

INSTYTUT FIZYKI
UNIwersytet Jagielloński

mgr Karol Kubat

**Zachowanie śladowej wody związanej
w układach farmaceutycznych i żywych
organizmach anhydrobiotycznych**

Praca na stopień doktora nauk fizycznych
wykonana w Zakładzie Fizyki Medycznej Instytutu Fizyki UJ
pod kierunkiem
prof. dr. hab. Huberta Harańczyka i dr hab. Anny Krupy



Kraków 2022

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisany *Karol Kubat* (nr indeksu: 1098706) doktorant Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. *„Zachowanie śladowej wody związanej w układach farmaceutycznych i żywych organizmach anhydrobiotycznych.”* jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem *prof. dr. hab. Huberta Harańczyka*, oraz *dr hab. Anny Krupy*. Pracę napisałem samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadom, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia

.....

podpis doktoranta

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi prof. dr. hab. Hubertowi Harańczykowi za zaangażowanie, życzliwość, cierpliwość, wszechstronną pomoc, okazaną troskę, poświęcony czas i prowadzenie ze mną wnikliwych dyskusji naukowych, pozwalających zrozumieć wiele zjawisk, co umożliwiło powstanie niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani dr hab. Anny Krupy z Wydziału Farmacji Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego za dostarczenie badanych próbek, materiałów naukowych oraz wsparcie mentorskie w trakcie pisania pracy.

Dziękuję bardzo Pani prof. Angelice Casanova-Katny, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile, oraz Panu prof. dr. hab. Kazimierzowi Strzałce, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ za dostarczenie unikalnych próbek pochodzącego z pustyni Atacama grzyba zlichenizowanego *Niebla tigrina*.

Bardzo serdecznie dziękuję moim koleżankom i kolegom – doktorantom i pracownikom Zakładu Fizyki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego – a w szczególności mgr Agacie Bogdał i mgr. Danielowi Jakubcowi za pomoc w wykonaniu części pomiarów oraz dyskusje naukowe. Inż. Tomaszowi Malarzowi za pomoc w obsłudze relaksometru i spektrometru.

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim Rodzicom za cierpliwość i okazane wsparcie podczas powstawania pracy.

Streszczenie

W ramach badań wykonanych w celu analizy zachowania śladowej ilości wody w układach farmaceutycznych oraz w organizmach anhydrobiotycznych zbadano próbki farmaceutyczne zawierające hydrofobową substancję leczniczą tadalafil, amfifilowy polimer Soluplus® oraz stałe rozproszenia tych substancji w proporcjach wagowych 1+9; 1+1; 9+1 (lek + polimer) przygotowane w procesie mielenia kulowego. Badano wpływ prędkości obrotowej młyna (100, 200, 400 obr./min.) i czasu mielenia (1h, 4h, 12h) na zdolność sorpcji pary wodnej. Badania wykonano także dla monohydratu bozentanu, który podobnie jak tadalafil jest trudno rozpuszczalny w wodzie, hydrofilowego polimeru Kollidon VA-64® oraz ich stałego rozproszenia w proporcji wagowej 1+1. W celu porównania zachowania wody w organizmach żywych i w próbkach farmaceutycznych dokonano także analizy skrajnie odwodnionego grzyba zlichenizowanego *Niebla tigrina* z Pustyni Atacama. Wykonano badania kinetyki hydratacji, relaksometrii i spektroskopii ^1H -NMR oraz wyznaczono izotermy sorpcji. Metody te pozwoliły na monitorowanie dynamiki molekularnej wody związanej, w celu zidentyfikowania frakcji wody występujących w badanych próbkach farmaceutycznych lub w żywym organizmie kryptobiotycznym. Na podstawie tras hydratacyjnych dla próbek farmaceutycznych wyodrębniono trzy do czterech frakcji wody w układzie. Natomiast, na podstawie analizy plechy *N. tigrina*, wykazano obecność maksymalnie trzech frakcji wody związanej. Zależność hydratacyjna sygnału ^1H -NMR dla próbek tadalafilu opisana była funkcją liniową, natomiast dla próbek bozentanu funkcją wymierną. W badanym poroście, funkcją wymierną opisane były niskie uwodnienia, zaś funkcją liniową wysokie uwodnienia tej próbki. Ponadto wykonano pomiary spektroskopii relaksacyjnej dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® zawierającego 50% substancji leczniczej, na podstawie których wyznaczono energię aktywacji ruchów molekularnych.

Abstract

As a part of the research carried out to analyze the behavior of trace amounts of water in pharmaceutical systems and in anhydrobiotic organisms, pharmaceutical samples containing the hydrophobic drug substance tadalafil, the amphiphilic polymer Soluplus® and solid dispersions of these substances in weight proportions 1 + 9; 1 + 1; 9 + 1 (drug + polymer) were tested. They were prepared by a ball milling process. The influence of the rotational speed of the mill (100, 200, 400 rpm) and the grinding time (1h, 4h, 12h) on the water vapor sorption capacity was investigated. The tests were also carried out for bosentan monohydrate, which, like tadalafil, is poorly soluble in water, for the hydrophilic polymer Kollidon VA-64® and their solid dispersion in the weight ratio of 1 + 1. In order to compare the behavior of water in living organisms and in pharmaceutical samples, the extremely dehydrated lichenized fungus *Niebla tigrina* from the Atacama Desert was also analyzed. Hydration kinetics, relaxometry, and ¹H-NMR spectroscopy were investigated, and sorption isotherms were determined. These methods allowed us to monitor the molecular dynamics of bound water in order to identify water fractions present in the tested pharmaceutical samples or in a living cryptobiotic organism. On the basis of the hydration courses for pharmaceutical samples, three to four fractions of water were identified in the system. However, based on the analysis of the thallus of *N. tigrina*, up to three fractions of bound water were found. The hydration dependence of the ¹H-NMR signal for the tadalafil samples was described by a linear function, while for the bosentan samples by rational function. In the tested lichen, the rational function described the low hydration, and the linear function described the high hydration levels of this sample. In addition, relaxation spectroscopy measurements were performed for the solid dispersion of tadalafil in Soluplus® containing 50% of the drug substance, on the basis of which the activation energy of molecular movements was determined.

Dorobek naukowy Autora

Spis publikacji

1. Martyna Durak-Kozica, Zbigniew Baster, **Karol Kubat**, Ewa Stępień, *3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells*, Cellular & Molecular Biology Letters, 2018, Volume **23**(1),1. <https://doi.org/10.1186/s11658-018-0123-z>, [IF = 5,78 (2020)], (40 pkt. MNiSW). cyt. = 19
2. Piotr Nowak, Anna Krupa, **Karol Kubat**, Agnieszka Węgrzyn, Hubert Harańczyk, Agata Ciulowska, Renata Jachowicz, *Water vapour sorption in tadalafil-Soluplus co-milled amorphous solid dispersions*, Powder Technology, 2019, Volume **346**, 373-384. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.010>, [IF = 5,13 (2020)], (140 pkt. MNiSW). cyt. = 12
3. Hubert Harańczyk, Kazimierz Strzałka, **Karol Kubat**, Aleksandra Andrzejowska, Maria Olech, Daniel Jakubiec, Paulina Kijak, Guillermo Palfner i Angélica Casanova-Katny A *comparative analysis of gaseous phase hydration properties of two lichenized fungi: Niebla tigrina (Follman) Rundel & Bowler from Atacama Desert and Umbilicaria antarctica Frey & I. M. Lamb from Robert Island, Southern Shetlands Archipelago, maritime Antarctica*, Extremophiles, May 2021, Volume **25**(2), 267–283. <https://doi.org/10.1007/s00792-021-01227-y>, [IF = 2,39 (2020)], (70 pkt. MNiSW). cyt. = 0
4. **Karol Kubat**, Anna Krupa, Witold Brniak, Agnieszka Węgrzyn, Dorota Majda, Agata Bogdał, Hubert Harańczyk, *How rotational speed of planetary ball mill and polymer load influence the performance and water vapor sorption in solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus*, Particuology, February 2023, Volume **73**, 37-46, <https://doi.org/10.1016/j.partic.2022.04.003>, [IF = 3,02 (2020)], (100 pkt. MEiN). cyt. = 0
5. **Karol Kubat**, Anna Krupa, Witold Brniak, Agnieszka Węgrzyn, Dorota Majda, Agata Bogdał, Hubert Harańczyk, *Data regarding particle size distribution, thermal properties and gaseous phase hydration of co-milled solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus*, Data in Brief, August 2022, Volume **43**, 10.1016/j.dib.2022.108451, (40 pkt. MEiN). cyt. = 0

Lista prezentacji konferencyjnych

1. Piotr Nowak, Anna Krupa, **Karol Kubat**, Hubert Harańczyk, Renata Jachowicz, *Kinetics of hydration in comilled binary systems composed of tadalafil and Soluplus® studied by 1H NMR spectroscopy*, 2nd European Conference on Pharmaceuticals: Novel Dosage Forms, Innovative Technologies, 3-4 Kwietnia 2017 Kraków, Polska **(Poster)**
2. Agata Ciułkowska, **Karol Kubat**, Hubert Harańczyk, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, *Gaseous phase hydration of DOPC and POPC multilayer vesicles*, 12th International Conference on Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substances, 4-7 Czerwca 2018 Lublin, Polska **(Poster)**
3. Agata Ciułkowska, **Karol Kubat**, Hubert Harańczyk, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, *1H-NMR identification of trapped water fractions in multilamellar DOPC and in POPC liposomes*, The AMPERE NMR School, 10-16 Czerwca 2018 Zakopane, Polska **(Poster)**
4. Hubert Harańczyk, Angelica Casanova-Katny, **Karol Kubat**, i inni, *Gaseous phase hydration of lichens from Atacama Desert and from Antarctica*, International conference Lichens: from molecules to ecosystems, 9 –13 Września 2019 Syktyvkar, Republika Komi, Rosja **(Prezentacja ustna)**
5. Paulina Kijak, Hubert Harańczyk, Maria Olech, **Karol Kubat**, *Badanie procesu wiązania i zamarzania wody w plesze antarktycznego porostu Usnea aurantiaco-atra*, 5. Zjazd Fizyków Polskich, 13 – 18 Września 2019 Kraków, Polska **(Poster)**
6. **Karol Kubat**, Hubert Harańczyk, Paulina Kijak, Angelica Casanova-Katny, Maria Olech, Agata Bogdał, Kazimierz Strzałka, *Własności hydratacyjne Heterodermia leucomelos i Ramalina tigrina z Pustyni Atacama*, 5. Zjazd Fizyków Polskich, 13 – 18 Września 2019 Kraków, Polska **(Poster)**
7. Piotr Nowak, Katarzyna Zakrzewska, Anna Kusior, **Karol Kubat** i inni, *Bound water behavior in TiO₂ nanopowders investigated by NMR*, EMRS 2019 Fall Meeting, 16-19 Września 2019 Warszawa, Polska **(Poster)**
8. Aleksandra Andrzejowska, **Karol Kubat**, Angelica Casanova-Katny, Kazimierz Strzałka, Maria Olech, Hubert Harańczyk, *Molecular dynamic of bound water in Antarctic lichenized fungus Umbilicaria antarctica Frey & I.M. observed by sorption isotherm and 1H-NMR*, 18th International School-Conference MAGNETIC RESONANCE AND ITS APPLICATIONS, 29 Marca — 2 Kwietnia, 2021 Online w Saint Petersburg, Rosja – Online **(Najlepszy poster)**
9. Agata Bogdał, **Karol Kubat**, Małgorzata Jemioła-Rzemińska, Kazimierz Strzałka, Hubert Harańczyk, *The classification of residual bound water fractions in rehydrated phospholipid lyophilizates*, 18th International School-Conference MAGNETIC RESONANCE

AND ITS APPLICATIONS, 29 Marca — 2 Kwietnia, 2021 w Petersburgu, Rosja – Online
(Poster)

10. Daniel Jakubiec, **Karol Kubat**, Aleksandra Andrzejowska, Maria Olech, Angelica Casanova-Katny, Kazimierz Strzałka, Hubert Harańczyk, *¹H-NMR spectroscopy and relaxometry studies of hydration from gaseous phase of foliose lichenized fungi: Roccellina nigricans from Atacama Desert region Chañaral*, 18th International School-Conference MAGNETIC RESONANCE AND ITS APPLICATIONS, 29 Marca — 2 Kwietnia, 2021 w Petersburgu, Rosja - Online (Poster)

11. **Karol Kubat**, Anna Krupa, Agata Bogdał, Hubert Harańczyk, *Hydration properties of tadalafil preparations in the matrix of the Soluplus polymer*, 18th International School-Conference MAGNETIC RESONANCE AND ITS APPLICATIONS, 29 Marca — 2 Kwietnia, 2021 w Petersburgu, Rosja - Online (Poster)

12. Piotr Nowak, Katarzyna Zakrzewska, Anna Kusior, **Karol Kubat** i inni, *Proton Nuclear Magnetic Resonance investigation of water fractions adsorbed on TiO₂ nanopowders*, 44th IMAPS POLAND CHAPTER 2021, 18-21 Kwietnia 2021, Bukowina Tatrzańska , Polska - Online (Poster)

Uczestnictwo w realizacji projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych

1. Grant NCN Sonata Bis nr DEC-2019/34/E/NZ7/00245, pt. „*Układy przesycone jako uniwersalna platforma do rozwiązywania problemu trudnej rozpuszczalności substancji leczniczych*”, kierownik: dr hab. Anna Krupa.
2. Project Sistema de Proyectos INACH, RT_27_16 pt. "*Ecophysiology of Antarctic and Atacama desert lichens: freezing and deep dehydration mechanism under natural conditions and under passive warming experiments*", kierownik: Investigador Principal prof. Angélica Casanova-Katny, Universidad Católica de Temuco, Temuco, Chile, grant z INACH (Instituto Antártico Chileno, Ministerio de Relaciones Exteriores, Chile), Tytuł konkursu : XXII Concurso Nacional de Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica, Antártica, 2016.

Spis treści

Streszczenie	4
Abstract	5
Dorobek naukowy Autora	6
Spis publikacji	6
Lista prezentacji konferencyjnych	7
Uczestnictwo w realizacji projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych	8
SPIS TREŚCI	9
Spis symboli	11
Spis skrótów	13
Wprowadzenie	14
I. WSTĘP	16
1. Własności wody w badanych układach	17
1.1. Struktura i właściwości wody	17
1.2. Wiązanie wodorowe	18
1.3. Procesy wpływające na dynamikę molekularną wody	18
2. Badane układy farmaceutyczne	20
2.1. Wprowadzenie i cel badań próbek farmaceutycznych	20
2.2. Charakterystyka stałych rozprożeń z tadalafilem	22
2.3. Charakterystyka stałych rozprożeń z bozentanem	25
3. Charakterystyka badanego organizmu anhydrobiotycznego	27
II. TEORIA	30
1. Badane zjawiska fizyczne	31
2. Sorpcja na powierzchniach	31
3. Izotermy sorpcyjne i ich klasyfikacja	32
3.1. Izoterma Langmuira	33
3.2. Izoterma BET	34
3.3. Izoterma GAB-Dent	34
4. Magnetyczny Rezonans Jądrowy	37
4.1. Moment pędu i moment magnetyczny jądra	37
4.2. Magnetyzacja	38
4.3. Precesja Larmore'a i zjawisko MRJ	38
4.4. Procesy relaksacyjne	39
4.5. Obserwacja zjawiska MRJ	41
III. MATERIAŁY I METODY	44

1. Preparatyka próbek farmaceutycznych	45
1.1. Źródło materiałów	45
1.2. Przygotowanie próbek farmaceutycznych	45
2. Preparatyka organizmu anhydrobiotycznego	47
3. Ocena morfologii próbek farmaceutycznych przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej	48
4. Badanie kinetyki hydratacji	49
5. Metody pomiaru magnetycznego rezonansu jądrowego	51
5.1. Relaksometria ^1H MRJ	51
5.2. Spektroskopia ^1H MRJ	51
IV. WYNIKI	53
1. Wyniki pomiarów tras hydratacyjnych	54
1.1. Trasy hydratacyjne dla stałych rozproszeń z tadalafilem	54
1.2. Trasy hydratacyjne dla stałych rozproszeń z bozentanem	60
1.3. Trasy hydratacyjne dla <i>N. tigrina</i> .	65
2. Wyniki pomiarów magnetycznego rezonansu jądrowego	67
2.1. Maksymalny poziom uwodnienia badanych układów mikroheterogennych	67
2.2. Wyniki pomiarów ^1H -NMR dla stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus®	69
2.3. Wyniki pomiarów ^1H -MRJ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie	76
2.4. Wyniki pomiarów ^1H -NMR dla próbek <i>Niebla tigrina</i>	82
3. Relaksacja spinowo-sieciowa protonów w zależności od temperatury dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (0,5TD)	86
3.1. Wyniki spektroskopii relaksacyjnej dla stałego rozproszenia powietrznie suchego ($\Delta m/m_0 = 0$)	87
3.2. Wyniki spektroskopii relaksacyjnej ^1H -NMR dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,15$	89
3.3. Wyniki spektroskopii relaksacyjnej ^1H -NMR dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,30$	91
V. DYSKUSJA	93
VI. WNIOSKI	97
SPIS RYSUNKÓW	100
SPIS TABEL	103
BIBLIOGRAFIA	104

Spis symboli

α_{H_2O}	Współczynnik proporcjonalności pozwalający przeliczyć masę mnożoną przez gęstość protonową na sygnał MRJ dla molekuł wody
α_{cd}	Współczynnik proporcjonalności dla części matrycy stałej, która uległa rozpuszczeniu
α_s	Współczynnik proporcjonalności dla części nierozpuszczalnej matrycy stałej
γ	Czynnik żyromagnetyczny jądra
Δm	Masa wody związanej
$\Delta m/m_0$	Przyrost masy wyrażony w jednostkach suchej masy
$\Delta M/m_0$	Wartość wysycenia miejsc pierwotnych wiążących wodę
$\Delta \nu$	Szerokość połówkowa linii
μ_0	Przenikalność magnetyczna w próżni
μ_n	Magneton jądrowy
ν	Położenie maksimum linii
τ_0	Czynnik eksponencjalny
τ_c	Czas korelacji
ρ_c	Średnia gęstość protonowa części rozpuszczalnej matrycy stałej
ρ_{H_2O}	Gęstość protonowa wody
ρ_s	Średnia gęstość protonowa nierozpuszczalnej matrycy stałej
Ξ	Stosunek powierzchni zajętej do całkowitej powierzchni
ω_0	Częstość Larmore'a
A	Pole pod linią proporcjonalne do liczby jąder rezonansowych w MRJ
A_i	Uwodnienie składowych kinetyki hydratacji
A_L/A_S	Stosunek pól powierzchni w spektroskopii jako miara ilości wody związanej w próbce, $\Delta m/m_0$
a	Współczynnik przyłączania molekuł
b	Stosunek szybkości przyłączania molekuł do ich odłączania w miejscach wtórnych przy $h = 1$
b_1	Stosunek liczby wolnych miejsc wiążących (dla $h = 1$) do liczby miejsc wiążących przypadających na jedną molekułę
C	Szybkość odłączania molekuł wody
C_0	Szybkość ucieczki z miejsc pierwotnych
C^h	Równowagowy poziom uwodnienia próbki
C_s	Stężenie nasyceniowe dla rozpuszczalnej frakcji stałej
E_a	Energia aktywacji
g_n	Czynnik Landego
$h(p/p_0)$	Wilgotność względna (stosunek ciśnienia paru wodnej w powietrzu i ciśnienia pary nasyconej)
h	Zredukowana stała Plancka
K	Stała dysocjacji

L	Amplituda frakcji mobilnej
L/S	Stosunek sygnałów w relaksometrii jako miara ilości wody związanej w próbce, $\Delta m/m_0$
m_{cd}	Masa rozpuszczonej frakcji stałej
m_p	Masa badanej próbki
m_{p+}	Masa protonu
m_0	Masa sucha badanej próbki
m_1	Masa frakcji wody związanej z frakcją rozpuszczalną
M/m_0	Całkowita masa frakcji stałej rozpuszczalnej
M_{xy}	Składowa poprzeczna magnetyzacji jądrowej
M_z	Składowa podłużna magnetyzacji jądrowej
M_∞	Wartość równowagowa wektora magnetyzacji jądrowej
p	Ciśnienie pary wodnej zawartej w powietrzu
p_0	Ciśnienie pary nasyconej
R	Stała gazowa
S	Amplituda frakcji stałej
t^h_i	Czas uwodnienia danej składowej
T	Temperatura
T_1	Czas relaksacji podłużnej (spinowo-sieciowej)
T_2	Czas relaksacji poprzecznej (spinowo-spinowej)
T_2^*	Efektywny czas relaksacji poprzecznej
T_g	Temperatura przejścia fazowego
V	Objętość próbki

Spis skrótów

0,1TD	Stałe rozproszenie tadalafilu w polimerze Soluplus® w stosunku 1+9
0,5TD	Stałe rozproszenie tadalafilu w polimerze Soluplus® w stosunku 1+1
0,5BS	Stałe rozproszenie bozentanu w kopowidonie w stosunku 1+1
0,9TD	Stałe rozproszenie tadalafilu w polimerze Soluplus® w stosunku 9+1
BET	Izoterma Brunauer-Emmet-Teller
BS	Bozentan niemieleny
BS_M	Bozentan mielony
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (<i>ang. deoxyribonucleic acid</i>)
FID	Sygnał zaniku swobodnej precesji (<i>ang. Free Induction Decay</i>)
FT	Transformata Fouriera
GAB	Izoterma Guggenheim-Anderson-de Boer
IS	Izoterma sorpcji
IR	Sekwencja zaniku inwersji (<i>ang. Inversion Recovery</i>)
KH	Kinetyka hydratacji
MRJ	Magnetyczny Rezonans Jądrowy (<i>ang. Nuclear Magnetic Resonance, NMR</i>)
PEG	Glikol polioksyetylenowy (<i>ang. polyethylene glycol</i>)
PDE	Fosfodiesteraza (<i>ang. phosphodiesterase</i>)
RL	Relaksometria MRJ czasu T_2
RF	Impuls o częstotliwości radiowej (<i>ang. Radio Frequency</i>)
S	Spektroskopia NMR
SEM	Skaningowa mikroskopia elektronowa (<i>ang. Scanning Electron Microscopy</i>)
ST	Spektroskopia relaksacyjna NMR czasu T_1 od temperatury
TD	Tadalafil

Wprowadzenie

Zachowanie śladowych ilości wody związanych z fazy gazowej zostało przeanalizowane na przykładzie układów mikroheterogennych charakteryzowanych różnymi typami struktury mikroskopowej. Pierwszym z nich były różne mieszaniny proszkowe substancji leczniczych wraz z substancją towarzyszącą, o różnej wielkości ziaren proszku dla każdej z próbek. Drugim układem był organizm (plecha) grzyba zlichenizowanego przeżywającego skrajne odwodnienie. Makroskopowo taki układ jest jednorodny, jednak jego struktura wewnętrzna (mykobionta) złożona jest z filamentów oraz ze zdehydratowanych molekuł węglowodanów, a obok nich występują globularne komórki fotobionta. Odwodnione próbki proszków zawierają wypełnione powietrzem pustacie, podobnie jak wysuszona plecha. Jednak plecha zawiera dodatkowo mocno pokurczone komórki fotobionta, a dla której można wyznaczyć porowatość metodą porozymetrii rtęciowej [1]. W obu przypadkach obecność pustaci może skutkować skokową zmianą podatności magnetycznej na granicy ośrodków.

Proces hydratacji proszku w postulowanym opisie może składać się z trzech etapów. Najpierw sorpcji molekuł z pary na powierzchni ziaren, następnie wnikania wody w głąb ziaren, wreszcie makroskopowej zmiany fazy ziaren, ich rozpuszczania, skutkującego nadmiarowym wzrostem udziału cieczy w próbce. Nie można wykluczyć procesu pęcznienia na pośrednich etapach rozpuszczania, jak to ma miejsce w skrajnie odwodnionym DNA [2] lub w kompleksach DNA/surfaktant [3].

Proces hydratacji plechy powinien wyglądać inaczej: woda adsorbowana z pary przenika do wnętrza plechy, wywołując powrót do objętości i kształtu fizjologicznego, w tym pęcznienie rehydratowanych komórek fotobionta, deponuje się w tkance mykobiona, a jednocześnie umożliwia inicjalizację akcji enzymatycznej skutkującej przetwarzaniem węglowodanów do łatwo rozpuszczalnych cukrów prostych, których obecność manifestuje się nadmiarowym wzrostem frakcji cieczowej w próbce.

Znaczących różnic między tymi układami można się spodziewać przy braku widocznego procesu pęcznienia dla plechy (wzrost objętości fotobionta zachodzi wewnątrz organizmu bez skokowego wzrostu powierzchni hydratowanej) oraz przy różnej zawartości metali grupy 3d, paramagnetyków elektronowych, fizjologicznie obecnych w plesze, które co do zasady nie powinny być obecne w substancjach o czystości farmaceutycznej.

W pracy badano, czy różnice mikroskopowe między procesami hydratacji badanych układów można rozróżnić metodami relaksometrii i spektroskopii ^1H -MRJ.

Przedstawiono wyniki badań zachowania śladowej ilości wody w organizmie anhydrobiotycznym na przykładzie porostu *Niebla tigrina*, oraz w dwóch modelowych trudno rozpuszczalnych w wodzie substancjach leczniczych, takich jak tadalafil i bozentan, dwóch hydrofilowych polimerach

stosowanych w technologii farmaceutycznej, jako nośniki dla tych związków tj. Soluplus® i Kollidon VA64® oraz dwuskładnikowych układów proszkowych (stałych rozproszeń) złożonych z ww. substancji aktywnych i polimerów.

Praca podzielona została na sześć głównych części poświęconych kolejno: wstępnej charakterystyce badanych układów, podstawom teoretycznym, materiałom i metodom, opisowi wyników oraz ich dyskusji. Na zakończenie sformułowano dwanaście najważniejszych wniosków płynących z pracy.

W pierwszych rozdziałach opisano przedmiot badań, czyli opis zachowania śladowych ilości wody w badanych układach. Przedstawiono podstawowe właściwości fizykochemiczne wody stanowiące podstawę procesów sorpcji wody. W kolejnych rozdziałach pierwszej części, zaprezentowano badane substancje farmaceutyczne wchodzące w skład układów proszkowych, oraz organizm anhydrobiotyczny: porost *Niebla tigrina* pochodzący z chilijskiej pustyni Atacama. W drugiej części opisano modele sorpcji wody uwzględniające różne efekty powierzchniowe, a także przedstawiono skrócony opis teorii zjawiska MRJ. Przedstawiono procesy relaksacyjne możliwe do zaobserwowania przy pomocy spektroskopii i relaksometrii rezonansu jądrowego wodoru.

W trzeciej części opisano materiały i metody wykorzystane w przeprowadzonych badaniach, w tym preparatykę próbek, opis pomiarów grawimetrycznych oraz użytą aparaturę i sekwencje MRJ.

Część czwarta przedstawia uzyskane wyniki doświadczalne, kolejno analizując kinetykę sorpcji, izotermę sorpcyjną próbek, oraz różne aspekty rezultatów pomiarów MRJ. Ostatnie dwie części zawierają dyskusję wyników oraz wnioski.

I. Wstęp

Rozdział opisuje właściwości wody, istotne informacje na temat badanych układów farmaceutycznych, oraz charakterystykę badanego organizmu anhydrobiotycznego.

1. Własności wody w badanych układach

Woda, czyli inaczej tlenek wodoru jest lekką i jedną z najprostszych cząsteczek w wszechświecie znanym człowiekowi, lecz dzięki swoim unikalnym właściwościom jest podstawą życia. Człowiek jest organizmem bardzo od niej zależnym, gdyż stanowi ona od ok. 50 do 70% masy ciała w zależności od wieku czy płci. Już nawet niewielkie odwodnienie na poziomie powyżej 3% może powodować pierwsze objawy kliniczne, a powyżej 9% może zagrażać życiu [4].

Tak więc śladowe ilości wody mogą decydować o przetrwaniu lub śmierci danego osobnika czego dowodem są organizmy anhydrobiotyczne mogące wykorzystać nawet mikroskopijne jej ilości do przetrwania [5]. Molekuły wody mają wpływ także na strukturę i dynamikę molekuł lub makromolekuł, będących z nią w kontakcie.

Właśnie ten aspekt stanowi przedmiot prezentowanych badań, który będzie analizowany na przykładzie próbek farmaceutycznych, w których hydrofobowa substancja lecznicza jest rozpraszana w hydrofilowym polimerowym nośniku w procesie mielenia. Takie postępowanie prowadzi do wytworzenia stałych rozproszeń, które mają na celu poprawę rozpuszczalności i biodostępności hydrofobowych substancji leczniczych. Natomiast, aby zagwarantować stabilność stałych rozproszeń istotna jest wiedza nt. zjawisk, jakie mogą zachodzić w próbce pod wpływem sorpcji pary wodnej z otoczenia (rozdział II.1). Zostało to skonfrontowane z zachowaniem prostego organizmu, który jest przystosowany do życia na pustyni i przetrwania praktycznie w nieobecności wody (opis i charakterystyka w rozdziale I.3).

Woda jest bardzo reaktywnym związkiem chemicznym, inicjującym powstawanie nowych związków chemicznych, co stanowi trudności w utrzymaniu wolnego od innych substancji związku chemicznego [6]. Kolejnym aspektem jest zapoczątkowywanie reakcji chemicznych w środowisku wodnym, jak np. dysocjacji jonowej, spowodowanych polarną strukturą molekuły wody [7, 8].

W celu prezentacji anomalnych właściwości wody przedstawiono: opis jej struktury i wybranych własności fizykochemicznych, istotę występującego w wodzie wiązania wodorowego, oraz podstawowe informacje dotyczące dynamiki molekuł, co będzie stanowić podstawę do analizy sorpcji wody do badanych próbek.

