakama može doći do pojave apsorpcije, Comptonovog efekta,

fluorescencije i difrakcije. Od najveće je važnosti difrakcija rendgenskih zraka. [24,25] Prilikom pada rendgenskih zraka na atom, njihovo električno polje pobuđuje elektrone na osciliranje i oni postaju izvor elektromagnetskih zraka koje emitiraju u svim pravcima te imaju istu frekvenciju, odnosno valnu duljinu, kao i upadne rendgenske zrake, pa se može reći da dolazi do raspršenja rendgenskih zraka na električnim omotačima pojedinih atoma ispitivane tvari. [25,26]

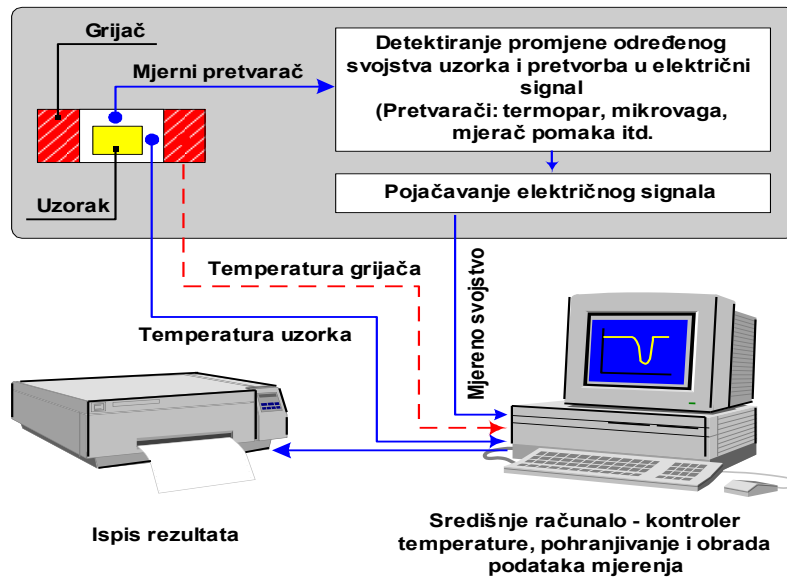
Zračenje, uzorak i detekcija difraktiranih zraka su temeljni elementi rendgenske difrakcijske analize (eng. *X-Ray Powder Diffraction*, XRPD). Zračenje može biti monokromatsko ili promjenljive valne duljine. Uzorak može biti monokristal, polikristalinični praškasti uzorak ili kompaktni čvrsti uzorak. Raspršeno zračenje se može s detektirati brojačem ili filmom. [24,25]

Difrakcija u polikristalnom uzorku (prahu) najviše se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ispitivanog uzorka, ali se također može koristiti i za određivanje parametara jedinične ćelije, određivanje molekulske i kristalne strukture, za određivanje prosječne veličine kristalita, za proučavanje naprezanja u materijalu (stresa) te preferirane orijentacije kristalita ili teksture [27] te može detektirati i kvantificirati polimorfne kontaminacije, kristalografske promjene i kvantificirati API u završnoj formulaciji. Rendgenska difrakcija, koristi se i za praćenje i kontrolu kvalitete API-ja, sirovina, intermedijera, ekscipiensa i gotovih proizvoda, što je iznimno važno jer svaka promjena može utjecati na sam proces proizvodnje konačnog lijeka i na samu bioraspoloživost lijeka. [19, 28]

2.2.2. Termička analiza API-ja

Termička analiza se definira kao skup tehnika kojima se mjere fizikalna svojstva tvari i/ili njezinih reakcijskih produkata u funkciji temperature ili vremena, pri čemu je tvar podvrgnuta programiranoj promjeni temperature u kontroliranoj atmosferi. Programirana temperatura podrazumijeva zagrijavanje ili hlađenje uzorka uz konstantnu brzinu promjene temperature, izotermički uvjeti ili kombinacija ova tri tipa. [29, 30]

Gotovo sve termičke metode koriste sličan tip instrumenta te se sustav za termičku analizu može prikazati zajedničkim shematskim prikazom, slika 5. [29]



Slika 5. Shematski prikaz sustava za termičku analizu [29]

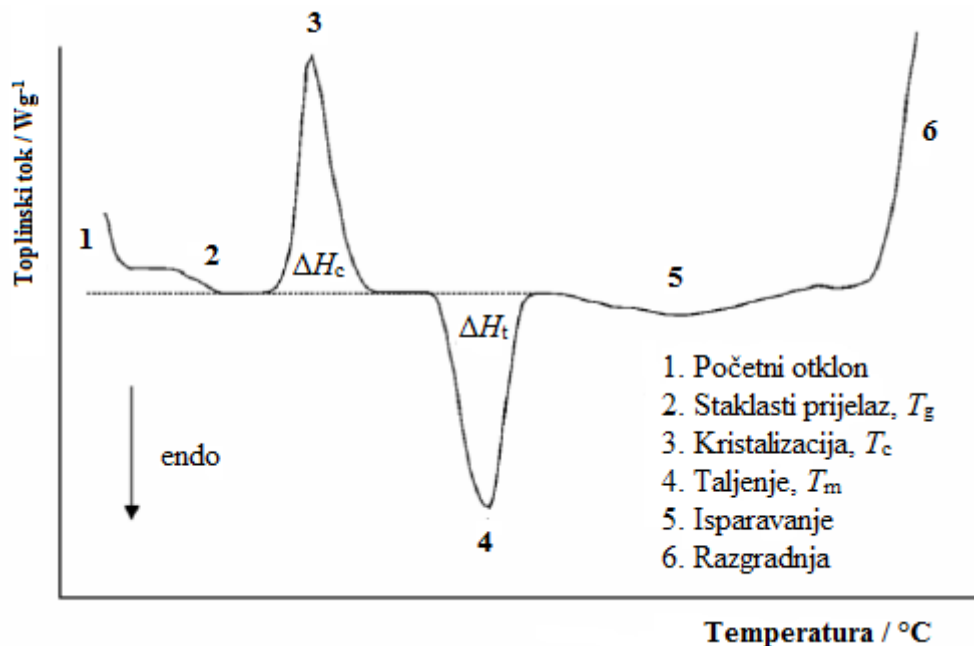
Najznačajniji parametri koji utječu na rezultat termičke analize su: masa i geometrija uzorka, priroda uzorka i produkata razvijenih tijekom mjerenja, tip i oblik ispitne posudice, brzina grijanja, te atmosfera u kojoj se provodi mjerenje. [29]

Najčešće primjenjivane tehnike termičke analize u karakterizaciji polimorfnih formi API-ja su diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA).

2.2.2.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (eng. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) je analitička tehnika kojom se kontinuirano prati razlika toplinskog toka između uzorka i referentnog materijala, u funkciji vremena ili temperature, tijekom programiranog zagrijavanja uzorka u uvjetima kontrolirane atmosfere. [29]

Diferencijalni pretražni kalorimetar bilježi razliku temperatura i razliku otpuštene ili primljene topline. Mjerenje se izvodi na način da se uzorak i referentni materijal zagrijavaju ili hlade programiranom brzinom te se pritom izravno mjeri diferencijalna toplina dH/dt potrebna da se razlika temperatura između referentnog materijala i uzorka održi konstantnom, a kao rezultat tome nastaje pik na DSC krivulji. [25,29] Metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije mogu se odrediti specifični toplinski kapacitet (C_p), promjena specifičnog toplinskog kapaciteta (ΔC_p), temperature faznih prijelaza (talište, T_m , staklište, T_g , temperatura kristalizacije, T_c), toplina faznih prijelaza (toplina kristalizacije, ΔH_c , toplina taljenja, ΔH_t), kao i podaci o kemijskim reakcijama (polimerizaciji, oksidaciji, razgradnji). [25]



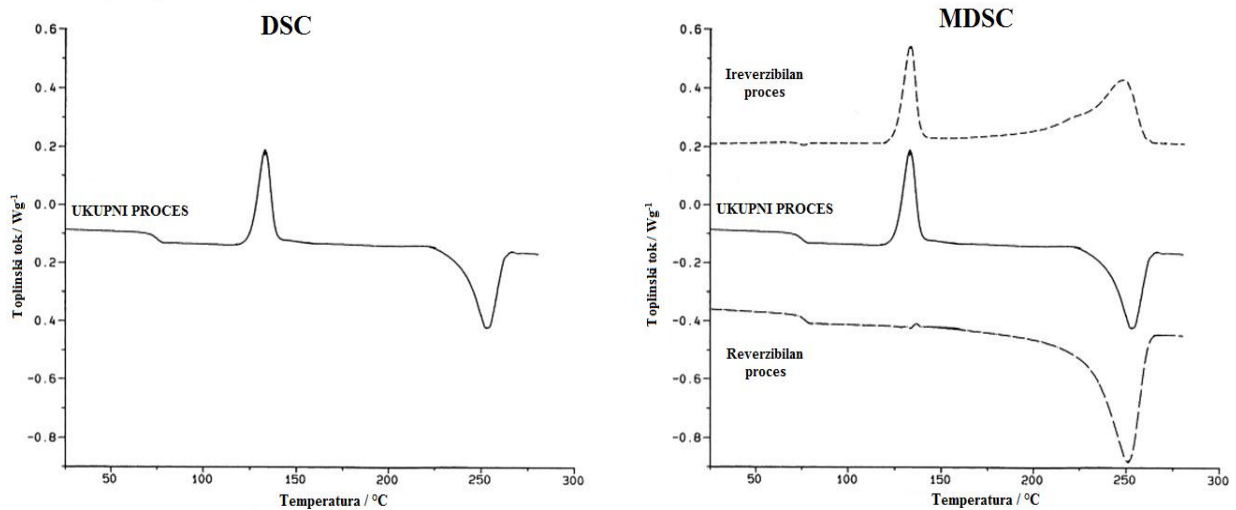
Slika 6. Shematski prikaz DSC termograma [25]

Na slici 6 prikazan je DSC termogram s krivuljom koja prikazuje različite procese (primjerice staklište, rekristalizaciju, taljenje, desolvataciju, razgradnju) koji mogu nastati u uzorku tijekom zagrijavanja. Prilikom zagrijavanja amornog uzorka, nakon nekog vremena na DSC krivulji pojavljuje se staklasti prijelaz (T_g) koji se očituje padom vrijednosti toplinskog toka. Daljnjim zagrijavanjem uzorka, pokretljivost molekula raste te na temperaturi T_c prime dovoljno energije da se poslože u pravilnu kristalnu strukturu, što dovodi do rekristalizacije uzorka iz amorfne u kristalnu polimorfnu formu. Proces rekristalizacije uzorka je egzoterman (rezultira egzotermnim pikom na krivulji ovisnosti toplinskog toka i temperature) te se pri njemu oslobađa određena toplina. Daljnjim dovodenjem topline uzorku dolazi do taljenja (T_m) prethodno nastale polimorfne forme. Proces taljenja je endoternog karaktera budući da on zahtjeva utrošak energije. Topline taljenja i kristalizacije karakteristične su samo za kristalne tvari, a određuju se kao površina ispod pika koji odgovara odgovarajućem prijelazu. Daljnjim zagrijavanjem dolazi do potpune razgradnje uzorka. [31]

2.2.2.2. Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija

Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija (MDSC) napredni je oblik DSC-a. Napredak je ostvaren u računalnom programu, a ne u DSC uređaju. Kod MDSC umjesto linerarnog zagrijavanja uzorka upotrebljava se sinusoidno zagrijavanje. Ukupni protok topline kombinacija je odgovora nastalih zbog promjena toplinskog kapaciteta i kinetičkih procesa, a

kada u materijalu nema nekakvih prijelaza, protok topline određen je samo toplinskim kapacitetom. U trenutku kad temperatura dosegne točku taljenja ili kristalizacije, protok topline nije određen samo toplinskim kapacitetom nego i energijom prijelaza. [32, 33]



Slika 7. Usporedba DSC i MDSC termograma [34]

Osnovna razlika između standardnog DSC i MDSC-a (slika 7) je u reverzibilnosti procesa, odnosno MDSC može odvojiti reverzibilne (stakliše, taljenje) od ireverzibilnih procesa (kristalizacija, isparavanje, razgradnja). Temelj za razdvajanje je razlika u protoku topline pri moduliranome i linearnom zagrijavanju te se pomoću diskretne Fourierove transformacije ukupni protok topline dijeli na onaj koji pripada reverzibilnim i onaj koji pripada ireverzibilnim procesima. Primjena MDSC tehnike posebno je važna kod proučavanja amorfa (lakša detekcija staklastog prijelaza) te u slučaju kada na standardnoj DSC krivulji ukupnog toplinskog toka u istom temperaturnom području imamo više preklapljenih procesa, primjerice kada se proces dehidratacije (ireverzibilan proces) odvija paralelno sa staklastim prijelazom (reverzibilan proces). [32, 33]

2.2.2.3. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza (eng. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) je analitička tehnika kojom se prati promjena mase uzorka u ovisnosti o temperaturi i/ili vremenu, tijekom programiranog zagrijavanja uzorka u uvjetima kontrolirane atmosfere. Ova analitička tehnika daje informacije vezane uz termičku stabilnost i sastav uzorka, međuprodukata i produkata razgradnje. [29] S obzirom na način rada termogravimetrijska analiza se dijeli na [29] izotermnu termogravimetriju kod koje se prati promjena mase uzorka ovisno o vremenu, uz

konstantnu temperaturu te neizotermnu (dinamičku) termogravimetriju kod koje se uzorak zagrijava određenom brzinom.

Rezultat TGA analize je TGA termogram, odnosno grafički prikaz ovisnosti promjene gubitka mase o vremenu ukoliko se radi o izotermnoj TGA ili o temperaturi ako je TGA neizotermna. Tipični TGA uređaj (slika 8) sastoji se od osjetljive vage (mikrovaga), komore za zagrijavanje, grijača te posudice za uzorak. [25, 31]



Slika 8. TGA uređaj (TA Instruments) [36]

Zagrijavanjem uzorka u TGA analizatoru, dolazi do reakcije dekompozicije uzorka pri čemu nastaju kruti i plinoviti produkti. Isparavanjem plinovitih produkata dolazi do gubitka jednog dijela mase uzorka što rezultira padom mase na TGA krivulji. [29] Kako bi se identificirao produkt isparavanja, TGA se najčešće kombinira s drugim analitičkim tehnikama, kao npr. FTIR. Ova metoda koristi se za karakterizaciju i identifikaciju materijala, za praćenje razgradnje materijala, određivanje organskog dijela u uzorku, sastava uzorka ili udjela dodataka, a primjenu je pronašla u gotovo svim granama industrije. [25,31]

2.3. Higroskopnost i stabilnost API-ja

Higroskopnost je fizikalno-kemijsko svojstvo koje se opisuje kao sposobnost materijala da apsorbira ili adsorbira vlagu iz okolne atmosfere. Često se ovo svojstvo mjeri na konstantnoj temperaturi s varijacijama relativne vlažnosti (eng. *Relative humidity*, RH). Najčešće korištena konvencionalna metoda higroskopnosti je Europska farmakopeja

(European Pharmacopoeia 9.0, Chapter 01/2008:51100) koja se temelji na izlaganju API-ja na $80\% \pm 2\%$ relativne vlažnosti tijekom 24 sata na $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ te se mjeri postotak apsorbirane vlage. [38] Higroskopnost API-ja se često procjenjuje zbog činjenice da apsorbirana vlaga može utjecati na fizičku i kemijsku stabilnost farmaceutskih proizvoda. Podaci o apsorpciji vlage mogu se također koristiti vezano uz odabir pomoćne tvari u konačnoj formulaciji, za definiranje procesnih uvjeta te uvjeta pakiranja i skladištenja, a koji osiguravaju fizičku i kemijsku stabilnost API-ja te kontroliraju prodiranje vlage u finalni proizvod/lijek. [37,38]

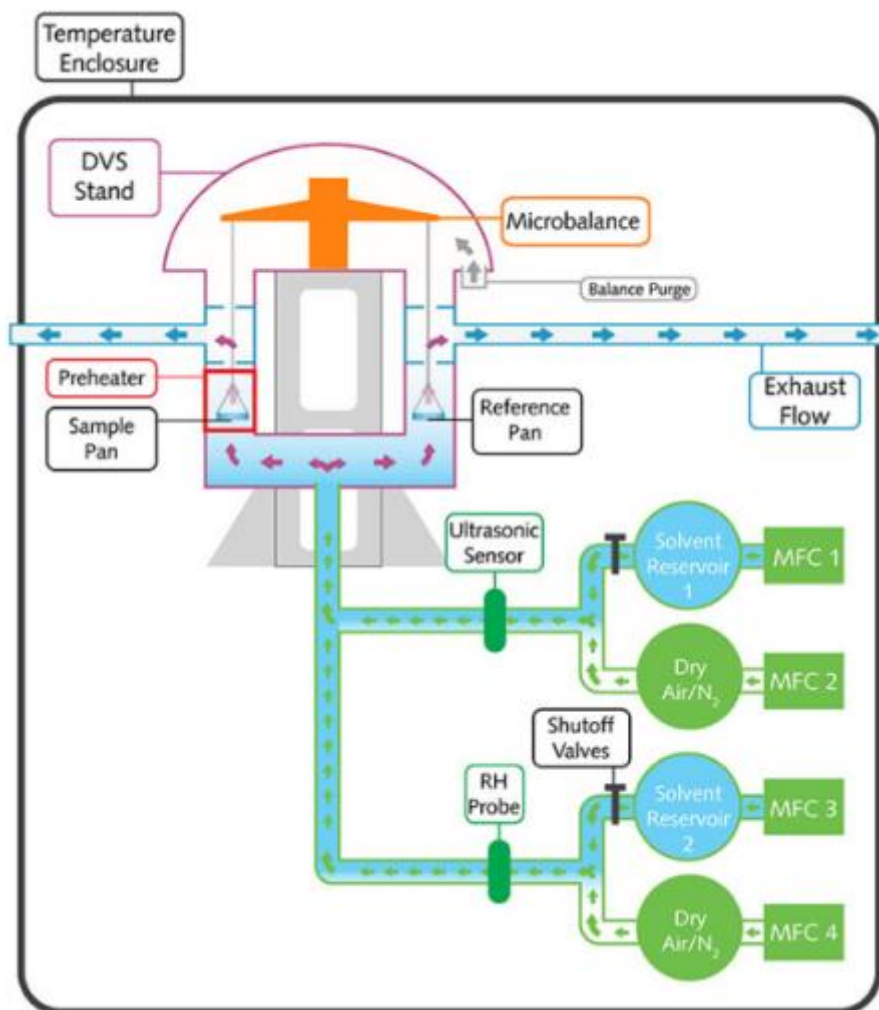
Higroskopnost API-ja se najčešće prati prethodno opisanom termogravimetrijskom analizom te metodom dinamičke sorpcije vodene pare (DVS).