1.1. Struktura i właściwości wody

Pierwszymi naukowcami, którzy opisali czym jest woda, byli pod koniec XVIII wieku Cavendish i Lavoisier, którzy wykazali, że woda jest związkiem złożonym z wodoru i tlenu w stosunku objętościowym 2:1. Później poznano dokładny skład wody (uwzględniający istnienie różnych izotopów: ^1H , ^2H , ^3H oraz ^{14}O , ^{15}O , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{19}O), który jest zależny od jej pochodzenia, ale można przyjąć, że abundancje $^{18}\text{H}_2\text{O}$, $^{17}\text{H}_2\text{O}$ i HDO wynoszą odpowiednio 0,2%, 0,04% i 0,03% [9]. W układach biologicznych dominuje forma $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ i to ona będzie w dalszej części tekstu rozumiana jako

„woda”, która dzięki swoim własnościom anomalnym jest jedną z podstawowych cząsteczek występujących w materii ożywionej.

We występującej w przyrodzie fazie lodu Ih cząsteczki wody są zachowane i tworzą regularną tetraedryczną sieć przestrzenną atomów tlenu, jednak wodory są nieuporządkowane, odpowiadając za entropię resztkową w 0 K. Struktura lodu Ih zawiera wewnątrz dużo wolnej przestrzeni, dzięki czemu w równowagowej temperaturze topnienia gęstość lodu jest mniejsza niż gęstość wody w stanie ciekłym.

Uśrednione wartości, jakie możemy uwzględnić dla struktury wody, to kąt między wiązaniami O–H wody wynosi $104,474^\circ$, a długość wiązania – $0,9575 \text{ \AA}$ [9] i jest to pojedyncze wiązanie kowalencyjne spolaryzowane.

Cząsteczka wody jest neutralna elektrycznie, jednak atom tlenu ma większą gęstość elektronową niż atomy wodoru, przez co pojawia się elektryczny moment dipolowy cząsteczki równy $1,855 \text{ D}$ dla izolowanej cząsteczki. Ta silna polarność wody przyczynia się do tworzenia wiązań wodorowych z innymi cząsteczkami wody, a także innymi cząsteczkami polarnymi. W stanie ciekłym moment dipolowy wody jest większy o $0,6\text{--}1,2 \text{ D}$, zaś dla najpowszechniej występującego lodu heksagonalnego wartość ta wynosi $3,09 \text{ D}$ [10].

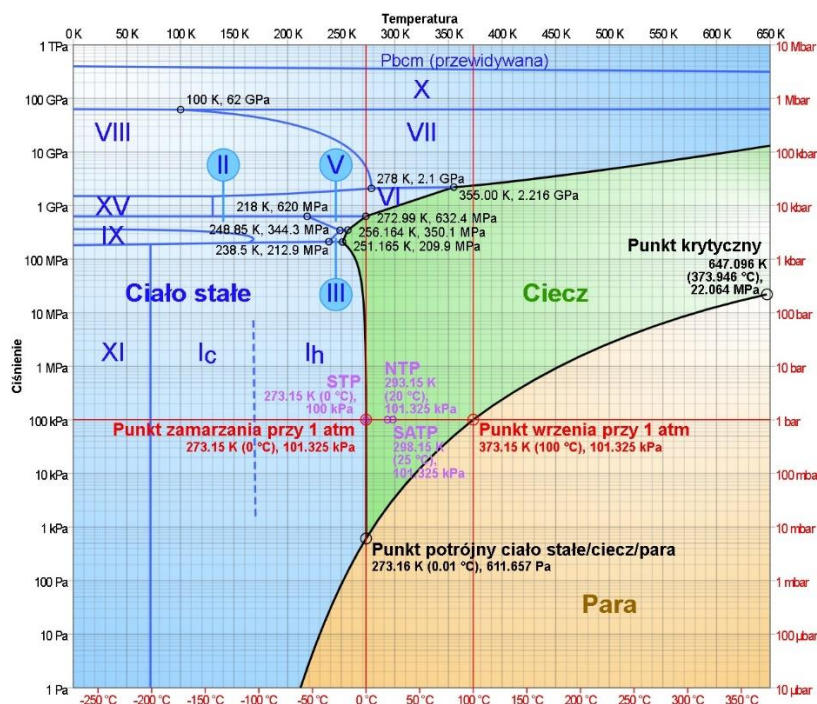
1.2. Wiązanie wodorowe

Koncepcja wiązania wodorowego jest niezbędna dla zrozumienia anomalnych własności wody. Powstawanie wiązań wodorowych tłumaczy dużą zdolność wody do zwilżania powierzchni różnych substancji. Z drugiej strony, hydrofobowość niektórych związków lub fragmentów ich cząsteczek można tłumaczyć brakiem lub niewielką zawartością atomów donorowych, mogących tworzyć wiązania wodorowe z cząsteczkami wody (np. w przypadku wosków, tłuszczów) [9, 11]. Wiązanie wodorowe jest zaliczane do czterech tzw. słabych oddziaływań fizycznych wraz z oddziaływaniem Van der Valsa, dipolowo-dipolowym czy jonowym. Cannon w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku określił warunki do powstania wiązania wodorowego typu X-H...Y, którymi są: wiązanie X-H jest częściowo jonowe, atom Y ma wolną parę elektronów na asymetrycznym orbitalu, w celu maksymalizacji energii wiązania wolna para elektronowa i wiązanie X-H muszą być ułożone do siebie współliniowo.

1.3. Procesy wpływające na dynamikę molekularną wody

Cząsteczka wody, która jest zbudowana z trzech atomów posiada 9 stopni swobody. Opisują one stan, w jakim znajduje się dany układ fizyczny. Dzięki tej informacji możemy stwierdzić, że cząsteczka wody może wykonywać trzy rodzaje ruchów: oscylacyjny, rotacyjny i translacyjny. Drgania oscylacyjne są ruchem wewnątrzcząsteczkowym, zmieniającym kształt molekuly przez zmianę długości wiązań lub kątów między nimi, oraz rozciąganie. Ruch rotacyjny obejmuje obroty cząsteczki

i zmianę jej orientacji względem otoczenia. Natomiast ruch translacyjny opisuje zmianę położenia wskutek dyfuzji lub ukierunkowanego przepływu.



Rysunek I.1. Diagram fazowy wody z wartościami ciśnienia i temperatury na liniach lub punktach przemian fazowych. Nazwy lodu oznaczono na niebiesko[12, 13].

Formy lodu zaznaczone w diagramie fazowym na Rys. I.1. to: I_h – lód heksagonalny (praktycznie cały lód w biosferze), I_c – metastabilny lód kubiczny, II – lód romboedryczny, III – lód tetragonalny, V – lód jednoskośnie krystaliczny, VI – lód tetragonalny krystaliczny, VII – lód kubiczny, VIII – lód VII z uporządkowanym położeniem atomów wodoru, IX – lód tetragonalny podobny do lodu III, X – lód symetryczny o orientacji protonowej, XI – lód rombiczny (ferroelektryczny, najbardziej stabilna forma lodu I_h), XV – lód VI o orientacji protonowej.

Szybkość ruchów molekuł wody zależy od jej fazy, która jest skorelowana z temperaturą i ciśnieniem zewnętrznym (Rys I.1), a w przypadku wody związanej z układem także od jego struktury. W przypadku czystej wody można rozważyć trzy główne regiony diagramu fazowego tj. obszar stanu stałego, ciekłego i gazowego. W warunkach normalnych ($T = 20^\circ\text{C}$, $p = 1 \text{ atm}$) woda jest w stanie ciekłym i wykonuje wszystkie rodzaje ruchów, podobnie jak w fazie gazowej. W przypadku lodu (np. I_h) cząsteczki wody ulegają głównie oscylacjom, a pozostałe formy ruchu są mocno ograniczone.

Przejścia fazowe wody wymagają zmian entalpii, entropii, a także struktury. Przykładowo przejście fazowe z fazy stałej do ciekłej zachodzi dzięki pobraniu ciepła (entalpii), która z kolei skutkuje zmianą struktury, przez co zmniejsza się stopień uporządkowania układu. Powoduje to wzrost entropii,

który odzwierciedla mobilność cząsteczek, czyli uwolnieniu stopni swobody ruchów translacyjnego i rotacyjnego.

Dynamika wody związanej z innym układem, np. ciałem stałym jest istotnie różna. Wiązania chemiczne redukują możliwość ruchu cząsteczki, stąd woda, a dokładniej cząsteczki wody, związane do powierzchni są mniej mobilne od cząsteczek wody w objętości fazy ciekłej, czy na granicy faz cieczo-gaz. Różnice te możemy zaobserwować na podstawie np. widm $^1\text{H-MR}$.

2. Badane układy farmaceutyczne

2.1. Wprowadzenie i cel badań próbek farmaceutycznych

Produkt leczniczy stanowi substancję lub mieszaninę substancji, która może służyć do zapobiegania, leczenia, diagnostyki lub zmiany fizjologicznych funkcji organizmu. Podany pacjentowi powinien wywoływać działanie immunologiczne, farmakologiczne lub metaboliczne.

Wiadomo, że stałe doustne postacie leków, jak np. tabletki, czy kapsułki, są najchętniej stosowane przez pacjentów. Dąży się zatem, do opracowywania nowych produktów leczniczych lub doskonalenia już stosowanych w lecznictwie w taki sposób, aby możliwe było ich podawanie pacjentowi właśnie w tej formie. Jednak, aby substancja lecznicza po podaniu doustnym wywołała ogólnoustrojowy efekt terapeutyczny, konieczne jest zapewnienie optymalnych warunków jej wchłaniania z przewodu pokarmowego. Dyfuzja bierna jest jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za ten proces, a szybkość dyfuzji bezpośrednio przekłada się na czas, po którym obserwuje się efekt terapeutyczny. Z tego powodu, rozpuszczalność oraz szybkość rozpuszczania substancji leczniczej w środowisku żołądka i jelit, warunkuje wchłanianie substancji leczniczych. Jeśli substancja lecznicza charakteryzuje się trudnościami w rozpuszczaniu w wodzie, stwarza to istotne ograniczenia technologiczne na etapie rozwoju nowych produktów leczniczych. Rozwiązanie tego problemu może stanowić właściwy dobór substancji pomocniczych lub/i technologii wytwarzania, które poprawią rozpuszczalność substancji czynnej w przewodzie pokarmowym. Przykładem jest zastosowanie substancji pomocniczych zwiększających hydrofilowość preparatu, które ułatwiają zwilżenie hydrofobowych cząstek substancji leczniczej.

Ponadto dąży się do przekształcenia krystalicznych substancji leczniczych w ich formy bezpostaciowe (amorficzne), które lepiej rozpuszczają się w wodzie. Ich wadą jest jednak ograniczona stabilność podczas przechowywania związana z ryzykiem rekrytalizacji formy amorficznej. Czynnikiem, który sprzyja rekrytalizacji amorficznych substancji leczniczych podczas przechowywania, jest plastyfikujący wpływ cząsteczek wody, absorbowanej z otoczenia.

W celu stabilizacji amorficznej formy substancji leczniczej istotny jest zatem właściwy dobór nośnika, który z jednej strony będzie korzystnie wpływał na rozpuszczalność, a z drugiej strony zagwarantuje stabilność amorficznej formulacji w okresie przechowywania.

Układy, w których substancja lecznicza jest rozproszona w nośniku, który jest nietoksyczny i nie wykazuje własnego działania farmakodynamicznego, określa się mianem stałych rozproszeń [14]. Stałe rozproszenia mają postać proszku, który może być prasowany w celu uformowania tabletek lub dozowany do kapsułek, które stanowią finalną postać leku przeznaczoną do podania doustnego pacjentom. Niestety hydrofilowe nośniki stosowane do wytwarzania stałych rozproszeń mogą mieć właściwości higroskopijne, co ogranicza ich praktyczne zastosowanie [15].

W niniejszej pracy doktorskiej do badań wpływu śladowych zawartości wody wybrano dwie substancje lecznicze trudno rozpuszczalne w wodzie, tj. tadalafil (Rys. I.2a) oraz monohydrat bozentanu (Rys I.4a). Obie substancje lecznicze są stosowane w farmakoterapii nadciśnienia tętniczego płucnego, jednak każda z nich charakteryzuje się odmiennym mechanizmem działania. W ostatnich latach, tadalafil i bozentan były przedmiotem badań, których celem było wykazanie ich przydatności terapeutycznej w nowych wskazaniach klinicznych [16 – 20]. Uzasadnia to poszukiwanie rozwiązań technologicznych, które w przyszłości ułatwią opracowanie postaci leku dostosowanych w swojej formie do farmakoterapii nowych rodzajów chorób.

Przedmiotem analiz opisanych w niniejszej rozprawie były w szczególności dwuskładnikowe stałe rozproszenia, złożone z modelowych substancji leczniczych oraz hydrofilowych polimerów. Stałe rozproszenie to układ proszkowy, w którym substancja lecznicza jest w stanie molekularnego rozproszenia w matrycy farmakologicznie obojętnego nośnika (np. hydrofilowego polimeru). Nośnik ma stabilizować amorficzną formę substancji leczniczej, zapobiegając jej rekrytalizacji podczas przechowywania. W niniejszej rozprawie stałe rozproszenia przygotowano metodą mielenia w młynie kulowym. Polimer Soluplus® wybrano jako nośnik dla tadalafilu. Z kolei, monohydrat bozentanu łączono z Kollidonem VA 64®.

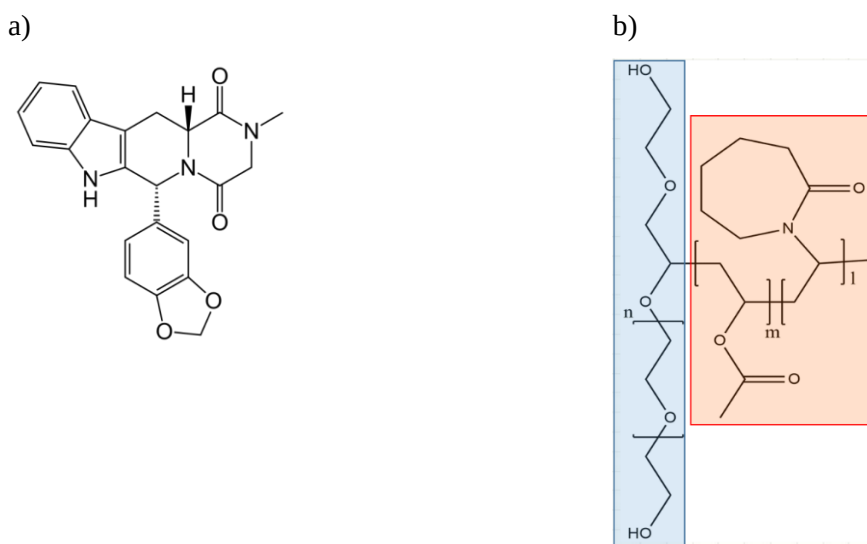
Założono, że wyjaśnienie zjawisk fizycznych, towarzyszących sorpcji pary wodnej z otoczenia, umożliwi optymalizację składu stałego rozproszenia oraz parametrów procesu jego wytwarzania. W przyszłości może to również ułatwić dobór opakowania, dostosowanego do warunków przechowywania finalnej postaci leku.

Biorąc pod uwagę, korzystne właściwości stałych rozproszeń pod kątem możliwości zwiększenia dostępności biologicznej substancji leczniczej, jak również ryzyko rekrytalizacji niestabilnej amorficznej formy substancji leczniczej podczas przechowywania, celem badań opisanych w rozprawie było wyjaśnienie oddziaływań molekularnych między parą wodną i substancją leczniczą, parą wodną i hydrofilowym nośnikiem, wreszcie parą wodną i stałym rozproszeniem.

W szczególności, dokonano analizy wpływu procesu technologicznego, struktury stałej matrycy mikroheterogennej oraz ilości hydrofilowego nośnika wielkocząsteczkowego, na kinetykę hydratacji stałych rozproszeń z fazy gazowej. Zidentyfikowano frakcje wody w stałych rozproszeniach oraz dokonano oceny zmian zachodzących w matrycy stałego rozproszenia pod wpływem zaabsorbowanej pary wodnej (np. pęcznienie, rozpuszczanie). Do oceny kinetyki hydratacji zastosowano metodę grawimetryczną. Przy użyciu modeli matematycznych określono mechanizm sorpcji wody. Dynamikę molekularną wody w stałych rozproszeniach analizowano metodą spektroskopii oraz relaksometrii magnetycznego rezonansu jądrowego protonów w ciele stałym.

2.2. Charakterystyka stałych rozproszeń z tadalafilem

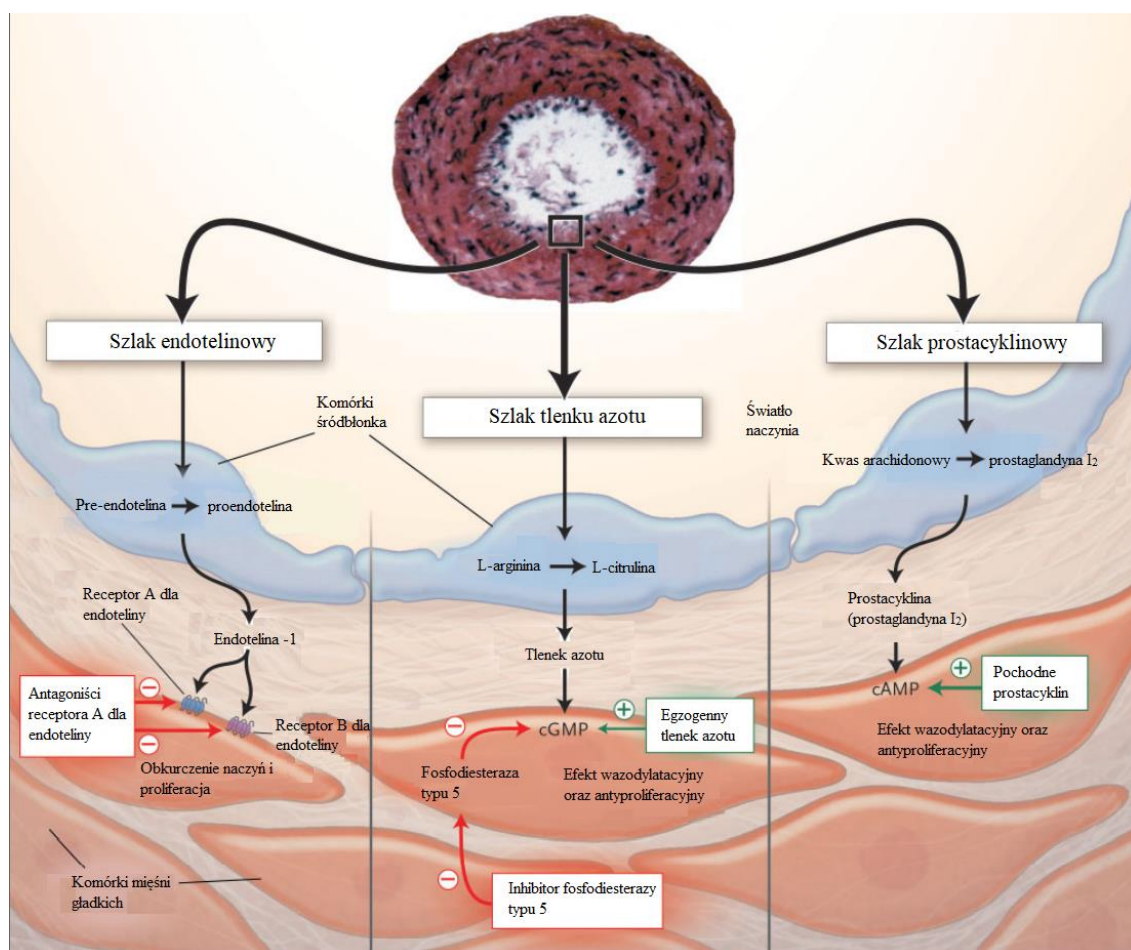
Tadalafil, pochodna czteropierścieniowego układu heksahydropirazyno-pirydo-indolu (rys. I.2a), jest stosowany w farmakoterapii jako inhibitor fosfodiesterazy-5 (PDE5). Enzym ten występuje w mięśniach gładkich ciał jamistych, naczyniach krwionośnych, mięśniach szkieletowych, płytkach krwi, płucach, nerkach i w mózgdzku. W porównaniu z innymi substancjami leczniczymi z tej grupy, tadalafil charakteryzuje się dłuższym czasem biologicznego półtrwania tj. 17,5 h, oraz zwiększoną selektywnością wobec PDE5 w porównaniu do innych izoform fosfodiesterazy (np. PDE1, PDE6 i PDE11). Mniejsze jest zatem ryzyko zaburzeń neurologicznych (PDE1), zaburzeń widzenia (PDE6) oraz bólu mięśni (PDE11) [21]. Tadalafil ma znikomą rozpuszczalność w wodzie ($< 5 \mu\text{g/mL}$). Z tego względu, jego dostępność biologiczna jest ograniczona i wynosi tylko 36 %.



Rysunek I.2. Wzór strukturalny: a) tadalafilu [22], b) polimeru Soluplus®. Na niebiesko zaznaczono część hydrofilową, na czerwono zaznaczono część lipofilową struktury polimeru.

Do tej pory zarejestrowano wiele produktów leczniczych z tadalafilem. Są to tabletki zawierające od 5 mg do 20 mg substancji leczniczej. Wskazania terapeutyczne dla tadalafilu obejmują

leczenie zaburzeń erekcji [23], łagodnego przerostu prostaty [24], oraz nadciśnienia tętniczego płucnego [25]. Prowadzone są badania nad wpływem tadalafilu na funkcjonowanie naczyń wieńcowych oraz w terapii schorzeń wynikających z osłabienia funkcji śródbłónka [16].



Rysunek I.3. Mechanizmy działania tadalafilu i bozentanu w terapii nadciśnienia płucnego [26].

Ze schematu przedstawionego na Rys. I.3 wynika, że głównym efektem działania tadalafilu jest zwiększenie stężenia cGMP w komórkach na skutek zahamowania aktywności fosfodiesterazy-5, która odpowiada za rozkład tego związku. W rezultacie duże stężenie cGMP powoduje rozkurcz naczyń, obniżenie ciśnienia oraz poprawę ukrwienia narządów.

W ostatnich latach podejmowane są próby zwiększenia dostępności biologicznej tadalafilu przez zastosowanie technologii mających na celu poprawę rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania tej substancji leczniczej [27]. Zaproponowano m.in. wytwarzanie stałych rozprożeń metodą suszenia rozpyłowego [28], liofilizacji [29] oraz mielenia [30]. Wykazano przydatność kopolimeru winylopirolidonu z octanem winylu (Kollidon VA64®) do stabilizacji amorficznej formy tadalafilu [29]. Stwierdzono zwiększenie ilości rozpuszczonej substancji leczniczej ze stałych rozprożeń, jak również korzystny profil uwalniania tadalafilu z tabletek przygotowanych przez prasowanie stałego rozprożenia w porównaniu z niemodyfikowaną substancją leczniczą [30]. Poprawa szybkości rozpuszczania

tadalafilu była również możliwa przy zastosowaniu jako nośników pochodnych celulozy oraz polimeru Soluplus (Rys. I.2b).

Soluplus® to kopolimer złożony z glikolu polietylenowego 6000 (PEG 6000), winylokaprolaktamu oraz octanu winylu połączonych w proporcjach 13:57:30. Jest on dostępny w postaci drobnego granulatu w kolorze kremowym o charakterystycznym zapachu.

W strukturze Soluplus można wyróżnić część hydrofilową i lipofilową. Za właściwości hydrofilowe odpowiada fragment glikolu polioksyetylenowego 6000 (PEG 6000). Natomiast za właściwości lipofilowe odpowiada winylokaprolaktam i octan winylu (Rys. I.2b). Masa cząsteczkowa Soluplus mieści się w zakresie od 90 do 140 g/mol. Jest to polimer amorficzny, dla którego temperatura przejścia szklanego (T_g) wynosi ok. 70 °C.

W środowisku wodnym, cząstki Soluplus® pęcznieją, następnie rozpuszczają się tworząc micelle. Ich obecność umożliwia solubilizację trudno rozpuszczalnych substancji leczniczych. Z tego względu jest on zaliczany do tzw. solubilizatorów micelarnych [31]. Co istotne, solubilizacja substancji leczniczej w wodnym środowisku przewodu pokarmowego może przekładać się na zwiększenie jej wchłaniania.

We wcześniejszych badaniach prowadzonych nad stałymi rozproszczeniami tadalafilu w Soluplus®, wykazano znaczne zwiększenie szybkości rozpuszczania substancji leczniczej w warunkach *in vitro*, jak również dostępności biologicznej tadalafilu podawanego dożołądkowo szczurom [32]. Miało to związek nie tylko z działaniem solubilizującym polimeru, ale również wiązało się z amorfizacją krystalicznego tadalafilu pod wpływem oddziaływania siły mechanicznej w procesie mielenia.

Zaletą amorficznej formy tadalafilu jest wysoka temperatura przejścia szklanego ($T_g = 147$ °C), co sugeruje jej stabilność w temperaturze pokojowej. Potwierdzono, że niezależnie od ilości polimeru, stałe rozproszczenia tadalafilu w Soluplus, przygotowane metodą mielenia, były amorficzne przez 5 miesięcy [32]. Wiadomo, że o efektywności procesu mielenia pod kątem amorfizacji substancji leczniczej decydują: właściwości fizykochemiczne związku, parametry procesu (prędkość obrotowa młyna, czas mielenia, temperatura), materiał z jakiego wykonano naczynia i kule mielące, ilość oraz rozmiar kul mielących, a także stopień wypełnienia naczyń [33].

Zaletami metody mielenia jako technologii wytwarzania stałych rozproszeń są: mniejsze ryzyko degradacji termicznej substancji leczniczej niż w przypadku użycia innych technologii (np. ekstruzji topliwej) oraz brak konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych, które z kolei są niezbędne w innych metodach, jak np. suszenie rozpyłowe. Do wad procesu mielenia należy natomiast, brak jego ciągłości, a także znaczne zużycie energii (długi czas mielenia), które jest uzależnione od energii sieci krystalicznej substancji leczniczej [30]. Zmniejszenie wielkości cząstek w tym procesie, powoduje zwiększenie ich powierzchni właściwej. W środowisku wodnym zwiększa się powierzchnia kontaktu cząstek stałych z rozpuszczalnikiem, co jest korzystne pod kątem zwiększenia szybkości rozpuszczania. Jednakże, sorpcja pary wodnej z otoczenia zachodzi również szybciej na powierzchni cząstek

zmikronizowanych niż w przypadku cząstek nierozdrobnionych, co może skutkować niekorzystnymi zmianami właściwości fizycznych, chemicznych i mechanicznych finalnej postaci leku podczas przechowywania. W szczególności jest to istotne, gdy do stabilizacji formy amorficznej stosowane są nośniki higroskopijne, które przechowywane w warunkach wysokiej wilgotności mogą pęcznieć lub/i rozpuszczać się. Zmiany tego rodzaju mogą ostatecznie uniemożliwić zastosowanie stałych rozprożeń w praktyce klinicznej.

Na podstawie wytycznych opracowanych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA), jakość produktu leczniczego powinna być zagwarantowana przez właściwe zaplanowanie procesu wytwarzania. Taka strategia rozwoju produktów leczniczych jest określana mianem koncepcji *Quality by Design* (QbD). W celu efektywnej implementacji tej koncepcji, niezbędna jest identyfikacja zmiennych krytycznych zależnych zarówno od formulacji (np. rodzaj i ilość nośnika), jak również procesu technologicznego (np. prędkość obrotowa, czas mielenia) oraz dogłębne zrozumienie, jaki wpływ mają te parametry na charakterystykę końcową produktu leczniczego. Odchodzi się tym samym od zapewnienia jakości poprzez tradycyjną kontrolę jakości finalnego produktu. Dąży się natomiast, aby na etapie prac badawczo-rozwojowych zaplanować doświadczenia w taki sposób, aby przez właściwy dobór warunków eksperymentalnych zidentyfikować najistotniejsze parametry i ocenić ich wpływ na dany proces [34, 35].

Do tej pory dla stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus, sporządzanych metodą mielenia kulowego, określono parametry krytyczne zależne od formulacji i procesu wytwarzania. Wykazano, że ilość polimeru Soluplus® miała istotny wpływ na szybkość rozpuszczania tadalafilu ze stałych rozprożeń. Ponadto, prędkość obrotowa oraz czas mielenia warunkowały kinetykę procesu rozpuszczania [36].

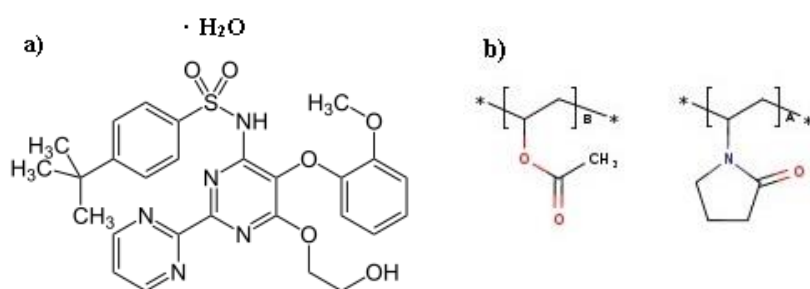
Biorąc pod uwagę powyższe, przedmiotem analiz opisanych w niniejszej rozprawie była ocena wpływu ww. zmiennych krytycznych czyli ilości polimeru, jak również czasu i prędkości obrotowej młyna kulowego, na zmiany fizyczne, zachodzące w stałych rozprośzeniach pod wpływem ich hydratacji z fazy gazowej.

2.3. Charakterystyka stałych rozprożeń z bozentanem

Bozentan (Rys. I.4a) jest przykładem substancji leczniczej z grupy nieselektywnych antagonistów receptora endoteliny. Został wprowadzony do leczenia w 2001 r. i jest przeznaczony do terapii pierwotnego i wtórnego nadciśnienia płucnego [26]. Ponadto jest stosowany w leczeniu twardziny układowej w celu zmniejszenia ilości owrzodzeń na palcach rąk i stóp. Wyniki badań klinicznych wskazują obecnie na potencjalną przydatność bozentanu w terapii idiopatycznego zwłóknienia płuc [17], zaawansowanego czerniaka [18], owrzodzeń skóry towarzyszących cukrzycy [19] lub stwardnienia rozsianego [20].

Obecnie w leczeniu dostępne są preparaty handlowe z bozentanem w postaci tabletek, zawierających 62,5 mg lub 125 mg substancji leczniczej. Podobnie jak tadalafil, również bozentan jest substancją leczniczą trudno rozpuszczalną w wodzie. Jednak w odróżnieniu od tadalafilu, jego rozpuszczalność zależy od pH. Bozentan jest nierozpuszczalny w kwaśnym środowisku soku żołądkowego ($< 2 \mu\text{g/mL}$), natomiast ponad 80-krotnie lepiej rozpuszcza się w zasadowym pH płynu jelitowego [37]. Po doustnym podaniu, jego dostępność biologiczna jest ograniczona i wynosi 50 % [38].

Podobnie jak w przypadku tadalafilu [29], w celu stabilizacji amorficznej formy bozentanu w stałych rozproszeniach przygotowanych metodą mielenia użyto polimer hydrofilowy - Kollidon VA-64® (kopowidon). Stałe rozproszenia opracowano w celu zwiększenia biodostępności substancji aktywnej po podaniu doustnym.



Rysunek I.4. Wzór strukturalny monohydratu bozentanu (a) i Kollidonu VA64 (b).

Kollidon VA 64® (kopowidon) jest kopolimerem winylopirolidonu z octanem winylu (Rys. I.4b) o masie cząsteczkowej 197,2 g/mol, temperaturze topnienia powyżej 140°C , temperaturze przejścia fazowego 106°C i bardzo dobrej rozpuszczalności w wodzie, która wynosi powyżej 300 g/L [39 – 41]. Kopowidon jest stosowany jako substancja wiążąca w procesie wytwarzania stałych doustnych postaci leku jak np. granulaty, tabletki. Z uwagi na dobrą rozpuszczalność polimeru w rozpuszczalnikach organicznych, opisano przydatność kopowidonu do sporządzania stałych rozprożeń z licznymi substancjami leczniczymi np. ezetymibem [42], indometacyną [43], ibuprofenem [44]. W leczeniu dostępne są produkty lecznicze, zawierających kopowidon jako nośnik stałego rozproszenia m.in. z ritonawirem (Norvir) lub olaparybem (Lynparza) [45].

Biorąc pod uwagę hydrofilowy charakter kopowidonu oraz uwodnienie cząsteczki bozentanu (monohydrat), konieczna jest ocena stabilności fizycznej dwuskładnikowych formułacji, zarówno krystalicznych jak i amorficznych, zwłaszcza gdy są one narażone na oddziaływanie pary wodnej, np. na skutek niewystarczającej szczelności/barierowości opakowania.

Celem badań opisanych w niniejszej rozprawie była analiza wpływu innego polimeru hydrofilowego na stabilność fizyczną stałych rozprożeń z bozentanem pod wpływem ich hydratacji z fazy gazowej, która ma duży wpływ na szereg parametrów uzyskanych stałych rozprożeń [15]. Stałe

rozproszenia przygotowano w procesie mielenia. Monohydrat bozentanu łączono z kopowidonem w stosunku wagowym 1+1, dla porównania analizie poddano samą substancję leczniczą i sam polimer.

3. Charakterystyka badanego organizmu anhydrobiotycznego

W porównaniu do opisanych wcześniej próbek farmaceutycznych, gdzie śladowe ilości wody mogą mieć wpływ na stabilność całego układu, w przypadku organizmów anhydrobiotycznych wpływ śladowych ilości wody jest inny. Możliwe zmiany strukturalne nakładają się na potencjalne wznowienie i nasilenie procesów życiowych organizmu.

Gatunkiem, jaki poddano analizie porównawczej jest porost strzępkowy *Niebla tigrina* [46] (Rysunek. I.5). Jest to gatunek endemiczny, zasiedlający obszar nadmorskiej pustyni Atacama, w Chile. Formacje Lomas, odpowiadające wybrzeżu o wysokiej topografii, z charakterystyczną florą i fauną, są w dużej mierze zdefiniowane przez odległość od wybrzeża i wysokość w stosunku do warstwy mgły pochodzącej z inwersji morskiej lub do camanchaca [47]. Temperatura powietrza osiąga 13 °C w zimie i 20 °C w lecie, z maksymalną wartością 26 °C; przy wysokiej wilgotności względnej 80-85%. Opady rzadko przekraczają 10 mm na rok, jedynie w latach "El Niño", kiedy anomalie temperatury powierzchni morza są dodatnie, zdarzają się ekstremalne opady o większej intensywności [47, 48].

Organizmy odporne na skrajne odwodnienie, takie jak grzyby zlichenizowane lub niektóre owady, mogą przekształcić się w formę kryptobiotyczną. W tej formie są one zdolne przetrwać okres suszy między opadami. Takie zdolności biologiczne nieczęsto pojawiają się podczas procesów ewolucyjnych, dlatego zwraca się uwagę na fizykochemiczne podstawy odporności na odwodnienie, a nie tylko na ostateczny efekt funkcjonalny [49–51].



Rysunek 1.5. Środowisko naturalne porostów na pustyni przybrzeżnej, Park Narodowy Pan de Azúcar, północne Chile; (a) zbocze przybrzeżne i napływająca mgła; (b) kolonia porostów w strefie mgły przybrzeżnej; (c) plecha *Niebla tigrina*, *in situ* [52].

Plecha porostów ulega rehydratacji z fazy gazowej do stosunkowo wysokiego poziomu uwodnienia (np. w wilgotnej komorze). *Usnea aurantiaco-atra* rehydratuje do wartości nasycenia $\Delta m/m_0 = 0,85 \pm 0,03$, *Ramalina terebrata* do wartości $\Delta m/m_0 = 1,2 \pm 0,05$, natomiast *Himantormia lugubris* do $\Delta m/m_0 = 0,85 \pm 0,05$. Maksymalny poziom uwodnienia z fazy gazowej (przy $p/p_0 = 100\%$) dla plechy *U. antarctica* wyniósł $\Delta m/m_0 = 1,10$, dla plechy *L. puberulum* $\Delta m/m_0 = 0,64$, dla *R. terebrata* $\Delta m/m_0 = 1,6$, dla *U. aprina* $\Delta m/m_0 = 0,82$, dla *C. aculeata* $\Delta m/m_0 = 1,0$, dla *T. compluculamatu* $\Delta m/m_0 = 1,3$, natomiast w przypadku jego wolnożyjącego fotobionta *P. crispa* $\Delta m/m_0 = 0,95$ [49]. Poziom ten jest zbliżony do uzyskiwanego dla hydrofilowych polimerów, zawartych w próbkach farmaceutycznych (Soluplus®, Kollidon VA64®), a także do wartości poziomu uwodnienia, jaki uzyskiwano dla badanej w tej rozprawie plechy.

W plechach niektórych gatunków porostów antarktycznych, dla których powyżej opisano wartości maksymalnego poziomu uwodnienia, podobnie jak w badanym w rozprawie poroście *Niebla tigrina*, podczas pomiarów $^1\text{H-NMR}$ ujawniły nieoczekiwany nadwyżkowy przyrost sygnału od protonów mobilnych, pojawiający się wraz ze wzrastającym poziomem uwodnienia podczas łagodnej rehydratacji prowadzonej z fazy gazowej. Efekt ten może być spowodowany dwiema przyczynami, a mianowicie prostym rozcieńczeniem rozpuszczalnej w wodzie frakcji stałej, lub dekompozycji składników wchodzących w skład matrycy stałej [53].

Tak więc celem badań plechy tego grzyba zlichenizowanego jako przykładowego organizmu anhydrobiotycznego było porównanie zachowania omawianego uniwersalnego adsorbentu, jakim jest woda, do efektu jaki ma ona na wcześniej prezentowane hydrofobowe substancje lecznicze modyfikowane technologicznie w procesie mielenia.

II. Teoria

Rozdział opisuje zjawiska fizyczne wykorzystywane w prowadzonych badaniach

1. Badane zjawiska fizyczne

W poniższym rozdziale zostały opisane zjawiska fizyczne powiązane z prowadzonymi badaniami. Na podstawie wykonanych tras hydratacyjnych (rozdział IV.1) możemy dopasować modele opisujące zjawisko sorpcji, którego podstawy teoretyczne opisano poniżej. W dalszej części rozdziału opisano podstawy magnetycznego rezonansu jądrowego i zjawisk mu towarzyszących wykorzystywane do opisu badań relaksometrycznych i spektroskopii ^1H -MRJ.

2. Sorpcja na powierzchniach

Sorpcją zazwyczaj nazywa się początkowy etap penetracji fazy skondensowanej przez cząsteczkę danej substancji. Uwzględnia on adsorpcję, czyli nagromadzenie się cząsteczek na powierzchni oraz absorpcję w objętości materiału. Substancję ulegającą adsorpcji nazywa się adsorbat, a substancję penetrowaną przez adsorbat - adsorbentem lub podłożem. Na powierzchnię czynną adsorbentu (stałego) składają się również różnego rodzaju pory i kanaliki. Uwzględniając stopień rozdrobnienia adsorbentu zwiększa się jego powierzchnia właściwa, wyrażana jako powierzchnia na jednostkę masy.

Związek między względnym ciśnieniem par, h , i zawartością substancji w materiale opisuje w danej temperaturze izoterma sorpcyjna. W przypadku sorpcji wody względne ciśnienie par, h , określamy także jako wilgotność względną, jest ona stosunkiem ciśnienia pary wodnej zawartej w powietrzu, p , do ciśnienia pary nasyconej, p_0 :

$$h = \frac{p}{p_0} \quad (1)$$

Zawartość wody w sorbencie można zaś zdefiniować jako masę zaabsorbowanej wody, Δm , na jednostkę suchej masy próbki, m_0 :

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{m_p - m_0}{m_0} \quad (2)$$

gdzie m_p to masa badanej próbki.

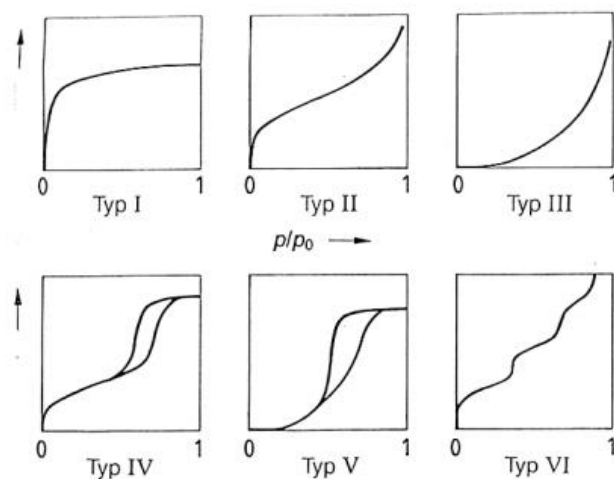
W zależności od występujących oddziaływań między składnikami procesu wyróżnia się dwa rodzaje sorpcji. Adsorpcja fizyczna występuje z powodu oddziaływań sił międzycząsteczkowych (siły van der Waalsa, wiązania wodorowe, itp.), podczas gdy adsorpcja chemiczna związana jest z przejściem elektronów pomiędzy ciałem stałym a substancją adsorbowaną. Proces ten wiąże się z powstaniem związku chemicznego między adsorbentem i pierwszą warstwą zaadsorbowanej substancji. Energia wydzielana w trakcie adsorpcji fizycznej jest tego samego rzędu co entalpia kondensacji, jej wartości wynoszą od kilku do około 50 kJ/mol, w przypadku chemisorpcji entalpia tego procesu jest większa o rząd wielkości i wynosi ok. 200 kJ/mol [54].

3. Izotermy sorpcyjne i ich klasyfikacja

Izoterma sorpcyjna przedstawia, jaka ilość substancji zostanie zaabsorbowana w zależności od stanu układu (czyli dla zestawu parametrów: ciśnienia i temperatury dla adsorpcji z fazy gazowej; ciśnienia, temperatury i stężenia w przypadku adsorpcji z cieczy). Ilość zaadsorbowanej substancji może zostać przedstawiona, jako pokrycie powierzchni, tzn. stosunek liczby miejsc adsorpcyjne zajętych do liczby miejsc adsorpcyjnych wolnych.

Obecnie stosuje się klasyfikację wg IUPAC (Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej) wyróżniająca VI typów izoterm adsorpcji (Rys. II.1) [55]:

- Typ I - charakterystyczny dla adsorbentów mikroporowatych, opisywany najprostszą izotermą Langmuira;
- Typ II - (najczęściej spotykany) i typ III (bardzo rzadko występujący) - charakterystyczny dla adsorbentów mikroporowatych, izoterma ma formę sigmoidy;
- Typ IV - (rozposzechniony) i V (rzadko występujący) – charakterystyczny dla mezoporowatych adsorbentów;
- Typ VI - adsorpcja wielowarstwowa na powierzchni jednorodnej.



Rysunek II.1. Ogólna prezentacja modeli izoterm sorpcji według typów.

Typ I, II i III jest zgodny z klasyfikacją wg. Brunauera. W toku wykonywanych badań dopasowano model odpowiadający sorpcji II typu, która w skrajnym przypadku przechodzi w typ III.

3.1. Izoterma Langmuira

Mechanizm przyłączania i odłączania molekuł od powierzchni adsorbenta, pierwszy raz został opisany przez Irvinga Langmuira w 1918 r. [56]. Przedstawił on model jednowarstwowej sorpcji cząsteczek, trafnie opisujący dane doświadczalne dla sorpcji z fazy gazowej w zakresie wilgotności $h < 0,1$. Jego model opierał się na szeregu założeń:

- stały adsorbent ma na swej powierzchni szczególnie aktywne miejsca zwane centrami aktywnymi, którymi mogą być na przykład ściany mikrokrystalitów, defekty sieciowe lub w przypadku adsorbentów złożonych, granice faz,
- do każdego centrum aktywnego może zostać zaadsorbowana, w wyniku adsorpcji fizycznej bądź chemicznej, jedna cząsteczka adsorbenta (powstaje warstwa monomolekularna),
- cząsteczki zaadsorbowane na centrach adsorpcji nie oddziałują wzajemnie na siebie,
- proces adsorpcji ma charakter dynamicznej równowagi pomiędzy adsorpcją i procesem odwrotnym do adsorpcji – desorpcją,
- zaadsorbowane cząsteczki nie wykazują ruchu translacyjnego (drgania, czy przemieszczania się) w płaszczyźnie powierzchni adsorbenta,
- energia adsorpcji jest stała i nie zależy od stopnia pokrycia powierzchni.

Zakładając, że liczba centrów aktywnych na powierzchni jest stała, proces adsorpcji można zapisać równaniem



gdzie A to liczba cząsteczek gazu, B – liczba wolnych miejsc aktywnych, a BA to liczba - zajętych miejsc aktywnych. Równowagowy współczynnik sorpcji można zapisać jako

$$K = \frac{[FA]}{[F] \cdot [A]}. \quad (4)$$

Jeśli Ξ to stosunek powierzchni zajętej do całkowitej powierzchni ($0 < \Xi < 1$) i przyjmując, że $[BA]$ jest proporcjonalne do pokrycia powierzchni zaadsorbowanymi cząsteczkami (czyli jest proporcjonalne do Ξ), podczas gdy $[B]$ jest proporcjonalne do liczby miejsc niezapełnionych, $1 - \Xi$, a $[A]$ jest proporcjonalne do ciśnienia gazu p , można zapisać

$$K = \frac{\Xi}{(1-\Xi)p} \Rightarrow \Xi = \frac{K \cdot p}{1 + K \cdot p}. \quad (5)$$

Faktem jest, że K jest wartością stałą tylko wtedy, gdy entalpia adsorpcji jest niezależna od stopnia pokrycia powierzchni. Współczynnik K opisujący równowagę między procesami sorpcji i desorpcji zależy m.in. od temperatury układu oraz od ciśnienia gazu nad powierzchnią. Oba te parametry stanu wywierają przeciwny wpływ na stężenie adsorbentu. Przykładowo, pokrycie powierzchni wzrasta ze zwiększaniem ciśnienia gazu, lecz maleje jeśli przy stałym ciśnieniu gazu rośnie temperatura.

3.2. Izoterma BET

Model Langmuira opisuje szczególną sytuację, gdy adsorpcja jest ograniczona do jednej warstwy, a więc ilość adsorbentu szybko się wysyca. Nie opisuje on m.in. zjawiska kondensacji występującego powszechnie dla dużych ciśnień pary.

Pod koniec okresu międzywojennego XX wieku Brunauer, Emmet i Teller na podstawie teorii Langmuira opracowali teorię adsorpcji wielowarstwowej [57]. Głównym założeniem modelu sorpcji BET jest równowaga w warunkach nasycenia, szybkość wiązania molekuł ap_0 i szybkość ich odłączania C od wtórnych miejsc wiążących jest jednakowa. Prowadzi do wniosku, że wartość parametru $b = 1$, co oznacza, że liczby A_{i+1} i A_i . Stosując te założenia do układu równań (8-10) dla $h = 1$ otrzymujemy równanie izotermy BET:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-h)(1+b_1 h-h)} \quad (6)$$

3.3. Izoterma GAB-Dent

Model BET dobrze opisuje dane doświadczalne w zakresie wilgotności względnej atmosfery do $h \approx 0,45$, natomiast powyżej tej wartości stosuje się bardziej ogólny model [58]. Stosowany skrót GAB odnosi się do nazwisk twórców (Guggenheim, Anderson i De Boer), którzy dokładniej rozwinęli model sorpcji wielowarstwowej, aby miał on zastosowanie w szerokim zakresie aktywności sorpcyjnej wody. Podstawy tego modelu są identyczne z poprzednikiem z lat 30-tych z tym wyjątkiem, iż opisuje on dodatkowo występowanie zróżnicowania tempa przyłączania molekuł w miejscach wtórnych. Zgodnie z założeniami modelu przyjmijmy pierwotne miejsca wiążące jako A_0 symbolem A_i oznaczmy pozostałe wtórne miejsca wiążące. W wyniku otrzymamy wzór na sumę wszystkich miejsc wiążących:

$$N = \sum_{i=0}^{\infty} A_i \quad (7)$$

Uwzględniając parametry opisujące ruch molekuł adsorbentu, należy rozwiązać układ równań opisujący kinetykę sorpcji. Niech ap oznacza szybkość wiązania molekuł (a - współczynnik przyłączania, p - ciśnienie atmosferyczne), C_0 szybkość ucieczki z miejsc pierwotnych, a C szybkość ucieczki dla miejsc wtórnych. W warunkach równowagi termodynamicznej otrzymujemy następujący układ równań:

$$\begin{cases} \frac{1}{N} \frac{dA_0}{dt} = C_0 \frac{A_1}{N} - ap \frac{A_0}{N} = 0 \\ \frac{1}{N} \frac{dA_1}{dt} = C \frac{A_2}{N} - ap \frac{A_1}{N} - C_0 \frac{A_1}{N} + ap \frac{A_0}{N} = 0 \\ \frac{1}{N} \frac{dA_2}{dt} = C \frac{A_2}{N} - ap \frac{A_2}{N} - C \frac{A_1}{N} + ap \frac{A_0}{N} = 0 \end{cases} \quad (8 - 10),$$

dzięki któremu możemy wyznaczyć liczbę miejsc wiążących i molekuł zależnych od A_0 . Dzięki tej operacji uzyskujemy zależność:

$$\frac{A_i}{N} = \left(\frac{a}{C}\right)^{i-1} \frac{a}{C_0} p^i \frac{A_0}{N}, \quad (11)$$

jeśli i określa bardzo dużą liczbę molekuł otrzymujemy:

$$\frac{A_0}{N} = 1 - \sum_{i=1}^{\infty} \frac{A_i}{N} = 1 - \bar{A}. \quad (12)$$

Z powodu występowania sumy szeregu arytmetycznego $\sum_{i=1}^{\infty} \frac{A_i}{N}$ otrzymujemy:

$$\frac{A_0}{N} = \frac{1 - \left(\frac{a}{C}\right)p}{1 + \left(\frac{a}{C_0}\right)p - \left(\frac{a}{C}\right)p}. \quad (13)$$

Jeżeli wykorzystamy zależność (4.13) do policzenia $\bar{A}$ otrzymamy:

$$\bar{A} = \frac{\left(\frac{a}{C}\right)p}{[1 - \left(\frac{a}{C_0}\right)p][1 + \left(\frac{a}{C_0}\right)p - \left(\frac{a}{C}\right)p]}. \quad (14)$$

Wprowadzając oznaczenia stosowane dla izoterm sorpcji: $h = \frac{p}{p_0}$, $b_1 = \frac{a}{C_0} p_0$, $b = \frac{a}{C} p_0$:

$$\bar{A} = \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)}. \quad (15)$$

Odnosząc wyrażenie (11) do układu, w którym wartość średnia miejsc wiążących to stosunek całkowitej masy po adsorpcji Δm , do masy substancji adsorbującej wysycającej miejsca pierwotne ΔM . Ponadto normalizując równanie masą suchą substancji m_0 otrzymamy model GAB-Denta w postaci sigmoidalnej:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)}. \quad (16)$$

3.3.1. Forma paraboliczna izoterm sorpcyjnej GAB-Dent

Otrzymywane dane doświadczalne sorpcji są często przedstawiane w postaci parabolicznej uzyskanej poprzez podzielenie parametru h przez równanie (16) dla modelu Denta:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + Bh - Ch^2. \quad (17)$$

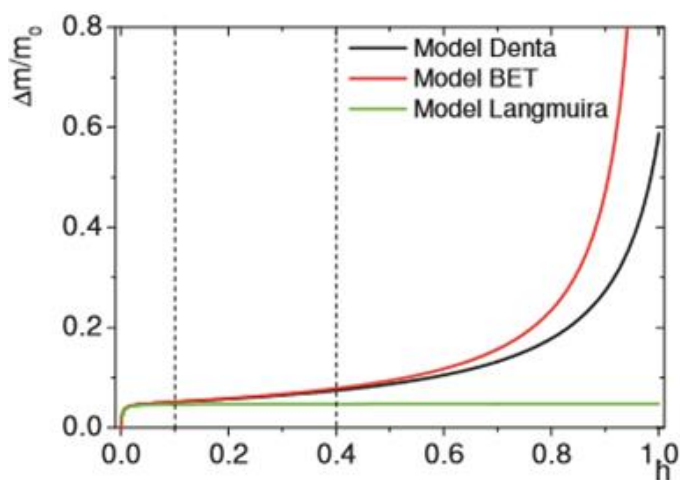
Na podstawie uzyskanych parametrów możemy wyznaczyć parametry postaci sigmoidalnej izotermy Dent-GAB w następujący sposób:

$$\frac{\Delta M}{m_0} = \frac{1}{\sqrt{B^2 + 4AC}}, \quad (18)$$

$$b_1 = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC}}{A}, \quad (19)$$

$$b = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC} - B}{2A}. \quad (20)$$

Parametr $\frac{\Delta M}{m_0}$ określa wartość wysycenia miejsc pierwotnych wiążących wodę, następnie parametr b oznacza stosunek szybkości przyłączania molekuł do ich odłączania w miejscach wtórnych przy $h = 1$. Odwrotność parametru b_1 jest stosunkiem liczby wolnych miejsc wiążących (dla $h = 1$) do liczby miejsc wiążących przypadających na jedną molekułę. Stanowi on miarę hydrofobowości powierzchni absorbentu. Aby zobrazować stosowalność modeli, poniżej przedstawiono wykresy wszystkich modeli w postaci sigmoidalnej o przykładowych parametrach wygenerowane komputerowo dla $\Delta M/m_0 = 0,047$; $b = 0,95$; $1/b_1 = 0,002$ (Rys. II.2):



Rysunek II.2 Zakres stosowalności izoterm sorpcji [59].

4. Magnetyczny Rezonans Jądrowy

Metody Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (MRJ lub NMR) są jednymi z najlepszych technik badania wody w fazie skondensowanej. Dzięki obserwacji jąder wodoru, które należą do najczęściej badanych jąder rezonansowych, można z otrzymanego sygnału wyciągnąć zarówno jakościowe, jak i ilościowe wnioski dotyczące wody.

Jedną z istotniejszych zalet technik NMR jest jej nieinwazyjność w określaniu dynamiki molekularnej, czy otoczenia chemicznego w próbkach biologicznych [60, 61]. Ich właściwości hydratacyjne są zazwyczaj badane przy użyciu magnetycznego rezonansu jądrowego dla jąder ^1H , ^2H lub ^{17}O poprzez obserwację spektroskopową lub obserwację procesów relaksacyjnych [62].

4.1. Moment pędu i moment magnetyczny jądra

Klasycznie moment pędu cząstki dany jest wyrażeniem:

$$\vec{L} = \vec{r} \times \vec{p}. \quad (21)$$

W opisie kwantowym wprowadza się operatory dla wszystkich wielkości wektorowych. Stąd moment pędu przyjmuje postać:

$$\vec{L} = -i\hbar \vec{r} \times \nabla. \quad (22)$$

Oprócz momentu pędu wynikającego z ruchu w przestrzeni, elektrony i niektóre jądra atomowe mają własny kręt - spin. Spin elektronu jest wartością stałą i wynosi $\frac{1}{2}$. Dla jąder o niezerowym momencie pędu zachodzi relacja między momentem magnetycznym, a tymże momentem pędu:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L}, \quad (23)$$

gdzie: γ - jest charakterystycznym dla każdego jądra współczynnikiem żyromagnetycznym równym $g_n \frac{e}{2m_{p+}} = \frac{g_n \mu_n}{\hbar}$ (m_{p+} - masa protonu, g_n - czynnik Landego, μ_n - magneton jądrowy).

Operator spinowy I spełnia te same relacje komutacyjne, co operator momentu pędu (23), a zastępując moment pędu operatorem spinowym I otrzymuje się:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I}. \quad (24)$$

Hamiltonian jądra obdarzonego momentem magnetycznym $\vec{\mu}$ umieszczonego w polu magnetycznym $\vec{B}$

ma postać:
$$\hat{H} = -\vec{\mu} \circ \vec{B}. \quad (25)$$

Rozważamy pole $\vec{B}_0$ skierowane wzdłuż osi z . Wówczas wartości własne operatora Hamiltona oddziaływania jądra z polem magnetycznym są iloczynami wartości własnych operatora I_z i czynnika $(\gamma \cdot B_0)$. Przez co różnice wartości energii między kolejnymi poziomami są równe:

$$\Delta E = E(m) - E(m - 1) = -\gamma \hbar B_0. \quad (26)$$

4.2. Magnetyzacja

Wypadkowy moment magnetyczny $\vec{M}$ próbki na jednostkę objętości nazywany jest magnetyzacją jądrową [63]:

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \sum_i \vec{\mu}_i, \quad (27)$$

gdzie V jest objętością próbki.

Jedynie składowa magnetyzacji w kierunku pola B_0 , M_z , jest różna od zera, gdyż obie składowe prostopadłe poszczególnych spinów ułożone są bezładnie i się zerują. Dzięki temu proces rezonansowego wzbudzenia falą elektromagnetyczną może być opisany za pomocą równań Blocha uwzględniających relaksację układu.

4.3. Precesja Larmore'a i zjawisko MRJ

Po uwzględnieniu wzorów (23) oraz (27) zasadę zachowania momentu pędu można zapisać jako

$$\frac{d}{dt} \vec{M} = \gamma \cdot \vec{M} \times \vec{B}_0. \quad (28)$$

Przy przejściu do układu wirującego z prędkością kątową $\vec{\omega}$ równoległą do osi OZ prędkość transformuje się w następujący sposób:

$$\vec{v} = \vec{v}_n + \vec{\omega} \times \vec{r}, \quad (29)$$

gdzie $\vec{v}_n$ jest prędkością tego punktu w układzie rotującym. Przyjmując, że magnetyzacja w wirującym układzie zachowuje się analogicznie do prędkości, równanie (28) przyjmuje następującą postać:

$$\frac{d}{dt} \vec{M} = \gamma \cdot \vec{M} \times (\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma}), \quad (30)$$

Jeżeli prędkość układu jest równa $\vec{\omega} = -\gamma \vec{B}_0 = \omega_0$, to wektor $\vec{M}$ jest w nim nieruchomy $\frac{d\vec{M}}{dt} = 0$. Natomiast jeżeli próbkę umieścimy w polu $\vec{B}_0$ i zadziałamy polem na nią polem zmiennym

$\vec{B}_1$ o częstotliwości spełniającej warunek rezonansu $\vec{\omega} = -\gamma\vec{B}_0$, to jego spiny będą precesować wokół kierunku wektora pola $\vec{B}_0$.

4.4. Procesy relaksacyjne

Relaksacją nazywany jest powrót układu do stanu równowagi termodynamicznej po jego wcześniejszym z tej równowagi wytrąceniu. W metodzie MRJ wzbudzenie ma postać impulsu o częstotliwości radiowej, który obraca magnetyzację próbki względem pola B_0 . Po jego zastosowaniu magnetyzacja jądrowa zostaje wychylona z wartości równowagowej, natomiast po jego wyłączeniu powraca do stanu początkowego. W procesie relaksacji wzbudzone sygnałem RF spiny jądrowe wracają do stanu podstawowego.

4.4.1. Ruch wektora magnetyzacji

Ruch wektora magnetyzacji $\vec{M}$ w polu $\vec{B}_0$ i pod wpływem pola $\vec{B}_1$ jest złożeniem ruchu precesyjnego i relaksacyjnego, a jego analizę umożliwia układ równań Blocha. Zmianę magnetyzacji w czasie można zapisać jako

$$\frac{d\vec{M}}{dt} = \vec{\omega}(t) \cdot \vec{M}(t) - [R][\vec{M}(t) - \vec{M}_\infty], \quad (31)$$

gdzie R to: $R = \begin{bmatrix} \frac{1}{T_2} & 0 & 0 \\ 0 & \frac{1}{T_2} & 0 \\ 0 & 0 & \frac{1}{T_1} \end{bmatrix}$, a $\vec{M}_\infty$ jest wartością równowagową składowej magnetyzacji wzdłuż osi

z. Wyraz $[R][\vec{M}(t) - \vec{M}_\infty]$ opisuje zanik magnetyzacji w płaszczyźnie xy i odrost składowej $M_z(t)$ ze stałymi czasowymi T_1 i T_2 . Rozpisanie tego równania na składowe daje:

$$\begin{cases} \frac{dM_x(t)}{dt} = [M_z(t)\omega_y(t) - M_y(t)\omega_z(t)] - \frac{M_x(t)}{T_2} \\ \frac{dM_y(t)}{dt} = -\frac{M_y(t)}{T_2} \\ \frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{[M_z(t) - M_\infty]}{T_1} \end{cases} \quad (32)$$

Zakładając, że pole magnetyczne jest statyczne i znajdując rozwiązania tych równań różniczkowych w odpowiednich płaszczyznach uzyskujemy funkcje, opisujące procesy relaksacji.