2.3.1. Dinamička sorpcija vodene pare

Dinamička sorpcija pare (eng. *Dynamic vapor sorption*, DVS) je gravimetrijska tehnika koja mjeri količinu i brzinu adsorpcije ili apsorpciju materijala. Temperatura i vlažnost su važni čimbenici u proizvodnji i skladištenju lijekova. Dinamična sorpcija vodene pare pruža svestranu i osjetljivu tehniku za procjenu stabilnosti farmaceutski aktivnih sastojaka, ekscipijensa i formulacija pod različitim kombinacijama temperature/vlažnosti. U tipičnom DVS eksperimentu, apsorpcija započinje od niže vrijednosti relativne vlažnosti (0%) prema višoj (90-95%). [39,40] Desorpcija se manifestira kao povratak s višeg na niži nivo relativne vlažnosti. Brzina kojom se materijal uravnotežuje na svakom nivou vlažnosti, kao i ukupni oblik rezultirajućeg profila adsorpcije/desorpcije, daje korisne informacije o strukturi materijala i dugoročnoj stabilnosti. [42]

Na slici 9 prikazan je shematski prikaz uređaja za dinamičku sorpciju pare/vlage. Uzorak se stavlja na digitalnu mikrovagu koja detektira apsorpciju i desorpciju vodene pare kroz povećanje ili smanjenje mase materijala, ovisno o promijeni relativne vlažnosti. Točnost mjerenja postiže se elektroničkom kontrolom temperature i vlažnosti, omogućujući izvrsnu stabilnost osnovnog instrumenta kao i preciznu kontrolu generirane relativne vlage. Uređaj koristi suhi plin nosilac, obično dušik ili komprimirani zrak. Digitalni regulatori protoka reguliraju protok suhих i zasićenih plinova. Relativna vlažnost se stvara preciznim miješanjem suhих i zasićenih plinova u željenim omjerima protoka. [42]

DVS analiza osigurava relativno brz način praćenja izoterme apsorpcije vode i desorpcije uzorka, u usporedbi sa standardnim izlaganjem uzorka uvjetima relativne vlažnosti u komorama koje traje tjedan i više dana. DVS-om je također moguće provoditi i mjerenja pri kojima se materijal izlaže konstantnim uvjetima relativne vlažnosti pri čemu se linearno ili postupno mijenja temperatura. [39]



Slika 9. Shema uređaja za dinamičku sorpciju vodene pare (DVS) [39]

2.4. Morfološka svojstva API-ja

Morfologija čestica izuzetno je bitna u farmaceutskoj industriji. Praćenje oblika i veličine čestica tijekom razvojnog procesa i pripreme formulacija omogućava kontrolu, usporedbu šarži, brzu identifikaciju produkta te pomaže u optimiziranju vremena potrebnog za pojedini tehnološki proces. Mjerenje veličina i oblika čestica omogućava bolje razumijevanje interakcije između API-ja i pomoćne supstance. Poznavanjem oblika čestica, može se bolje predvidjeti ponašanje aktivne supstancije pa je i proces formulacije bolje razumljiv i lakše ga je kontrolirati. Također, veličina čestica API-ja je važna karakteristika za doziranje API-ja u tabletama. [43,44] Morfologija čestica API-ja najčešće se prati optičkim mikroskopom te skenirajućim elektronskim mikroskopom.

2.4.1. Optički mikroskop

Veličina i oblik čestica uzorka najčešće se prate optičkim mikroskopom, spojenim s digitalnom kamerom koja je povezana na računalo u kojem softveru obrađuju podatke. Uzorak se nanese na staklenu pločicu, doda 1-2 kapljice otapala (silikonsko ulje), razmaže po pločici i prekrije stakalcem. Podešavanje mikroskopa za snimanje isto je kao i kod ostalih optičkih mikroskopa. Odabir povećanja je proizvoljan, no se mora unijeti u softver kao parametar pri analizi podataka. Softver nudi i mogućnost točnog određivanja veličine kristala. Na slici se jasno vidi oblik kristala te moguća postojanost aglomerata. [43]

2.4.2. Skenirajući elektronski mikroskop

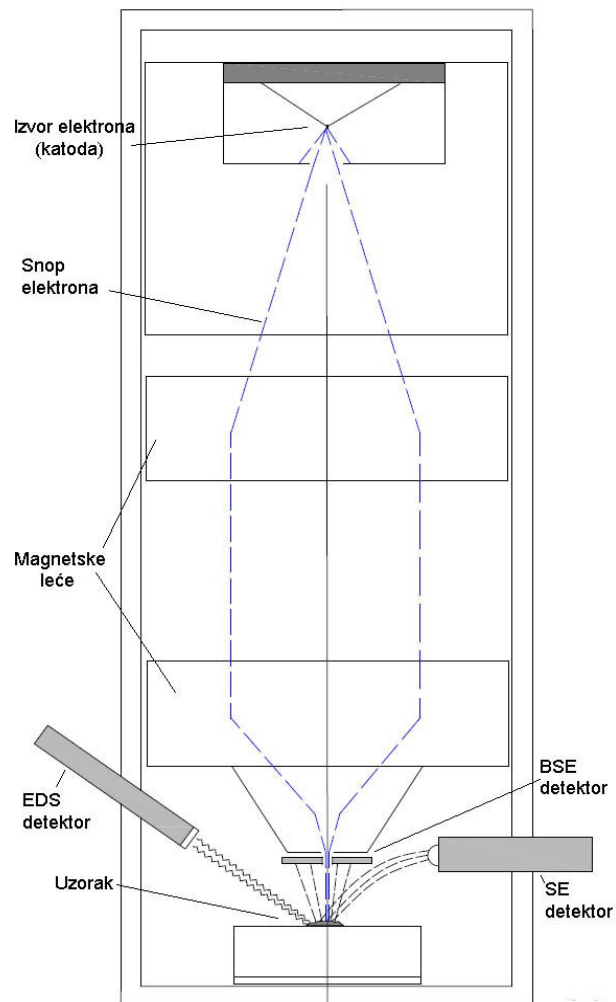
Skenirajući elektronski mikroskopi (eng. *Scanning Electron Microscope*, SEM) omogućavaju praćenje mikrostrukture koje su nevidljive ljudskom oku uvećanjem i do 1 000 000 puta. Osnove rada SEM-a sastoje se od skeniranja površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. [46]

Kako ne bi došlo do zagrijavanja i naelektriziranosti uzorka, ispitivani uzorak mora biti vodljiv, jer se analiza materijala izvodi pod elektronskim snopom. S obzirom da većina materijala ne provodi struju, uzorak je potrebno prethodno *napariti*, tj. prekriti tankim slojem (15-20 nm) električki vodljivog materijala. Naparivanje uzoraka zlatom ili paladijem se češće koristi kada se analizom želi postići SE snimka na nepoliranim (neobrađenim) uzorcima, a zlato ili paladij daju bolji kontrast slike, bolje se ističu nagibi, pore i druge morfološke karakteristike uzorka. [47,48]

Nakon pripreme, uzorak se stavlja u komoru za snimanje gdje je fiksiran na nosač. Na slici 10 je shematski prikaz SEM uređaja, odnosno komore za snimanje. Izvor elektrona je katoda smještena u emisijskoj komori. Elektroni se ubrzavaju na putu između katode i anode koje se nalaze pod visokim naponom, a zatim se fokusiraju i usmjeravaju pomoću magnetskih leća na površinu uzorka. Komora i kolona elektronskog mikroskopa za vrijeme rada nalaze se pod niskim ili visokim vakuumom. Prilikom udarca elektrona o površinu uzorka, dolazi do raznih efekata koje koristimo za dobivanje slike i provođenje analize u SEM-u. [47,49]

Prilikom sudara s atomskom jezgrom atoma koji grade uzorak, elektron iz elektronskog snopa mikroskopa se može odbiti natrag te se ti odbijeni elektroni se nazivaju elektroni povratnog raspršenja, odnosno BSE (eng. *Back Scatter Electron*). BSE detektor koristi se za proučavanje razlika u kemijskom sastavu uzoraka, a ujedno i smanjuju efekte izazvane nakupljanjem elektrona na površini uzorka (nabijanje) pa se uz njegovu upotrebu mogu snimati i uzorci koji nisu električki vodljivi. Drugi važan efekt koji nam se događa u

trenutku sudara elektrona iz snopa i uzorka je izbijanje elektrona iz elektronskog omotača atoma uzorka te se ti izbijeni elektroni nazivaju sekundarni elektroni ili SE (eng. *Secondary Electrons*). SE detektor prikazuje površinu uzorka u velikoj rezoluciji te je stoga posebno pogodan za proučavanje morfologije. [47,48]



Slika 10. Shematski prikaz SEM uređaja [48]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Kemikalije

Za karakterizaciju API-ja i pretraživanje polimorfnih formi korištena su otapala navedena u tablici 1. Naziv API-ja, njegova kemijska struktura i stvarna polimorfna forma nisu navedene zbog tajnosti podataka.

Tablica 1. Otapala korištena pri pretraživanju polimorfnih formi API-ja.

Otapalo	M / g mol ⁻¹	Vrelište / °C	Proizvođač
Acetone, >99,5%	58,08	56,00	Kemika
Acetonitril (ACN), > 99,5%	41,05	82,00	Kemika
Anisol, 99%	108,1	153,0	Sigma Aldrich
1-butanol (1-BuOH), 99,5%	74,12	117,7	Kemika
2-butanol (2-BuOH), > 99%	74,12	100,0	Sigma Aldrich
Diklormetan (DKM), > 99,5%	84,93	39,60	Kemika
Dimetilsulfoksid (DMSO), > 99,5%	78,13	189,0	Kemika
Etanol apsolutni (EtOH p.a.), > 99,8%	46,07	78,37	Kemika
Etanol, 96% (EtOH tech)	46,07	78,37	Kemika
Heptan, > 99%	32,04	64,70	Kemika
Heksan, > 98,5%	100,2	98,42	Honeywell
<i>i</i> -butil acetat (<i>i</i> -BuOAc)	116,2	118,0	Sigma
Kloroform, > 99%	119,4	61,20	Kemika
Metanol (MeOH), > 99,8%	32,04	64,70	Kemika
Metiletilketon (MEK), > 99%	72,11	79,64	Kemika
metil <i>i</i> -butil keton (MIBK), > 99%	100,2	118,0	Kemika
metil <i>t</i> -butil eter (MTBE)	88,15	55,20	Kemika
Pentan, > 99%	72,15	36,10	Kemika
Perolej eter, vrelište 40-70°C	82,20	42,0-62,0	Kemika
1-propanol (1-PrOH), > 99,8%	60,09	97,00	Kemika
2-propanol (2-PrOH), > 99,8%	60,01	82,50	Kemika
<i>p</i> -ksilen, > 99%	106,2	138,40	Honeywell
Tetrahydrofuran (THF), osušeni max 0,01% H ₂ O, > 99,5%	72,11	66,00	Kemika
2-metil tetrahydrofuran (2-meTHF), > 99,5%	86,13	80,20	Honeywell
Toluen, > 99,5%	92,14	110,6	Kemika
Voda (H ₂ O)	18,02	100,0	Pliva

3.2. Oprema i eksperimentalni uvjeti provođenja eksperimenta

Tijekom fizikalne karakterizacije API-ja i pretraživanja novih polimorfnih formi korištene su različite tehnike fizikalne karakterizacije: XRPD, DSC, TGA analiza, DVS te optička i SEM mikroskopija.

3.2.1. Rendgenska difrakcijska analiza

Ispitivanje praškastih uzoraka provedeno je primjenom rendgenske difrakcijske analize na uređaju Philips X'Pert PRO difraktometaru praha, opremljenim izvorom Cu zračenja 1.54184 Å. Praškasti uzorak nanesen je izravno na silicijsku pločicu. Uzorci su snimani 12 minuta u rasponu kutova 2Theta (2θ) od 3° – 40° . Pomak kuta tijekom snimanja iznosio je 0,0167, a brzina snimanja 0,056 $^\circ$ /s.

3.2.2. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna pretražna kalorimetrija provedena je na uređaju DSC Discovery - TA Instruments. Temperaturni program je zadan u temperaturom rasponu od 25 do 300 $^\circ$ C, uz zagrijavanje 10 $^\circ$ C/min i protokom dušika od 50 mL/min. Uzorak je izvagan u hermetički zatvorenu aluminijsku posudicu s malom rupicom na poklopcu, a kao referentna posudica također je korištena hermetički zatvorena (prazna) posudica s probušenim poklopcem. Masa ispitivanog uzorka iznosila je 1-2 mg.

Podaci su obrađeni u programu TRIOS Softwaru (TA Instruments).

3.2.3. Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija

Modulirana diferencijalna pretražna kalorimetrija snimana je na istom uređaju kao i diferencijalna pretražna kalorimetrija. Temperaturni program je zadan u temperaturnom rasponu od -50 do 300 $^\circ$ C, uz grijanje 2 $^\circ$ C/min i protok dušika od 50 ml/min. Uzorak je izvagan (1-2 mg) u hermetički zatvorenu aluminijsku posudicu, a kao referentna posudica također je korištena hermetički zatvorena (prazna) posudica s poklopcem.

Podaci su obrađeni u programu TRIOS Softwaru (TA Instruments).

3.2.4. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza uzoraka provedena je na instrumentu TGA Discovery - TA Instruments. Uzorci su pripremljeni vaganjem 5-10 mg u otvorenu aluminijsku posudicu te snimljeni metodom zagrijavanja u rasponu od 25 do 300 $^\circ$ C po 10 $^\circ$ C/min, u struji dušika od 50 ml/min. Računalnim programom TRIOS praćena je promjena mase.

3.2.5. Dinamička sorpcija vodene pare

Relativna vlažnost uzoraka praćena je na DVS Instrumentu – Surface Measurement Sistem (SMS), DVS Standard Analysis Suite v.42. Uređaj koristi suhi plin nosilac, dušik ($p = 1-2$ bara). Temperaturni raspon snimanja iznosio je 0-100 $^\circ$ C. U staklenu posudicu unutar

DVS uređaja izvagano je 20-30 mg uzorka. Mjerenje je provedeno prema programu (predefiniran u DVS Win računalnom programu) koji je obuhvaćao raspon izlaganja uzorka vlažnosti 0%-90%-0%. Rezultati analize obrađeni su u MS Excel-u, pomoću kojeg je i nacrtana DVS histereza.

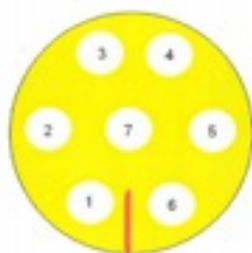
3.2.6. Optički mikroskop

Morfološka svojstva API-ja praćena su primjenom optičkog mikroskopa Olympus BX51, spojenog s digitalnom kamerom koja je povezana s računalom. Snimljeni podaci obrađeni su računalnim programom Stream Essentials.

Uzorak je nanesen na staklenu pločicu i uz 1-2 kapljice silikonskog ulja razmazan po pločici i prekriven stakalcem. U računalnom softveru, izoštrena je slika kako bi se kristali jasno vidjeli te je uvećanjima 4, 10 i 20 puta, izmjerena veličina određenih čestica i aglomerata.

3.2.7. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Jeol JSM-5800 skenirajućim elektronskim mikroskopom praćena je morfološka struktura čestica uzorka. Uzorci za snimanje su pripremljeni na odgovarajućim okruglim pločicama sa specijalnim ljepljivim trakama. Pločice su stavljene na stalak (slika 11), a zatim u stroj za napanje gdje su prskani zlatom visoke čistoće. Tlak napanja je iznosio 13.32 Pa, struja 4 mA, dok je vrijeme napanja bilo 15 minuta.



Slika 11. Stalak s pločicama na kojima su pripremljeni uzorci

Nakon napanja uzorka, stalak s uzorcima je postavljen u komoru za snimanje. Digitalnim programom AZtec, korištenjem različitih automatskih funkcija (fokusiranja, kontrola kontrasta, svjetlosti) dobivene su slike. Korištena su uvećanja od 50, 200, 500, 1000 i 2000 puta.

3.3. Ispitivanja topljivosti API-ja

Početnom uzorku API-ja, kojeg ćemo nazvati formom X, ispitana je topljivost u određenim otapalima (tablica 1). Na temelju dobivenih podataka o topljivosti API-ja u pojedinim otapalima, pristupilo se pokusima pretraživanja polimorfni formi u suspenzijama s antiotapalima ili otapalima u kojima je topljivost API-ja vrlo mala, ili izlaganjem uzoraka parama otapala (saune). Također, ispitana je topljivost forme X i amorfne forme u otopinama različitih kiselosti: HCl (koncentracije 0,1 M, pH = 1,2), acetatni pufer (koncentracije 50 mM, pH = 4,5) i fosfatni pufer (koncentracije 50 mM, pH = 6,8) i destiliranoj H₂O (pH = 6,40).

3.3.1. Ispitivanje topljivosti uzorka u otapalima

Oko 20 mg uzorka odvagano je u staklenu bočicu te su dodavani alikvoti u koracima po 100 µL određenog otapala uz miješanje na sobnoj temperaturi te naknadno zagrijavanje na 50 °C, sve do pojave potpune topljivosti uzorka, ili do maksimalnog volumena od 10 mL uzorka. Neotopljeni uzorci analizirani su primjenom XRPD analize. Uzorci koji su se otopili ostavljeni su da isparavaju do pojave kristalizacije. Tako dobivena krutina, također je analizirana primjenom XRPD analize.

3.3.2. Ispitivanje topljivosti u otopinama različite kiselosti

Uzorci amorfna i forme X ($m = 50$ mg) suspendirani su u otopinama ($V = 9,0$ ml) različitih kiselosti: HCl (koncentracije 0,1 M, pH = 1,2), acetatni pufer (koncentracije 50 mM, pH = 4,5) i fosfatni pufer (koncentracije 50 mM, pH = 6,8) i destiliranoj H₂O (pH = 6,40), uz miješanje na 37 °C. Nakon 4 h, izmjerene su pH vrijednosti suspenzija te su uzorci analizirani XRPD metodom. Suspenzije su filtrirane PTFE (politetrafluoroetilen) filterom (0.45µm). 1 ml alikvota filtrirane otopine razrijeđeno je s 4 ml određene otopine te je tako pripremljenim otopinama određena topljivost uzorka pomoću HPLC metode.

3.4. Pretraživanja polimorfni formi

3.4.1. Suspenzije s otapalima

50-100 mg uzorka izvagano je u bočicu s određenim otapalom ($V = 2$ ml) uz miješanje na magnetskoj miješalici, na određenoj temperaturi (10 i 25 °C). Nakon vremenskog razdoblja

od 1, 2, 4 i 24 sata te 7 dana uzorkovani su mokri uzorci koji su potom analizirani XRPD metodom.

3.4.2. Izlaganje parama otapala

25-30 mg uzorka izloženo je parama otapala ($V = 2$ ml), prema tablici 1 te su uzorci analizirani primjenom XRPD metode nakon 7 i 30 dana.

3.5. Ispitivanja stabilnosti uzoraka izlaganjem stres testovima

U cilju ispitivanja fizikalno kemijske stabilnosti, uzorci API-ja izloženi su tzv. stresnim testovima što je uključivalo grijanje uzorka na povišenim temperaturama, izlaganje povišenim tlakovima, mljevenje uzorka u tarioniku te mljevenje u kugličnom mlinu.

Temperaturna stabilnost

Uzorci su grijani u sušnici pod vakuumom ili DSC uređaju, pri različitim temperaturama u različitom trajanju te nakon toga analizirani primjenom XRPD metode.

Djelovanje tlačnih sila

Uzorci su izloženi djelovanju tlačnih sila (3000, 5000 i 10000 N) na preši kroz vrijeme od jedne, tri ili pet minuta te su nakon toga analizirani primjenom XRPD metode.

Mljevenje u tarioniku

Uzorci su mljeveni u ahatnom tarioniku s tučkom 1, 3 i 5 minuta srednjom brzinom te snažno 30 sekundi.