4.4.2. Relaksacja składowej podłużnej magnetyzacji jądrowej

Powrót składowej M_z do wartości początkowej, czyli relaksacja podłużna, jest nazywany relaksacją spin - sieć, ponieważ zmiana jej wartości wiąże się ze zmianą energii układu spinów jądrowych, oddawania energii wzbudzonych spinów do otoczenia termodynamicznego zwanego w NMR siecią.

Energia oddziaływania spinów z polem B_0 jest proporcjonalna do wartości składowej M_z , (25). Parametrem charakteryzującym relaksację spin - sieć jest czas T_1 - czas relaksacji podłużnej, po którym składowa M_z odrasta do 63%, co dobrze odzwierciedla poniższy wzór:

$$M_z(t) = M_z(0) \cdot (1 - 2e^{-t/T_1}). \quad (33)$$

4.4.3. Relaksacja składowej poprzecznej magnetyzacji jądrowej

Po poddaniu próbki działaniu pola $\vec{B}_1 \perp \vec{B}_0$ w warunkach rezonansu pojawi się składowa poprzeczna magnetyzacji jądrowej. Zanik składowej M_{xy} wektora magnetyzacji to relaksacja poprzeczna będąca skutkiem utraty koherencji faz precesujących spinów jądrowych poprzez przejścia kwantowe między spinami tego samego rodzaju, stąd inna nazwa: relaksacja spin - spin. Wartość energii układu spinów jądrowych pozostaje stała (23). Ruch składowej M_{xy} opisuje równanie:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) \cdot e^{-t/T_2}, \quad (34)$$

gdzie T_2 jest czasem relaksacji poprzecznej nazywanym też czasem relaksacji spin - spin.

4.4.4. Czasy korelacji

Wartości czasów magnetycznej relaksacji jądrowej T_1 i T_2 powiązane są z czasem korelacji ruchów molekularnych, τ_c , czyli czasem, w którym cząsteczka zmieni swoje położenie o 1 radian (w płaszczyźnie) lub 1 steradian (w przestrzeni). Wynika to z faktu, że ruch naładowanych cząstek indukuje zmiany rozkładu pól lokalnych, co z kolei powoduje relaksację. Czas korelacji jest miarą ruchliwości molekuł - przy krótkim τ_c molekuły poruszają się szybko (np. w cieczy), a przy długim - wolno (jak w ciele stałym). Zależności czasów relaksacji od czasu korelacji dla pary spinów opisują równania wyprowadzone przez Bloembergena, Purcella i Pounda (model BPP) [64]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} \right) \quad (35)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2}{r^6} \left(4\tau_c + \frac{\tau_c}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + 4\omega_2^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_1 + \omega_2)^2 \tau_c^2} \right) \quad (36)$$

gdzie r - odległość pomiędzy oddziałującymi spinami. W przypadku pary jednakowych spinów $\gamma_1 = \gamma_2$ i $\omega_1 = \omega_2$ te wzory upraszczają się. Przyjmując, że czas korelacji jest opisany relacją Arrheniusa, tzn.:

$$\tau_c = \tau_0 e^{\frac{E_a}{RT}}, \quad (37)$$

gdzie, τ_0 jest czynnikiem eksponencjalnym, E_a - energią aktywacji rozumianą jako minimalna ilość energii potrzebnej do pokonania bariery energetycznej pomiędzy dwoma właściwymi dla rozważanego

ruchu minimami energetycznymi o równej głębokości , a R – stałą gazową, to zależność odwrotności czasów relaksacji T_1 i T_2 od odwrotności temperatury osiąga minimum dla $\omega \cdot \tau_c = 0,616$, gdzie ω odpowiada częstości pracy spektrometru. Po uproszczeniu wzór (35) prezentuje się następująco:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (38)$$

Dla niskich temperatur ruch obserwowanej molekuly jest wolniejszy od częstości obserwacji $\omega \cdot \tau_c > 0,616$, a wzór BPP dla szybkości relaksacji podłużnej można przybliżyć jako:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \frac{2}{\omega^2 \tau_c}. \quad (39)$$

Analogicznie, dla wysokich temperatur, gdy $\omega \cdot \tau_c < 0,616$, ruch cząsteczek jest szybki, a szybkość relaksacji można przybliżyć wzorem:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} 5\tau_c. \quad (40)$$

W podobny sposób można przybliżyć szybkość relaksacji poprzecznej (36) w niskich i wysokich temperaturach.

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{2} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \tau_c \quad (41)$$

$$\text{gd } \omega \cdot \tau_c < 0,616 \quad \frac{1}{T_2} = \frac{3}{20} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(3\tau_c + \frac{11}{\omega^2 \tau_c} \right). \quad (42)$$

4.5. Obserwacja zjawiska MRJ

4.5.1. Kształt linii rezonansowych

Sygnał zaniku swobodnej precesji (FID) jest funkcją napięcia od czasu $V = f(t)$. Aby uzyskać widmo, konieczne jest poddanie tegoż sygnału transformacji Fouriera, w wyniku której uzyskuje się sygnał MRJ w postaci zależności napięcia od częstości:

$$F(\omega) = F(f(t)) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i2\pi\omega t} dt. \quad (43)$$

Efektom jest krzywa rezonansowa o maksimum w częstości Larmora ω_0 .

Dla próbek w stanie ciekłym przyczynki od oddziaływania dipolowego oraz anizotropia przesunięcia chemicznego, a więc i wartości pól lokalnych, są uśredniane w wyniku ruchów molekularnych cieczy, co skutkuje wąską, lorentzowską linią rezonansową:

$$L(\omega) = \frac{2A_L}{\pi} \frac{\Delta\nu}{4(\nu - \nu_0)^2 + \Delta\nu^2}, \quad (44)$$

gdzie A_L jest polem pod linią (proporcjonalnym do liczby jąder rezonansowych), $\Delta\nu$ - szerokością połówkową linii, a ν_0 - położeniem maksimum linii.

W przypadku ciała stałego mamy do czynienia ze znacznie wolniejszymi ruchami molekularnymi, pola lokalne nie ulegają uśrednieniu, a wzbudzenie spinów występuje w szerszym zakresie częstości. Skutkuje to szerszą, w przybliżeniu gaussowską, linią widmową:

$$G(\omega) = \frac{A_S \sqrt{\ln 4}}{\Delta \nu \sqrt{\frac{\pi}{2}}} e^{-2 \frac{(v-v_0)^2 \ln 4}{\Delta \nu^2}}, \quad (45)$$

gdzie oznaczenia są analogiczne, jak w przypadku funkcji Lorentza. Szerokość linii zależy od oddziaływań, jakim podlegają obserwowane jądra rezonansowe. Wszystkie oddziaływania będące mechanizmami relaksacji mogą powodować poszerzenie linii. W przypadku jąder atomowych o spinie 1/2 zasadniczy wpływ na szerokość linii mają oddziaływania dipolowe.

Model ten wielokrotnie został wykorzystany do opisu układów biologicznych, takich jak plechy grzybów zlichenizowanych [65, 66], DNA [3], oraz lipidów [67].

4.5.2. Zależność sygnału ^1H -MRJ od poziomu uwodnienia próbki.

Wielkość sygnału cieczowego ^1H -NMR wyrażona w jednostkach sygnału stałego, L/S (lub A_L/A_S w domenie częstotliwości), może być traktowana jako miara ilości wody związanej w próbce, $\Delta m/m_0$. Jeśli w próbce dochodzi jedynie do adsorpcji molekuł wody, wówczas zależność L/S ($\Delta m/m_0$) jest liniowa. Jeśli wyraz wolny jest większy od zera, oznacza to, że próbka zawiera pewną ilość wody związanej z strukturą wewnętrzną, nieusuwanej w czasie dehydratacji do fazy gazowej. Jeśli jednak próbka zawiera frakcję stałą rozpuszczalną w wodzie, sygnał cieczowy MRJ, L , może być opisany przez:

$$L = \alpha_{H_2O} \rho_{H_2O} \Delta m + \alpha_{cd} \rho_c m_{cd}, \quad (46)$$

gdzie Δm jest masą wody związanej, ρ_{H_2O} gęstością protonową wody, m_{cd} masą rozpuszczonej frakcji stałej, ρ_c średnią gęstością protonową części rozpuszczalnej matrycy stałej, a α_{H_2O} , α_{cd} , są współczynnikami proporcjonalności pozwalającym przeliczyć masę mnożoną przez gęstość protonową na sygnał MRJ, odpowiednio dla molekuł wody oraz dla części matrycy stałej, która uległa rozpuszczeniu [68, 69].

Współczynniki te mogą różnić się od jedynki na przykład w obecności jonów paramagnetycznych w środowisku. Sygnał S pochodzący od części stałej próbki może być opisany jako:

$$S = \alpha_s \rho_s m_0 - \alpha_{cd} \rho_c m_{cd}, \quad (47)$$

gdzie m_0 jest suchą masą próbki, ρ_s - średnią gęstością protonową nierozpuszczalnej matrycy stałej, α_s , α_{cd} - współczynnikami proporcjonalności dla części nierozpuszczalnej matrycy stałej oraz dla części matrycy stałej, która uległa rozpuszczeniu.

Ilość rozpuszczonej frakcji stałej zależy od średniego stężenia nasycenia (rozpuszczeniowego) C_s dla rozpuszczalnej frakcji stałej, co pozwala na wyznaczenie masy części rozpuszczalnej matrycy stałej:

$$m_{cd} = \frac{c_s}{1-c_s} \Delta m. \quad (48)$$

Stosując wzór (48) do ilorazu L/S uzyskujemy wzór:

$$L/S = k \frac{(1 + \frac{\gamma}{\delta} * \frac{c_s}{1-c_s}) \frac{\Delta m}{m_0}}{1 - \frac{\gamma}{\delta} * \frac{c_s}{1-c_s} * \frac{\Delta m}{m_0}}, \quad (49)$$

gdzie: $k = \frac{\alpha_L \rho_L}{\alpha_s \rho_s}$, $\gamma = \frac{\rho_c}{\rho_{H_2O}}$, $\delta = \frac{\rho_s}{\rho_{H_2O}}$.

Jeśli założyć, że w próbce występują dwa rodzaje wody, a mianowicie woda ściśle i woda luźno związana, wtedy sygnał cieczowy opisany równaniem (46) można rozdzielić dla każdej frakcji. Zakładając że woda ściśle związana ma kontakt z substancją ulegającą rozpuszczeniu można wtedy wyznaczyć funkcję opisującą stosunek sygnałów L_1/L :

$$L_1/L = \frac{m_1}{m_1 + 1 + (\gamma * \frac{c_s}{1-c_s}) * \Delta m}, \quad (50)$$

gdzie m_1 opisuje frakcję wody związanej z frakcją rozpuszczalną. Jak wynika ze wzoru (49) oraz (50), badając hydratacyjne zależności sygnału ^1H -MRJ, można wyznaczyć średnie stężenie nasycenia substancji rozpuszczających się w próbce.

III. Materiały i metody

Rozdział opisuje źródło i opis preparatyki zmierzonych próbek, analizę morfologiczną przy użyciu SEM, przebieg eksperymentu pomiaru tras hydratacyjnych i tworzenia izoterm sorpcyjnych, oraz użytą aparaturę i sekwencje pomiarowe w badaniach MRJ.

1. Preparatyka próbek farmaceutycznych

1.1. Źródło materiałów

Do badań użyto tadalafil i monohydrat bozentanu wyprodukowane przez Zakłady Farmaceutyczne Polpharma S.A (Starogard Gdański, Polska). Natomiast, polimery Soluplus® oraz Kollidon VA64® otrzymano z firmy BASF (Warszawa, Polska).

1.2. Przygotowanie próbek farmaceutycznych

Analiza obejmowała 25 stałych rozproszeń, które zostały przygotowane w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM i przekazane do badań opisanych w niniejszej rozprawie (Tabela III-1). Dobór substancji pomocniczych oraz metody sporządzania stałych rozproszeń, opierał się na danych z piśmiennictwa oraz wynikach wcześniejszych prac zrealizowanych na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM. Wykazały one m.in. zwiększenie szybkości rozpuszczania tadalafilu ze stałych rozproszeń w Soluplus® w warunkach *in vitro*, co przekładało się na zwiększenie dostępności biologicznej tadalafilu w warunkach *in vivo* [32, 37, 70]. Dla porównania oceniono same substancje lecznicze: tadalafil i bozentan, jak również dwa polimery hydrofilowe: Soluplus® i Kollidon VA64®.

Tabela III-1. Zestawienie oznaczeń, składów i metod analizy próbek farmaceutycznych opisanych w pracy. Proporcje składników wyrażono w % wagowych.

Nazwa formulacji	Hydrofobowa substancja lecznicza		Hydrofilowy polimer		Parametry procesu mielenia		Metoda analizy
	Tadalafil	Monohydrat bozentanu	Soluplus®	Kollidon VA64® (kopowidon)	Prędkość obrotowa tarczy planetarnego młyna kulowego [obr./min]	Czas mielenia [h]	
TD	100	0	0	0	0	0	KH, R, S
BS	0	100	0	0	0	0	KH
BS_M	0	100	0	0	400	4	KH, IS
0,5BS	0	50	0	50	400	4	KH, IS, R, S
0,1TD 100/60	10	0	90	0	100	1	R, S
0,1TD 200/60	10	0	90	0	200	1	R, S

0,1TD 400/60	10	0	90	0	400	1	R, S
0,1TD 100/240	10	0	90	0	100	4	R, S
0,1TD 200/240	10	0	90	0	200	4	KH, IS, R, S
0,1TD 400/240	10	0	90	0	400	4	R, S
0,1TD 100/720	10	0	90	0	100	12	R, S
0,1TD 200/720	10	0	90	0	200	12	R, S
0,5TD 100/60	50	0	50	0	100	1	R, S
0,5TD 200/60	50	0	50	0	200	1	R, S
0,5TD 400/60	50	0	50	0	400	1	R, S
0,5TD 100/240	50	0	50	0	100	4	R, S
0,5TD 200/240	50	0	50	0	200	4	KH, IS, R, S, ST
0,5TD 400/240	50	0	50	0	400	4	R, S
0,5TD 100/720	50	0	50	0	100	12	R, S
0,5TD 200/720	50	0	50	0	200	12	R, S
0,9TD 100/60	90	0	10	0	100	1	R, S
0,9TD 200/60	90	0	10	0	200	1	R, S
0,9TD 400/60	90	0	10	0	400	1	R, S
0,9TD 100/240	90	0	10	0	100	4	R, S
0,9TD 200/240	90	0	10	0	200	4	KH, R, S
0,9TD 400/240	90	0	10	0	400	4	R, S
0,9TD 100/720	90	0	10	0	100	12	R, S
0,9TD 200/720	90	0	10	0	200	12	R, S
Soluplus®	0	0	100	0	0	0	KH, IS, R, S
Kollidon VA64®	0	0	0	100	0	0	KH, IS, R, S

KH - kinetyka hydratacji, IS - izotermy sorpcji, R - relaksacja czasu T_2 ^1H -MRJ, S - spektroskopia ^1H -MRJ, ST - spektroskopia relaksacyjna czasu T_1 .

Każdorazowo przygotowano po 1 g mieszaniny tadalafilu z polimerem Soluplus® w trzech proporcjach wagowych tj. 1+9 (0,1TD); 1+1 (0,5TD) i 9+1 (0,9TD). Mieszaniny przeniesiono do naczyń o poj. 45 mL, wykonanych z tlenku cyrkonu. Mielenie wykonano przy użyciu planetarnego młyna kulowego Pulverisette 7 classic line (Fritsch, Idar-Oberstein, Niemcy). W każdym naczyniu znajdowało się po 7 kul mielących o średnicy 1 cm, które były również wykonane z tlenku cyrkonu. Stosunek masowy kul do próbki wynosił 75:1. Prędkość obrotowa tarczy młyna wynosiła odpowiednio 100, 200 lub 400 obr./min, natomiast, czas mielenia wynosił 1 h, 4 h lub 12 h. Każde mielenie prowadzono w cyklach po 20 min, po których następowało zatrzymanie młyna na 10 min, w celu zmniejszenie ryzyka przegrzania próbki. W taki sam sposób przygotowano stałe rozproszenie bozentanu w Kollidon VA64® (0,5BS) w proporcji 1+1 (m/m). Prędkość obrotowa tarczy młyna wynosiła 400 obr./min, a czas mielenia wynosił 4 h. Dla porównania, w tych samych warunkach, wykonano mielenie bozentanu bez dodatku polimeru (BS_M).

Następnie próbki do tras hydratacyjnych umieszczono na tackach wykonanych z aluminium o średnicy ok. 2,5 cm. Próbkę do pomiarów $^1\text{H-MRJ}$ umieszczono w probówkach wykonanych z szkła.

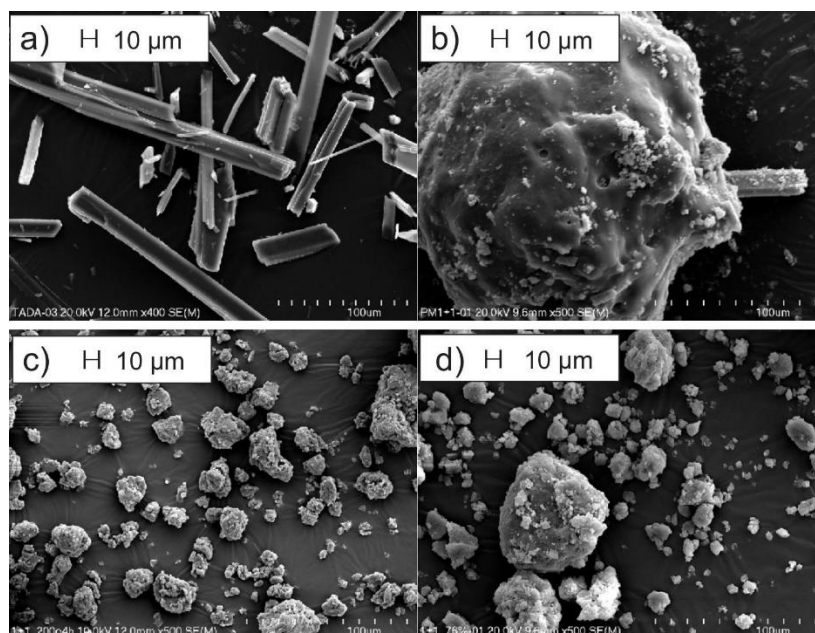
W przypadku stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus, trasy hydratacyjne wyznaczono dla próbek stałych rozprożeń mielonych z prędkością obrotową 200 obr./min przez 4 h. Natomiast stałe rozproszenia bozentanu były mielone przez 4h z prędkością 400 obr./min. Próbkę tadalafilu, niemielonego bozentanu oraz przykładowej mieszaniny 0,9TD próbki nie uwalniały się powyżej $\Delta m/m_0 = 0,1$, a wyznaczone zmiany masy oscylowały w granicy błędu wagi. W badaniach $^1\text{H-MRJ}$ czasu relaksacji spinowo-spinowego w domenie czasu, oraz w domenie częstotliwości masy wszystkich zmierzonych próbek przedstawiono w Tabeli III-3. Pomiar zależności czasu relaksacji spinowo-sieciowego od temperatury wykonano tylko dla jednej próbki reprezentatywnej to jest stałego rozprożenia tadalafilu sporządzonego w stosunku wagowym 1+1, otrzymanego podczas mielenia z prędkością 200 obr./min przez 4 h.

2. Preparatyka organizmu anhydrobiotycznego

Niebla tigrina [46] (Rys. I.5), gatunek endemiczny, zebrany został podczas ekspedycji na Pustyni Atacama w dniach 3-16 listopada 2017 roku, na obszarze Las Lomitas w Parque Nacional Pan de Azúcar, Chañaral, Pustynia Atacama, Chile. Formacje Lomas. Przechowywane w temperaturze 20°C i wilgotności otoczenia do 30%. Próbkę do tras hydratacyjnych umieszczono na tackach o średnicy ok. 2,5 cm wykonanych z aluminium. Próbkę do pomiarów $^1\text{H-MRJ}$ umieszczono w probówkach wykonanych z szkła.

3. Ocena morfologii próbek farmaceutycznych przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej

Analizę morfologiczną próbek farmaceutycznych wykonano we współpracy z Instytutem Nauk Geologicznych na Wydziale Geografii i Geologii UJ przy użyciu mikroskopu skaningowego Hitachi S-4700 (Japonia). Przed przystąpieniem do analizy, próbki proszków naklejano na paski węglowe miedzianych holderów. Po napyleniu węglem, wykonano zdjęcia w powiększeniu 400-500x.



Rysunek III.1. Zdjęcia ze skaningowego mikroskopu elektronowego dla taladafilu przed procesem mielenia (a), mieszaniny taladafilu z Soluplus® (0,5TD) przed mieleniem (b), próbki 0,5TD po mieleniu – stałe rozproszenie (c), stałego rozproszenia 0,5TD po hydratacji w wilgotności względnej (RH) 76% przez 7 dni (d).

Stwierdzono że taladafil ma kryształy o charakterystycznym iglastym kształcie (Rys. III-1a), podczas gdy cząstki Soluplus mają kulisty kształt i są znacznie większe od substancji aktywnej. Porównując zdjęcia można zaobserwować, że po zmieleniu kryształy taladafilu ulegają mikronizacji i tworzą aglomeraty o różnej wielkości (Rys. III-1c). Nie ma istotnej zmiany morfologii stałego rozproszenia 0,5TD po tygodniu przechowywania w wilgotności względnej 76%. Jednak próbki przechowywane w 76% tworzyły duże miękkie aglomeraty (Rys. III-1d), rozpadające się na proszek po wyjęciu z pojemnika.

4. Badanie kinetyki hydratacji

W badaniach kinetyki hydratacji uwadniano próbki z fazy gazowej w eksykatorach zawierających substancje, zmieniające ciśnienie pary wodnej nad powierzchnią ich roztworów nasyconych. Do materiałów mających takie właściwości należą sole i kwasy. Do pomiarów opisanych w tej pracy wykorzystano eksykatory o wilgotności względnej atmosfery przedstawionej w Tabeli III-2. Przed rozpoczęciem pomiarów próbki były dodatkowo wstępnie dehydratowane nad żelem krzemionkowym ($h = 0$) przez 72h w celu usunięcia wody, która mogła zostać zabsorbowana w trakcie preparatyki.

Tabela III-2. Substancje użyte do hydratacji z fazy gazowej.

Substancja	Wilgotność względna p/p_0	Substancja	Wilgotność względna p/p_0
żel krzemionkowy	0%	52%	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
LiCl	11%	63%	NH_4NO_3
H_3PO_4	19%	76%	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
$\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	23%	88%	K_2CO_3
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	32%	93%	$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$
K_2CO_3	44%	97%	K_2SO_4
100%		H_2O	

Przyrosty masy były określane poprzez ważenie próbek na wadze analitycznej (*RadWag WAX 110* o dokładności 0,01 mg) umieszczonej na podłożu antywibracyjnym. Uwodnienie wyrażano w jednostkach bezwymiarowych na podstawie przyrostu masy próbki po hydratacji względem jej suchej masy, m_0 (wzór 2).

Sucha masa m_0 została otrzymana wskutek trwającego 72 h wyprężania w temperaturze 343 K, które przeprowadzono na końcu serii pomiarów z uwagi na ryzyko zmiany struktury próbek. Masy próbek powietrznie suchych oraz suche masy próbek użytych w pomiarach MRJ zebrano w Tabeli III-3.

Tabela III-3. Masy próbek użytych do pomiarów relaksometrii i spektroskopii ^1H -NMR.

Formulacja	Masa powietrznie sucha m_{ps} [mg]	Sucha masa m_0 [mg]	Formulacja	Masa powietrznie sucha m_{ps} [mg]	Sucha masa m_0 [mg]
Soluplus®	52,63	50,69	0,5TD 100/720	54,88	52,78
0,1TD 100/60	46,76	45,64	0,5TD 200/720	48,59	46,71
0,1TD 200/60	47,95	46,74	0,9TD 100/60	47,18	46,26
0,1TD 400/60	53,43	52,11	0,9TD 200/60	46,28	45,56
0,1TD 100/240	57,77	56,27	0,9TD 400/60	55,99	54,15
0,1TD 200/240	57,46	56,31	0,9TD 100/240	70,77	67,23
0,1TD 400/240	33,18	32,21	0,9TD 200/240	48,50	47,26
0,1TD 100/720	47,68	45,54	0,9TD 400/240	53,78	51,93
0,1TD 200/720	42,10	39,97	0,9TD 100/720	48,81	47,09
0,5TD 100/60	53,14	51,12	0,9TD 200/720	49,81	48,54
0,5TD 200/60	43,36	41,40	TD_M	32,67	32,44
0,5TD 400/60	56,35	54,05	BS	33,79	33,48
0,5TD 100/240	65,00	63,22	BS_M	42,03	41,85
0,5TD 200/240	40,88	40,08	0,5BS	63,66	63,45
0,5TD 400/240	64,58	61,58	Kollidon VA64®	62,21	61,84
<i>N. tigrina</i>		11,25		10,98	

Uzyskane z tras hydratacyjnych wyniki, a także uzyskane na podstawie tych wyników izotermy sorpcji zostały zaprezentowane w Rozdziale IV.

5. Metody pomiaru magnetycznego rezonansu jądrowego

Pomiary były wykonywane metodą jednoimpulsowego wzbudzenia jąder impulsem $\pi/2$, a następnie procesy relaksacji rejestrowano w domenie czasu i częstotliwości.

5.1. Relaksometria ^1H MRJ

Pomiary relaksacji ^1H -NMR wykonano przy użyciu relaksometru wysokiej mocy typu WNS HB65 firmy Waterloo NMR Spectrometers, z Waterloo, Ontario, Kanada. Częstota rezonansowa wynosiła 30 MHz w polu magnetycznym o wartości indukcji około 0,7 T.



Rysunek III.2. Relaksometr MRJ WNS HB65.

5.1.1. Sekwencja pomiarowa

Impuls $\pi/2$

Sygnały zebrane w funkcji uwodnienia próbek otrzymano mierząc zaniki swobodnej precesji po impulsie $\pi/2$. Czas trwania impulsu wyznaczono poprzez znalezienie maksimum sygnału $F(\tau)$ dla serii pomiarów o tej samej mocy impulsu. Wyniósł on $1,25 \mu\text{s}$ dla wszystkich próbek. Czas repetycji (RT) wynosił 5 s, pojedynczy pomiar był wypadkową 700 akumulacji.

5.2. Spektroskopia ^1H MRJ

Badania MRJ w domenie częstotliwości wykonywano na spektrometrze Bruker Avance III 300, firmy Bruker Biospin, wyposażonym w magnes nadprzewodzący o średnicy otworu 89 mm (system „wide-bore”), w którym wytwarzane jest pole magnetyczne o indukcji 7 T, co odpowiada częstotliwości rezonansowej protonów 300,13 MHz.



Czas martwy spektrometru wynosił $7,5 \mu\text{s}$. Moc impulsu wysokiej mocy („impulsu twardego”) wynosiła 400 W. Próbkę chłodzono w strumieniu azotu gazowego odparowywanego grzałką zawieszoną w naczyniu Dewara z ciekłym azotem. Sterownik temperatury Eurotherm, umożliwiał stabilizację temperatury z dokładnością do 0.1 K. W przypadku pomiarów hydratacyjnych eksperyment prowadzono w temperaturze 300 K.

Rysunek III.3. Spektrometr Bruker Avance III 300.

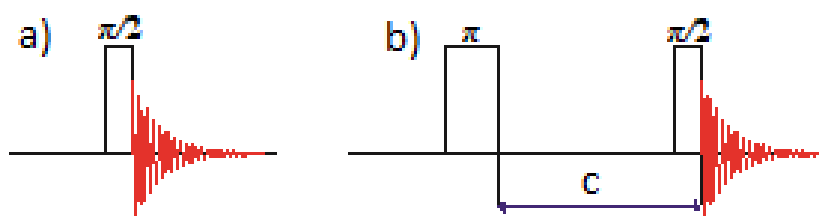
5.2.1. Sekwencje pomiarowe

Impuls $\pi/2$

Pojedyncze widma w funkcji uwodnienia otrzymano dzięki pomiarowi zaniku swobodnej precesji (FIDu) po potraktowaniu próbki pojedynczym impulsem $\pi/2$. Czas trwania impulsu wyznaczono poprzez znalezienie maksimum zależności $\text{Amp}(\tau)$ dla serii pomiarów o tej samej mocy impulsu. Wyniósł on $1,5 \mu\text{s}$ dla wszystkich próbek. Czas repetycji (RT) wynosił 5 s, pojedynczy pomiar był wypadkową 40 akumulacji.

Sekwencja zaniku inwersji (ang. *Inversion Recovery* IR)

Polega na potraktowaniu próbki kolejno impulsami π , a następnie $\pi/2$. Pierwszy z impulsów powoduje inwersję magnetyzacji do wartości $-M_z$, drugi impuls obraca magnetyzację na płaszczyznę xy . Między oboma impulsami przebiega relaksacja podłużna, wartość składowej M_z rejestrowanej podczas pomiaru FID po impulsie $\pi/2$ zależy od czasu, podczas którego mogła wcześniej swobodnie relaksować, a więc zależy od odstępu czasu C . Czasy C były dobierane w zależności od estymowanej wartości T_1 tak, aby najdłuższa wartość wynosiła ok. $4T_1$, czas repetycji ustalano na $5T_1$. Seria widm była uśrednionym wynikiem 20 akumulacji.



Rysunek III.4. Sekwencje pomiarowe (a) Impuls $\pi/2$, (b) Sekwencja zaniku inwersji użyte w spektroskopii ^1H -NMR. Parametr C oznacza odstęp czasu między impulsami, zmieniany w czasie pomiaru.

IV. Wyniki

Rozdział opisuje wyniki badań tras hydratacyjnych oraz analizę dopasowanych izoterm sorpcji, wyniki badań ^1H -NMR w domenie czasu i częstotliwości

1. Wyniki pomiarów tras hydratacyjnych

Trasy hydratacyjne z fazy gazowej rejestrowano przez co najmniej 150h dla wszystkich dwuskładnikowych stałych rozproszeń, jak również dla ich poszczególnych składników w zakresie wilgotności względnej od 0-100 % (Tabela III-1). Nie udało się uzyskać tras hydratacyjnych dla próbek zawierających 90% tadalafilu lub 100% tadalafilu ze względu na ich silnie hydrofobowy charakter. Suche masy próbek wyznaczono zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale III.3. Do uzyskanych wyników dopasowano superpozycję funkcji opisaną wzorem 51.

1.1. Trasy hydratacyjne dla stałych rozproszeń z tadalofilem

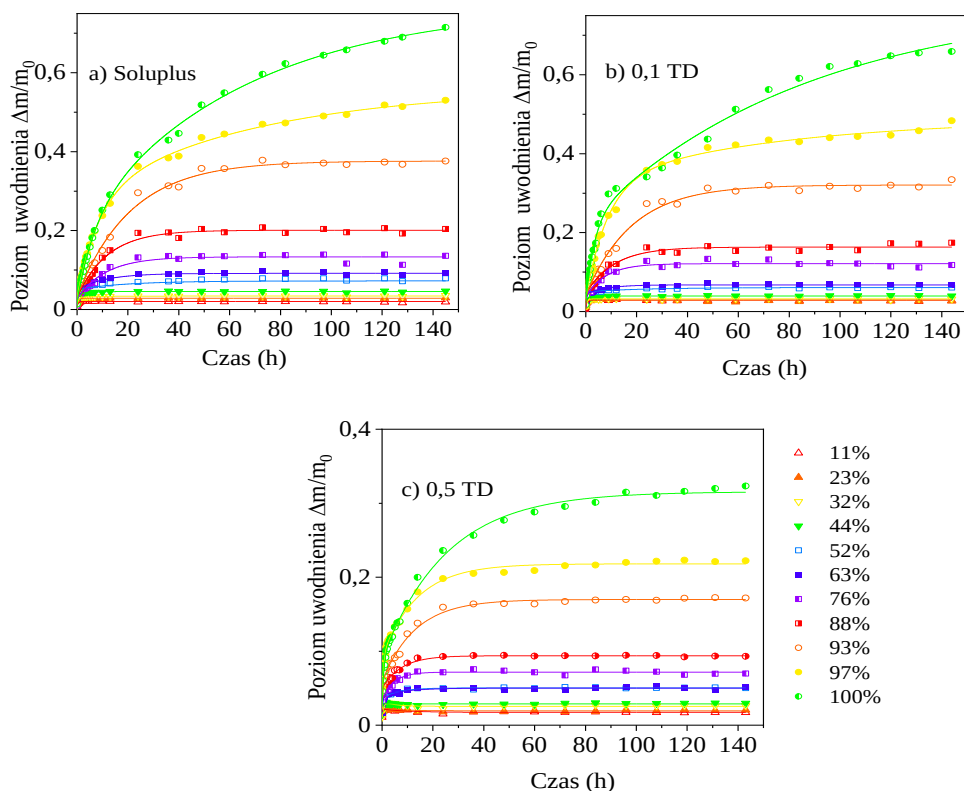
Prowadzona z fazy gazowej hydratacja stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® może zostać przybliżona superpozycją kilku funkcji eksponencjalnych, a ponadto wyodrębnić można frakcję wody nieusuwanej w czasie dehydratacji do fazy gazowej. Jeśli poziom hydratacji wyrazimy jako przyrost masy próbki wyrażony w jednostkach suchej masy, m_0 , to hydratację można wyrazić wzorem 51.

$$\frac{\Delta m}{m_0} = A_0 + A_1 \exp(-t/t_1^h) + A_2 \exp(-t/t_2^h) + A_3 \exp(-t/t_3^h), \quad (51)$$

gdzie t_i^h jest czasem uwodnienia danej składowej, A_0 uwodnieniem początkowym (woda nieusuwana w $h = 0\%$), zaś A_i są przyrostami poziomu hydratacji dla danej wilgotności otoczenia. Suma tych składowych:

$$C^h = A_0 + A_1 + A_2 + \dots \quad (52)$$

daje równowagowy poziom uwodnienia próbki.



Rysunek IV.1. Kinetyka hydratacji polimeru Soluplus® (a) oraz stałych rozprożeń tadafilu w Soluplus® w proporcji 1+9 (b) lub 1+1 (c) zarejestrowana w różnych warunkach wilgotności względnej (%).

Dla próbek czystego Soluplusu® i próbek o 10% zawartości tadafilu hydratowanych w wilgotności względnej do 32%, oraz dla próbki o 50% zawartości tadafilu hydratowanej w wilgotności względnej poniżej 44% dopasowano funkcję jednoeksponencjalną. Wyniki uzyskane dla wszystkich próbek hydratowanych w wilgotności względnej w zakresie od 44% do 93% były dobrze opisywane funkcją dwueksponencjalną. Natomiast dla trzech najwyższych wilgotności, tj. 93%, 97% i 100% trasy hydratacyjne dla próbek Soluplus® zostały dopasowane trzy funkcje eksponencjalne. Czas hydratacji t_3 dla stałego rozproszenia, zawierającego 90% polimeru (0,1TD) określano na podstawie czasu, który uzyskano dla najwyższego uwodnienia, pomimo dopasowania dwóch eksponent.

Interpretując składową A_0 , jako frakcję wody najściślej związanej; A_1 jako frakcję wody ściśle związanej; A_2 jako frakcję wody luźno związanej; wreszcie A_3 jako frakcję wody swobodnej, uzyskane wyniki zebrano w Tabeli IV-1.

Tabela IV-1. Wyniki dopasowań superpozycji funkcji eksponencjalnych i zmiana morfologii próbek podczas hydratacji stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® z fazy gazowej.

Parametr			Wartość średnia (n=12) ± odchylenie standardowe			Morfologia próbki		
			0,5TD	0,1TD	Soluplus®		Przed hydratacją	Po hydratacji
Fracja wody zależna od energii wiązania	Bardzo ściśle związana	A_0^h	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,004	0,013 ± 0,002	0,5TD	żółty sypki proszek	powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,1$ zlepiony proszek $\Delta m/m_0 = 0,3$ półstały hydrożel
	Ściśle związana	A_1^h	0,031 ± 0,002	0,071 ± 0,008	0,021 ± 0,003	0,1TD	kremowy sypki proszek	powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,1$ zlepiony proszek $\Delta m/m_0 = 0,3$ półstały hydrożel
	Luźno związana	A_2^h	0,079 ± 0,002	0,152 ± 0,008	0,131 ± 0,007	Soluplus®	biały sypki proszek	powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,11$ półstały hydrożel, $\Delta m/m_0 = 0,3$ przezroczysta bardzo gęsta ciecz
	Wolna (swobodna)	A_3^h	-	0,352 ± 0,002*	0,421 ± 0,004			
Czas hydratacji [h]	Ściśle związana	t_1^h	0,33 ± 0,08	0,24 ± 0,08	0,30 ± 0,08	Soluplus®	biały sypki proszek	powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,11$ półstały hydrożel, $\Delta m/m_0 = 0,3$ przezroczysta bardzo gęsta ciecz
	Luźno związana	t_2^h	11,6 ± 1,3	10,2 ± 1,8	11,5 ± 1,9			
	Wolna (swobodna)	t_3^h	-	80 ± 34*	67 ± 12			

* czas oraz uwodnienie dopasowane dla drugiej eksponenty próbki uwodnionej w $h = 1$, której czas odbiegał od czasów uzyskanych w niższych wilgotnościach względnych

Jak wynika z Tabeli IV-1 dla wszystkich próbek wyznaczono parametr A_0 , który stanowi wartość do 2% suchej masy badanych próbek. Parametr ten może świadczyć o zawartości wody, która była mocno związana ze strukturą próbki podczas mielenia i nie ulegała dehydratacji w trakcie wstępnego suszenia nad żelem krzemionkowym.

Układem wiążącym największą ilość wody jest sam polimer Soluplus®. Wynika to z deklarowanych przez producenta higroskopijnych właściwości tego polimeru. Podobnie niewiele większą wartość czasu hydratacji oraz niewiele mniejszą maksymalną wartość poziomu uwodnienia zaobserwowano dla stałego rozproszenia zawierającego 10% hydrofobowego tadalafilu i 90% Soluplus®. W próbkach nie da się jednoznacznie określić frakcji wody opisywanej trzecią eksponentą uznawaną za wolną (swobodną), gdyż nie ulega ona wysyceniu w trakcie hydratacji z fazy gazowej. Zbliżone czasy hydratacji zarówno dla wody ściśle, jak i dla wody luźno związanej, t_1 i t_2 , uzyskano dla polimeru, jak i dla stałego rozproszenia złożonego z 50% tadalafilu i 50% Soluplus® (0,5TD).

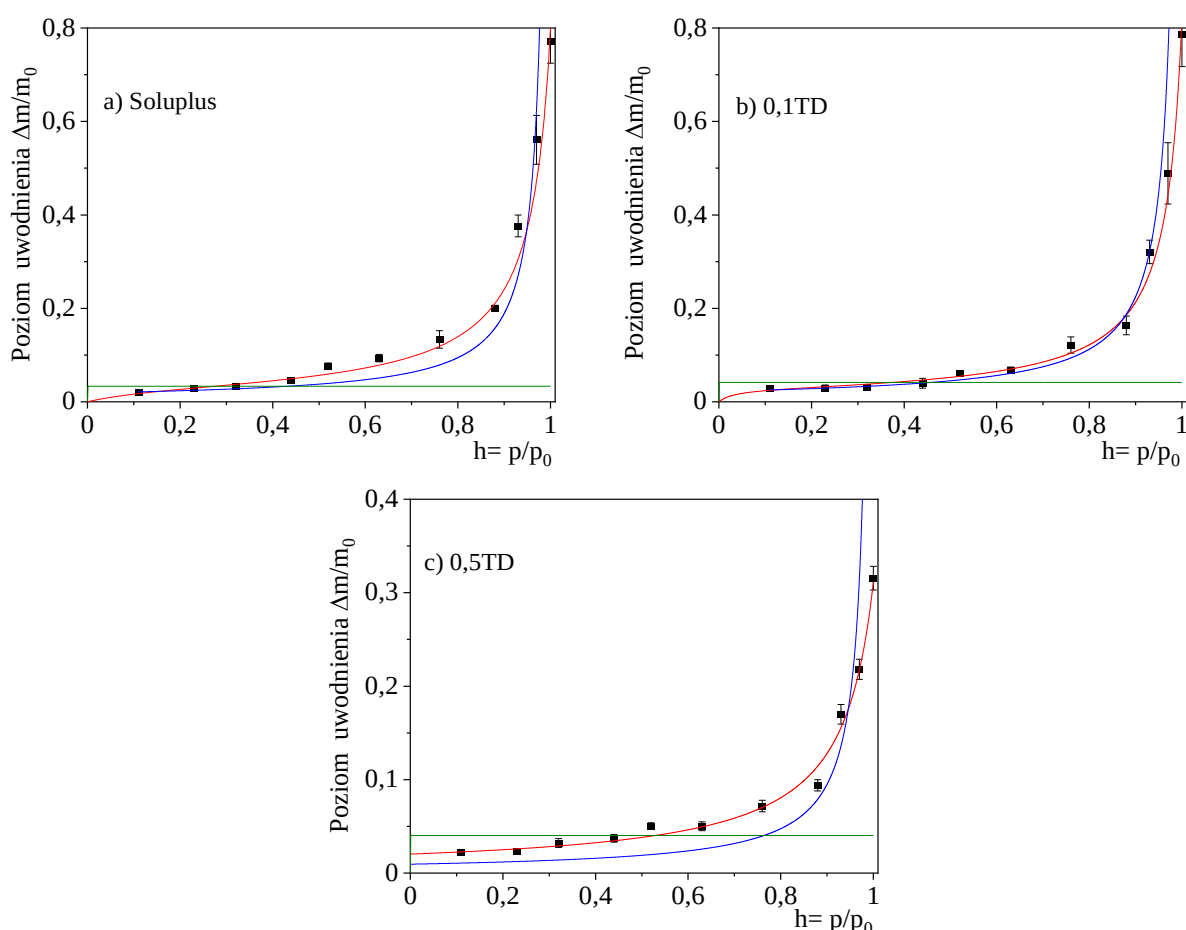
Natomiast niewielka zawartość tadalafilu w układzie powodowała zwiększenie siły wiązań wodorowych w próbce.

Na podstawie równowagowych poziomów uwodnienia próbki (52) zestawionych w funkcji wilgotności względnej utworzono izotermę sorpcji przedstawioną na Rysunku IV.2. Dla stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus® dopasowano trzy modele sorpcji, model Languimira (53), model BET (54) oraz model GAB-Dent (55). Spośród nich model GAB-Dent był najlepiej dopasowany.

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1+b_1 h)} \quad (53)$$

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-h)(1+b_1 h-h)} \quad (54)$$

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-bh)(1+b_1 h-bh)} \quad (55)$$



Rysunek IV.2. Izotermę sorpcji wraz z dopasowanymi modelami Languimira (zielona linia), BET (niebieska linia) oraz model GAB-Dent (czerwona linia) dla stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus®.

W próbce zawierającej 100% Soluplus® przyrost masy, który stanowiła woda wysycająca pierwotne miejsca wiążące wyliczona z modelu GAB wynosi $\Delta M/m_0 = 0,034 \pm 0,002$, co dobrze

odpowiada łącznej średniej zawartości wody ($A_0 + A_I = 0,034$) wyznaczonej z tras hydratacyjnych (Tab. IV-1). Natomiast, zawartość nieobsadzonych pierwotnych miejsc wiążących ($1/b_I$) przy $h = 1$ wynosiła 14,3%. W przypadku 0,1TD, $\Delta M/m_0 = 0,028$, co tylko nieznacznie przekracza wartość wyznaczoną dla wody opisanej parametrem A_0 . Dla tej próbki przy $h = 1$ obsadzona jest dominująca większość pierwotnych miejsc wiążących, gdyż nieobsadzone miejsca stanowią tylko 3,3% wszystkich. W miarę zwiększania udziału tadalafilu w próbce, parametr $\Delta M/m_0$, odpowiada w granicy błędu frakcji A_0 wyznaczonej z tras hydratacyjnych, a liczba nieobsadzonych miejsc wiążących dla najwyższej wilgotności względnej jest jeszcze niższa, stanowiąc mniej niż 2% wszystkich pierwotnych miejsc wiążących.

Dla sprawdzenia stosowalności modelu GAB-Dent (wzór 55), dane przedstawiono w formie parabolicznej.

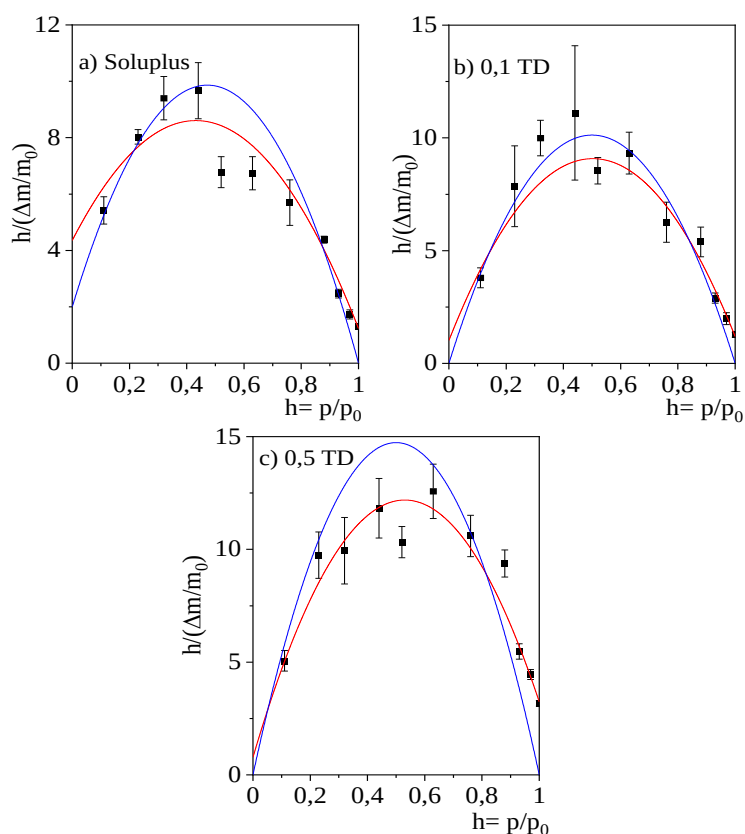
$$\frac{h}{\Delta m/m_0} = A + Bh - Ch^2 \quad (56)$$

$$\frac{\Delta M}{m_0} = \frac{1}{\sqrt{B^2 + 4AC}}, \quad (57)$$

$$b_1 = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC}}{A}, \quad (58)$$

$$b = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC} - B}{2A}. \quad (59)$$

Zastosowano formę paraboliczną tego modelu przedstawioną na Rysunku IV.3, do której dopasowano funkcję ze wzoru 56, uzyskując dla 100% polimeru wartości: $A = 4,35 \pm 0,72$; $B = 20 \pm 4$; $C = -23 \pm 3$, natomiast dla stałego rozproszenia złożonego z 90% polimeru (0,1 TD) wartości te wynosiły kolejno: $A = 1,01 \pm 0,25$; $B = 32 \pm 4$; $C = -32 \pm 3$, dla 0,5 TD: $A = 1,1 \pm 0,3$; $B = 43 \pm 5$; $C = -40 \pm 4$. Następnie wyznaczono parametry modelu GAB-Dent ze wzorów 57-59, a wyniki tych obliczeń przedstawiono w Tabeli IV-2. Kryterium stosowalności modelu GAB jest nadwyżka wartości izotermy ponad zero dla wilgotności względnej $h=1$, gdyż dla modelu BET dla $h = 1$ izoterma przechodzi przez zero.



Rysunek IV.3. Paraboliczna forma izotermy sorpcji z modelem BET (niebieska linia) oraz GAB-Dent (czerwona linia) dla polimeru Soluplus (a) oraz stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus® (b-c).

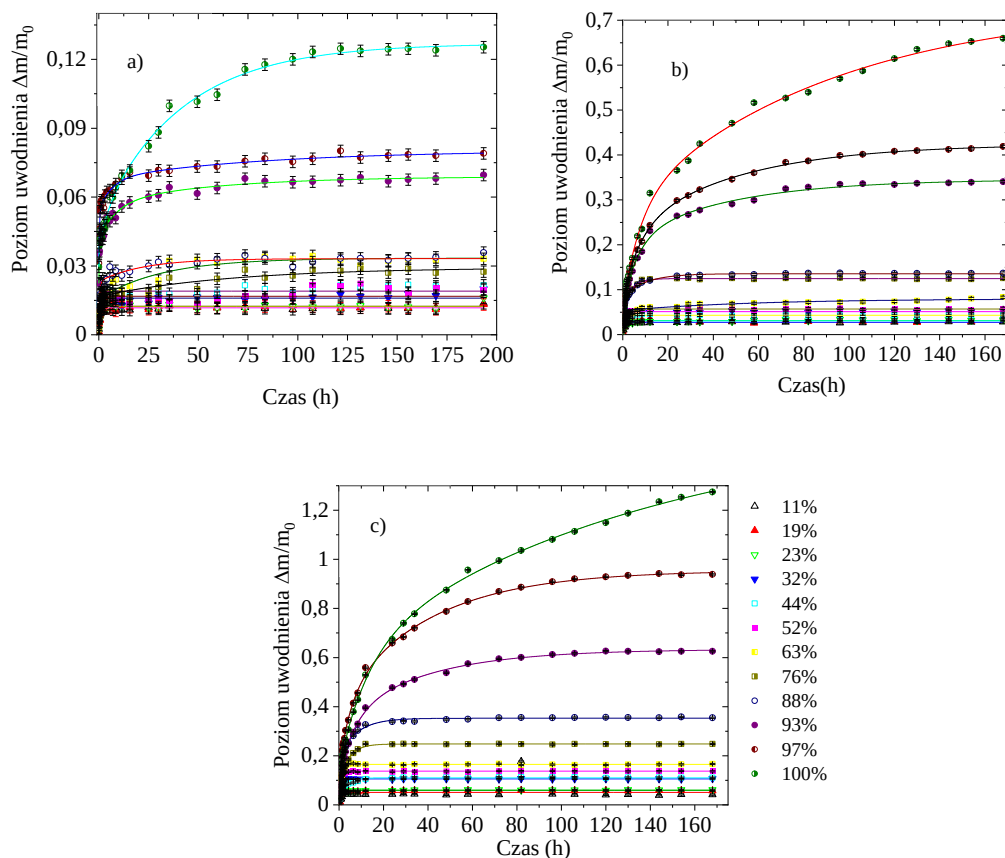
Na podstawie uzyskanych wyników (Rys. IV.3) widoczne jest przesunięcie od modelu BET w stronę GAB-Dent wraz ze zwiększeniem zawartości tadalafilu w stałym rozproszeniu, pomimo iż dla czystego polimeru dopasowanie modelu BET i tak nie jest tak dobre, jak dopasowanie modelu GAB-Dent. Poniżej przedstawiono uzyskane dla próbek parametry modelu GAB-Dent.

Tabela IV-2. Wyniki dopasowań parametrów modelu sorpcji GAB-Dent dla stałych rozprożeń tadalafilu zawierające 50% (0,5TD) lub 90% (0,1TD) Soluplus®. Dla porównania przedstawiono dane dla samego polimeru.

Parametr	0,5TD	0,1TD	Soluplus®
$\Delta M/m_0$	$0,021 \pm 0,002$	$0,028 \pm 0,002$	$0,034 \pm 0,002$
b	$0,935 \pm 0,007$	$0,966 \pm 0,004$	$0,958 \pm 0,006$
1/b1	$0,017 \pm 0,004$	$0,029 \pm 0,004$	$0,143 \pm 0,001$

1.2. Trasy hydratacyjne dla stałych rozproczeń z bozentanem

Wykonano trasy hydratacyjne dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie w proporcji wagowej 1+1 (m/m) przygotowanego metodą mielenia (4 h, 400 obr./min), próbki bozentanu mielonego w tych samych warunkach co stałe rozproszenie oraz niemielonego polimeru – Kollidon VA64® (kopowidon). Wyniki przedstawiono na Rys. IV-4.



Rysunek IV.4. Kinetyka hydratacji bozentanu mielonego przez 4 h z prędkością 400 obr/min (a), stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (1+1, 4 h, 400 obr./min) (b) oraz kopowidonu (c). Wilgotność względną wyrażono w %.

Podobnie jak w przypadku układów z tadalafilem, również dla bozentanu, jego stałego rozproszenia z kopowidonem oraz samego kopowidonu, proces hydratacji z fazy gazowej, mierzony jako przyrost masy wyrażony w jednostkach suchej masy, można przybliżyć funkcją eksponencjalną, lub superpozycją funkcji eksponencjalnych (60):

$$\frac{\Delta m}{m_0} = A_0 + A_1 \exp(-t/t_1^h) + A_2 \exp(-t/t_2^h) + A_3 \exp(-t/t_3^h), \quad (60)$$

gdzie t_i^h jest czasem hydratacji danej składowej, A_0 woda nieusuwalna dla $h = 0$, zaś A_i są przyrostami poziomu hydratacji dla danej wilgotności otoczenia.

Dla badanych próbek z Rys. IV.4 dopasowano funkcję jednoeksponencjalną dla tras hydratacyjnych przeprowadzanych w atmosferze o wilgotności względnej aż do 52%. Z kolei, kinetykę hydratacji dla wyższych wilgotności względnych opisywała funkcja dwueksponencjalna. Natomiast w próbkach, zawierających kopowidon (Rys. IV.4b i IV.4c) dla najwyższych wilgotności względnych atmosfery (93%, 97%, 100%) dopasowano trzy eksponenty.

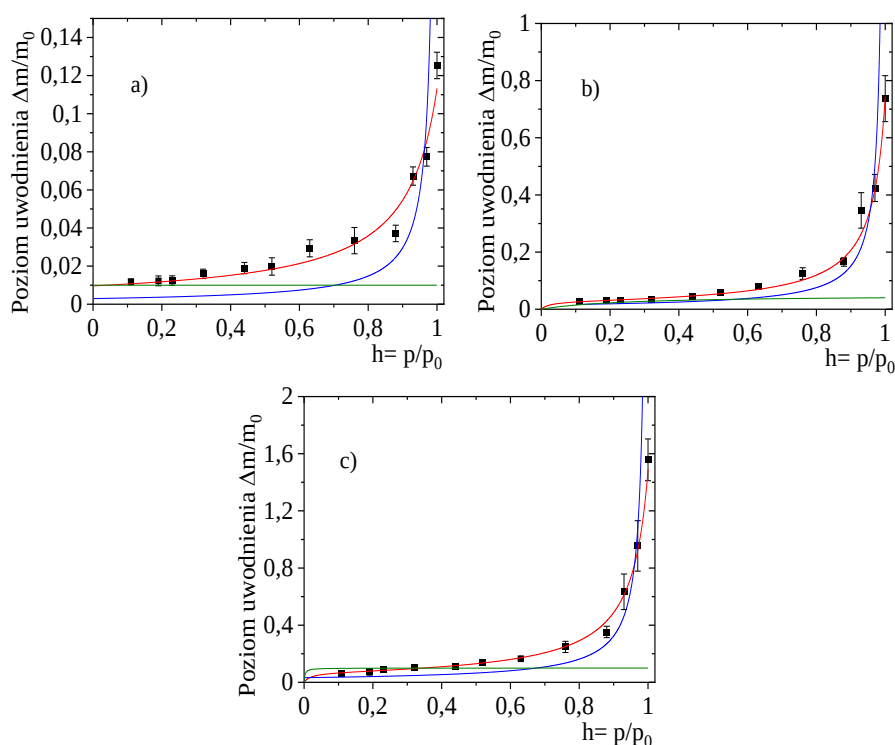
Opisując kolejne składowe hydratacyjne śladowej wody wiązanej podczas hydratacji z fazy gazowej, wyróżniono/zidentyfikowano następujące frakcje wody w stałym rozproszeniu bozentanu w kopowidonie (0,5BS) to jest: najściślej związaną, ściśle związaną, luźno związaną i wodę wolną (swobodną). W Tabeli IV-3. zestawiono wartości parametrów dopasowanych superpozycji funkcji eksponencjalnych wyznaczonych dla stałego rozproszenia i poszczególnych składników wchodzących w jego skład (wzór 60).

Tabela IV-3. Wyniki dopasowań funkcji ekponencjalnej i morfologia próbek dla tras hydratacyjnych stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS), mielonego bozentanu (BS_M) oraz niemielonego kopowidonu. Pramatory procesu mielenia: 4 h, 400 obr./min.

Parametr			Wartość średnia parametru (n=12) ± odchylenie standardowe			Morfologia próbki		
			BS_M	0,5BS	kopowidon		Przed hydratacją	Po hydratacji
Fracja wody zależna od energii wiązania	Bardzo ściśle związana	A_0^h	0,011 ± 0,002	0,020 ± 0,003	0,023 ± 0,005	BS_M	żółty sypki proszek	żółty proszek, powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,1$ próbka półstała
	Ściśle związana	A_1^h	0,013 ± 0,002	0,033 ± 0,006	0,099 ± 0,016	0,5BS	żółty sypki proszek	powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,1$ próbka półstała $\Delta m/m_0 = 0,3$ żółta przezroczysta gęsta ciecz, $\Delta m/m_0 = 0,5$ pojawia się biały osad (rekrytalizacja bozentanu)
	Luźno związana	A_2^h	0,027 ± 0,001	0,112 ± 0,008	0,251 ± 0,038	kopowidon	biały sypki proszek	powyżej uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,11$ próbka półstała $\Delta m/m_0 = 0,3$ przezroczysta gęsta ciecz, która upływnia się wraz z uwodnieniem
	Wolna (swobodna)	A_3^h	-	0,261 ± 0,017	0,582 ± 0,046			
Czas hydratacji [h]	Ściśle związana	t_1^h	0,52 ± 0,14	0,87 ± 0,24	1,05 ± 0,26			
	Luźno związana	t_2^h	30 ± 5	6,6 ± 1,5	7,7 ± 1,8			
	Wolna (swobodna)	t_3^h	-	62 ± 12	72 ± 16			

W porównaniu do tadalafilu, w bozentanie pomimo iż również jest on silnie hydrofobową substancją leczniczą, wiązanie wody występuje nawet dla próbki czystego bozentanu, chociaż tylko w przypadku, jeśli jest zmielony. Próbka bozentanu niemielonego była hydratowana, jednak nie obserwowano zmian większych niż błąd pomiaru masy. Stałe rozproszenie bozentanu w kopowidonie (1+1) dla wilgotności względnych równych lub wyższych od $h = 0,88$ adsorbuje wodę, osiągając ponad dwukrotnie wyższe poziomy uwodnienia niż dla próbek w niższych wilgotnościach względnych. Dla stałego rozproszenia umieszczonego w atmosferze o wilgotności względnej równej $p/p_0 = 100\%$ po 72h hydratacji, czyli po przekroczeniu $\Delta m/m_0 = 0,5$, próbka zmienia kolor z żółtego na biały, co sugeruje obecność rekrytalizację amorficznego bozentanu. Zgodnie z oczekiwaniami, czas hydratacji bozentanu t_1 znacznie skraca się w obecności hydrofilowego kopowidonu, osiągając wartości porównywalne z czasem hydratacji typowym dla samego polimeru. W odniesieniu do frakcji wody ściśle związanej, czas

hydratacji jest prawie trzykrotnie dłuższy niż dla stałego rozproszenia tadalafile w Soluplus® (0,5TD). Natomiast, czas hydratacji wody luźno związanej w stałym rozproszeniu 0,5BS jest prawie dwukrotnie krótszy, niż w przypadku stałego rozproszenia 0,5TD (Tab. IV-1, IV-3).



Rysunek IV.5. Izotermi sorpcji wraz z dopasowanymi modelami Langmuira (zielona linia), BET (niebieska linia) oraz model GAB-Dent (czerwona linia) dla bozentanu mielonego (a), stałego rozproszenia bozentanu z kopowidonom (0,5BS) (b) i kopowidonu (c).

Dla próbek bozentanu mielonego można zauważyć różnicę w procesie hydratacji z fazy gazowej, gdyż udało się utworzyć izotermę sorpcyjną już dla samej substancji leczniczej bez dodatku hydrofilowego polimeru (Rysunek IV.5a), co nie było możliwe dla tadalafile. Maksymalny poziom uwodnienia stałego rozproszenia 0,5BS jest dwukrotnie wyższy, niż dla stałego rozproszenia 0,5TD.