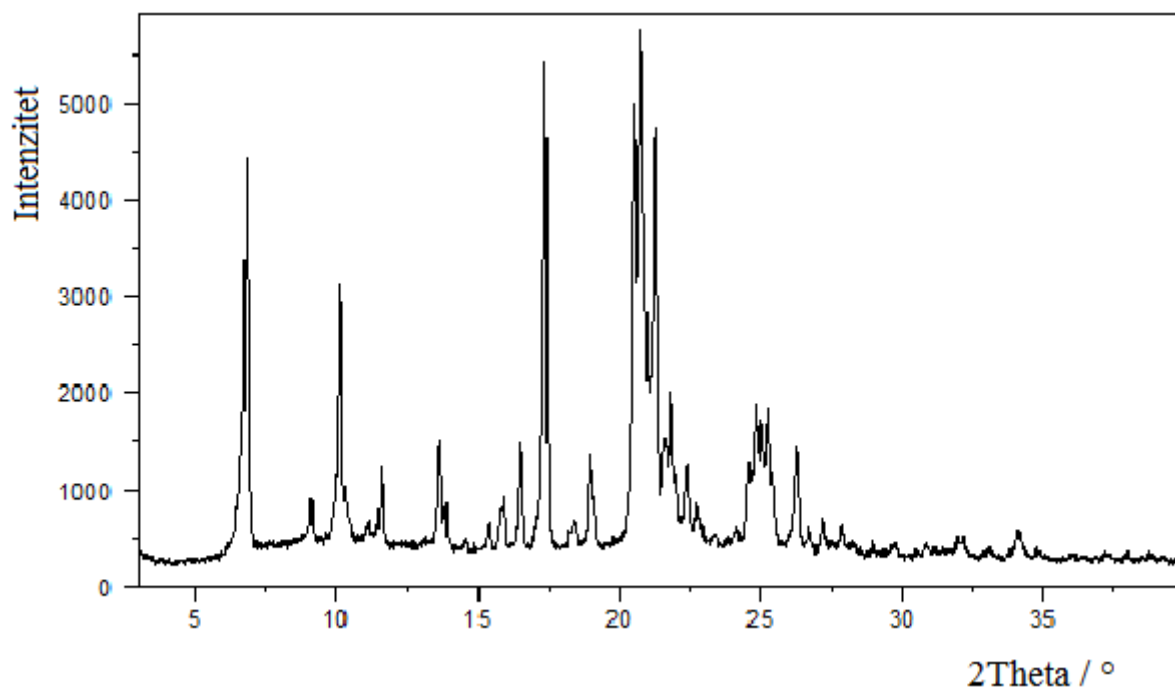
Mljevenje u kugličnom mlinu

Uzorci API-ja mljeveni su nitridnim kugličnim mlinom s 5 nitridnih kuglica, uz 600 okretaja u minuti. Pri tome je polimorfna stabilnost uzorka API-ja praćena primjenom XRPD metode nakon 0.25, 0.5, 1, 2 i 4 sata mljevenja.

4. REZULTATI I RASPRAVA

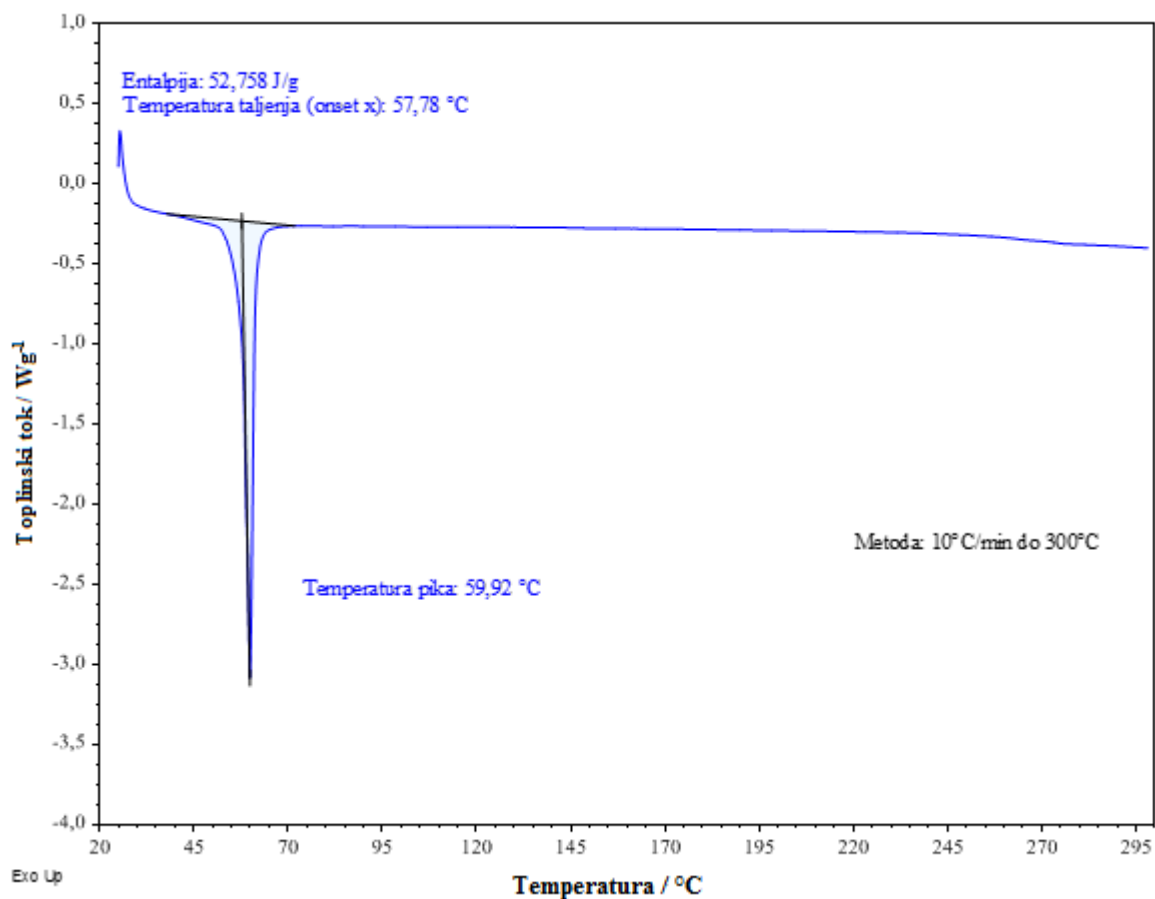
4.1. Fizikalna karakterizacija forme X

Uzorak početne forme API-ja, označen kao forma X, analiziran je rendgenom, a dobiveni difraktogram prikazan je na slici 12. Ovaj difraktogram poslužio je kao referentna točka za uočavanje promjena kod polimorfnih oblika API-ja.

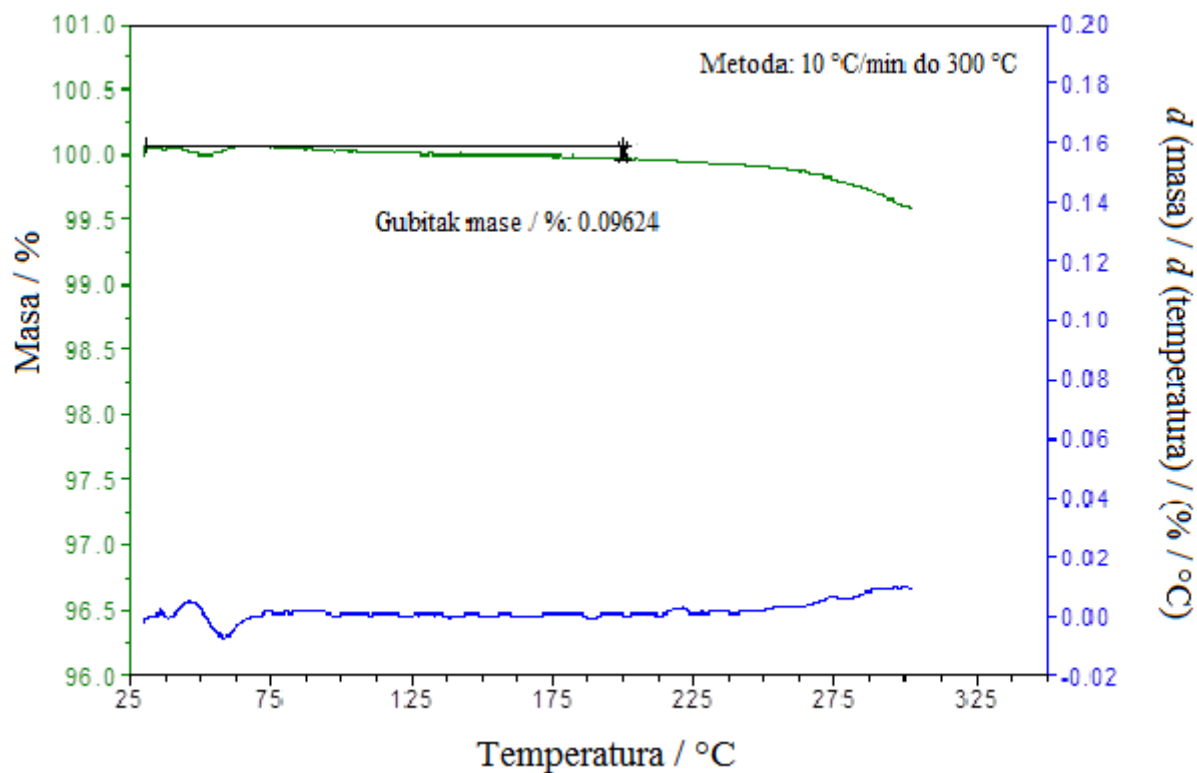


Slika 12. XRPD difraktogram X forme API-ja

Rezultati DSC analize polimorfne forme X pokazuju točku taljenja na 57,78 °C (T_m (onset), slika 13). TGA termogram forme X (slika 14) pokazuje pad mase od 0,09642% do 200 °C, dok na temperaturama iznad 220 °C nastupa razgradnja forme.



Slika 13. DSC termogram forme X



Slika 14. TGA termogram forme X

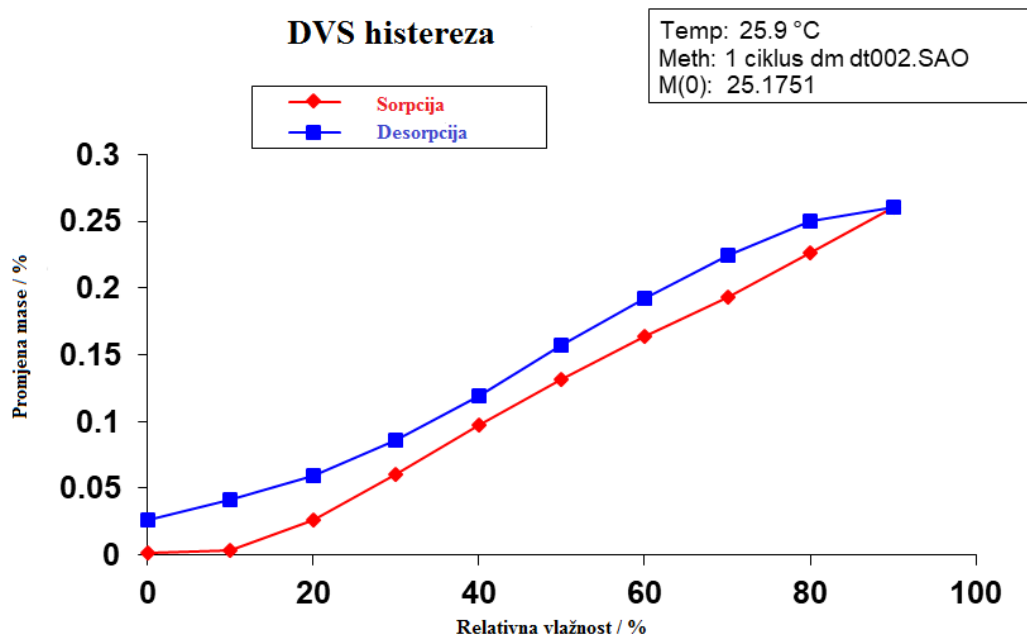
4.1.1. Higroskopnost forme X

Higroskopnost forme X ispitivana je izlaganjem uzorka forme X različitim uvjetima vlage u komorama, primjenom DVS-a te izlaganjem uzorka 80% relativne vlažnosti (u vremenu od 24 sata) prema Europskoj Farmakopeji.

U cilju istraživanja higroskopskih svojstava i polimorfne stabilnosti forme X u ovisnosti o različitim uvjetima relativne vlažnosti, uzorak je izložen različitim uvjetima vlage na 25 °C, u periodu od 7 i 30 dana. Uzorci su analizirani rendgenskom difrakcijom i TGA analizom nakon 7 dana te rendgenskom analizom 30 dana, prema tablici 2.

Tablica 2. Promjene uslijed izlaganja vlažnoj atmosferi na temperaturi 25 °C. RH predstavlja relativnu vlažnost atmosfere. Termogravimetrijski gubitak mase određen je uslijed zagrijavanja do 150 °C, nakon 7 dana izlaganja. Rendgenom je praćena stabilnost X forme naon 7 i 30 dana izlaganja.

RH / %	Vrijeme izlaganja		
	7 dana	7 dana	30 dana
	gubitak mase / %	stabilnost	stabilnost
0	0.096	100 % forma X	100 % forma X
20	0.55	100 % forma X	100 % forma X
40	0.48	100 % forma X	100 % forma X
60	0.56	100 % forma X	100 % forma X
80	0.71	100 % forma X	100 % forma X
100	0.69	100 % forma X	100 % forma X



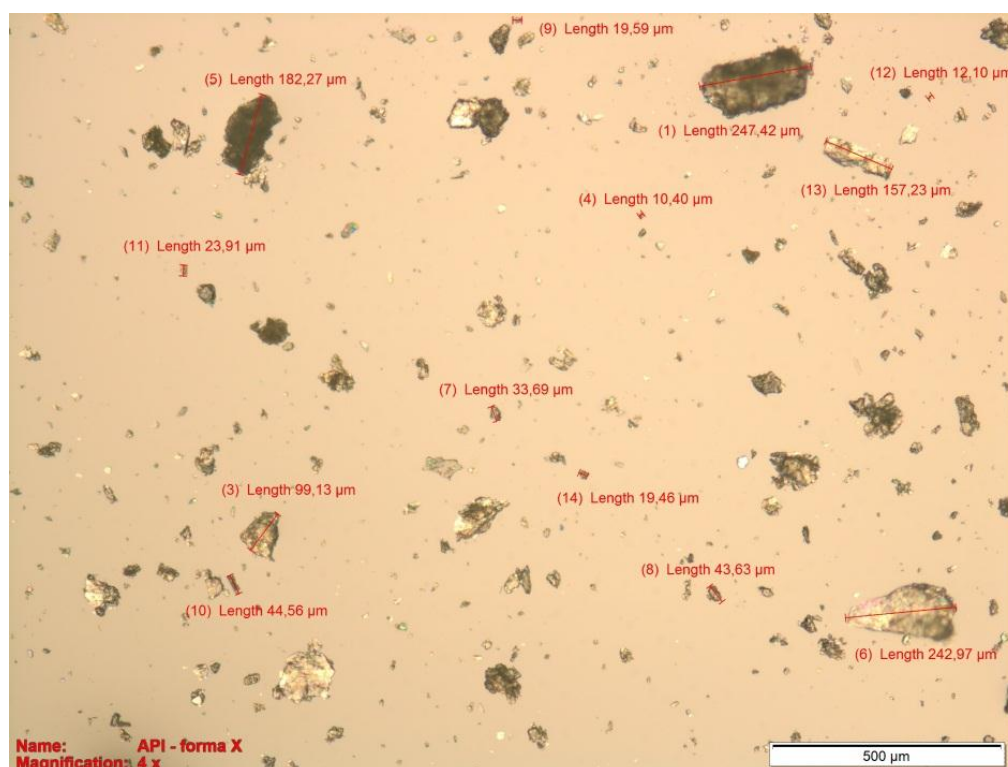
Slika 15. DVS histereza forme X

Tijekom DVS eksperimenta (slika 15) povećanje mase uzorka (sorpcija vlage) na 80% relativne vlažnosti iznosi 0,22%. Proces apsorpcije vodene pare je reverzibilan, nakon smanjenja postotka vlažnosti (desorpcije) nema promjena u polimorfnom obliku. Također, higroskopsnost uzorka forme X testirana je i prema Europskoj farmakopeji, pri čemu je ravnotežni unos vode na 80% relativne vlažnosti, sobnoj temperaturi i vremenu od 24h, iznosio 0.04%.

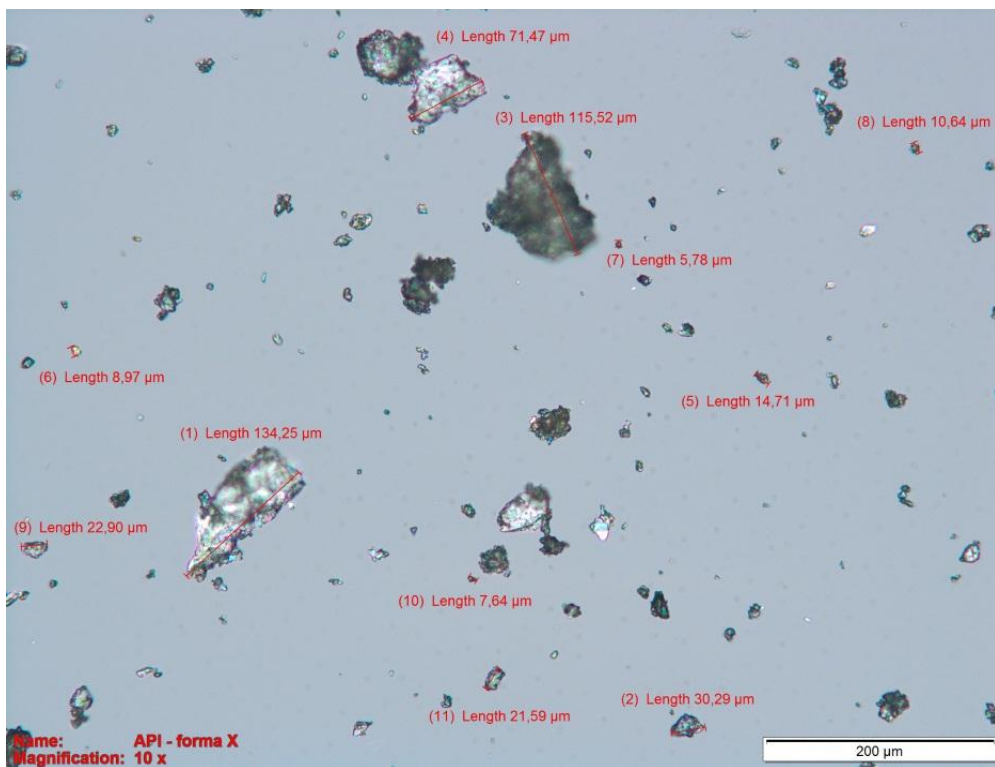
Na temelju testova higroskopsnosti forme X može se zaključiti da forma nije higroskopsna te da je polimorfno stabilna.

4.1.2. Morfološka svojstva forme X

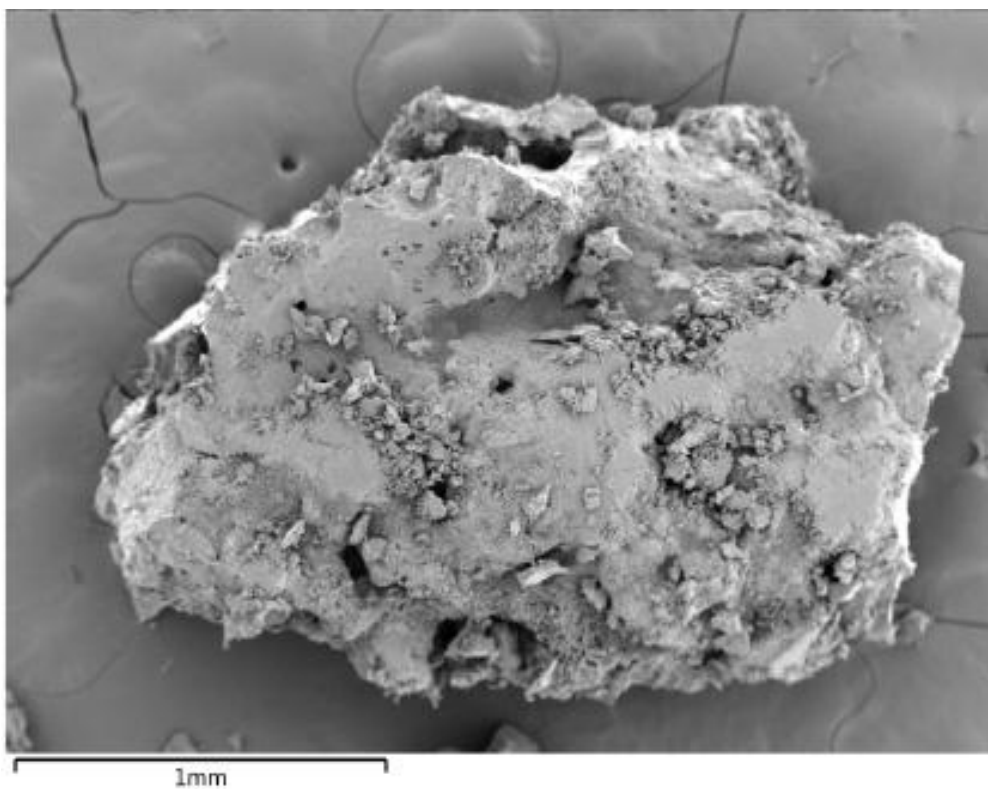
Morfološka svojstva forme X praćena su primjenom optičke (slike 16, 17) i SEM mikroskopije (slike 18–20). Rezultati pokazuju da formu X karakteriziraju čestice nepravilnog oblika, veličine primarnih čestica od 10 do 20 μm , uz prisutnost manjih (od 100 do 250 μm) i većih aglomerata (oko 1 mm).