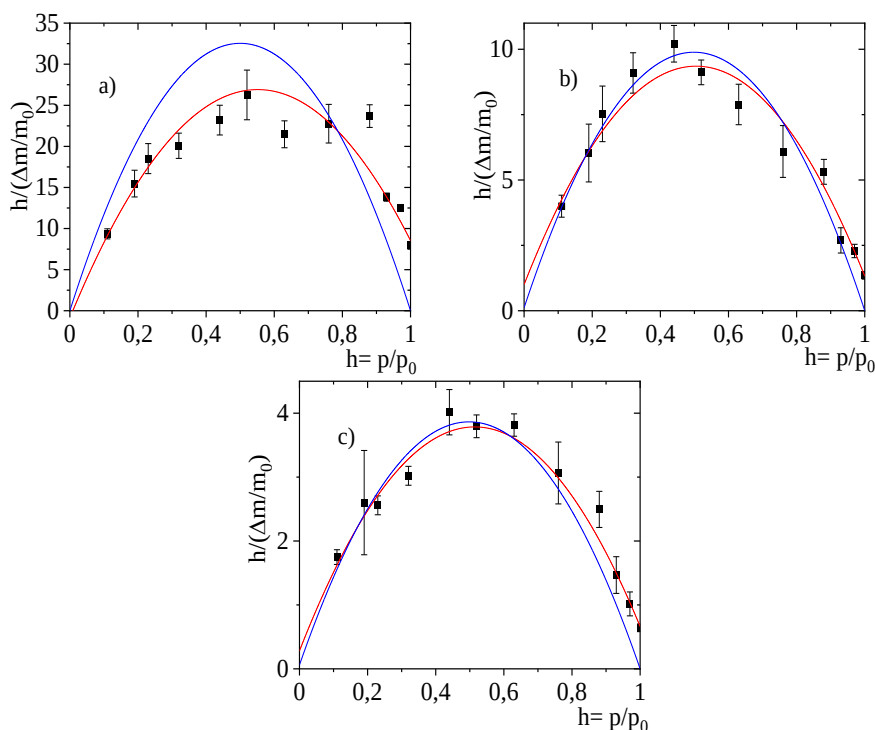
Podobnie jak w przypadku stałych rozproszeń tadalafile w Soluplus®, sorpcja wody z fazy gazowej w stałym rozproszeniu bozentanu z kopowidonom jest dobrze opisywana modelem sorpcji wielowarstwowej GAB-Dent.

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1 - bh)(1 + b_1 h - bh)} \quad (61)$$

Parametr $\Delta M/m_0$ określa wartość wysycenia miejsc pierwotnych wiążących wodę, następnie parametr b oznacza stosunek szybkości przyłączania molekuł do ich odłączania w miejscach wtórnych

przy $h = 1$. Odwrotność parametru b_1 jest stosunkiem liczby wolnych miejsc wiążących (dla $h = 1$) do liczby miejsc wiążących przypadających na jedną molekułę.

Woda wysycająca pierwotne miejsca wiążące $\Delta M/m_0$ stanowi przyrost masy na poziomie $0,008 \pm 0,002$ dla bozentanu mielonego, $0,027 \pm 0,001$ dla stałego rozproszenia 0,5BS i $0,069 \pm 0,003$ dla kopowidonu. Natomiast, zawartość nieobsadzonych pierwotnych miejsc wiążących ($1/b_1$) przy $h = 1$ wynosi około 1-3% dla wszystkich próbek z bozentanem.



Rysunek IV.6. Paraboliczna forma izotermy sorpcji dla bozentanu mielonego (a), stałego rozproszenia bozentanu z kopowidonem – 0,5BS (b), kopowidonu (c); zamknięte kwadraty - dane doświadczalne; niebieska linia – model BET, czerwona linia –model GAB-Dent .

W przypadku próbek z bozentanem również lepiej stosowny jest model GAB (Rys. IV.6.) także w formie parabolicznej $\frac{h}{\Delta m/m_0} = A + Bh - Ch^2$. (62)

Choć dla badanych próbek zawierających kopowidon ta różnica jest niewielka, lecz model BET nie jest spełniony, gdyż $b \neq 1$. Z parametrów parabol wynoszących dla mielonego bozentanu: $A = 2,45 \pm 0,86$; $B = 100 \pm 13$; $C = -91 \pm 11$, dla stałego rozproszenia 0,5BS: $A = 2,55 \pm 0,62$; $B = 18 \pm 2$; $C = -19 \pm 2$ i dla kopowidonu: $A = 0,28 \pm 0,03$; $B = 13 \pm 1$; $C = -13 \pm 1$. W Tabeli IV-4 zestawiono dane uzyskane z dopasowania parametrów do modelu GAB-Dent na podstawie Rys. IV.5. jak również po przeliczeniu parametrów parabol z Rys. IV.6 zgodnie ze wzorami 57- 59.

Tabela IV-4. Wyniki dopasowań parametrów modelu sorpcji GAB-Dent dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie. Dla porównania przedstawiono dane dla bozentanu mielonego (BS_M) oraz kopowidonu.

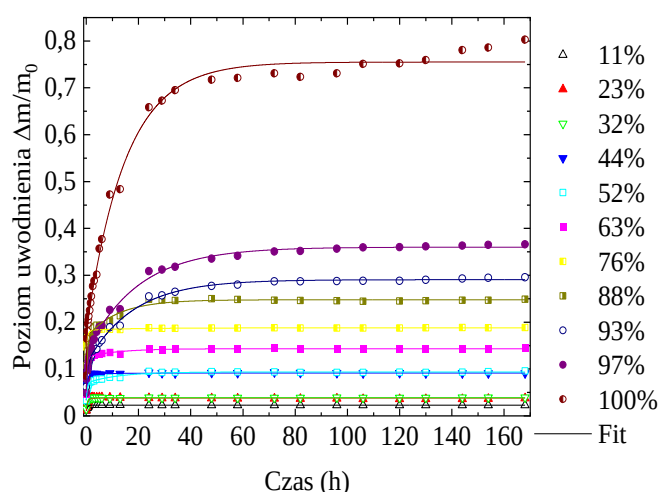
Parameter	BS_M	0,5BS	kopowidon
$\Delta M/m_0$	$0,009 \pm 0,001$	$0,027 \pm 0,001$	$0,069 \pm 0,003$
b	$0,915 \pm 0,011$	$0,963 \pm 0,004$	$0,953 \pm 0,005$
$1/b_1$	$0,009 \pm 0,001$	$0,028 \pm 0,002$	$0,019 \pm 0,003$

1.3. Trasy hydratacyjne dla *N. tigrina*.

W plesze *Niebla tigrina*, anhydrobiotycznego organizmu żywego, będącego układem mikroheterogennym o strukturze wewnętrznej mocno hierarchicznej, hydratacja prowadzona z fazy gazowej pozwala rozróżnić trzy dobrze wyodrębnione frakcje wody związanej, różniące się zarówno masą, jak i czasami hydratacji. Dopasowano superpozycję dwóch funkcji eksponencjalnych:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = A_0 + A_1 \exp(-t/t_1^h) + A_2 \exp(-t/t_2^h) \quad (63)$$

Tylko dla próbki umieszczonej w atmosferze o wilgotności względnej równej $p/p_0 = 100\%$ zaobserwowano charakterystycznie zwiększony poziom hydratacji, co może być związane z warunkami siedliska i pobierania wody z mgieł pojawiających się na stokach górskich pustyni Atacama:



Rysunek IV.7. Wykres kinetyki hydratacji z fazy gazowej dla plechy *Niebla tigrina* [50].

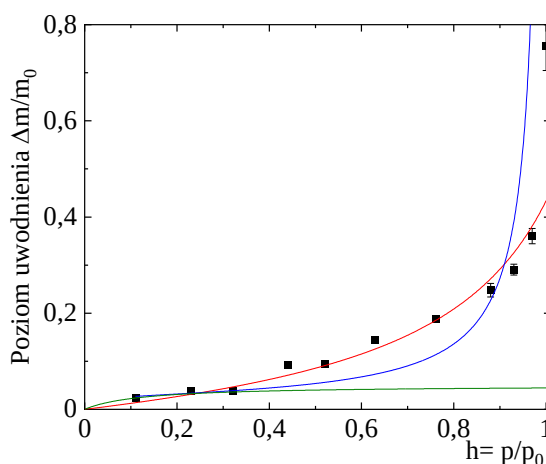
W odróżnieniu od badanych próbek farmaceutycznych, w przypadku porostu nie udało się dopasować trzeciej funkcji eksponencjalnej (wzór 63). Wyniki pokazujące średnią wartość uzyskano dla parametrów A_0^h równego $0,051 \pm 0,004$ oraz pierwszej składowej eksponencjalnej A_1^h , której wartość jest równa prawie A_0 i wynosi $0,054 \pm 0,004$. Ulegają one wysyceniu, natomiast składowa A_2^h narasta od 0,002 dla $p/p_0 = 44\%$ do $0,057 \pm 0,008$ dla $p/p_0 = 100\%$. Czas hydratacji, $t_1^h = (0,51 \pm 0,05)\text{h}$, można

porównywać do tego uzyskanego dla bozentanu mielonego. Natomiast czas hydratacji frakcji wody luźno związanej t_2^h jest dłuższy od pozostałych czasów hydratacji obserwowanych w próbkach farmaceutycznych. Mieści się on w zakresie między 11,8h do 19,5h i wykazuje zmienność między wilgotnościami względnymi, co sugeruje jego stabilność.

Wykorzystując wartości w stanie nasycenia poziomów uwodnienia otrzymanych w pomiarach kinetyki hydratacji, dla plechy *N. tigrina* można zbudować izotermę sorpcyjną, którą można przybliżyć modelami sorpcji wielowarstwowej BET lub GAB:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-h)(1+b_1 h-h)}, \quad (64)$$

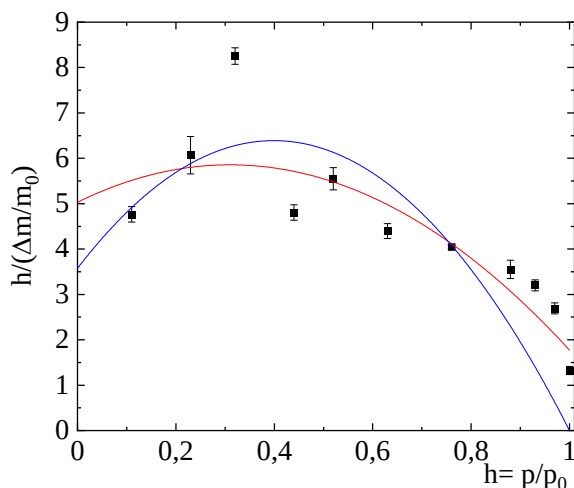
$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0} \frac{b_1 h}{(1-bh)(1+b_1 h-bh)}. \quad (65)$$



Rysunek IV.8. Izoterma sorpcji dla *N. tigrina* wraz z dopasowanymi modelami Languimira (zielona przerywana linia), BET (niebieska przerywana linia) oraz model GAB-Dent (czerwona linia) [50].

Dla próbek *Niebla tigrina* zawartość wody związanej do miejsc pierwotnych $\Delta M/m_0$, podobnie jak dla kopowidonu, stanowiła w przybliżeniu 7%. Jednak największą różnicę w porównaniu do próbek farmaceutycznych stanowiła liczba nieobsadzonych miejsc wiążących wynosząca 35%. Parametr b dopasowania wynosił $0,88 \pm 0,12$. W formie parabolicznej model GAB opisany wzorem:

$$\frac{h}{\Delta m/m_0} = A + Bh - Ch^2 \text{ prezentuje się następująco (Rys. IV.9).}$$



Rysunek IV.9. Paraboliczna forma izoterm sorpcji z modelem BET (niebieska przerywana linia) oraz modelem GAB-Dent (czerwona linia) dla *N. tigrina*.

W porównaniu do próbek farmaceutycznych parabola dla *N. tigrina* ma inny kształt. Jest ona bardzo rozciągnięta, co może być dodatkowo spowodowane bardzo niską wartością poziomu uwodnienia dla $h = 32\%$ i odpowiada punktowi o wysokiej wartości w formie parabolicznej izoterm sorpcji. Z parametrów paraboli wynoszących: $A = 5 \pm 1$; $B = 5,3 \pm 0,1$; $C = -8,6 \pm 0,2$, wyznaczono parametry izoterm sorpcji, które potwierdzają wartości uzyskane z modelu sigmoidalnego.

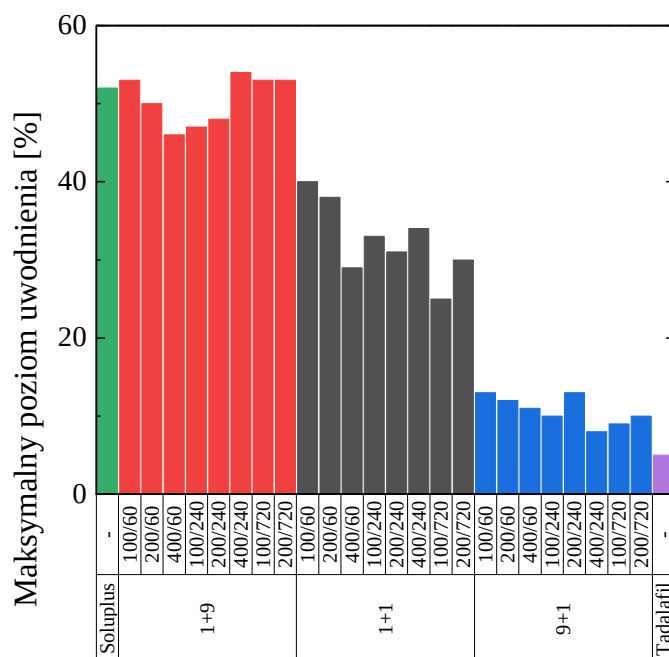
2. Wyniki pomiarów magnetycznego rezonansu jądrowego

W celu zbadania dynamiki molekularnej śladowej wody związanej w badanych układach mikroheterogennych wykonano pomiary zależności czasu relaksacji T_2^* oraz widm $^1\text{H-NMR}$ w funkcji poziomu uwodnienia dla próbek farmaceutycznych z Tabeli III-1 oraz dla organizmu anhydrobiotycznego. Wyniki uzyskano w domenie czasu i komplementarnie w domenie częstotliwości. Dodatkowo w celu sprawdzenia zachowania układów pod wpływem temperatury, wykonano pomiary spektroskopii relaksacyjnej czasu T_1 dla układu, który uznano za najbardziej reprezentatywny czyli dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus (0,5TD) przygotowanego w procesie mielenia z prędkością 200 obr./min przez 240 min.

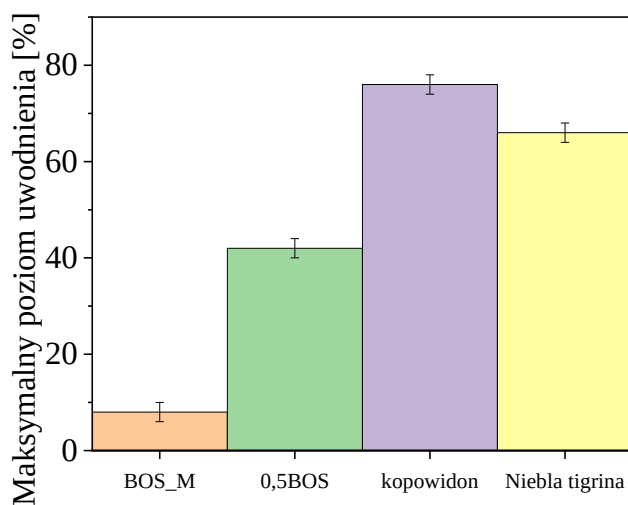
2.1. Maksymalny poziom uwodnienia badanych układów mikroheterogennych

W poniższym podrozdziale przedstawiono maksymalne uwodnienia, które uzyskano dla badanych próbek podczas wykonywania pomiarów MRJ wraz z krótką dyskusją uzyskanych wartości. Zostały one wyszczególnione ze względu na różnice w uzyskiwanych poziomach uwodnienia między

pomiarami kinetyk hydratacji, wynikającymi z różnic w wielkości powierzchni mającej bezpośredni kontakt z atmosferą, jest to spowodowane rozmiarem próbki.



Rysunek IV.10. Maksymalne uwodnienia stałych rozprożeń tadalafilu z Soluplus® uzyskane podczas pomiarów 1H-MRJ w zależności od składu formulacji i parametrów procesu mielenia tj. prędkości obrotowej 100-400 obr./min oraz czasu mielenia 60-720 min.



Rysunek IV.11. Maksymalne poziomy uwodnienia uzyskane w ¹H-MRJ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS) w porównaniu z BS_M, kopowidonem i plechą porostu *Niebla tigrina*.

Na podstawie rysunku IV.11 stwierdzono, że podobnie jak w przypadku stałych rozprożeń z tadalafitem, największy wpływ na maksymalny poziom uwodnienia formułacji z bozentanem ma ilość hydrofilowego polimeru w próbce. Poziom maksymalnego uwodnienia dla stałego rozproszenia zawierającego 50 % kopowidonu wynosił ok. 40 % i był pięciokrotnie większy od wartości parametru uzyskanej dla bozentanu mielonego bez dodatku polimeru. Podczas analizy kopowidonu (bez dodatku bozentanu), maksymalne uwodnienie wynosiło 76% i było prawie dwukrotnie większe niż dla stałego rozproszenia 0,5BS oraz prawie dziesięciokrotnie większe niż dla bozentanu mielonego przy zastosowaniu tych samych parametrów procesu jak podczas sporządzania stałego rozproszenia.

2.2. Wyniki pomiarów ^1H -NMR dla stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus®

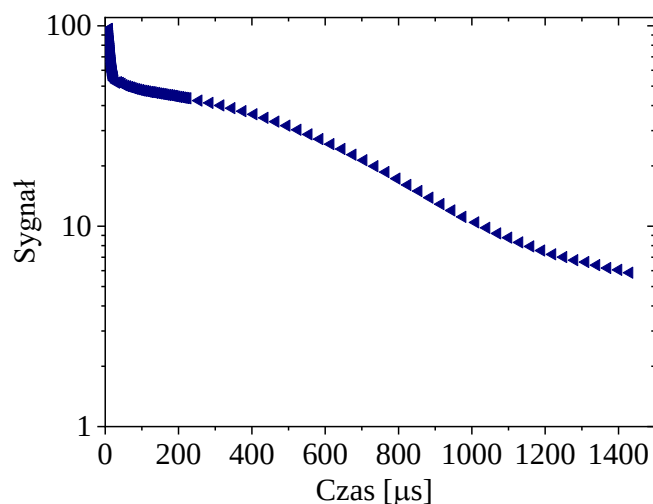
Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów (FID) w stałych rozproszeniach tadalafilu, bozantanu, jak również w płaszczyźnie *N. tigrina* został dobrze dopasowany superpozycją funkcji Gaussa dla frakcji stałej (S) i funkcji eksponencjalnej dla frakcji ciekłej (L).

Dla stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus® (Tab III-1) oraz samego polimeru wyróżniono dwie frakcje dobrze dopasowane funkcją Gaussa i jedną frakcję protonów mobilnych:

$$FID(t) = S_1 \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S1}^*}\right)^2\right) + S_2 \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S2}^*}\right)^2\right) + L \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L}^*}\right) \quad (66)$$

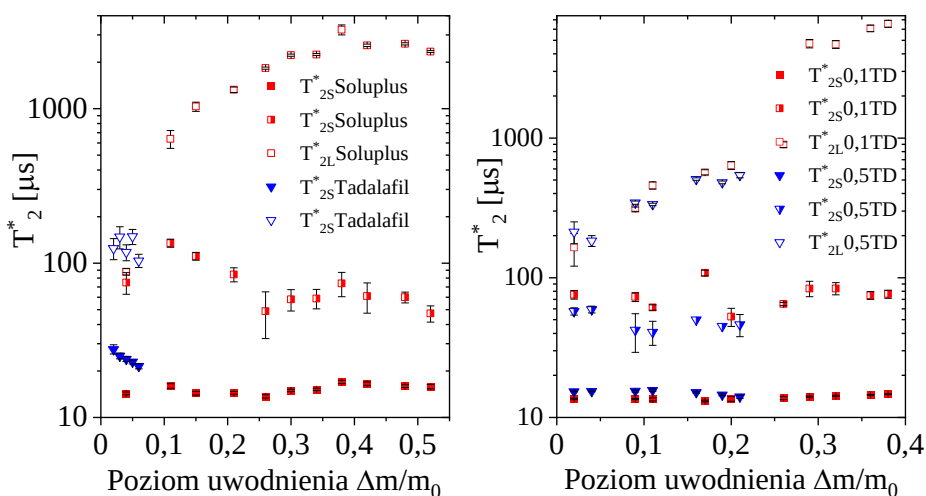
gdzie: S_i to amplituda danej frakcji stałej, L to amplituda frakcji mobilnej, natomiast T_{2x}^* to efektywne czasy relaksacji spinowo-spinowej dla poszczególnych frakcji sygnału.

Dla zobrazowania sytuacji dopasowania takiej superpozycji, przedstawiono sygnał zaniku swobodnej precesji (ang. *FID = Free Induction Decay*) dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (Rys. IV.12). Dla bardzo długich czasów t (dla 600 μs i powyżej zaznacza się efekt bardzo szerokiej linii gaussowskiej będącej następstwem nie własności próbki, lecz niejednorodności pola B_0 elektromagnesu. Oczywiście nie był brany pod uwagę.



Rysunek IV.12. Wykres sygnału ^1H -NMR FID dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (0,5TD 200/240) uwodnionego do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,26$.

Dopasowanie pośredniej składowej zaniku swobodnej precesji funkcją Gaussa, S_2 , jest niepewne, gdyż w wielu innych układach mikroheterogennych obserwowano zbliżoną składową o nieco większym czasie zaniku, skutecznie dopasowywaną funkcją eksponencjalną. O wyborze funkcji Gaussa w dopasowaniu składowej pośredniej zdecydowały wyniki eksperymentów w domenie częstości, gdzie wyraźnie zarysowała się dodatkowa linia pochodząca od frakcji o ograniczonej mobilności, a jednoznacznie mająca kształt funkcji Gaussa. Superpozycja przedstawiona na Rys. IV.12, a opisana wzorem 66 była stosowana dla wszystkich próbek, tak więc nie udało się wyodrębnić kilku składowych ciekłych, a jedynie przedstawiono sumę tych składowych.



Rysunek IV.13. Zależność hydratacyjna czasów relaksacji T_2^* protonów wyznaczona w ^1H -MRJ dla stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus (0,1TD 200/240, 0,5TD 200/240) w porównaniu do samej substancji leczniczej i polimeru [71].

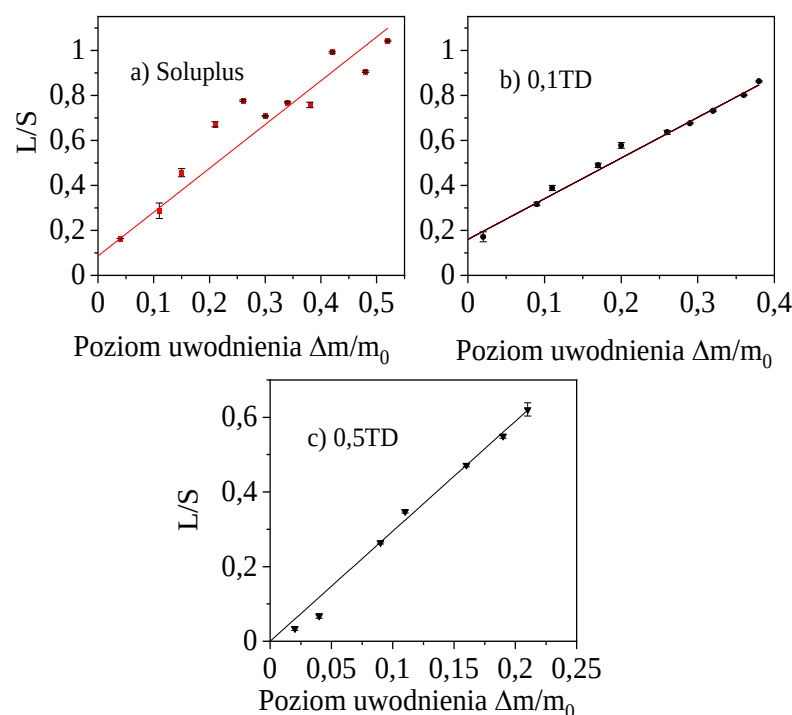
Stałe rozproszenia 0,1TD oraz 0,5TD przedstawione na Rysunku IV.13. były mielone kulowo z prędkością 200 obr./min przez 4h. Niestety nie udało się rozdzielić czasu relaksacji dla frakcji ciekłej na poszczególne składowe i jest ona opisana jedną eksponentą. W Tabeli IV-5 zestawiono czasy relaksacji T_2^* wyznaczone dla stałych rozprożeń tadafilu w Soluplus, które przygotowano przy zastosowaniu innych parametrach procesu mielenia.

Tabela IV-5. Zakresy efektywnych czasów relaksacji T_2^* dla stałych rozprożeń tadafilu w Soluplus w zależności od parametrów procesu mielenia.

Próbka	Czas T_2^* I Gauss	Czas T_2^* II Gauss	Czas T_2^* eksponenta
TD	21– 28	104 – 148	-
0,9 TD 100/60	17 – 19	66– 88	357 – 568
0,9 TD 200/60	18 – 20	80– 104	103 – 336
0,9 TD 400/60	18 – 20	55 – 102	222 – 395
0,9 TD 100/240	15 – 19	57 – 93	126 – 360
0,9 TD 200/240	17 – 20	75 – 116	1258 – 3632
0,9 TD 400/240	19 – 24	84 – 190	1158 – 3599
0,9 TD 100/720	20 – 24	103 – 129	1618 – 2495
0,9 TD 200/720	21 – 25	104 – 193	765 – 882
0,5 TD 100/60	14 – 17	61 – 80	167 – 5021
0,5 TD 200/60	15 – 17	54 – 76	117 – 3938
0,5 TD 400/60	15 – 17	46 – 64	87 – 2369
0,5 TD 100/240	15 – 16	55 – 67	66 – 1934
0,5 TD 200/240	15 – 16	48 – 69	185 – 5645
0,5 TD 400/240	15 – 18	41 – 97	68 – 933
0,5 TD 100/720	15 – 17	47 – 128	116 – 3034
0,5 TD 200/720	15 – 16	36 – 79	78,29 – 1315
0,1 TD 100/60	14 – 17	36 – 79	78 – 1315
0,1 TD 200/60	15 – 18	27 – 74	220,4 – 4068
0,1 TD 400/60	15 – 18	50 – 84	320– 3755
0,1 TD 100/240	15 – 18	59 – 65	1621 – 2924
0,1 TD 200/240	13 – 15	53 – 108	164 – 6566
0,1 TD 400/240	15 – 17	54 – 78	2201 – 3532
0,1 TD 100/720	14 – 16	48 – 85	819 – 4084
0,1 TD 200/720	14 – 15	60 – 85	819 – 3964
Soluplus®	14 – 17	47 – 135	87 – 3247

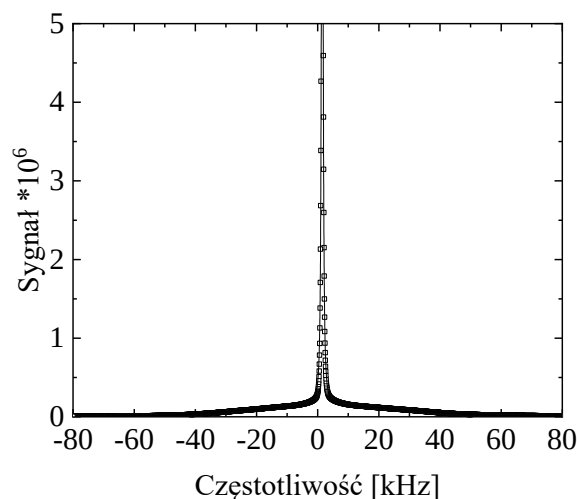
Na podstawie danych zebranych w tabeli IV-5 można stwierdzić, że czas relaksacji funkcji Gaussa ulega skróceniu wraz z zwiększaniem ilości polimeru Soluplus® w stałym rozproszeniu.

Oprócz analizy czasów relaksacji, które jak widać charakteryzują się obszarem przejściowym, gdzie trudno określić przynależność uzyskanego czasu do danej frakcji, czy to mobilnej ciekłej czy bardziej unieruchomionej stałej, obszar ten został opisany drugą funkcją Gaussa. Druga funkcja Gaussa została dopasowana na podstawie wyników uzyskanych w domenie częstotliwości. Może to być spowodowane zwilżaniem próbki, a co za tym idzie zwiększeniem mobilności protonów w matrycy stałej. Z tego względu wykonano analizę stosunku amplitud badanych składowych, aby określić, czy mimo zachodzącej nie całkowitej zmiany stanu skupienia próbki, zachodzi jej rozpuszczanie.



Rysunek IV.14. Wykres amplitudy sygnału ^1H -NMR pochodzącej od protonów mobilnych, wyrażonej w jednostkach sygnału stałego, L/S dla dwóch wybranych stałych rozproszeń tadafafilu w Soluplus® w porównaniu do samego polimeru [63].

Dla stałych rozproszeń tadafafilu w Soluplus zależności hydratacyjne L/S przedstawione na Rysunku IV.14. opisane są funkcją liniową odpowiednio: $L/S = (1,81 \pm 0,07)(\Delta m/m_0) + (0,16 \pm 0,07)$ dla 0,1TD, oraz $L/S = (2,95 \pm 0,07)(\Delta m/m_0)$ dla 0,5TD, co oznacza brak występowania frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie [72], pomimo widocznej zmiany morfologii próbek zawierających sam polimer i 10% tadafafilu. Dla porównania, powyższa zależność dla polimeru Soluplus jest opisana funkcją liniową: $L/S = (1,95 \pm 0,09)(\Delta m/m_0) + (0,08 \pm 0,01)$. Stwierdzono, że na skutek uwodnienia powyżej 30%, proszkowa postać analizowanych próbek zamieniała się w półstały hydrożel. Najprawdopodobniej było to związane z uwodnieniem łańcuchów amfifilowego polimeru. Nie wykazano bowiem rozpuszczania próbki (matrycy stałej) połączonego ze zmianą jej struktury. Komplementarnie wykonano pomiary ^1H -MRJ w domenie częstotliwości opisane poniżej.

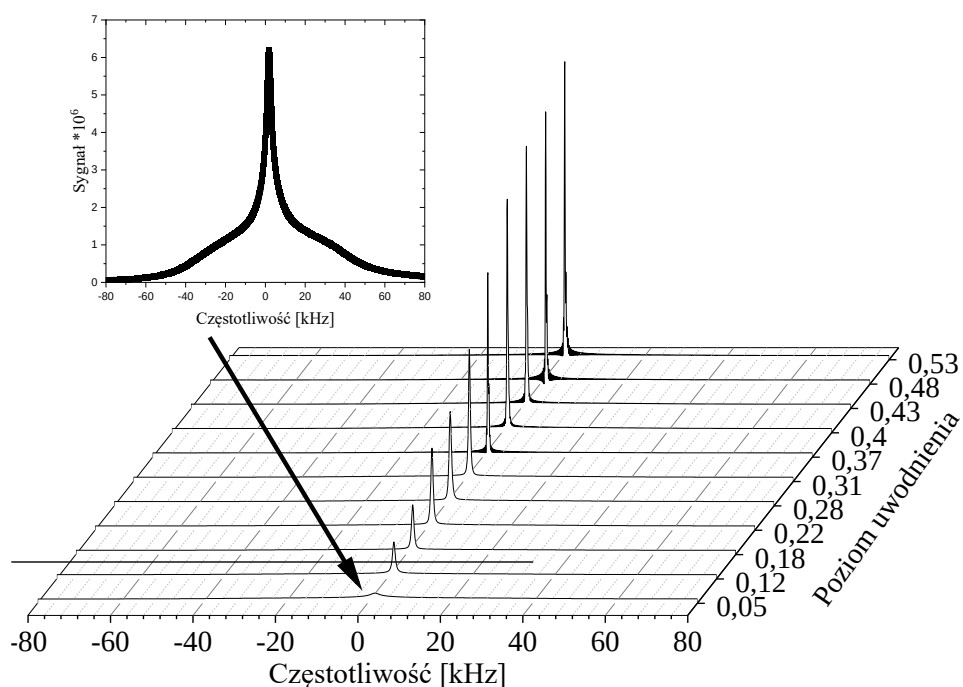


Rysunek IV.15. Widmo ^1H -NMR zarejestrowane w domenie częstotliwości dla stałego rozproszenia tadafilu w Soluplus® (0,1TD 200/240) o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,28$.

Widma ^1H -NMR stałych rozprożeń tadafilu w Soluplus®, zarejestrowane w domenie częstotliwości, opisano jako superpozycję dwóch funkcji Gaussa (wzór 45) dla frakcji stałej (S) oraz jednej funkcji Lorentza (wzór 44) dla frakcji ciekłej (L). W zależności od próbki i uwodnienia funkcja dopasowana była kombinacją jak np. przedstawiona poniżej we wzorze 67:

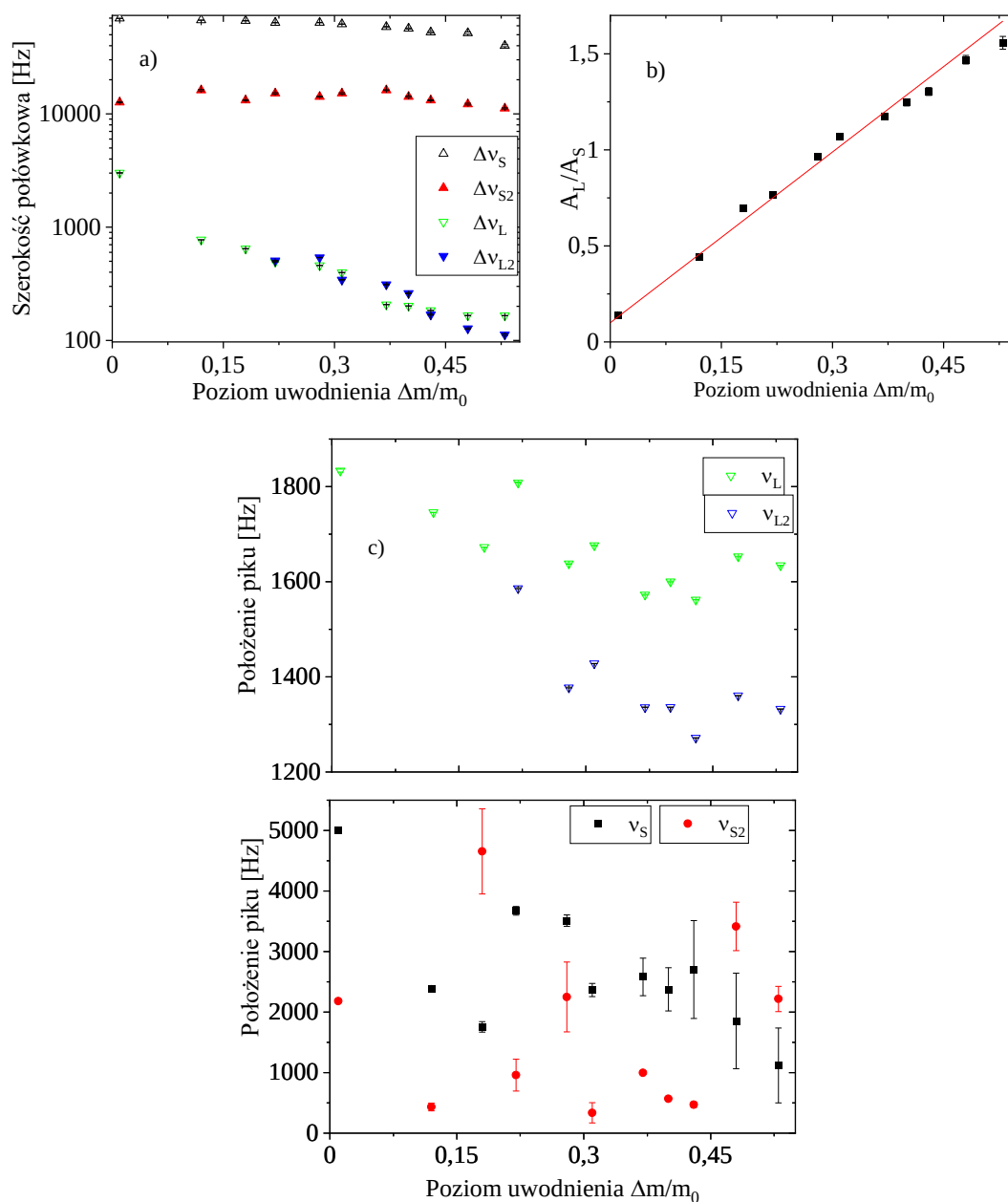
$$G(\nu) = \frac{A_{S1}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_{S1}} \exp \left[-2 * \left(\frac{\nu - \nu_{S1}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_{S1}} \right)^2 \right] + \frac{A_{S2}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_{S2}} \exp \left[-2 * \left(\frac{\nu - \nu_{S2}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_{S2}} \right)^2 \right] + \frac{2A_{L1}}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_{L1}}{4 * (\nu - \nu_{L1})^2 + \Delta \nu_{L1}^2} \right] + \frac{2A_{L2}}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_{L2}}{4 * (\nu - \nu_{L2})^2 + \Delta \nu_{L2}^2} \right] \quad (67)$$

gdzie: A_S to pole powierzchni pod krzywą Gaussa, $\Delta \nu_S$ to szerokość połówkowa funkcji Gaussa, ν_S położenie maksimum funkcji Gaussa, A_L to pole powierzchni pod krzywą Lorentza, $\Delta \nu_L$ to szerokość połówkowa funkcji Lorentza, ν_L położenie maksimum funkcji Lorentza.



Rysunek IV.16. Widma ^1H -NMR stałego rozproszenia 0,1TD 100/720 przedstawione w funkcji narastającego poziomu uwodnienia.

Na podstawie widm przedstawionych na Rysunku IV.16., pik powiązany z frakcją ciekłą dla uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,05$ jest praktycznie niewidoczny w porównaniu z kolejnym zmierzonym widmem dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0 = 0,12$. Jednak na powiększeniu widoczna jest linia Lorentza o znacznej szerokości połówkowej $\Delta\nu_L = 3,19$ kHz. Szerokość ta ulega zwężeniu w miarę zwiększania poziomu uwodnienia.



Rysunek IV.17. Zależność szerokości połówkowej widma ^1H -NMR dla stałego rozproszenia 0,1TD 100/720 od poziomu uwodnienia (a), stosunku pól powierzchni pod linią od protonów mobilnych do takiej od protonów o małej mobilności (b), położenia pików(c).

W próbkach stałych rozproszeń tadafilu w Soluplus® udało się wyodrębnić dwie populacje protonów o znacznym stopniu unieruchomienia, dopasowane funkcjami Gaussa. Dla pierwszej, szerszej funkcji Gaussa, wraz z wzrostem zawartości tadafilu w układzie zaobserwowano zmniejszenie szerokości połówkowych od $\Delta v_S \approx 70$ kHz do $\Delta v_S \approx 60$ kHz lub $\Delta v_S \approx 50$ kHz dla próbek zawierających odpowiednio 10% (0,1TD) lub 50% (0,5TD) tadafilu. Natomiast dla próbek, które tylko w niewielkim stopniu, czyli tych zawierających 90% substancji leczniczej (0,9TD), oraz dla samego tadafilu (TD)

szerokości wynosiły $\Delta\nu_S \approx 65$ kHz. Dla dopasowanej drugiej, węższej funkcji Gaussa szerokość połówkowa wahała się między 8-18 kHz niezależnie od rodzaju próbki, lecz ulegała poszerzeniu wraz z wzrostem poziomu uwodnienia. Jej obecność miała znaczący wpływ na jakość dopasowania. Wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki linia dopasowana funkcją Lorentza, a pochodząca od protonów mobilnych wody związanej zwężała się. Podobną tendencję zaobserwowano dla szerokości połówkowych frakcji ciekłej dla powietrznie suchych próbek, zwężających się od $\Delta\nu_L \approx 3,4$ kHz do 2,3 kHz.

Pomimo braku rozdzielania pozycji linii lorentzowskiej, przy wyższych uwodnieniach próbki udało się dopasować dwie funkcje Lorentza, które różniły się przesunięciem chemicznym. Ich położenia były oddalone od siebie od 150 do 400 Hz (Rys. IV.17.). Różnica przesunięć chemicznych zwiększała się wraz z wzrostem poziomu uwodnienia. Położenie pików składowych stałych, zachowywało się chaotycznie w stosunku do stabilnej tendencji obserwowanej dla pików frakcji ciekłej. Równocześnie położenie funkcji Lorentza ulegało przesunięciu od 1600 Hz do 1100 Hz wraz z wzrostem poziomu uwodnienia próbek. Rozdzielenie tych funkcji było możliwe dla coraz niższych poziomów uwodnienia w miarę zwiększania zawartości tadalafilu w stałym rozproszeniu, mimo iż maksymalne uwodnienie zmniejszało się wraz z wzrostem zawartości substancji leczniczej. Dla polimeru bez dodatku tadalafilu było powyżej 32%, gdy tadalafil stanowił 10% stałego rozproszenia (0,1TD) maksymalne uwodnienie wynosiło 21% (Rys IV.10), natomiast gdy ilość tadalafilu została zwiększona z 10% do 50% (0,5TD), parametr miał wartość 14%.

W całym zakresie badanych poziomów uwodnienia, zależność liniowa pól powierzchni pod wykresami składowej mobilnej (składowa/e lorentzowska/ie) od sumy obu składowych o znacznym stopniu unieruchomienia (obu składowych gaussowskich) była liniowa, co oznacza brak rozpuszczania próbki, który byłby charakteryzowany przez nieliniową zależność hydratacyjną stosunku pól powierzchni.

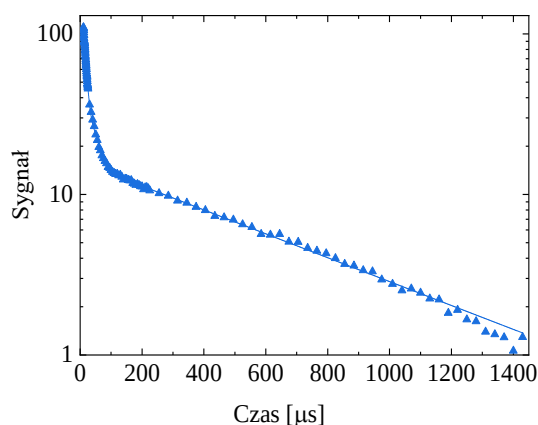
2.3. Wyniki pomiarów $^1\text{H-MRJ}$ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie

Dla próbek bozentanu mielonego bez dodatku polimeru (BS_M) oraz z 50 % dodatkiem kopowidonu (0,5BS) dopasowano, podobnie jak dla próbek z tadalofilem, superpozycję dwóch funkcji Gaussa i jednej eksponenty.

$$FID(t) = S_1 \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S1}^*}\right)^2\right) + S_2 \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S2}^*}\right)^2\right) + L \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L}^*}\right) \quad (68)$$

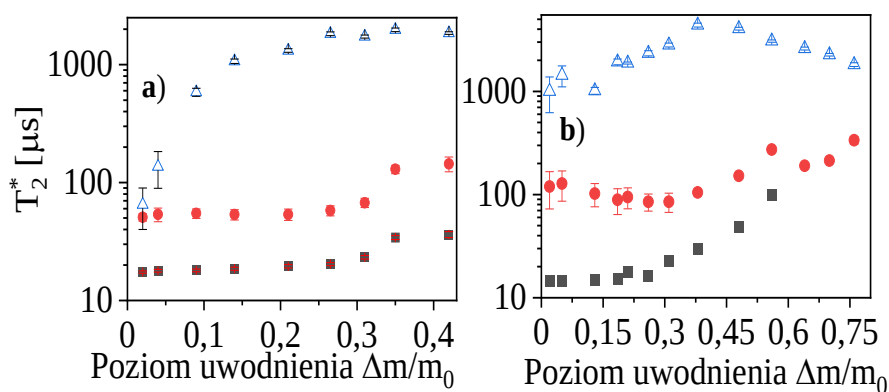
gdzie: S_i to amplituda danej frakcji stałej, L to amplituda frakcji mobilnej, natomiast T_{2x}^* to efektywne czasy relaksacji spinowo-spinowej dla poszczególnych frakcji sygnału.

Dla zobrazowania dopasowania takiej superpozycji, poniżej przedstawiono sygnał zaniku swobodnej precesji (ang. *FID* = *Free Induction Decay*) dla stałego rozproszenia bozentanu z kopowidonek wraz z dopasowaną funkcją (Rys IV.18).



Rysunek IV.18. Sygnał ^1H -NMR FID dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS) uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,09$ wraz z dopasowaniem.

Zestawienie wszystkich uzyskanych czasów relaksacji dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie oraz samego kopowidonu przedstawiono na Rys. IV.19.



Rysunek IV.19. Czasy relaksacji T_2^* ^1H -MRJ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS) (a) i kopowidonu (b).

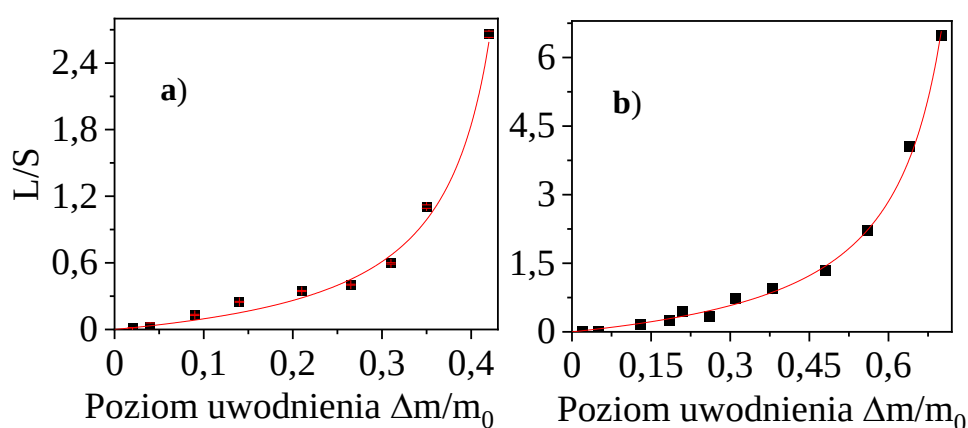
Wyniki uzyskane dla próbki mielonego bozentanu nie odzwierciedlały jego hydratacji prezentowanej w trasach. Jedynie dla próbek na poziomie uwodnienia 0,02, 0,04 i 0,06 stwierdzono

wiązanie się z drobinami wody osadzonymi na wewnętrznych ściankach próbówki w trakcie próby hydratowania próbki w wilgotności 100%.

Tabela IV-6. Czasy relaksacji T_2^* 1H-MRJ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie, bozentanu mielonego i kopowidonu.

Próbka	Czas T_2^* I Gauss	Czas T_2^* II Gauss	Czas T_2^* I eksponenta
BS_M	25 – 33	57 – 85	2050 – 2616
0,5BS	17 – 36	51 – 144	1000 – 4392
kopowidon	14 – 98	85 – 335	65 – 1973

Na podstawie zakresów czasów relaksacji T_2^* podanych w Tab. IV-6 oraz wartości czasów relaksacji T_2^* przedstawionych na Rys. IV.19 można zauważyć skrócenie czasu relaksacji matrycy stałej w stałym rozproszeniu, które zawiera hydrofilowy polimer. Z kolei, druga składowa stała ulega wydłużeniu prawdopodobnie w związku z rozpuszczaniem się próbki (hydrofilowego polimeru) zachodzącym w wysokich uwodnieniach. Widoczne to jest na Rysunku IV.19b dla kopowidonu analizowanego bez dodatku bozentanu, w którym obserwujemy wręcz zanik pierwszej składowej związanej z matrycą polimerową. Można wnioskować, że całość objętości próbki stałej zmieniała stan skupienia - powstawała gęsta ciecz (lub hydrożel).



Rysunek IV.20. Zależność hydratacyjna stosunku amplitud sygnałów swobodnej precesji ^1H -NMR, L/S , dla stałego rozproszenia (0,5BS) bozentanu w kopowidonie (a) i kopowidonu (b).

Zarówno dla stałego rozproszenia jak i dla samego polimeru zaobserwowano nieliniowy przebieg zależności hydratacyjnej, L/S , dobrze opisany jest funkcją wymierną (Rys. IV.20):

$$L/S = k \frac{(1 + \frac{\gamma}{\delta} * \frac{C_S}{1 - C_S}) \frac{\Delta m}{m_0}}{1 - \frac{\gamma}{\delta} * \frac{C_S}{1 - C_S} * \frac{\Delta m}{m_0}}, \quad (69)$$

gdzie: $k = \frac{\alpha_L \rho_L}{\alpha_S \rho_S}$, $\gamma = \frac{\rho_c}{\rho_{H_2O}}$, $\delta = \frac{\rho_s}{\rho_{H_2O}}$.

Nie udało się wyodrębnić oddzielnego sygnału od wody ściśle związanej, co wykluczyły określenie zależności L_1/L i zastosowanie wzoru (50).

Tabela IV-7. Parametry funkcji wymiernej dopasowanej do zależności hydratacyjnej sygnału $^1\text{H-NMR}$ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidoniem oraz kopowidonu.

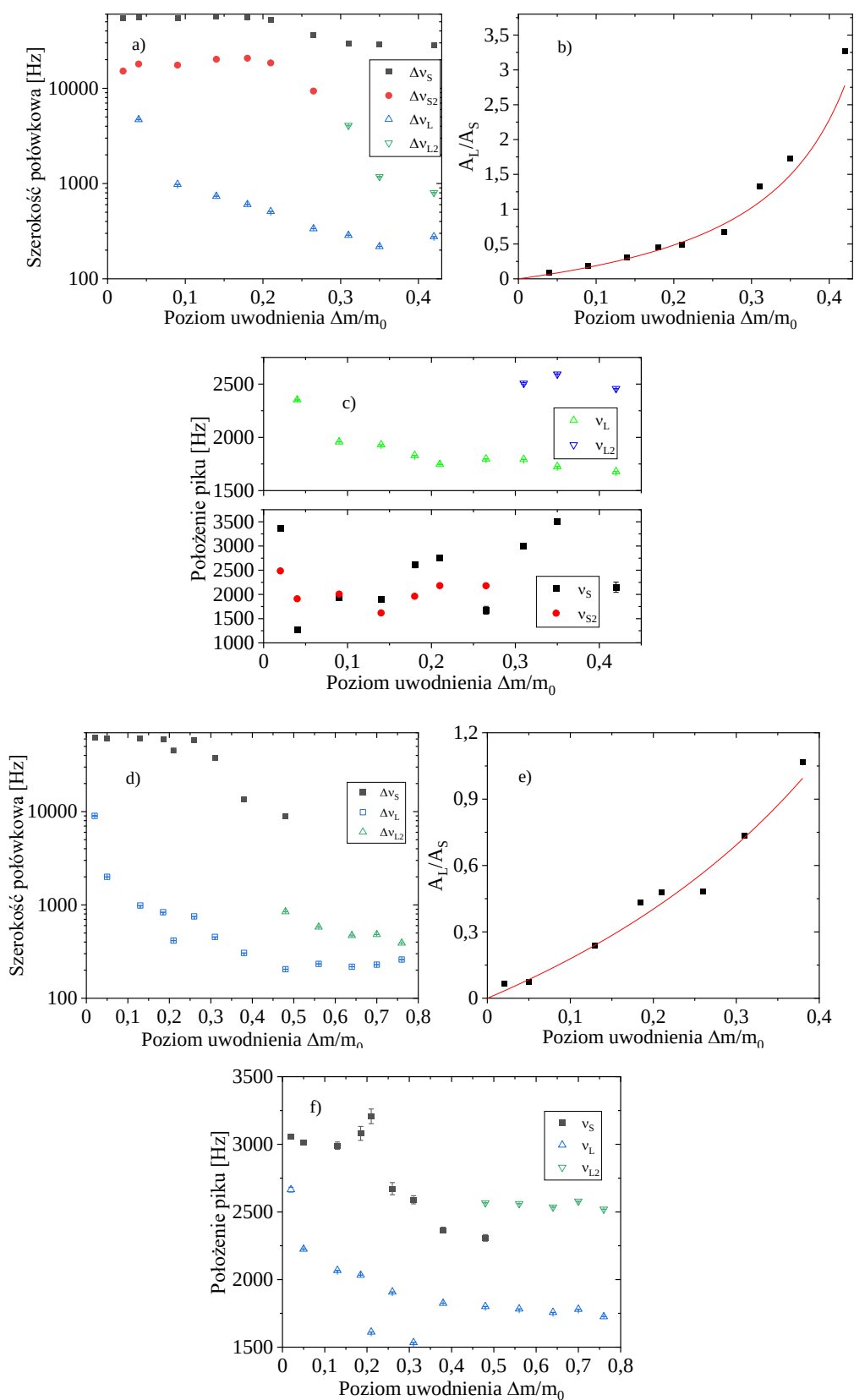
Parametr	0,5BS	kopowidon
k	$0,25 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,04$
γ	$0,68 \pm 0,01$	$0,68 \pm 0,01$
C_s	$0,59 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,01$
δ	$0,47 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$

Na podstawie parametrów uzyskanych dla stałego rozproszenia, udało się określić parametr C_s o wartości odpowiadającej stosunkowi masowemu składników w próbce (w granicy błędu).

Widma $^1\text{H-NMR}$ stałych rozproszeń bozentanu w kopowidonie, zarejestrowane w domenie częstotliwości, opisano jako superpozycje dwóch funkcji Gaussa (wzór 45) dla frakcji stałej (S) oraz jednej funkcji Lorentza (wzór 44) dla frakcji ciekłej (L) podobnie jak w stałych rozproszeniach tadalafilu. W zależności od próbki i uwodnienia funkcja dopasowana była kombinacją jak np. przedstawiona poniżej we wzorze 70:

$$G(\nu) = \frac{A_{S1}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_{S1}} \exp \left[-2 * \left(\frac{\nu - \nu_{S1}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_{S1}} \right)^2 \right] + \frac{A_{S2}}{\sqrt{\pi \ln 2} \Delta \nu_{S2}} \exp \left[-2 * \left(\frac{\nu - \nu_{S2}}{\sqrt{2 \ln 2} \Delta \nu_{S2}} \right)^2 \right] + \frac{2A_{L1}}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_{L1}}{4 * (\nu - \nu_{L1})^2 + \Delta \nu_{L1}^2} \right] + \frac{2A_{L2}}{\pi} \left[\frac{\Delta \nu_{L2}}{4 * (\nu - \nu_{L2})^2 + \Delta \nu_{L2}^2} \right]. \quad (70)$$

Natomiast dla próbki samego polimeru nie udało się dopasować drugiej funkcji Gaussa dla uzyskanych wyników.



Rysunek IV.21. Zależność szerokości połówkowej linii ^1H -NMR, położenia pików oraz stosunku pól powierzchni pod wykresami od poziomu uwodnienia dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (a-c) oraz kopowidonu (d-f)

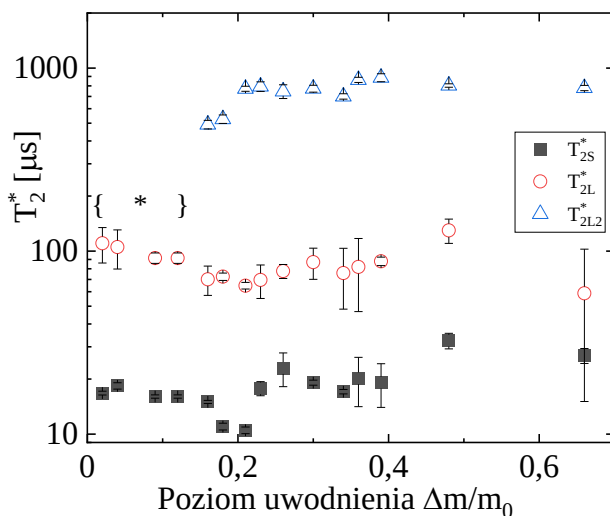
Na podstawie zależności hydratacyjnych przedstawionych na Rysunkach IV.21a oraz IV.21d można zaobserwować zwężanie się szerokości połówkowych frakcji stałej i ciekłej wraz z rosnącym poziomem uwodnienia. Dla pierwszej (o większej szerokości połówkowej) funkcji Gaussa różnica między szerokościami połówkowymi jest już widoczna dla próbek suchych, gdzie dla mieszaniny jest ona na poziomie $\Delta\nu_S \approx 55$ kHz natomiast dla kopowidonu, podobnie jak dla Soluplusa jest ona na poziomie $\Delta\nu_S \approx 65$ kHz. Pierwsza funkcja Gaussa w obu przypadkach ulega zwężeniu dla stałego rozproszenia 0,5BS od $\Delta\nu_S \approx 55$ do 28 kHz. Natomiast jedyna składowa stała obecna dla polimeru, w odróżnieniu od wyników z domeny czasu, zanika dla uwodnień powyżej 0,48 od $\Delta\nu_S \approx 62$ do 8,9 kHz. Druga funkcja Gaussa, w odróżnieniu od stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus (0,1TD i 0,5TD), jest widoczna tylko w stałym rozproszeniu bozentanu w kopowidonie (0,5BS), gdzie obserwujemy zwężanie się linii dopasowanej funkcją Gaussa od $\Delta\nu_S \approx 20$ do 9,35 kHz oraz już dla $\Delta m/m_0 > 0,05$ zanik drugiej składowej od protonów o ograniczonej mobilności.

Dla badanych próbek powyżej poziomu uwodnienia 0,3 dla 0,5BS i 0,48 dla kopowidonu dopasowana została druga funkcja Lorentza. Jednak w przypadku mieszaniny, jej dopasowanie jest połączone z zanikiem drugiej składowej stałej. Natomiast w próbce kopowidonu obserwujemy wtedy zanik składowej stałej. Obie szerokości połówkowe funkcji Lorentza dla badanych próbek zachowują się jednak podobnie, przyjmując wartości od $\Delta\nu_L \approx 9$ kHz do wąskich pików 0,2 kHz. W odróżnieniu od próbek wcześniej badanego stałego rozproszenia tadalafilu, oba piki obecne dla wysokich uwodnień opisywane funkcją Lorentza są dostatecznie rozdzielone w odległości ok. 800 Hz (Rys. IV.21c i f). Dodatkowo położenie pików frakcji stałej jest stabilne w porównaniu do wcześniej uzyskanych wyników dla stałych rozproszeń tadalafilu, co może sugerować występującą zmianę fazy stałej w ciekłą, gdzie dla tadalafilu może to sugerować reorganizację struktury.

Potwierdzeniem tej zbieżności może być skuteczne dopasowanie funkcji wymiernej także w przypadku stosunku pól powierzchni pod wykresami, podobnie jak to było dla wyników uzyskanych w domenie czasu. Dodatkowym aspektem, który może mieć wpływ na tę zależność jest rekrytalizacja bozentanu pod wpływem plastyfikującego działania zaadsorbowanej wody w stałym rozproszeniu o poziomie uwodnienia powyżej 0,3 widoczna na Rys. 9.11a jako zwężenie drugiej składowej Gaussa, a wreszcie przejście w składową Lorentzowską. Efekt ten nie był widoczny dla eksperymentu w domenie czasu. Stosunek pól powierzchni pod wykresami dla obydwu próbek jest opisywany funkcją wymierną, podobnie jak dla wyników dla domeny czasu wartości, gdzie $C_S \approx 0,56$ dla stałego rozproszenia i 0,47 dla kopowidonu.

2.4. Wyniki pomiarów ^1H -NMR dla próbek *Niebla tigrina*

Inaczej, niż w przypadku substancji farmaceutycznych, zachowuje się czas relaksacji T_2^* , dla wody adsorbowanej w plesze *N. tigrina* i odpowiedź od tejże matrycy stałej.