Slika 16. Mikroskopska slika forme X - uvećanje 4 ×



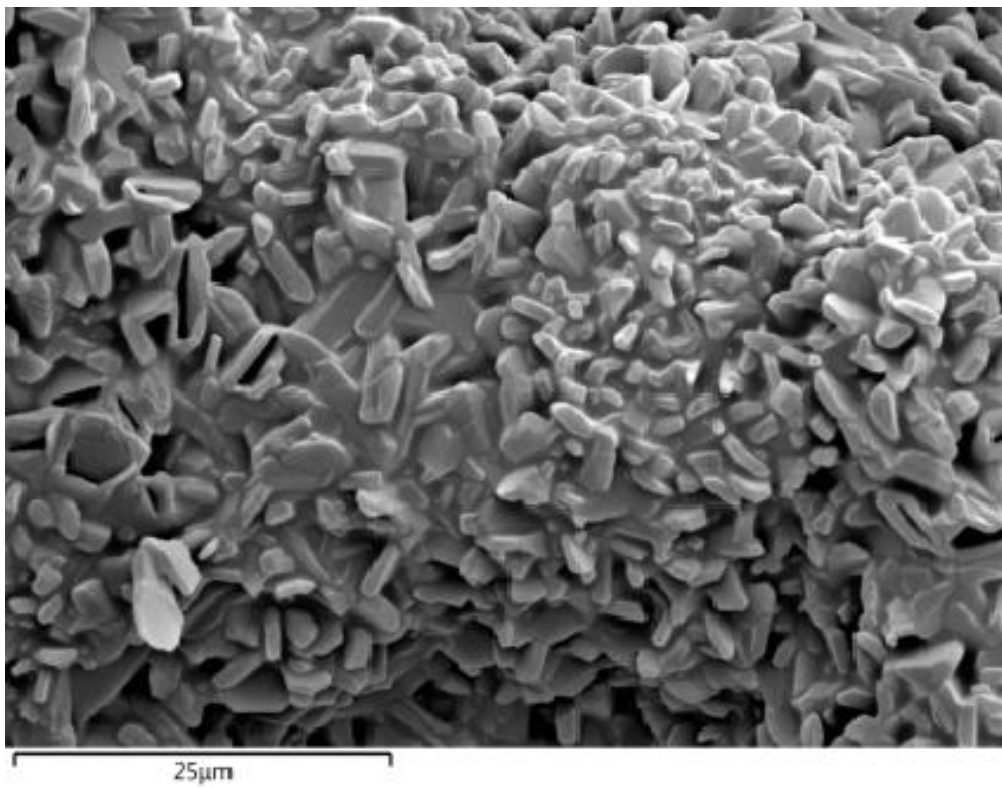
Slika 17. Mikroskopska slika forme X - uvećanje 10 ×



Slika 18. SEM slika forme X - uvećanje 50 ×



Slika 19. SEM slika forme X - uvećanje 500 ×



Slika 20. SEM slika forme X - uvećanje 2000 ×

4.1.3. Topljivost forme X u otopinama različitih kiselosti

Ispitivanje BCS klasifikacije topljivosti (tablica 3) forme X, miješanjem na 37 °C, pokazuje slabu topljivost u otopini HCl (0,1 M, pH = 1,2) i acetatnom puferu (50 mM, pH = 4,5), dok u fosfatnom puferu (50 mM, pH = 6,8) i vodi (pH = 6,4) pokazuje djelomičnu netopljivost.

Tablica 3. Ispitivanje topljivosti forme X u otopinama različitih kiselosti i BCS klasifikacija

Otopina	Početni pH	Konačni pH	Topljivost / mg ml ⁻¹	BCS klasifikacija
HCl (0,1 m)	1,20	6,88	25,85	slabo topljivo
Acetatni pufer (50 mM)	4,50	5,76	15,10	slabo topljivo
Fosfatni pufer (50 mM)	6,80	6,88	0,10	djelomično netopljivo
H ₂ O	6,40	6,59	0,00	djelomično netopljivo

4.1.4. Pretraživanje polimorfnih formi

Uzorak forme X izlagan je određenim otapalima u suspenziji na temperaturama od 10 i 25 °C te su promjene u formi praćene XRPD metodom nakon 1 i 7 dana izlaganja. Pokazalo se da su rezultati isti za obje temperature. Promjene u formi prikazane su u tablici 4. Također, uzorak forme X izlagan je i parama određenih otapala na temperaturi od 25 °C. Uzorci su analizirani XRPD metodom nakon 4 i 30 dana izlaganja te su rezultati (tablica 4) isti tokom različitog vremena izlaganja.

Forma X je polimorfno stabilna:

- tijekom izlaganja uzorka parama otapala (acetona, EtOH, H₂O, heksan, heptan, 2-BuOH),
- tijekom izlaganja uzorka suspenzijama s otapalima (heptan, heksan, H₂O, pentan), kroz 7 dana na 10 i 25 °C

Forma X je polimorfno je nestabilna:

- tijekom izlaganja uzorka parama otapala (MeOH, THF, DKM, i-BuOAc, MEK, kloroform, MTBE, toluen, 2-metil THF, *p*-ksilen, 1-BuOH)
- tijekom izlaganja uzorka suspenzijama s otapalima (acetone:H₂O (1:1), 1-BuOH:H₂O (1:1), *p*-ksilenom, petrolej eterom) kroz 7 dana na 10 i 25 °C

Izlaganje forme X parama otapala 2-metil THF-a, *p*-ksilena i *n*-BuOH-a, rezultiralo je nastankom solvatnih formi (Ya, Yb i Yc).

Tablica 4. Dobivene polimorfne forme izlaganjem uzorka forme X otapalima u suspenziji (10 i 25 °C, analiza nakon 1 i 7 dana) i parama otapala (25°C, XRPD analiza nakon 4 i 30 dana).

Suspenzije s otapalima		Izlaganje parama otapala	
Otapalo	Forma	Otapalo	Forma
heptan, heksan, H ₂ O, pentan	X	aceton, EtOH, H ₂ O, heksan, heptan, 2-BuOH	X
aceton: H ₂ O (1:1), aceton: H ₂ O (2:1), 1-BuOH: H ₂ O (1:1) 1-BuOH: H ₂ O (2:1)	amorf (otopljeno)	MeOH, THF, DKM, i-BuOAc, MEK, kloroform, MTBE, toluen	amorf
<i>p</i> -ksilen	Yb	2-metil THF	Ya
petrolej eter	smjesa amorfa, X i Ya	<i>p</i> -ksilen	Yb
		1-BuOH	Yc

4.1.5. Stabilnost forme X izlaganjem stres testovima i mehaničkim djelovanjima

Tablica 5. Stabilnost forme X izlaganjem povišenjim temperaturama, tlačnim silama, mljevenju u kugličnom mlinu i u tarioniku

Izlaganje	Trajanje / min	Uvjeti	Forma
Povišena temperatura	30	40 °C	X
	30	50 °C	X
	30	60 °C	smjesa X i amorfa
	30	70 °C	smjesa X i amorfa
	30	100 °C	amorf
Tlačne sile	5	3000 N	X
	5	5000 N	X
	5	10000 N	X
Mljevenje u tarioniku	1	normalno	X
	3	normalno	X
	5	normalno	X
	0,5	snažno	X
Mljevenje u tarioniku s kapljicom otapala	3	EtOH	X
	3	H ₂ O	X
	3	MeOH	X
	3	Heksan	X
	3	Aceton	X
Mljevenje u kugličnom mlinu	15	600 rpm uz 5 nitridnih kuglica	X
	30		X
	60		X
	120		X

U cilju izučavanja stabilnosti forme X, uzorci su podvrgnuti stres testovima prema tablici 5. Uočeno je kako je forma X je polimorfno stabilna (tablica 5) na temperaturama ispod temperatura taljenja ($< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), tijekom djelovanja tlačnih sila (3000, 5000 i 10000 N) u vremenu od 5 minuta, tijekom suhog mljevenja u tarioniku i mljevenja s otapalima (EtOH, MeOH, H₂O, heksan, aceton) te tijekom mljevenja u kugličnom mlinu kroz 4 sata.

4.2. Fizikalna karakterizacija amorfne forme

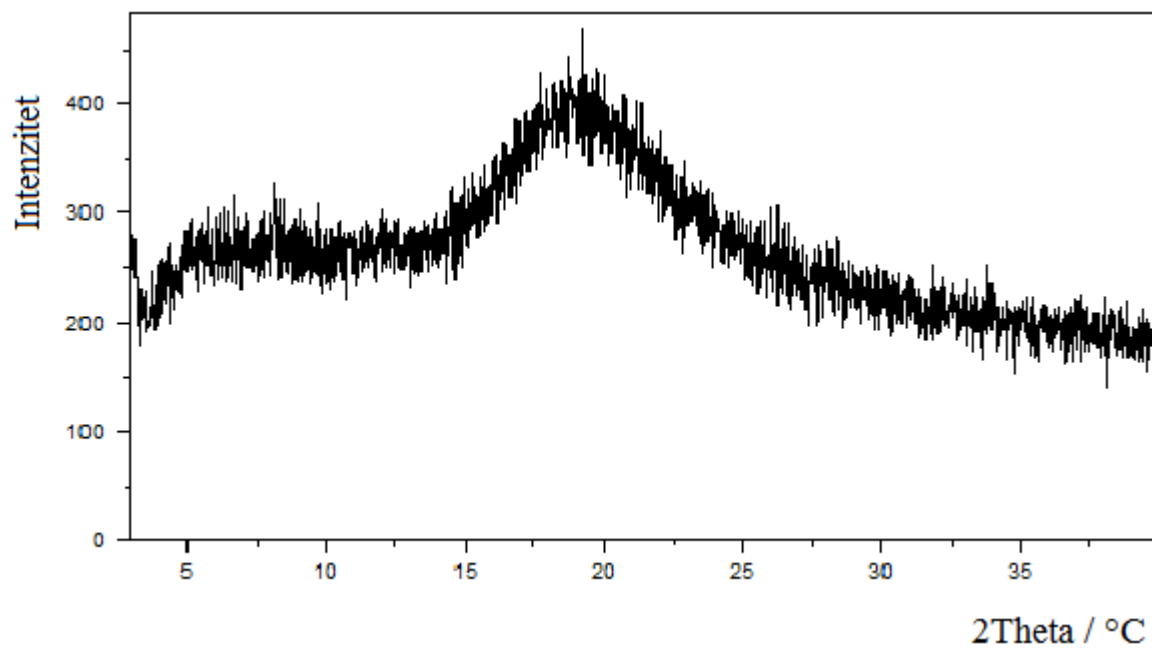
Amorfna forma API-ja dobivena je:

- zagrijavanjem forme X na DSC-u iznad točke taljenja ($T_m = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$) i brzim ($20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) ili sporim ($2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hlađenjem ispod temperature staklastog prijelaza (slika 21),
- grijanjem uzorka forme X na $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ u sušnici pod vakuumom, u vremenu 30 minuta, te spontanim hlađenjem na sobnu temperaturu (slika 21).

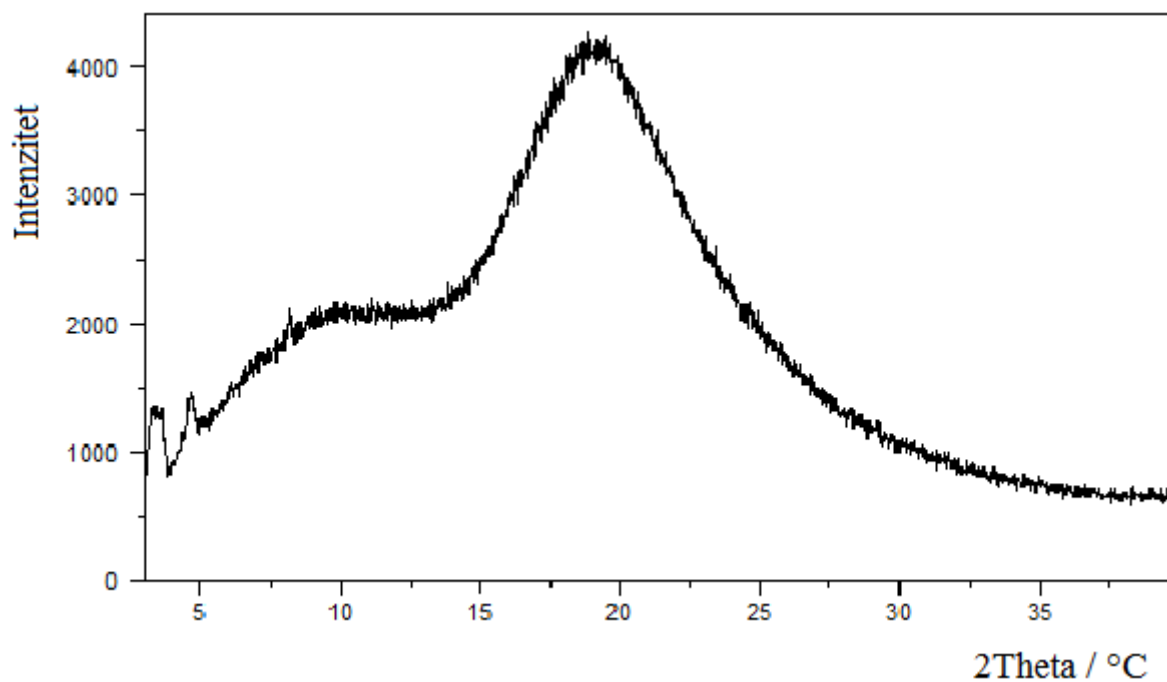
Amorfna forma također je uočena prilikom pretraživanja polimorfni formi forme X, tijekom pokusa izlaganja uzorka određenim otapalima:

- u suspenziji s otapalima: aceton:H₂O (u omjerima 1:1 i 2:1) i 1-BuOH:H₂O (u omjerima 1:1 i 2:1),
- u saunama s otapalima: metanol (MeOH), tetrahidrofuran (THF), diklormetan (DKM), *i*-butilacetat (*i*-BuOAc), metiletilketon (MEK), kloroform, metil terc-butil eter (MTBE), toluen.

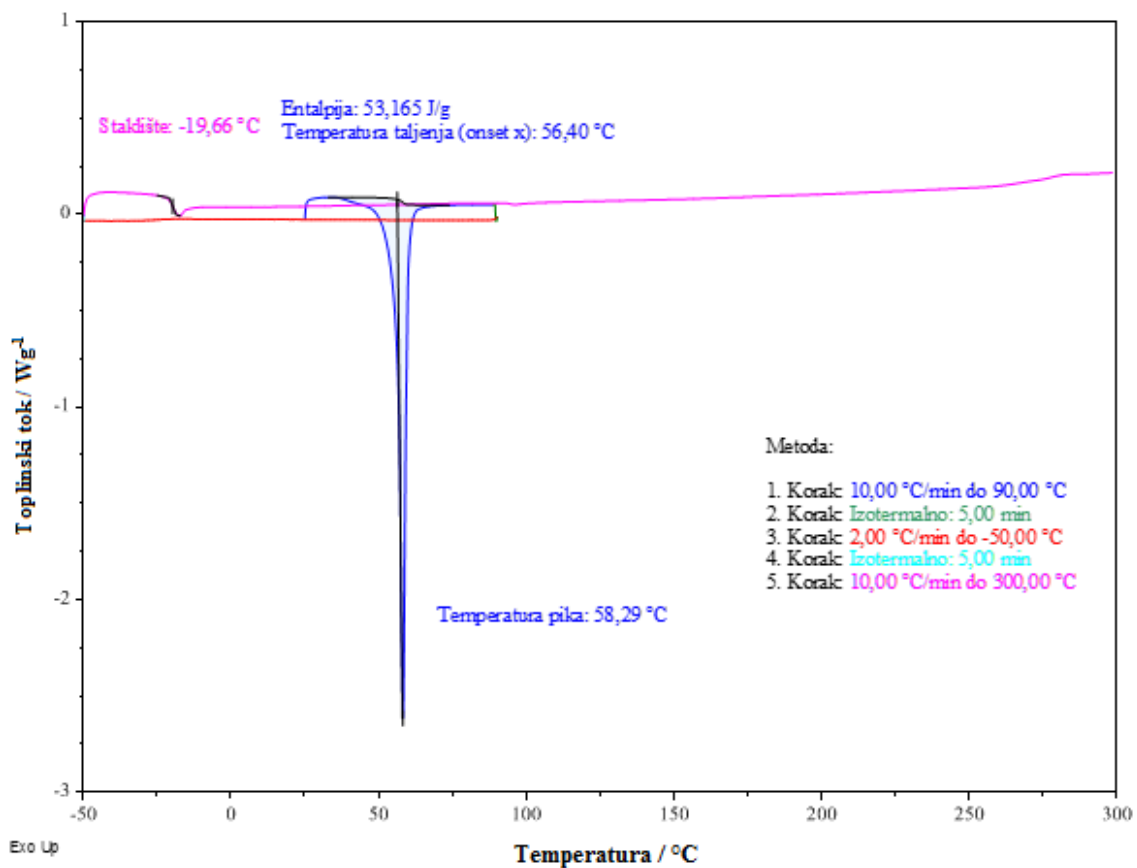
Amorfna forma dobivena zagrijavanjem iznad temperature taljenja u sušnici korištena je za pokuse fizikalne karakterizacije, stres testove te u eksperimentima pretraživanja polimorfni formi (izlaganje parama otapala i suspenzije s otapalima).



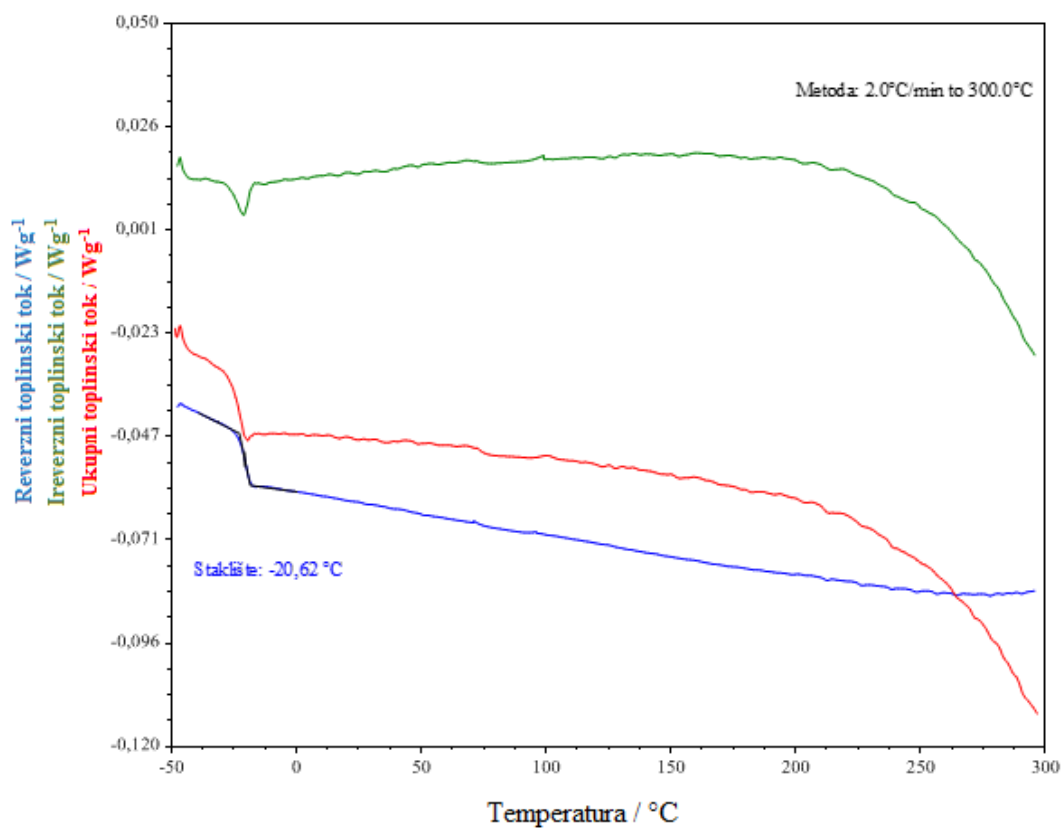
Slika 21. XRPD difraktogram amorfne forme dobivene grijanjem iznad točke taljenja te hlađenjem (2 °C/min) na DSC-u



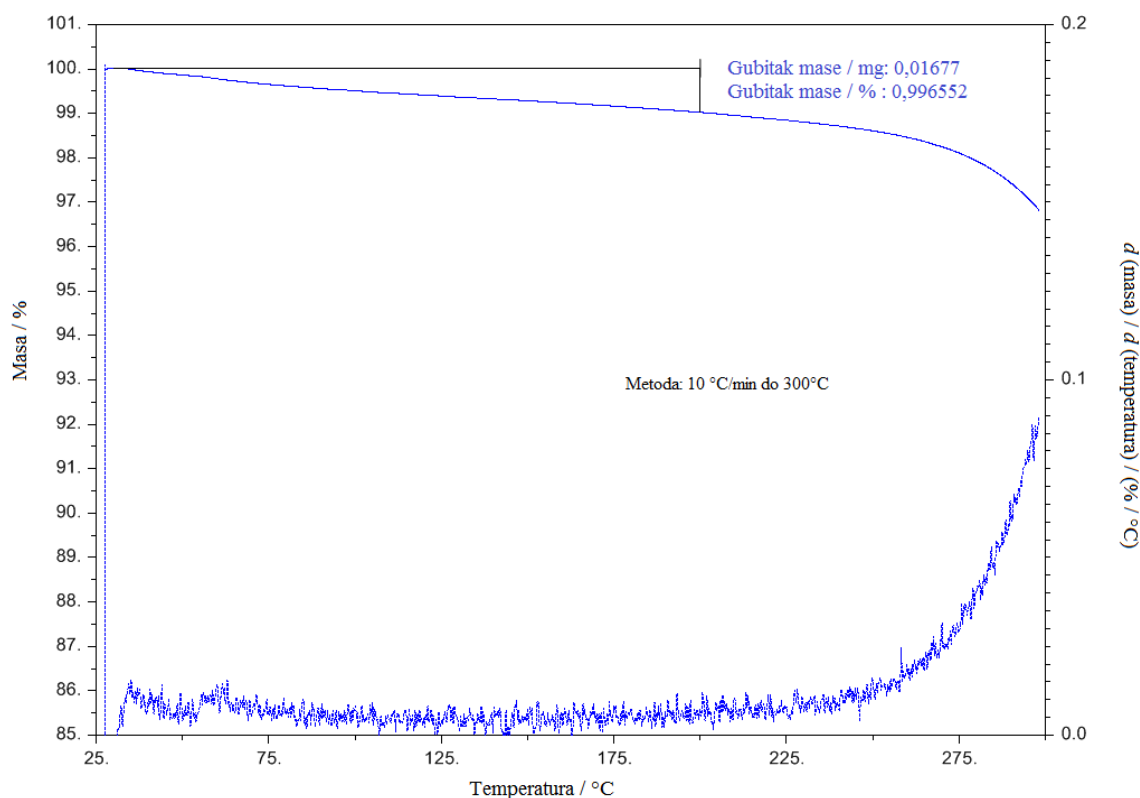
Slika 22. XRPD difraktogram amorfne forme dobivene grijanjem uzorka u sušnici iznad temperature taljenja (100 °C/30 min) te spontanim hlađenjem na sobnu temperaturu



Slika 23. Ciklički DSC termogram – prikaz dobivanja amorfne forme u DSC-u, postupkom zagrijavanja forme X iznad temperature taljenja te kontroliranim hlađenjem (2 °C/min)



Slika 24. MDSC termogram amorfne forme



Slika 25. TGA termogram amorfne forme dobivene grijanjem u sušnici na 100 °C/30 min

Rezultati cikličke DSC analize, prikazane na slici 23, pokazuju da je zagrijavanjem uzorka forme X iznad temperature taljenja te hlađenjem uzorka dobivena amorfna forma. U cilju preciznijeg praćenja staklastog prijelaza (bolja rezolucija mjerenja) uzorak amorfa sniman je naknadno primjenom MDSC analize koja se obično koristi za karakterizaciju amorfni materijala.

Primjenom modulirane DSC analize (slika 24) određena je temperatura staklastog prijelaza ($T_g = -20,62$ °C). Razlika u temperaturi staklastog prijelaza (od cca 1 °C) određena primjenom DSC i MDSC analize može se objasniti razlikom u brzini snimanja uzorka (10 °C/min u slučaju DSC te 2 °C/min u slučaju MDSC). Naime veća brzina grijanja uzorka, rezultira većim temperaturnim kašnjenjem u uzorku te za posljedice ima pomicanje temperature staklastog prijelaza prema višim vrijednostima.

4.2.1. Higroskopnost amorfne forme

Higroskopnost amorfne forme ispitivana je izlaganjem amorfne forme različitim uvjetima vlage u komorama na 25 °C u periodu od 7 dana. Uzorci su analizirani rendgenskom difrakcijom i TGA analizom (tablica 6).

Tablica 6. Promjene uslijed izlaganja vlažnoj atmosferi na temperaturi 25°C. RH predstavlja relativnu vlažnost atmosfere. Termogravimetrijski gubitak mase određen je uslijed zagrijavanja do 200 °C. Rendgenom je praćena stabilnost amorfne forme.

Vrijeme izlaganja		
7 dana		
RH / %	gubitak mase / %	stabilnost
0	1,00	100 % amorfna forma
20	0,46	100 % forma X
40	0,54	100 % forma X
60	0,52	100 % forma X
80	0,60	100 % forma X
100	0,94	100 % forma X

Higroskopnost amorfne forme testirana je i prema Europskoj farmakopeji, pri čemu je ravnotežni unos vode na 80% relativne vlažnosti, sobnoj temperaturi i vremenu od 24 h, iznosio 0,10%. Na temelju testova higroskopnosti amorfne forme može se zaključiti da je amorfna forma blago higroskopna i polimorfno nestabilna budući da na svim uvjetima vlage konvertira u formu X (tablica 6).

4.2.2. Morfološka svojstva čestica amorfne forme

Uzorak amorfne forme nije moguće analizirati optičkim mikroskopom niti SEM analizom jer uzorak nije praškastog oblika, već ima viskozna i ljepljiva svojstva.

4.2.3. Topljivosti amorfne forme u otopinama različite kiselosti

Ispitivanje BCS klasifikacije topljivosti (tablica 7) amorfne forme na 37 °C pokazuje slabu topljivost u otopini HCl (0,1 M, pH = 1,2) i acetatnom puferu (50 mM, pH = 4,5), dok u fosfatnom puferu (50 mM, pH = 6,8) i vodi (pH = 6,4) pokazuje djelomičnu netopljivost.

Tablica 7. Ispitivanje topljivosti forme X u otopinama različitih kiselosti i BCS klasifikacija

Otopina	Početni pH	Konačni pH	Topljivost / mg ml ⁻¹	BCS klasifikacija
HCl (0,1 m)	1,20	4,21	19,35	slabo topljivo
Acetatni pufer (50 mM)	4,50	4,86	4,90	slabo topljivo
Fosfatni pufer (50 mM)	6,80	6,90	0,25	djelomično netopljivo
H ₂ O	6,40	6,39	0,00	djelomično netopljivo

4.2.4. Pretraživanje polimorfnih formi

Prilikom pretraživanja polimorfnih oblika, izlaganjem amorfnе forme API-ja otapalima u suspenziji i parama određenih otapala, rezultati (tablica 8) su pokazali da amorfnа forma nije stabilna te da konvertira u formu X već nakon kraćeg vremena izlaganja.

Tablica 8. Dobivene polimorfne forme izlaganjem amorfnе forme otapalima u suspenziji (25 °C, XRPD analiza nakon 1 i 7 dana) i parama otapala (25 °C, XRPD analiza nakon 7 i 30 dana)

Suspenzije s otapalima		Izlaganje parama otapala	
Otapalo	Forma	Otapalo	Forma
pentan	X	EtOH	X
petrolej eter		DMSO	
heksan		H ₂ O	
heptan		heptane	
H ₂ O		hexane	
		2-BuOH	

4.2.5. Ispitivanje stabilnosti izlaganjem stresnim i mehaničkim uvjetima

U cilju izučavanja stabilnosti amorfnе forme uzorci su podvrgnuti stres testovima prema tablici 9. Rezultati su pokazali da je amorfnа forma vrlo nestabilna na svim stres testovima te konvertira u formu X ili smjesu forme X i amorfa.

Tablica 9. Stabilnost amorfnе forme izlaganjem povišenim temperaturama, povišenom tlaku te mljevenjima u tarioniku i kugličnom mlinu

Izlaganje	Trajanje / min	Uvjeti	Forma
Povišena temperatura	30	40 °C	smjesa X i amorfa
	30	50 °C	smjesa X i amorfa
	30	60 °C	smjesa X i amorfa
	30	70 °C	amorf
	30	100 °C	amorf
Tlačne sile	5	3000 N	X
	5	5000 N	X
	5	10000 N	X
Mljevenje u tarioniku	1	normalno	X
	3	normalno	X
	5	normalno	X
	0,5	snažno	X
Mljevenje u tarioniku s kapljicom otapala	3	EtOH	X
	3	H ₂ O	X
	3	MeOH	X
	3	Heksan	X
	3	Aceton	X
Mljevenje u kugličnom mlinu	15	600 rpm uz 5 nitridnih kuglica	smjesa X i amorfa
	30		smjesa X i amorfa
	60		smjesa X i amorfa
	120		smjesa X i amorfa

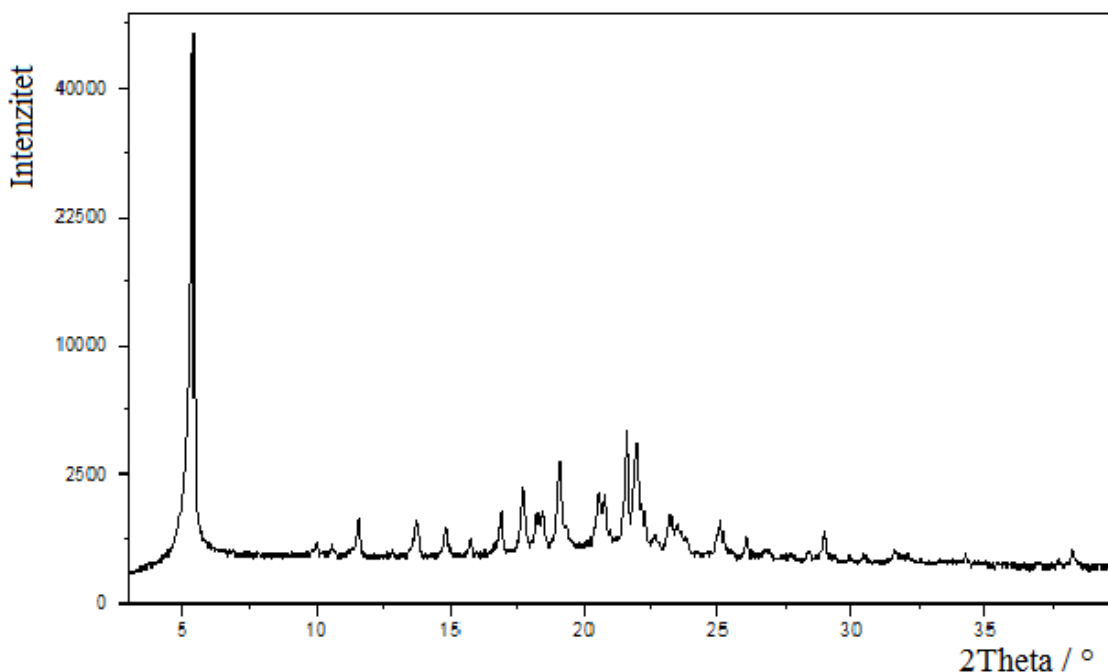
4.3. Fizikalna karakterizacija solvatnih formi

Prilikom pretraživanja novih formi API-ja, pronađene su tri solvatne forme: 2-metil tetrahidrofuran solvat (forma Ya), *p*-ksilen solvat (forma Yb) i *n*-butanol solvat (forma Yc).

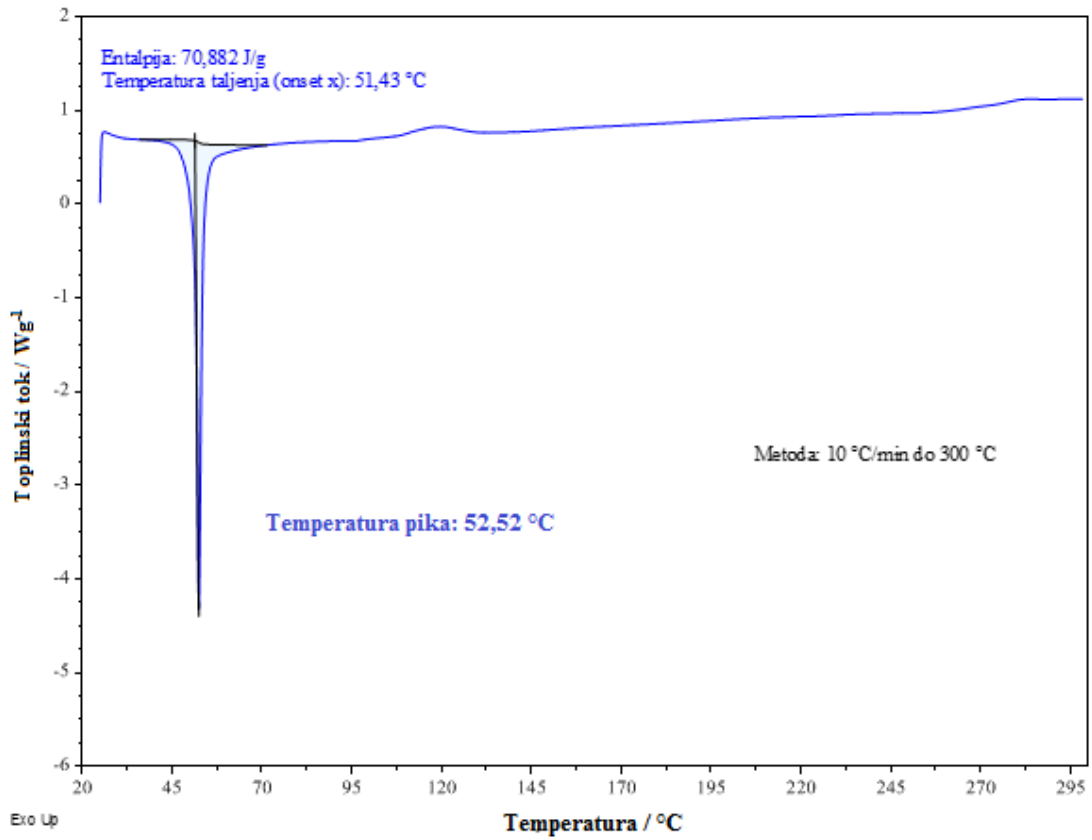
4.3.1. Forma Ya

API forma Ya sastoji se od API-ja i 2-metil tetrahidrofurana (2-metil THF), a dobivena je tijekom pretraživanja polimorfnih formi:

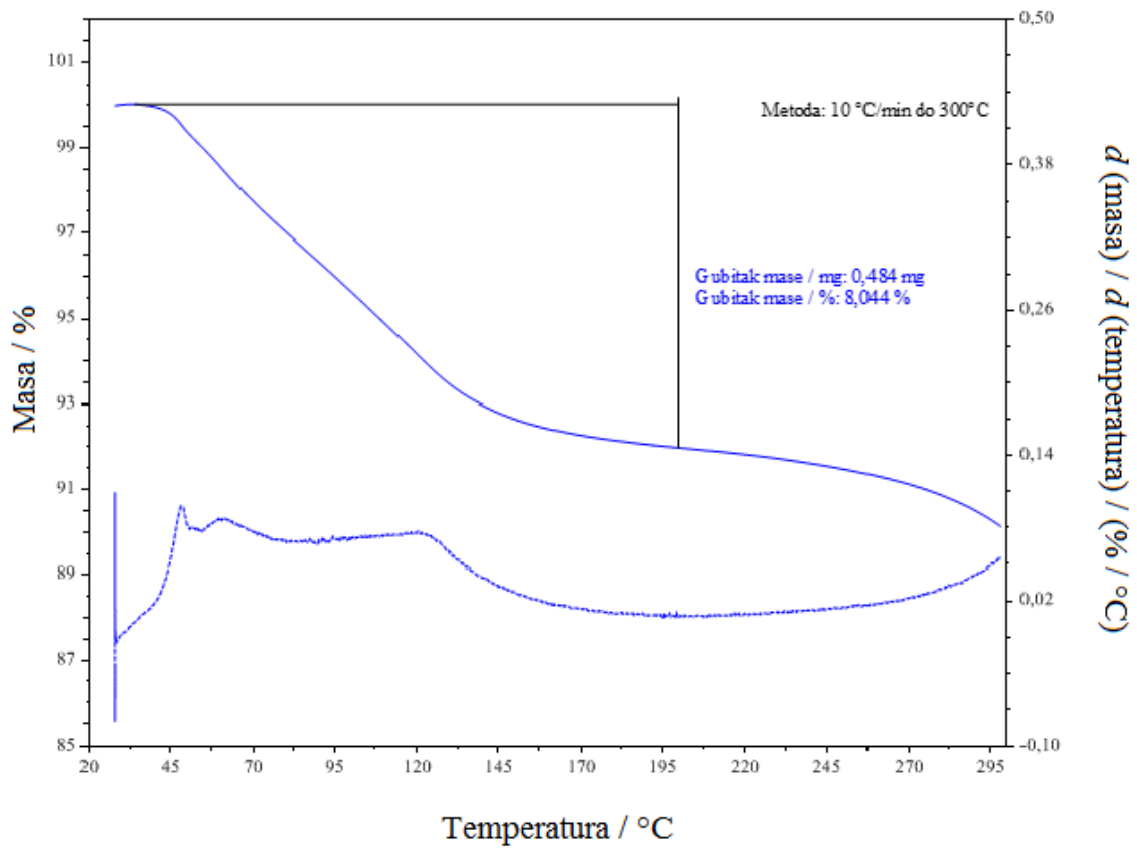
- izlaganjem uzorka forme X ($m = 100$ mg) parama otapala 2-metil THF-a ($V = 5$ ml) na sobnoj temperaturi u vremenu od 4 dana. Forma je dokazana XRPD analizom (slika 26).
- sporom evaporacijom, pri čemu je 20 mg forme X izvavano u staklenu bočicu te otopljeno dodavanjem 2,5 ml petrolej etera pri sobnoj temperaturi, uz miješanje na Vortex miješalici. Staklena bočica je zatim lagano zatvorena kako bi se osiguralo sporo isparavanje otapala. Nakon 7 dana uočena je kristalizacija uzorka.
- naglim hlađenjem otopine uzorka. Uzorak forme X ($m = 40$ mg) otopljen je u 1 ml acetona uz miješanje (300 rpm) na temperaturi vrelišta otapala. Potom je otopina naglo hladena u kupelji na temperaturu od -15 °C. Uočena je smjesa forme X i forme Ya. Istom procedurom, no sa diklormetanom, također je dobivena smjesa forme X i Ya.



Slika 26. XRPD difraktogram forme Ya



Slika 27. DSC termogram forme Ya



Slika 28. TGA termogram forme Ya

Rezultati DSC i TGA analize (slika 27 i 28) forme Ya potvrđuju da je riječ o solvatnoj formi s desolvatacijom u temperaturnom području od 50 do 175 °C te taljenjem ($T_{m(\text{onset})}$) oko 52,52 °C. TGA termogram pokazuje ukupni gubitak mase od 8,04% do 200 °C, no vidljivo je da se proces desolvatacije odvija u dva djelomično preklopljena koraka. Na temelju usporedne DSC i TGA rezultata solvatne forme Ya i forme X, očito je da je tijekom desolvatacije došlo do konverzije solvatne forme Ya u bezvodnu formu X, praćene razgradnjom na temperaturama iznad 220°C.

4.3.1.1. Higroskopnost forme Ya

U cilju proučavanja higroskopskih svojstava i polimorfne stabilnosti API-ja, forme Ya u ovisnosti o različitim uvjetima relativne vlažnosti, uzorak je izložen različitim uvjetima vlage na 25 °C, u periodu od 7 i 30 dana. Uzorci su analizirani rendgenskom difrakcijom i TGA analizom nakon 7 i 30 dana, prema tablici 10.

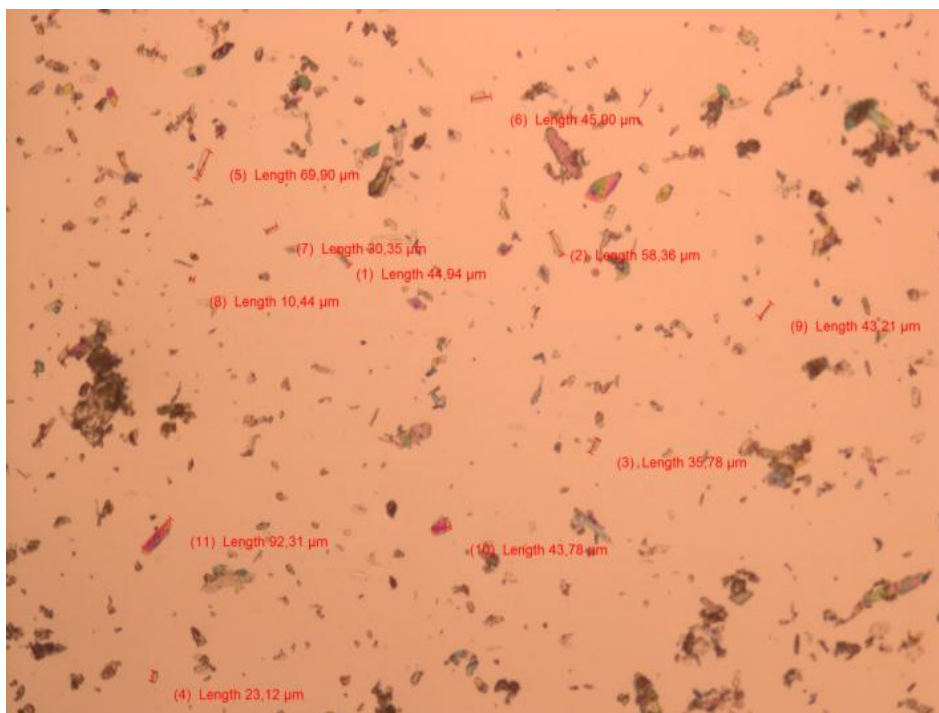
Tablica 10. Promjene uslijed izlaganja vlažnoj atmosferi na temperaturi 25 °C. RH predstavlja relativnu vlažnost atmosfere. Termogravimetrijski gubitak mase određen je uslijed zagrijavanja do 200 °C, nakon 7 dana izlaganja. Rendgenom je praćena stabilnost forme Ya nakon izlaganja u vremenu od 7 i 30 dana.

		Vrijeme izlaganja	
		7 dana	30 dana
RH / %	gubitak mase / %	stabilnost	stabilnost
0	8,04	100% forma Ya	100% forma Ya
20	3,70	50% X + 50% Ya	90% X + 10% Ya
40	2,79	70% X + 30% Ya	90% X + 10% Ya
60	3,65	80% X + 20% Ya	90% X + 10% Ya
80	3,40	70% X + 30% Ya	90% X + 10% Ya
100	1,90	90% X + 10% Ya	100% forma X

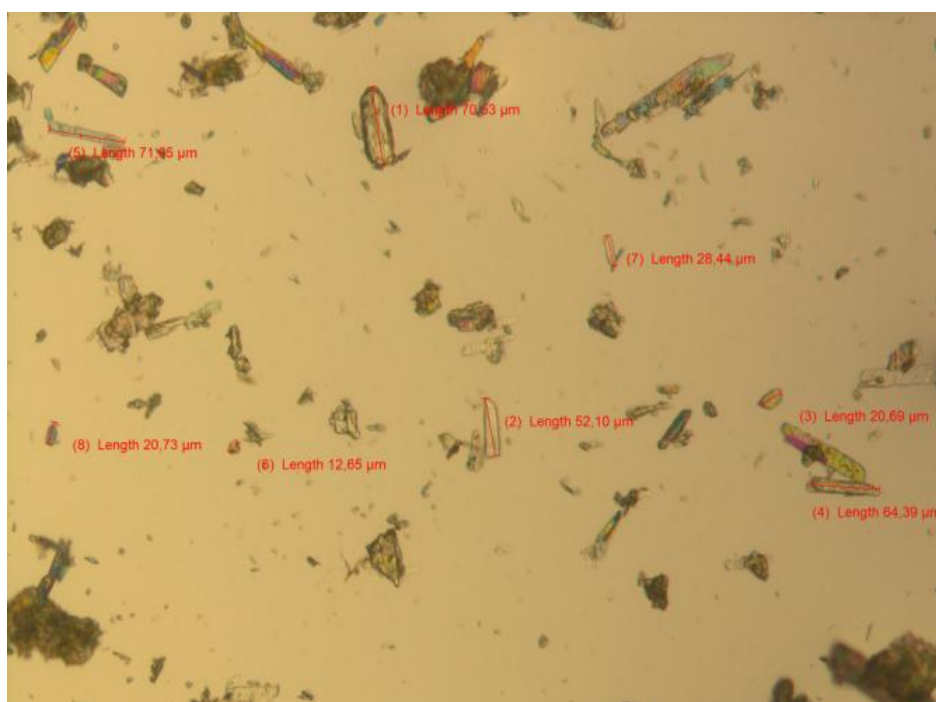
Na temelju testova higroskopnosti forme Ya može se zaključiti da je forma higroskopna i polimorfno nestabilna, budući da već nakon 7 dana na svim uvjetima vlage konvertira u smjesu forme X i forme Ya. S povećanjem postotka relativne vlažnosti konverzija u formu X je brža (primjerice uzorak sa 20% relativne vlažnosti nakon 30 dana pokazuje smjesu forme X i forme Ya sa većim udjelom forme X, dok uzorak sa 100% relativne vlažnosti u istom vremenskom razdoblju pokazuje potpunu konverziju u formu X).

4.3.1.2. Morfologija čestica forme Ya

Morfološka svojstva forme Ya praćena su primjenom optičke mikroskopije (slike 29 i 30). Formu Ya karakteriziraju čestice nepravilnog oblika, veličine između 10 i 90 µm.



Slika 29. Mikroskopska slika forme Ya - uvećanje 4 ×



Slika 30. Mikroskopska slika forme Ya - uvećanje 10 ×

4.3.1.3. Stabilnost forme Ya izlaganjem stresnim i mehaničkim uvjetima

Uzorak forme Ya podvrgnut je određenim stresnim i mehaničkim uvjetima (tablica 11) te rezultati pokazuju da je forma nestabilna i konvertira u formu X:

- spontano na sobnoj temperaturi
- desolvatacijom na 35 °C u vremenu od 30 minuta
- mljevenjem u tarioniku u vremenu do 5 minuta te snažnim mljevenjem tijekom 30 sekundi

Tablica 11. Stabilnost forme Ya izlaganjem povišenim temperaturama i mljevenju u tarioniku

Izlaganje	Trajanje / min	Uvjeti	Forma
Povišena temperatura	30	25 °C	X
	30	35 °C	X
Mljevenje u tarioniku	1	normalno	X
	3	normalno	X
	5	normalno	X
	0,5	snažno	X

4.3.1.4. Pretraživanje polimorfnih oblika forme Ya

Tablica 12. Polimorfne forme nastale izlaganjem Ya parama otapala (25°C, XRPD analiza nakon 4 i 30 dana)

Izlaganje parama otapala	
Otapalo	Forma
DMSO, 1-BuOH, heptan, heksan, 2-BuOH	forma Ya
H ₂ O, MTBE	forma X
toluen	amorfna forma
Aceton, MIBK, MeOH, 2-metil THF, DKM, MEK, kloroform	Otopljeno, nakon isparavanja otapala konverzija u formu X

Pretraživanje polimorfnih oblika forme Ya provedeno je izlaganjem uzorka forma Ya parama otapala u vremenu od 4 i 30 dana na sobnoj temperaturi. Rezultati (tablica 12) pokazuju da je forma Ya stabilna prilikom izlaganja parama otapala dimetilsulfoksida (DMSO), 1-butanola, heptana, heksana i 2-butanola, a nestabilna izlaganjem parama ostalih otapala kao što su:

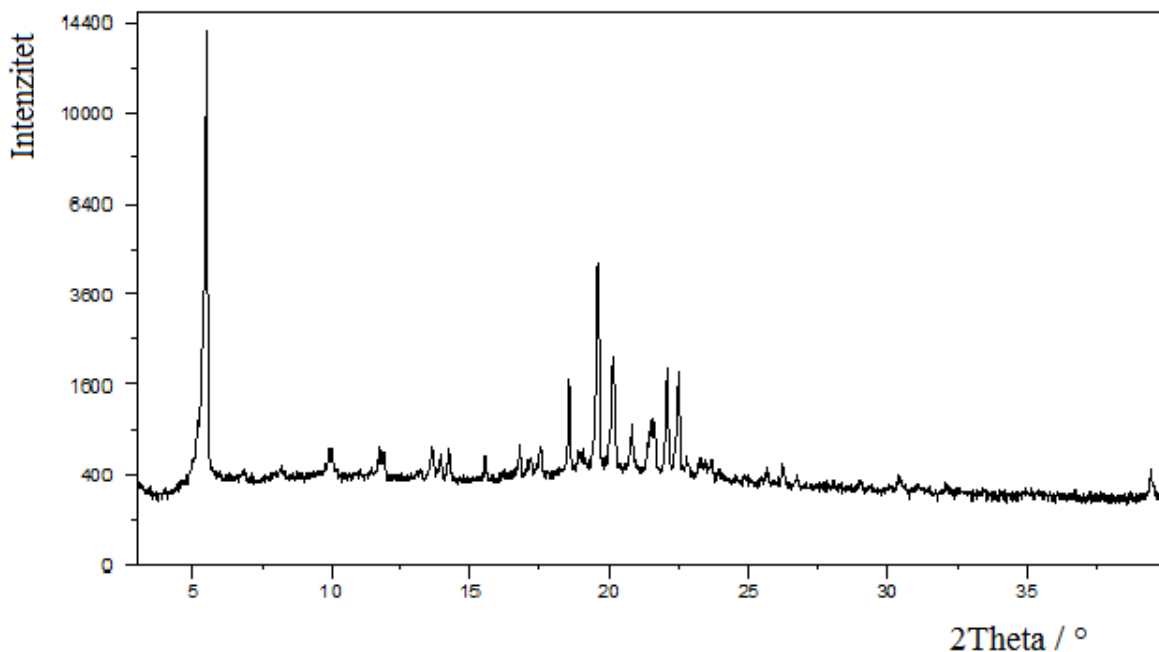
- H₂O, MTBE, gdje dolazi do konverzije u formu X

- Toluen, gdje dolazi do konverzije u amorfnu formu
- aceton, MIBK, MeOH, 2-metil THF, DKM, MEK, kloroform – otapanje, a nakon isparavanja otapala dolazi do konverzije u formu X

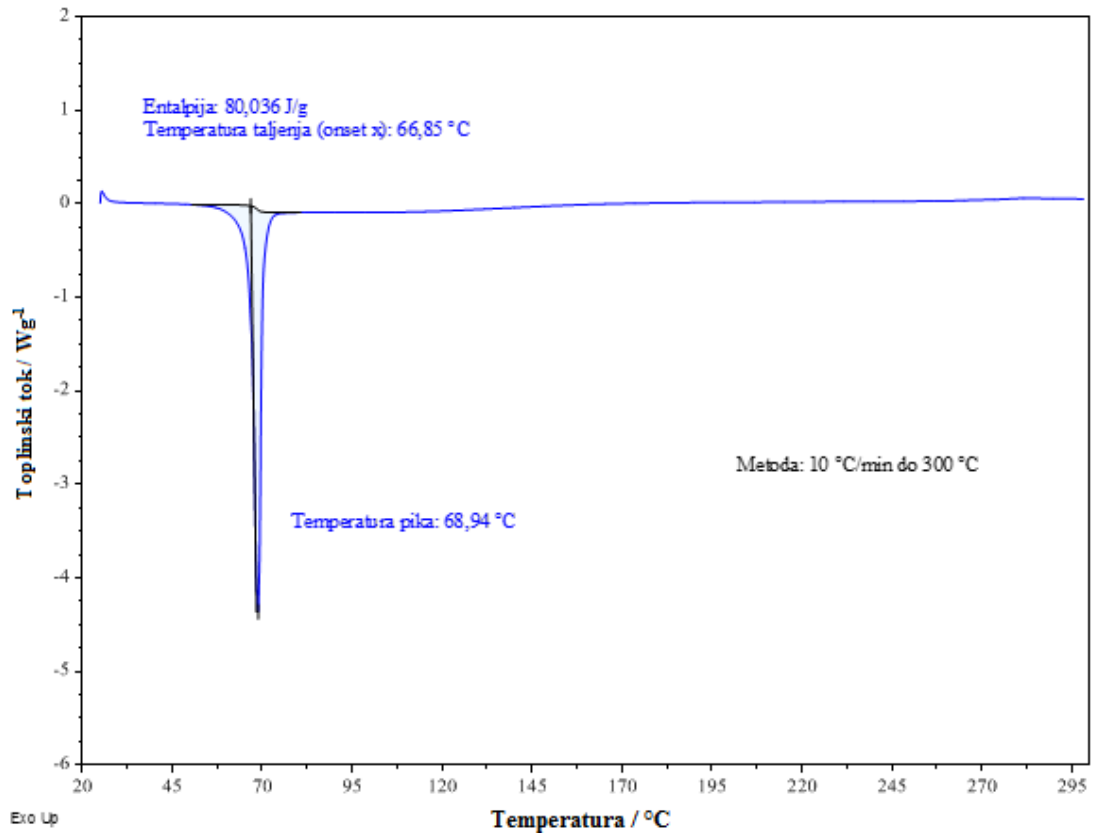
4.3.2. Forma Yb

Forma Yb sastoji se od API-ja i *p*-ksilena, a dobivena je na različite načine:

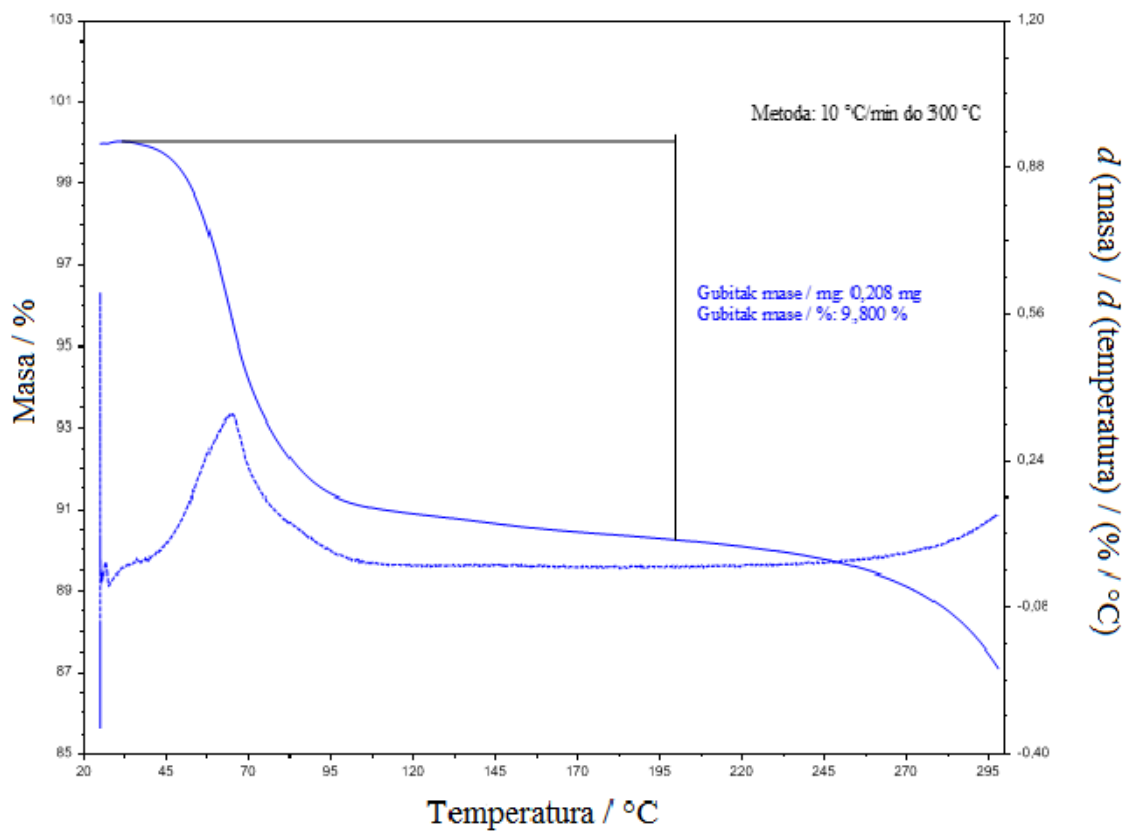
- U pokusu spore evaporacije. Uzorak forme X ($m = 20$ mg) otopljen je u 1 ml *p*-ksilena na temperaturi refluksa te je otopina zatim postepeno ohlađena do sobne temperature i ostavljena u otvorenoj bočici da lagano isparava. Nakon 24 dana, uočena je kristalizacija te je XRPD analizom dokazana forma Yb, slika 31. Isti postupak ponovljen je na većoj skali (200 mg uzorka i 10 ml *p*-ksilena) te je također dobivena forma Yb, čime se dokazala ponovljivost.
- U pokusu izlaganja uzorka smjese forme X ($m = 50$ mg) parama otapala *p*-ksilena ($V = 2,5$ ml), na sobnoj temperaturi. Nakon 7 dana izlaganja uzorak je analiziran XRPD analizom čime je dokazana forma Yb.



Slika 31. XRPD difraktogram forme Yb



Slika 32. DSC termogram forme Yb



Slika 33. TGA termogram API - forme Yb

Rezultati DSC i TGA analize (slika 32 i 33) forme Yb potvrđuju da je forma Yb solvatna forma sa desolvatacijom u temperaturnom području od 50 do 175 °C te taljenjem (T_m (onset)) oko 66,85 °C. TGA termogram pokazuje ukupni gubitak mase od 9,80% do 200 °C. Na temelju usporedbe DSC i TGA rezultata solvatne forme Yb i bezvodne forme X, očito je da je tijekom desolvatacije došlo do konverzije solvatne forme Yb u bezvodnu formu X, praćene razgradnjom na temperaturema iznad 220 °C.

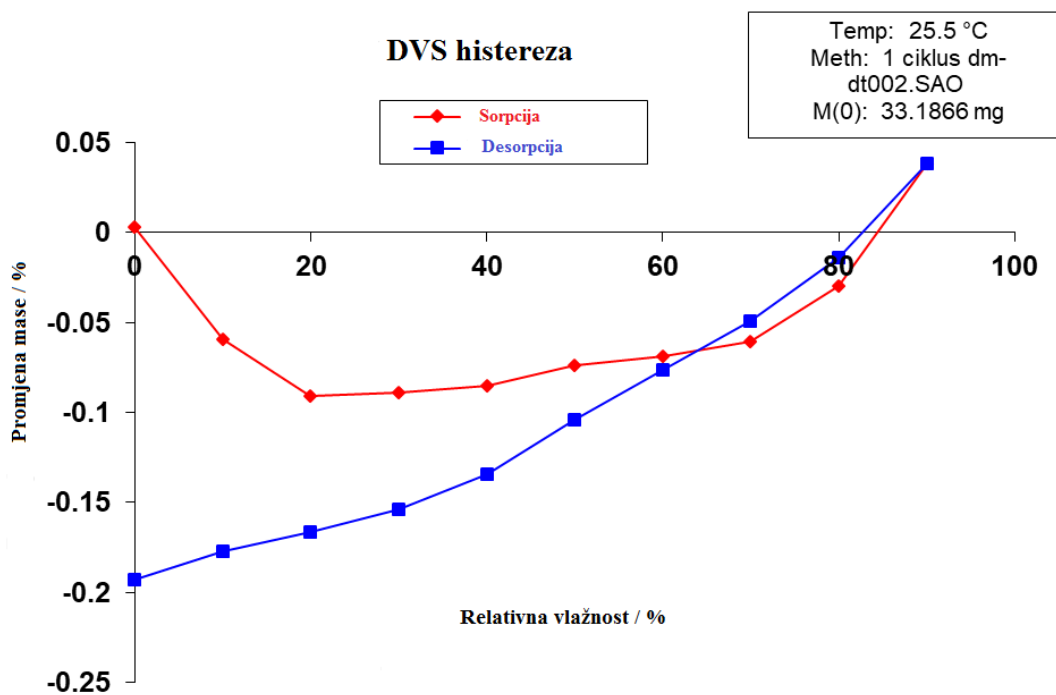
4.3.2.1. Higroskopnost forme Yb

Higroskopnost forme Yb ispitivana je izlaganjem forme Yb različitim uvjetima relativne vlažnosti u komorama te primjenom DVS-a.

Tablica 13. Promjene uslijed izlaganja vlažnoj atmosferi na temperaturi 25°C. RH predstavlja relativnu vlažnost atmosfere. Termogravimetrijski gubitak mase određen je uslijed zagrijavanja do 200 °C. Rendgenom je praćena stabilnost forme Yb nakon izlaganja u vremenu od 7 dana.

Vrijeme izlaganja		
7 dana		
RH / %	gubitak mase / %	stabilnost
0	9,80	100 % forma Yb
20	7,26	50% X + 50% Yb
40	7,56	50% X + 50% Yb
60	7,70	50% X + 50% Yb
80	6,13	50% X + 50% Yb
100	7,71	50% X + 50% Yb

Tijekom DVS eksperimenta povećanje mase uzorka (sorpcija vlage) na 80% RH iznosi 0,02% (slika 34). Proces apsorpcije vlage je ireverzibilan. Nakon smanjenja postotka vlažnosti (ciklusa desorpcije) došlo je do promjene polimorfne oblika, odnosno konverzije solvatne forme Yb u bezvodnu formu X.



Slika 34. DVS histereza forme Yb

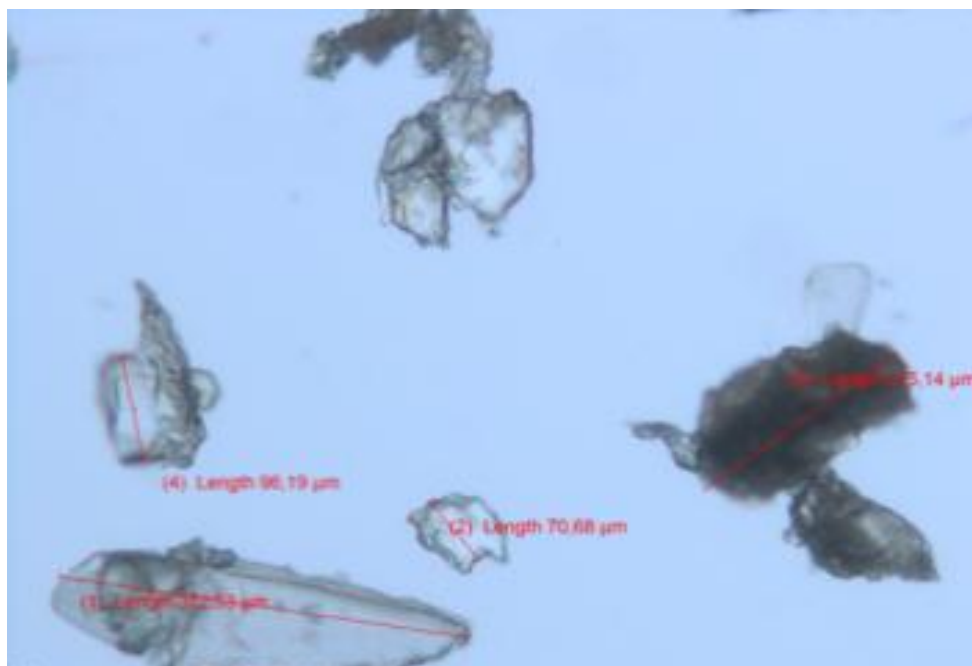
Temeljem testova higroskopnosti i stabilnosti API-a forme Yb (tablica 13, slika 34), može se zaključiti da je forma Yb nehigroskopna i polimorfno nestabilna.

4.3.2.2. Morfološka svojstva čestica forme Yb

Morfološka svojstva forme Yb izučavana su primjenom optičke mikroskopije (slike 35 i 36). Utvrđeno je da formu karakteriziraju čestice od 50 do 300 μm , nepravilnog oblika.



Slika 35. Mikroskopska slika forme Yb - uvećanje 4 ×



Slika 36. Mikroskopska slika forme Yb - uvećanje 10 ×

4.3.2.3. Stabilnost forme Yb izlaganjem stresnim i mehaničkim uvjerima

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 14, vidljivo je da je forma Yb je polimorfno nestabilna desolvatacijom na 30 i 40 °C u vremenu od 30 minuta gdje prelazi u smjesu formi X i Yb te mljevenjem u tarioniku kroz različita vremenska razdoblja (1, 3 i 5 minuta) gdje prelazi u smjesu formi X i Yb.

Tablica 14. Stabilnost forme Yb u ovisnosti o temperaturi i mljevenju u tarioniku

Izlaganje	Trajanje / min	Uvjeti	Forma
Povišena temperatura	30	30 °C	Yb
	30	40 °C	Smjesa formi Yb i X
Mljevenje u tarioniku	1	normalno	Smjesa formi Yb i X
	3	normalno	Smjesa formi Yb i X
	5	normalno	Smjesa formi Yb i X
	0,5	snažno	Smjesa formi Yb i X

4.3.2.4. Pretraživanje polimorfnih oblika forme Yb

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 15, vidljivo je da je forma Yb je polimorfno nestabilna:

- u suspenziji s vodom, te u otapalima: petrolej eteru, pentanu, heksanu, heptane pri 10 i 25 °C prelazi u smjesu forme X i forme Yb,
- izlaganjem parama otapala u vremenu od 4 dana na sobnoj temperaturi:
 - u H₂O, heksanu, heptanu, DMSO, anisolu prelazi u smjesu forme X i Yb,

- u EtOH prelazi u amorfnu formu,
- u 1-BuOH prelazi u formu Yc , dok u se otapa u otapalima: acetonu, MeOH, THF, 2-metil THF, MIBK, DKM, i-butil acetatu, MEK, MTBE, toluenu, kloroformu, te 2-BuOH.

Tablica 15. Dobivene polimorfne forme izlaganjem forme Yb parama otapala (25 °C, XRPD analiza nakon 4 dana) i otapalima u suspenziji (10 i 25 °C , XRPD analiza nakon 1 dana)

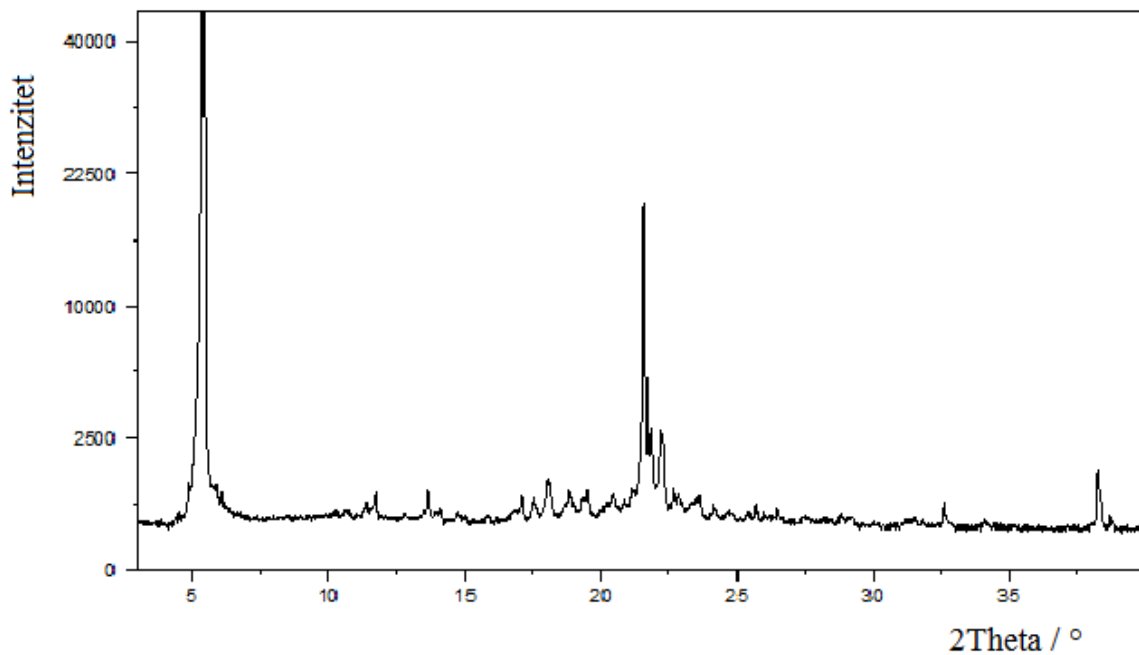
Suspenzije s otapalima		Izlaganje parama otapala	
Otapalo	Forma	Otapalo	Forma
1-BuOH : H ₂ O (1:1), 1-BuOH : H ₂ O (2:1), Aceton: H ₂ O (1:1), aceton:H ₂ O (2:1), heksan, mesitilen	amorfna forma	H ₂ O, heksan, heptan, DMSO, anisol	smjesa amorfa, forme X i forme Yb
H ₂ O, petrolej eter, pentan, heksan, heptan	smjesa amorfa, forme X i forme Yb	EtOH apsolutni, EtOH 96%, aceton, MeOH, THF, 2-metil THF, MIBK, DKM, i-butil acetat, MEK, MTBE, toluen, kloroform, 2-BuOH	amorfna forma
		1-BuOH	forma Yc

4.3.3. Forma Yc

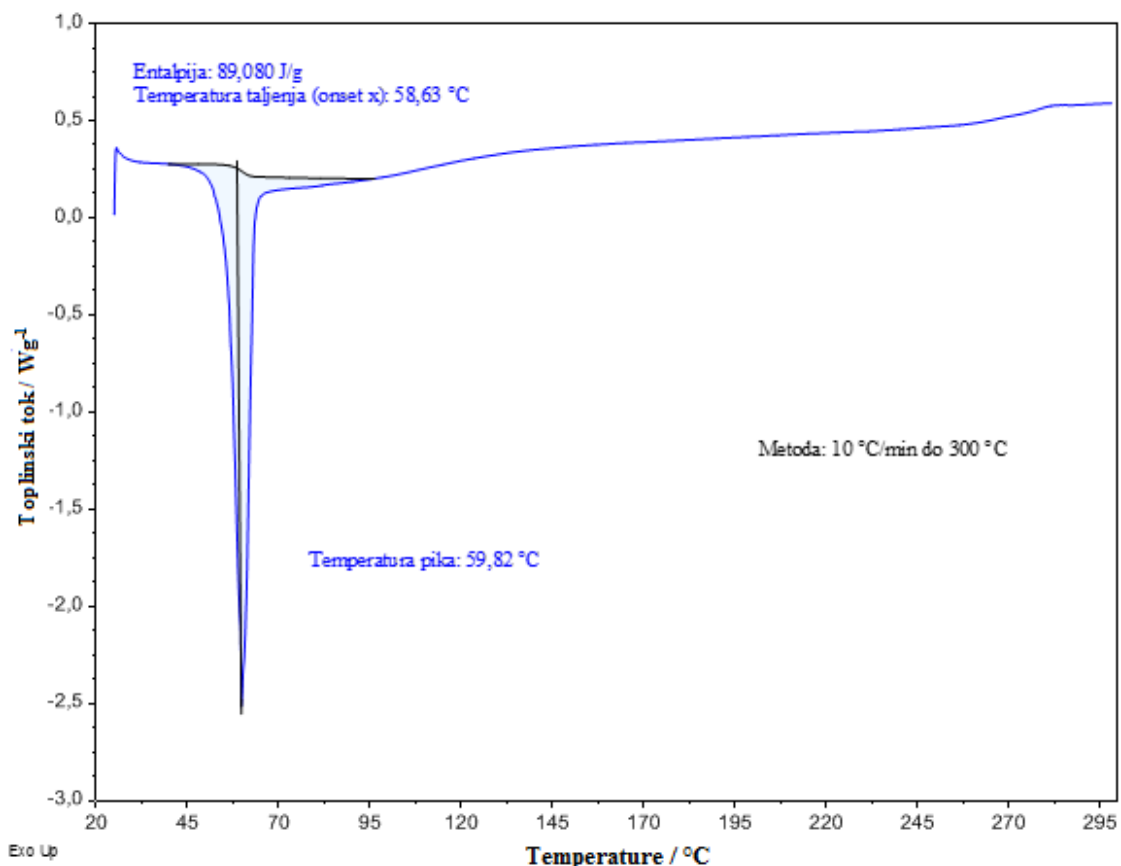
Forma Yc sastoji se od API-ja i *n*-butanola, a dobivena je na različite načine:

- U pokusu spore evaporacije. Uzorak forme X ($m = 20$ mg) otopljen je u 1 ml *n*-butanola (*n*-BuOH) na temperaturi refleksa te je otopina zatim postepeno ohlađena na sobnu temperaturu te ostavljena u otvorenoj bočici da lagano isparava. Nakon 35 dana uočena je kristalizacija te je XRPD analizom dokazana forma Yc, slika 37. Isti postupak ponovljen je na većoj skali (200 mg uzorka i 10 ml *n*-BuOH) , pri istim uvjetima te je također dobivena forma Yc, čime se dokazala ponovljivost.

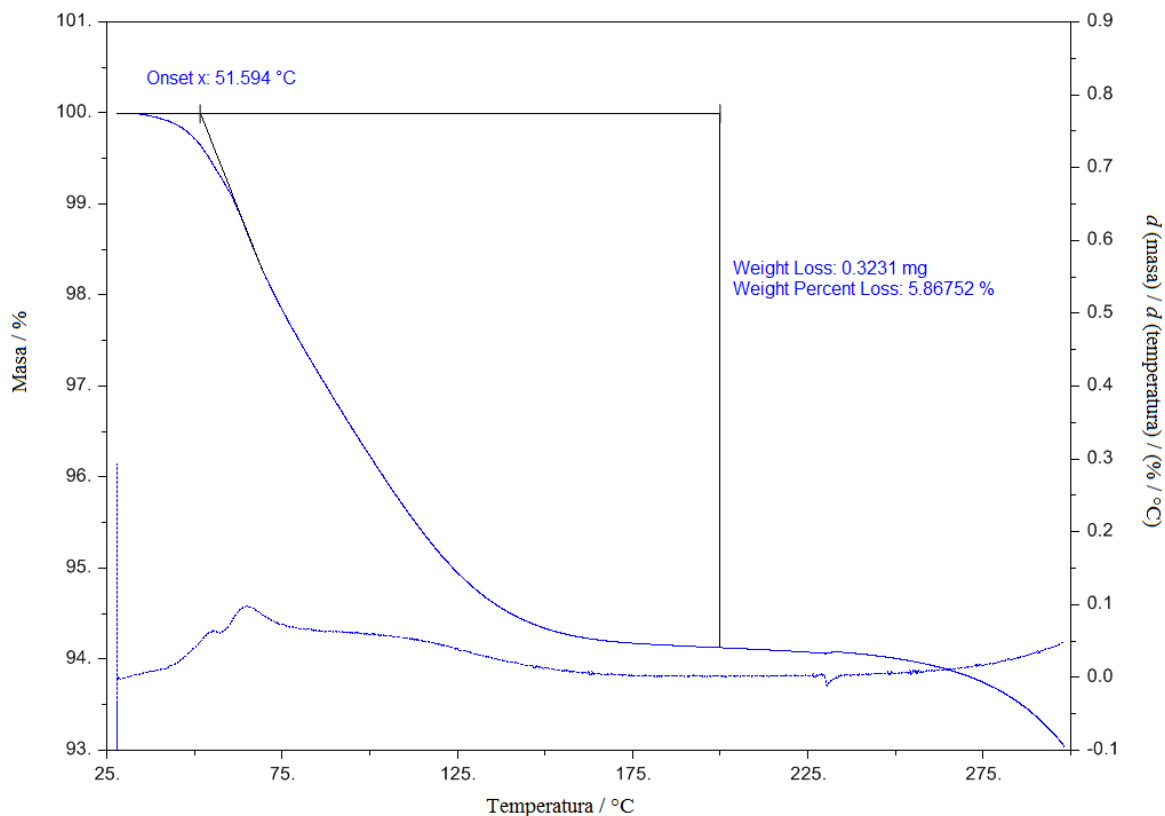
- U pokusu izlaganja uzorka forme X ($m = 20$ mg) parama otapala n-butanola ($V = 2,5$ ml), na sobnoj temperaturi. Nakon 4 dana, uzorak je analiziran XRPD metodom čime je dokazana forma Yc.



Slika 37. XRPD difraktogram forme Yc



Slika 38. DSC termogram forme Yc



Slika 39. TGA termogram forme Yc

Rezultati DSC i TGA analize (slika 38 i 39) forme Yc potvrđuju da je forma Yc solvatna forma sa desolvatacijom u temperaturnom području od 50 do 175 °C, te taljenjem ($T_{m(\text{onset})}$) oko 58,63 °C.

TGA termogram pokazuje ukupni gubitak mase od 5.87% do 200 °C. Na temelju usporedne DSC i TGA rezultata solvatne forme Yb i bezvodne forme X, očito je da je tijekom desolvatacije došlo do konverzije solvatne forme Yc u bezvodnu formu X, praćene razgradnjom na temperaturema iznad 220 °C.

4.3.3.1. Higroskopnost forme Yc

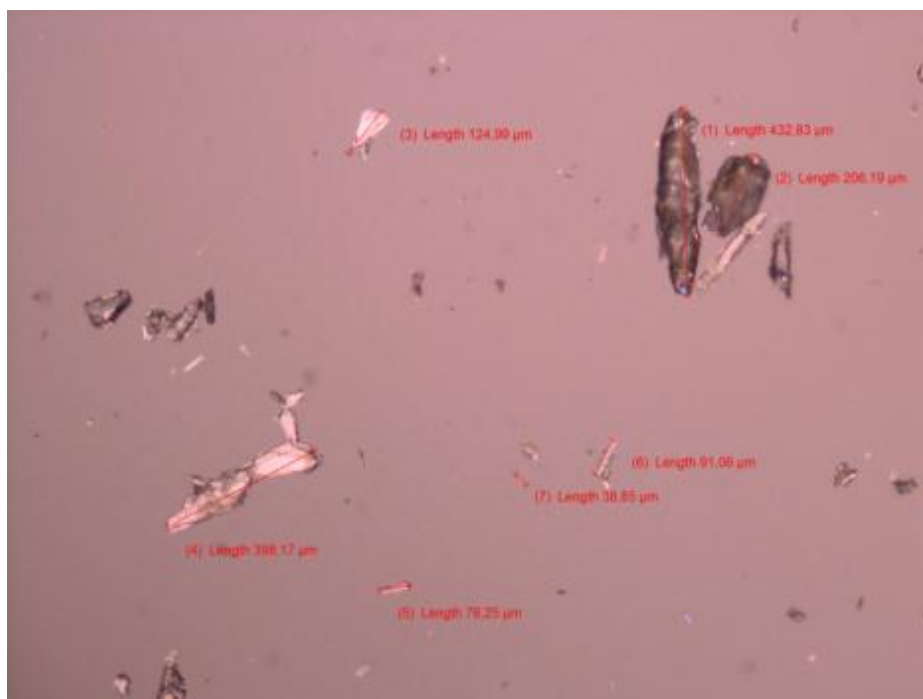
Na temelju rezultata izlaganja uzorka forme Yc uvjetima relativne vlažnosti (0-100% RH) na 25 °C, u vremenu od 7 dana, može se zaključiti (tablica 16) da je forma Yc polimorfno nestabilna. Već pri 20 i 40% relativne vlažnosti prelazi u smjesu forme Yc i forme X, dok na 60%-100% potpuno prelazi u formu X.

Tablica 16. Promjene uslijed izlaganja vlažnoj atmosferi na temperaturi 25°C. RH predstavlja relativnu vlažnost atmosfere. Termogravimetrijski gubitak mase određen je uslijed zagrijavanja do 200 °C. Rendgenom je praćena stabilnost forme Yc nakon izlaganja u vremenu od 7 dana.

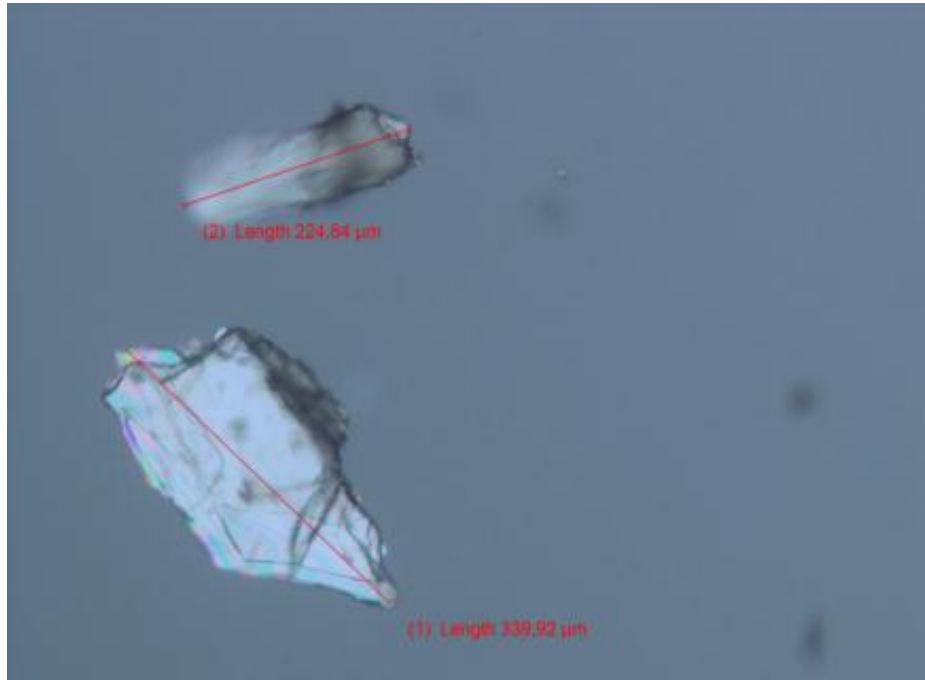
Vrijeme izlaganja		
7 dana		
RH / %	gubitak mase / %	stabilnost
0	5,87	100 % forma Yc
20	6,10	50% forma X + 50% forma Yc
40	2,68	50% forma X + 50% forma Yc
60	1,07	100 % forma X
80	1,18	100 % forma X
100	3,28	100 % forma X

4.3.3.2. Morfologija čestica forme Yc

Morfološka svojstva forme Yc proučavana su primjenom optičke mikroskopije (slike 40 i 41). Formu Yc karakteriziraju čestice nepravilnog oblika, veličine od 40 do 300 µm.



Slika 40. Mikroskopska slika čestica forme Yc - uvećanje 4 ×

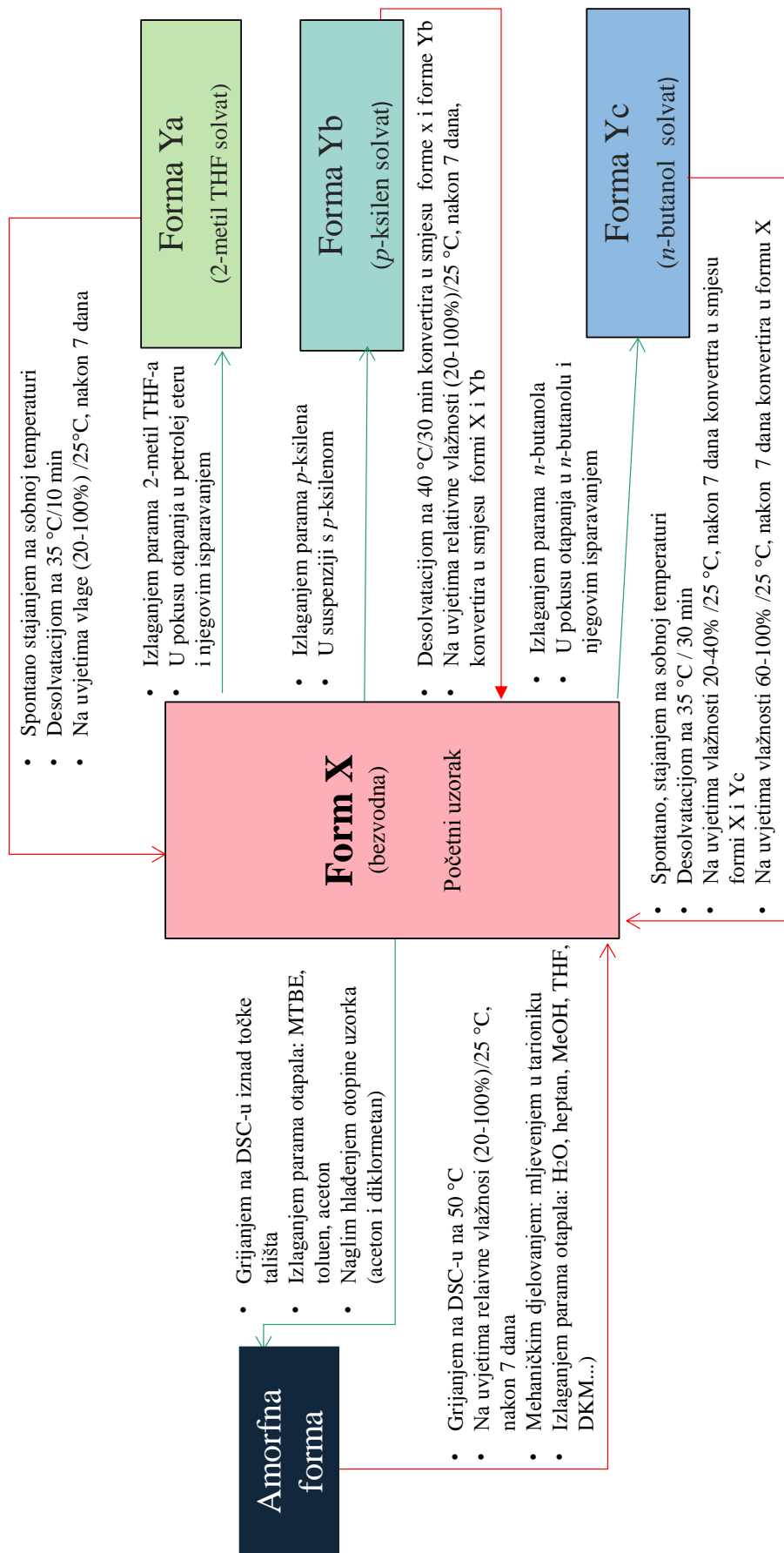


Slika 41. Mikroskopska slika čestica forme Yc - uvećanje 10 ×

4.3.3.3. *Stabilnost forme Yc izlaganjem stresnim uvjetima*

Forma Yc, pokazala se kao vrlo nestabilna, grijanjem na 35 °C, ali i spontano stajanjem na zraku vrlo lako konvertira u stabilni anhidro formu X.

Iz navedenih razloga, nisu provedeni drugi testovi za utvrđivanje polimorfne stabilnosti.



Slika 42. Shema nastajanja polimorfnih oblika i njihova konverzija u početni oblik

5. ZAKLJUČAK

U cilju odabira najpoželjnije polimorfne forme i forme s najboljim promjenskim svojstvima (kao što su: stabilnost, morfologija, topljivost i dr.) provedena je fizikalna karakterizacija API-ja forme X te dio eksperimenata koji se provode u sklopu standardnog postupka pretraživanja polimorfni formi.

U sklopu provedenih stres testova te eksperimenata pretraživanja polimorfni formi, iz polaznog API-ja, forme X (anhidro forma) dobivena je amorfnna forma te tri solvatne forme (forma Ya (2-metil THF solvat), forma Yb (*p*-ksilen solvat) i forma Yc (*n*-butanol solvat).

Na temelju fizikalne karakterizacije i testova stabilnosti provedenih na amorfno, bezvodnoj formi X te solvatnim formama (Ya, Yb, Yc), utvrđeno je da su amorfnna forma i solvatne forme Ya, Yb, Yc polimorfno vrlo nestabilne te lako konvertiraju u bezvodnu formu X. Testovima BCS topljivosti (ispitivanje topljivosti u otopinama različitih kiselosti (pH = 1,2, 4,5 i 6,8) te destiliranoj vodi, na temperaturi 37 °C, utvrđeno je da je BCS topljivost amorfnne i bezvodne forme X usporediva, odnosno da obje forme imaju istu klasu topljivosti (slaba topljivost (za pH = 1.2 i 4.5 te gotovo netopivo za pH = 6.8 i u destiliranoj vodi) u istim otopinama. Pri tome je nešto bolja topljivost zabilježena u slučaju forme X u otopinama pH = 1.2 i 4.5.

Fizikalnom karakterizacijom forme X utvrđeno je da je forma X nehigroskopna te se nalazi u bezvodnoj formi. Njezina visoka stabilnost je potvrđena stres testovima (grijanje, mljevenje u tarioniku, mljevenje u kugličnom mlinu, izlaganje tlačnim silama) te izlaganjem različitim otapalima. U otapalima 2-metil THF, *p*-ksilen i *n*-butanol prelazi u nestabilne solvatne forme (Ya, Yb, Yc) koje lako konvertiraju natrag u bezvodnu formu X.

S obzirom na gore navedeno, bezvodna forma X, nameće se kao jedina proizvodno zanimljiva polimorfna forma.

Temeljem dobivenih rezultata, može se zaključiti da je pretraživanje polimorfni formi, njihova detaljna fizikalna karakterizacija te određivanje njihove stabilnosti od iznimne važnosti za razumijevanje svojstava bitnih za daljnji proces proizvodnje te primjene i konačne formulacije lijeka.

Isto tako treba istaknuti da metode fizikalne karakterizacije koje su od izuzetne važnosti pri izučavanju i karakterizaciji API-ja treba kombinirati s drugim analitičkim tehnikama kao što su HPLC određivanje čistoće uzorka, GC (određivanje sadržaja i postotka ostatnih otapala) te FTIR i Raman spektroskopija i NMR analiza.

6. LITERATURA

1. Tieger, E., Investigation of the pharmaceutical applicability of solvates: screening, characterization, crystallization, disertacija, Fakultet kemijske tehnologije i biotehnologije, Prag, 2017.
2. <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2011/biopharmaceutical-classification-system.html> (pristup 15.05.2019.)
3. Lee, E.H., *A practical guide to pharmaceutical polymorph screening & selection*, *AJPS* **9** (2014) 163-175
4. https://www.pharmpress.com/files/docs/ch01_sample%20chapter.pdf (pristup 20.05.2019.)
5. Aitipamula, S., Vangala, V.R., *X-Ray Crystallography and its Role in Understanding the Physicochemical Properties of Pharmaceutical Cocrystals*, *J. Indian Inst. Sci.* **97** (2017) 227-243.
6. Vladiskovic, C., *Structural Studies of Active Pharmaceutical Ingredients: Polymorphism and Solid-State Reactivity*, disertacija, Dipharma Francis S.r.l., 2014.
7. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/andaspharmaceutical-solid-polymorphism-chemistry-manufacturing-and-controls-information> (pristup 24.05.2019.)
8. Censi, R., Martino, P.D., *Polymorph Impact on the Bioavailability and Stability of Poorly Soluble Drugs*, *Molecules* **20** (2015) 18759-18776
9. <http://www.polycrystalline.it/pages/13/solid-form-screening-selection/solvates-hydrates-identification.html> (pristup 25.05.2019.)
10. Bauer, J.F., *Polymorphism - A Critical Consideration in Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Stability*, *Journal of Validation Technology* (2008) 15-23
11. <https://www.crystallizationsystems.com/news/october-2017/Why-hydrate-formation-must-be-accounted-for-at-all-stages-of-drug-development-and-manufacturing> (pristup 25.05.2019.)
12. https://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2012_5-Solid-State-Characterization.pdf (pristup 23.05.2019.)
13. <http://www.ijpsonline.com/articles/pharmaceutical-cocrystals-an-overview-3400.html> (pristup 02.05.2019.)

14. <https://www.raps.org/regulatory-focus%E2%84%A2/news-articles/2016/8/fda-to-reclassify-pharmaceutical-co-crystals> (pristup 27.05.2019).
15. Gadade, D.D., Pekamwar, S.S., *Pharmaceutical Cocrystals: Regulatory and Strategic Aspects, Design and Development*, Adv. Pharm. Bull. **6** (2016) 479–494.
16. Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država, *Guidance for Industry: Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals*, Center for Drug Evaluation and Research, Silver Spring, MD, USA, 2013.
17. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-reflection-paper-use-cocrystals-other-solid-state-forms-active-substances-medicinal-products_en.pdf (pristup 27.05.2019.)
18. Karimi - Jafari, M., L.Padrela, L., Walkner, G.M., Croker, D.M., *Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications*, Crystal Growth & Design **18, 10** (2018)6370-6387
19. Storey, R.A., Ym'en, I., *Solid State Characterization of Pharmaceuticals*, First Edition, A John Wiley & Sons, Ltd., 2011.
20. <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/119521-Developing-Amorphous-Pharmaceuticals-Opportunity-and-Necessity/> (pristup 27.05.2019.)
21. Gao, P., *Amorphous Pharmaceutical Solids: Characterization, Stabilization, and Development of Marketable Formulations of Poorly Soluble Drugs with Improved Oral Absorption*, Mol. Pharmaceutics **5, 6** (2008) 903-904
22. Einfalt, T., Planinšek, O., Hrovat, K., *Methods of amorphization and investigation of the amorphous state*, Acta Pharm. **63** (2013) 305–334
23. Vranić, E., *Amorphous pharmaceutical solids*, Bosnian Journal of Basic Medical Sciences **4(3)** 2004; 35-39
24. Kurajica, S., *Rendgenska difrakcija u inženjerstvu materijala*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, str. 2, 7, 10
25. Klobučić, A., *Sušenje aktivne farmaceutske supstance u sušioniku s raspršivanjem*, Diplomski rad, FKIT, Zagreb, 2016.
26. Thakral, N.K., Zanon, R.L., Kelly, R.C., Thakral, S., *Applications of Powder X-Ray Diffraction in Small Molecule Pharmaceuticals: Achievements and Aspirations*, Journal of Pharmaceutical Sciences **107** (2018) 2969-2982

27. Prugovečki, B., Meštrović, E., *Difrakcija rentgenskog zračenja u polikristalnom uzorku*, Skripta za internu uporabu, Drugo prošireno izdanje, Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb, 2011.
28. <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/36153-Increasing-Application-of-X-Ray-Powder-Diffraction-in-the-Pharmaceutical-Industry/> (preuzeto 30.05.2019.)
29. Matečić Mušanić, S., *Mehanizam i kinetika procesa starenja dvobaznih raketnih baruta i mogućnost procjene životnog vijeka*, Disertacija, 2011.
30. Haines, P.J., *Thermal Methods of Analysis, Principles, Applications and Problems*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1995.
31. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch S.R., *Principles of Instrumental Analysis*, Sixth edition, Brooks Cole, USA, 2006.
32. Dürriegl, M., *Priprava čvrstih disperzija za kontrolirano oslobađanje lijeka metodom sušenja raspršivanjem*, Disertacija, Zagreb, 2011.
33. Reading, M., Luget, A., Wilson, R., *Modulated differential scanning calorimetry*, *Thermochimica Acta* **238** (1994), 295-307
34. http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TP_006_MDSC_num_1_MDSC.pdf (pristup 13.06.2019.)
35. Knopp, M.M., Löbmann, K., Elder, D.P., Rades, T., Holm, R., *Recent advances and potential applications of modulated differential scanning calorimetry (mDSC) in drug development*, *European Journal of Pharmaceutical Science* **25** (2016) 164-173
36. <https://www.tainstruments.com/products/thermal-analysis/thermal-analysis-accessories/tga-accessories/> (pristup 10.06.2019.)
37. Ravikiran, A., Maruthapillai, A., Kamaraj, P., Chappa, P., *Hygroscopicity categorization of pharmaceutical solids by gravimetric sorption analysis: A systematic approach*, *Asian Journal of Pharmaceutics* **10(4)** 2016, 279-286.
38. Anbarasan, A., Nataraj, J., Shanmukhan, N., Radhakrishnan, A., *Effect of Hygroscopicity on Pharmaceutical Ingredients, Methods to Determine and Overcome: An Overview*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **10(3)** (2018), 61-67
39. https://www.surfacemeasurementsystems.com/solutions/dynamic_vapor_sorption/ (pristup 01.06.2019.)
40. https://www.surfacemeasurementsystems.com/solutions/dynamic_vapor_sorption/ (pristup 01.06.2019.)

41. <http://www.tainstruments.com/pdf/literature/TA337%20Investigation%20of%20Pharmaceutical%20Stability%20Using%20DVS.pdf> (pristup 03.06.2019)
42. <https://public.jenck.com/notijenck/uploads/propiedades-de-sorcion-de-humedad-de-los-materiales-farmaceuticos-estudiados-por-dvs.pdf> (pristup 03.06.2019.)
43. Lekšić, E., *Metode i važnost određivanja oblika i veličine čestica praha*, Poslijediplomski rad, Zagreb, 2006.
44. Sabiruddin, M., Miroshnyk, I., Heinämäki, J., Antikainen, O., Rantanen, J., Vuorela, P., Vuorela, H., Yliruusi, J., *Crystal Morphology Engineering of Pharmaceutical Solids: Tableting Performance Enhancement*, AAPS Pharm Sci Tech, **10(1)** 2009, 113–119.
45. Šimeg L., *Primjena elektronske mikroskopije u karakterizaciji prirodnih materijala*, Završni rad, Zagreb, 2014.
46. Mršić, G., Žugaj, S., *Analiza GSR čestica upotrebom elektronskog mikroskopa (SEM/EDX)*, Stručni članak, broj 3-4, Zagreb, 2007., 179-200
47. <http://www.rgf.bg.ac.rs/semlab/brosura%20SEM%20LAB.pdf> (pristup 04.06.2019.)
48. <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/> (pristup 04.06.2019.)

ŽIVOTOPIS

Marijana Pavišić [REDACTED] Pohađala je Gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkoga u Križevcima, smjer opća gimnazija, od 2008. do 2012. godine. Nakon završene srednje škole odlazi u Zagreb gdje upisuje Preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom studija odradila je praksu u Pliva Hrvatska d.o.o., na odjelu fizikalne karakterizacije, gdje nastavlja raditi do završetka studija. Zvanje sveučilišne prvostupnice primijenjene kemija postiže 2017. pod mentorstvom prof. dr. sc. Sanje Martinez, obranivši rad pod naslovom „Najnovija saznanja o industrijskog primjeni limunske kiseline za pasivizaciju nehrđajućeg čelika“. Iste godine upisuje diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija na matičnom fakultetu.