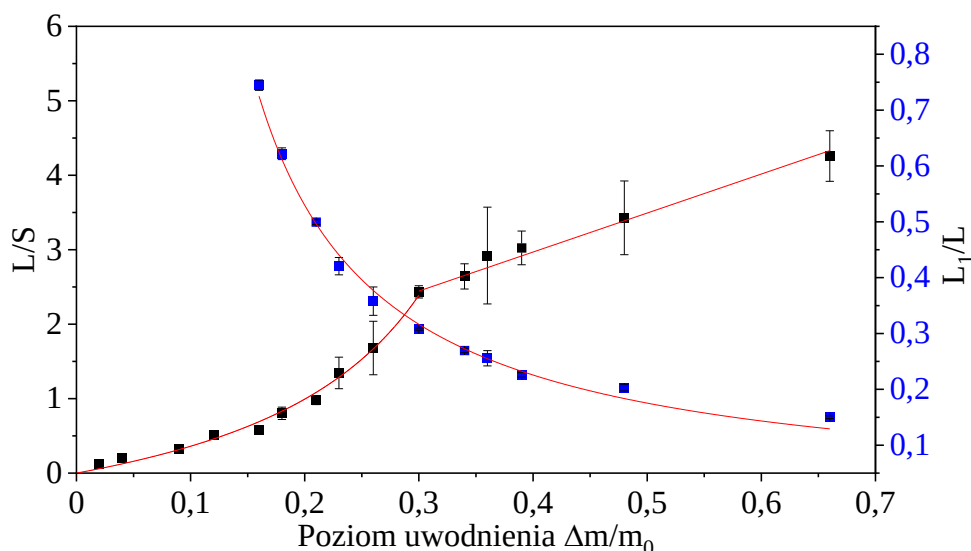
Rysunek IV.22. Zależność hydratacyjna czasów relaksacji T_2^* ^1H -MRJ dla próbki *Niebla tigrina* [50].

Dla najniższych poziomów uwodnienia ($\Delta m/m_0 < 0,18$) nie udało się wyodrębnić sygnału pochodzącego od wody luźno związanej. Funkcja relaksacji jest dopasowana superpozycją jednej funkcji Gaussa i dwiema funkcjami eksponencjalnymi:

$$FID(t) = S \cdot \exp\left(-\left(\frac{t}{T_{2S1}^*}\right)^2\right) + L_1 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L1}^*}\right) + L_2 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T_{2L2}^*}\right) \quad (70)$$

z których krótsza jest w zakresie zmienności równie skutecznie opisywanych funkcją Gaussa jak i Lorentza, jednak w odróżnieniu od próbek farmaceutycznych, gdzie dopasowano drugą składową Gaussa w pomiarach w domenie częstotliwości, dla *N. tigrina* podobnie jak w przypadku innych grzybów zlichenizowanych [53, 68] dopasowano drugą funkcję eksponencjalną. Na podstawie czasów przedstawionych na Rys. IV.22 zakresy czasów relaksacji wahają się od 10,5 do 32,4 μs dla pierwszej frakcji matrycy stałej, od 58,7 do 129 μs dla frakcji wody ściśle związanej, natomiast dla drugiej frakcji ciekłej od 91,6 do 887 μs , pomimo wysokich poziomów uwodnień, jakie uzyskano dla próbki.

Jeszcze ciekawsza sytuacja ma miejsce dla próbki *Niebla tigrina* dla zależności hydratacyjnej stosunku amplitud sygnałów pochodzących od frakcji ciekłej i stałej. Zostało to przedstawione na Rys. IV.23. Pochodzenie składowej o pośrednim czasie relaksacji jest zupełnie inne. Pochodzi ona od wody ściśle związanej w plesze i skutecznie została dopasowana funkcją eksponencjalną.



Rysunek IV.23. Zależność hydratacyjna stosunku sygnałów L/S i L_1/L ^1H -MRJ obserwowanego w domenie czasu dla próbek *Niebla tigrina*.

Dla plechy *Niebla tigrina* zależność hydratacyjna amplitudy sygnału pochodzącego od protonów mobilnych wyrażonego w jednostkach sygnału od protonów unieruchomionych, L/S , jest dwuetapowa (Rys. IV.23). Dla poziomów hydratacji mniejszych od $\Delta M/m_0 = 0,3$ opisywana jest funkcją wymierną, a następnie dla wyższych poziomów uwodnienia funkcją liniową z parametrami opisanymi w zamieszczonej poniżej Tabeli IV-8. Ponieważ w funkcji swobodnej precesji udało się wyodrębnić sygnał pochodzący od wody ściśle związanej, możliwe było wyznaczenie zależności L_1/L opisanej wzorem 71:

$$\frac{L_1}{L} = \frac{m_1}{m_1 + 1 + (\gamma^* \frac{C_S}{1 - C_S}) * \Delta m} , \quad (71)$$

gdzie m_1 opisuje frakcję wody związanej z frakcją rozpuszczalną.

Tabela IV-8. Parametry dopasowania funkcji wymiernej, oraz funkcji liniowej amplitudy składowej sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, wyrażonej w jednostkach sygnału ^1H -NMR pochodzącego od protonów o znacznym stopniu unieruchomienia, L/S i L_1/L , dla *Niebla tigrina*.

L/S f. wymierna	L/S f. liniowa	L_1/L
$k = 1,71 \pm 0,12$		$\Delta M/m_0 = 0,13 \pm 0,01$
$\gamma = 0,59 \pm 0,02$	$A = 5,24 \pm 0,27$	$\gamma = 0,59 \pm 0,01$
$C_S = 0,526 \pm 0,044$	$B = 0,87 \pm 0,09$	$C_S = 0,526 \pm 0,032$
$\delta = 0,305 \pm 0,017$		
$\Delta M_C = 0,333 \pm 0,001$		

Na podstawie Rys. IV.23 możemy określić, że poziom uwodnienia w którym stwierdzono zanik funkcji wymiernej (nastąpiło rozpuszczenie całej frakcji rozpuszczalnej). Dzięki zastosowaniu obu zależności (wzory 69 i 71) jednoznacznie udało się wyznaczyć stężenie nasyceniowe równe $C_S = 0,526$.

Pozwala to wyliczyć całkowitą masę frakcji stałej, rozpuszczalnej we wodzie, $\Delta M_c/m_0$, według wzoru [69]:

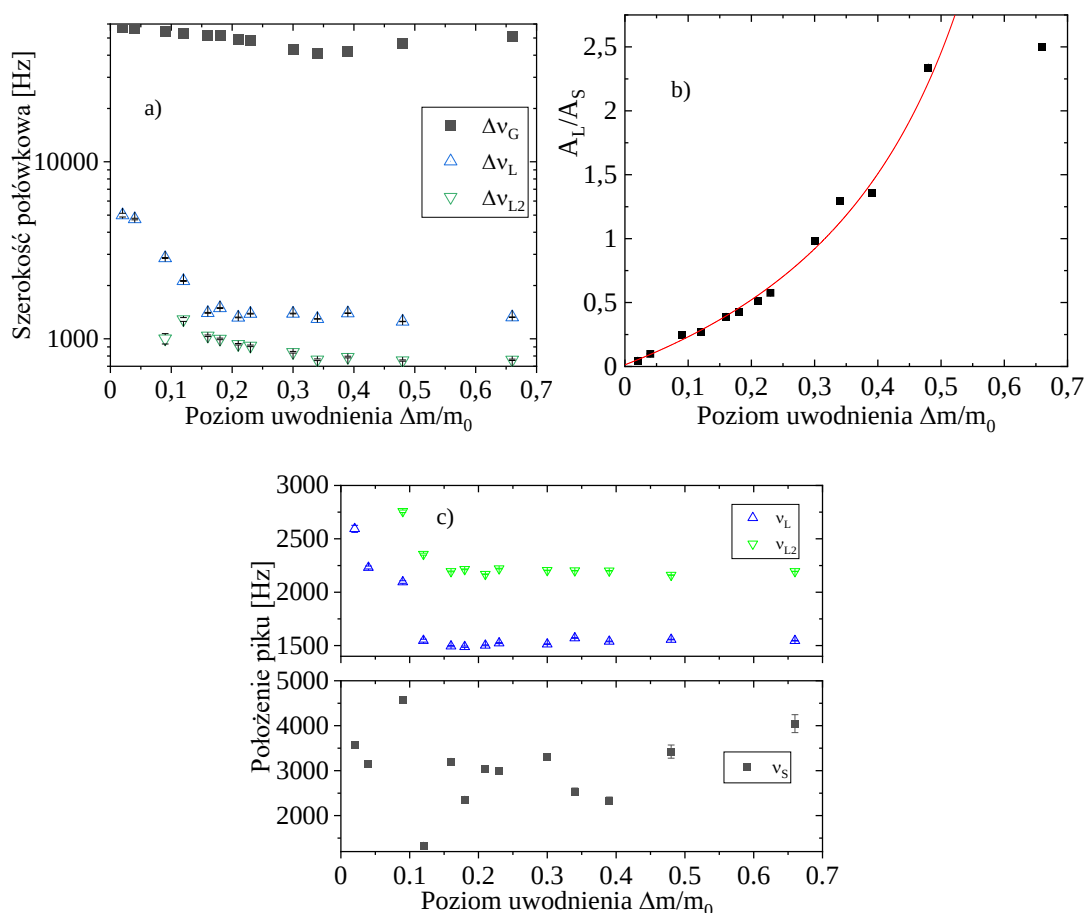
$$\Delta M_c = \frac{C_S}{1-C_S} \Delta M \quad (72)$$

Jeśli poziom uwodnienia, dla którego rozpuszczona została cała frakcja stała rozpuszczalna we wodzie wynosi $\Delta M/m_0 = 0,3$, to całkowita masa frakcji stałej rozpuszczalnej we wodzie w plesze *Niebla tigrina* wynosi $\Delta M_c/m_0 = 0,333$ (wzór 72). Dotąd dla żadnego gatunku antarktycznych grzybów zlichenizowanych nie udało się wyznaczyć analogicznej wartości granicznej.

W celu porównania zachowania śladowych ilości wody w układzie mikroheterogennym o zupełnie innym rodzaju niejednorodności, podobnie jak dla domeny czasu, także dla domeny częstotliwości wykonano pomiary dla organizmu anhydrobiotycznego, plechy *N. tigrina*.

Dla porostu *N. tigrina* dopasowano superpozycje funkcji identyczną, jak w przypadku polimeru kopowidon z tą różnicą, że dla badanego organizmu drugą funkcję Lorentza (73) udało się dopasować już dla bardzo niskich poziomów uwodnienia, a jej pojawienie nie powodowało zaniku funkcji Gaussa opisującej frakcję stałą.

$$G(v) = \frac{A_{S1}}{\sqrt{\pi \ln 2 \Delta v_{S1}}} \exp \left[-2 * \left(\frac{v - v_{S1}}{\sqrt{2 \ln 2 \Delta v_{S1}}} \right)^2 \right] + \frac{2A_{L1}}{\pi} \left[\frac{\Delta v_{L1}}{4 * (v - v_{L1})^2 + \Delta v_{L1}^2} \right] + \frac{2A_{L2}}{\pi} \left[\frac{\Delta v_{L2}}{4 * (v - v_{L2})^2 + \Delta v_{L2}^2} \right] \quad (73)$$

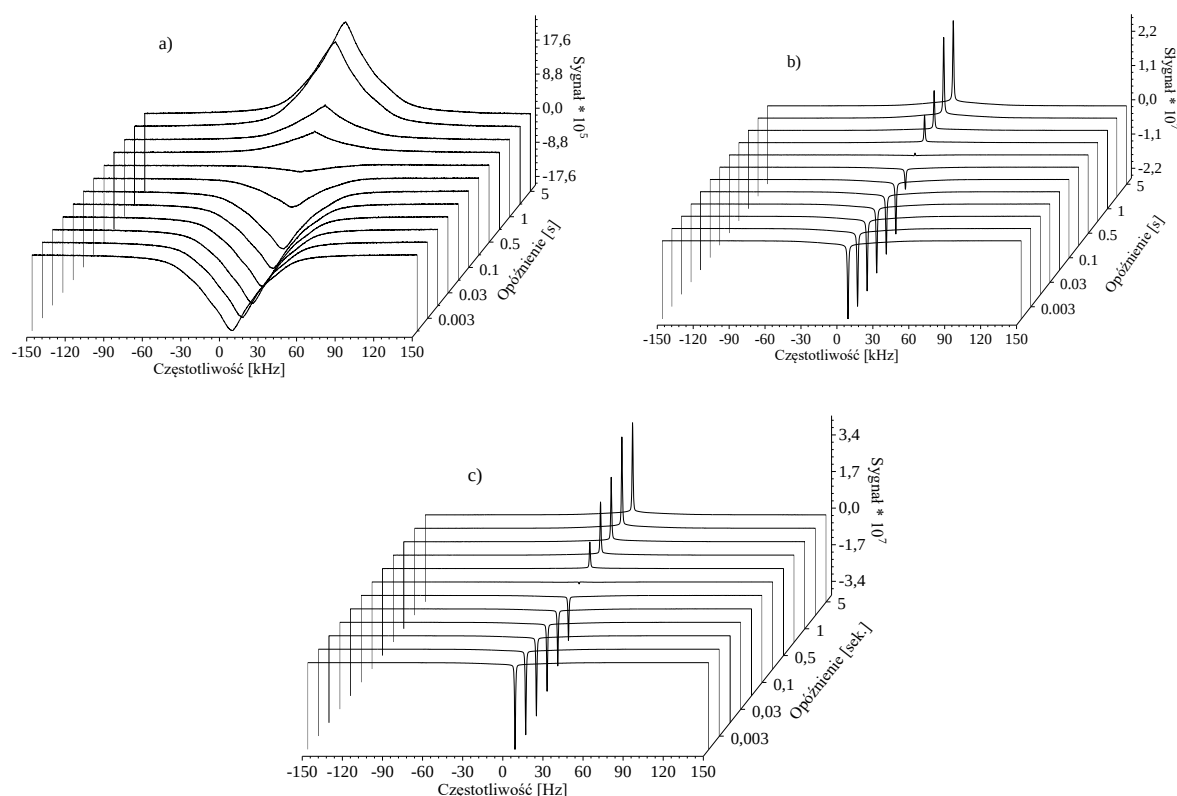


Rysunek IV.24. Zależności szerokości połówkowej linii ^1H -NMR (a), stosunku pól powierzchni pod wykresami (b) oraz położenia pików (c) od uwodnienia dla *Niebla tigrina*.

Funkcja Gaussa zaś charakteryzuje się utrzymaniem szerokości połówkowej w przedziale między 40 – 55kHz. Pomimo niewidocznego optycznie rozdzielania pików Lorentza do próbki udało się dopasować dwie funkcje Lorentza. Przesunięcie chemiczne wynosiło około 700 Hz i było podobne jak to wyznaczone dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (Rys. IV.24c). Różnica jednak między badanymi układami farmaceutycznym a organizmem anhydrobiotycznym jest widoczna w wartości szerokości połówkowej $\Delta v_{L1} \approx 1050$ Hz i $\Delta v_{L2} \approx 800$ Hz (Rys. IV.24a), która jest o ok. 5-krotnie większa niż dla próbki farmaceutycznej. Podobnie jak w przypadku domeny czasu stosunek pól pod powierzchnią funkcji jest opisywany funkcją wymierną, dla której parametry $C_S = 0,53 \pm 0,04$ i $\gamma = 0,59 \pm 0,02$. Różnica jednak jest związana z zakresem funkcji wymiernej, który dla wyników spektroskopowych obejmuje niemal cały mierzony zakres, gdzie w domenie czasu fragment był opisywany funkcją liniową.

3. Relaksacja spinowo-sieciowa protonów w zależności od temperatury dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (0,5TD)

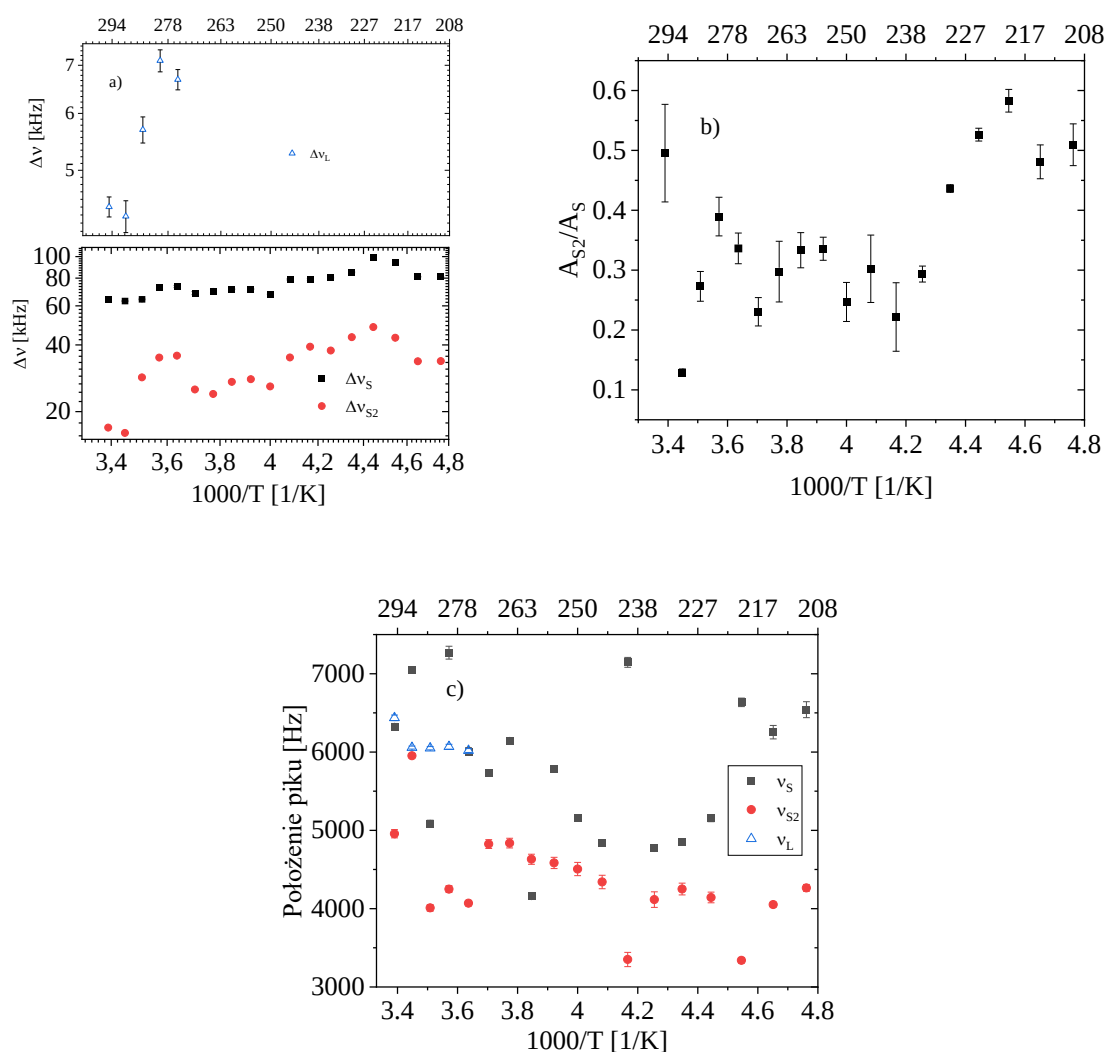
W stałych rozproszeniach tadalafilu w Soluplus® wyodrębniono sygnał od dwóch rodzajów ciała stałego, jeden o szerokości połówkowej rzędu 60 kHz, a drugi o szerokości połówkowej 10 kHz. Nie można skorelować ich z proporcją tadalafilu do Soluplusa w układzie, gdyż występują także oddzielnie w poszczególnych składnikach. Brak wyraźnych efektów rozpuszczania, sugeruje ograniczone oddziaływanie obu składników. Anomalne zachowanie tak przygotowanego stałego rozproszenia, skłoniło do starannej analizy zachowania obu sygnałów dla obniżonej temperatury, a także zbadania osiąganego stopnia przechłodzenia śladowej wody związanej w stałym rozproszeniu tadalafilu w Soluplus®. Pomiary spektroskopii relaksacyjnej wykonano na przykładzie stałego rozproszenia o 50% zawartości tadalafilu (0,5TD) przygotowanego podczas mielenia z prędkością obrotową 200 obr./min przez 240 min (Część III). Wyniki uzyskano dla trzech próbek ze spektrum poziomu uwodnienia (suchej oraz uwodnionych do 15% i 30%). Poniżej zestawiono widma spektroskopii relaksacyjnej wykonane w temperaturze 275K dla trzech badanych uwodnień:



Rysunek IV.25. Widma spektroskopii relaksacyjnej stałych rozprożeń o 50% zawartości tadalafilu (0,5TD) i o poziomie uwodnienia (a) $\Delta m/m_0 = 0$, (b) $\Delta m/m_0 = 0,15$, (c) $\Delta m/m_0 = 0,3$; rejestrowane w temperaturze 275 K.

Na podstawie uzyskanych widm, do których dopasowywano superpozycję dwóch funkcji Gaussa i jednej funkcji Lorentza, dla każdej temperatury, wyznaczono czasy T_1 dla każdej spośród wyodrębnionych frakcji (wzór 67), a następnie wyznaczono zależność temperaturową dla każdej próbki, które przedstawiono poniżej.

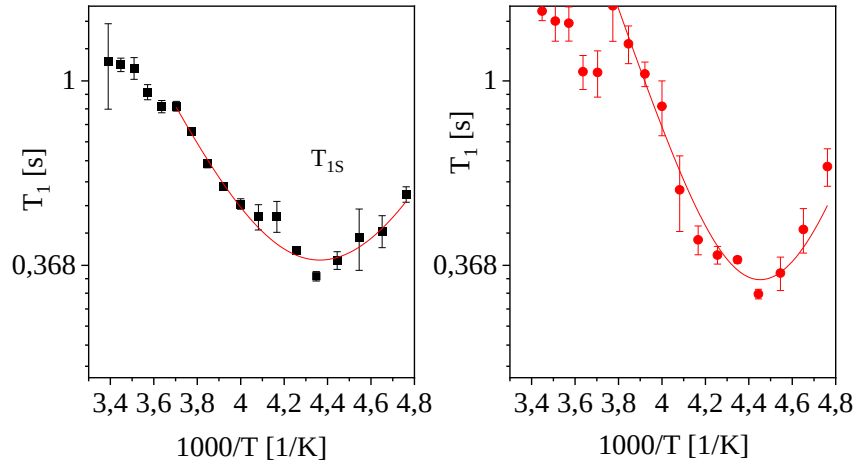
3.1. Wyniki spektroskopii relaksacyjnej dla stałego rozproszenia powietrznie suchego ($\Delta m/m_0 = 0$)



Rysunek IV.26. Wykresy zależności szerokości połówkowej (a), stosunku pól powierzchni frakcji stałej (b), oraz położenia pików (c) ^1H -NMR od temperatury dla suchego stałego rozproszenia 0,5TD.

Na podstawie superpozycji dwóch funkcji Gaussa i jednej funkcji Lorentza wyznaczono trzy frakcje składowe w próbce. Dla pierwszej składowej stałej, wartość ta waha się od 65 kHz do 100 kHz.

Szerokość połówkowa linii pochodzącej od drugiej składowej narasta od 18 do 40 kHz dla temperatury obniżanej od 295 K do 210 K. Natomiast składową odpowiadającą śladowym ilościom wody, co sugeruje jej szerokość połówkowa w suchej próbce, mierzono do temperatury 275K. Stosunek pól powierzchni w zależności od temperatury jest na poziomie $A_{S2}/A_S = 0,3 \pm 0,1$ i wzrasta podwójnie poniżej 235 K. Na podstawie pól powierzchni, sporządzono wykresy odrostu magnetyzacji dla każdej frakcji, określając w ten sposób czas relaksacji podłużnej, której zależność od temperatury przedstawiono na Rysunku IV.28.



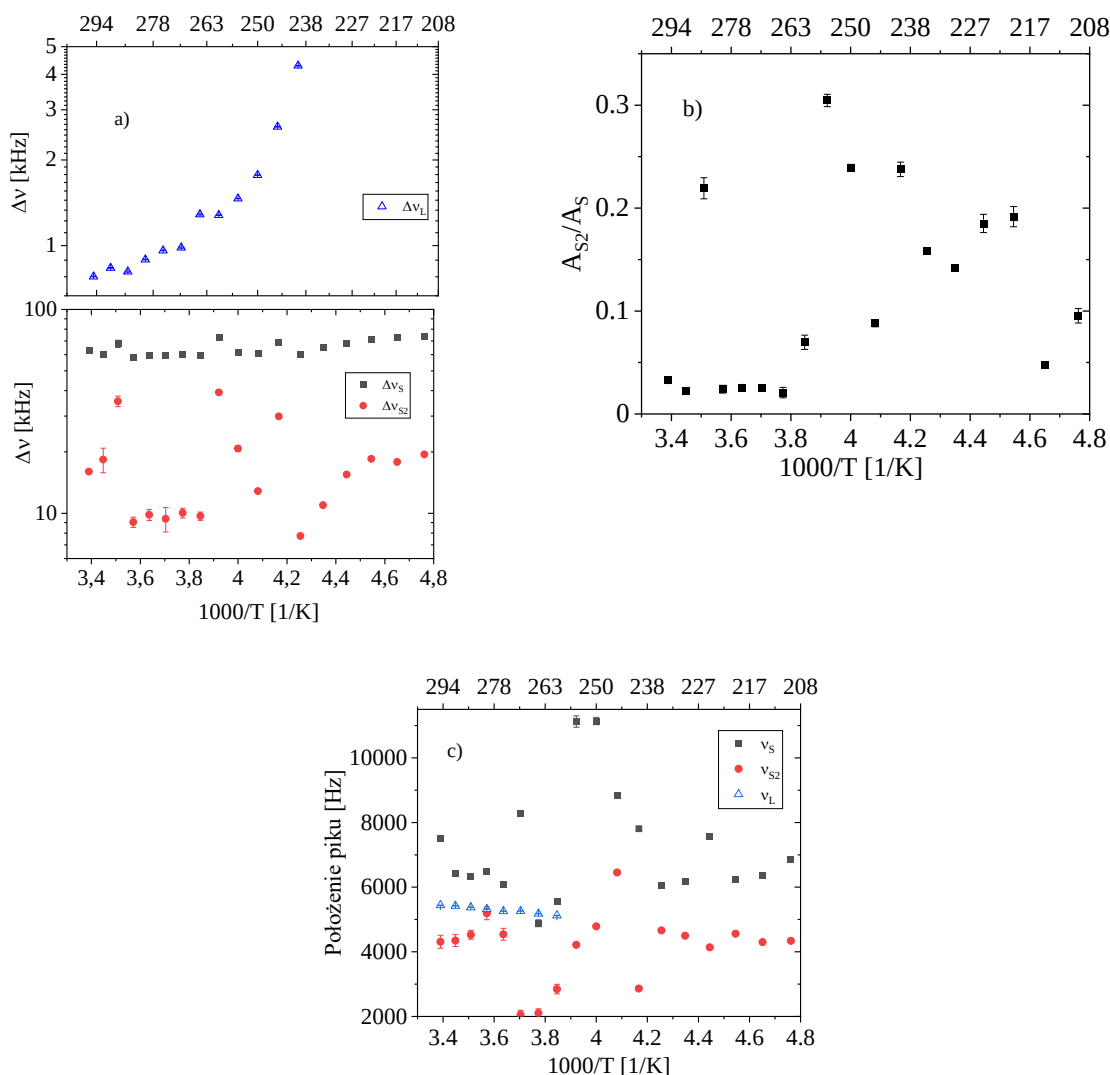
Rysunek IV.27. Zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 od temperatury dla obu składowych stałych magnetyzacji suchego stałego rozproszenia 0,5TD ($\Delta m/m_0 = 0$).

Dla uzyskanych zależności czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów w funkcji temperatury dopasowano zmodyfikowany model BPP [model Bloembergena, Purcella i Pounda] (wzór 74) w celu wyznaczenia energii aktywacji, średniej odległości między spinami, oraz temperatury minimum czasu relaksacji.

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^4 \hbar^2}{r^6} \left(\frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} \right) \quad (74)$$

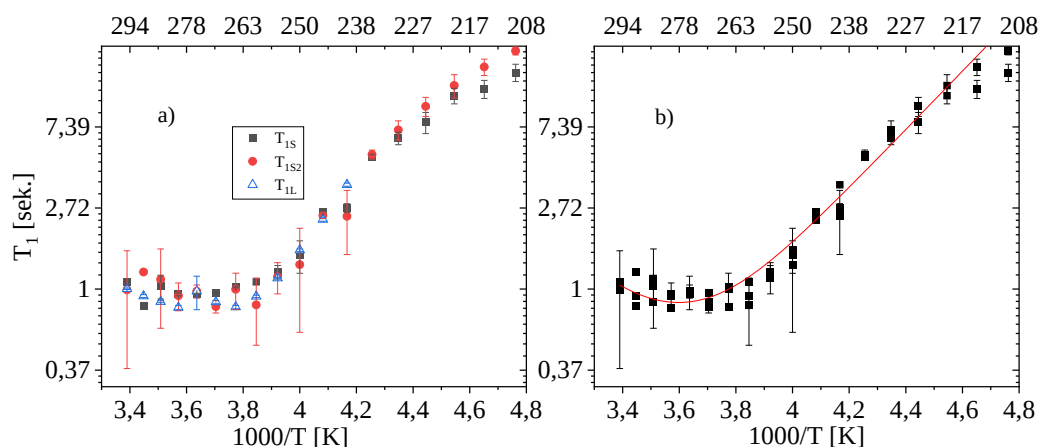
Dla obu składowych zaobserwowano skok czasu relaksacji powiązany z brakiem składowej ciekłej w dopasowaniu, tak więc model dopasowano od 265 K. Uzyskana z modelu wartość energii aktywacji ruchów molekularnych dla pierwszej składowej jest równa $E_S = 19,4 \pm 0,7$ kJ/mol, a odległość między parą relaksujących protonów $r_S = 1,91 \pm 0,02$ Å. Dla drugiej składowej wartość $E_S = 28,3 \pm 2,1$ kJ/mol i odległość między spinami równa się $r_S = 1,87 \pm 0,01$ Å. Minima wartości T_1 z modelu odpowiadają 230 dla pierwszej składowej z $\omega \cdot \tau_c \approx 1$, i 225 K a następnie dla drugiej składowej stałej z $\omega \cdot \tau_c \approx 1$.

3.2. Wyniki spektroskopii relaksacyjnej ^1H -NMR dla stałego rozproszenia tadafilu w Soluplus® uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,15$



Rysunek IV.28. Zależności szerokości połówkowej (a), stosunku pól powierzchni frakcji stałych (b), oraz położenia pików (c) widm ^1H -NMR od temperatury dla próbki ($\Delta m/m_0 = 0,15$) dla stałego rozproszenia 0,5TD.

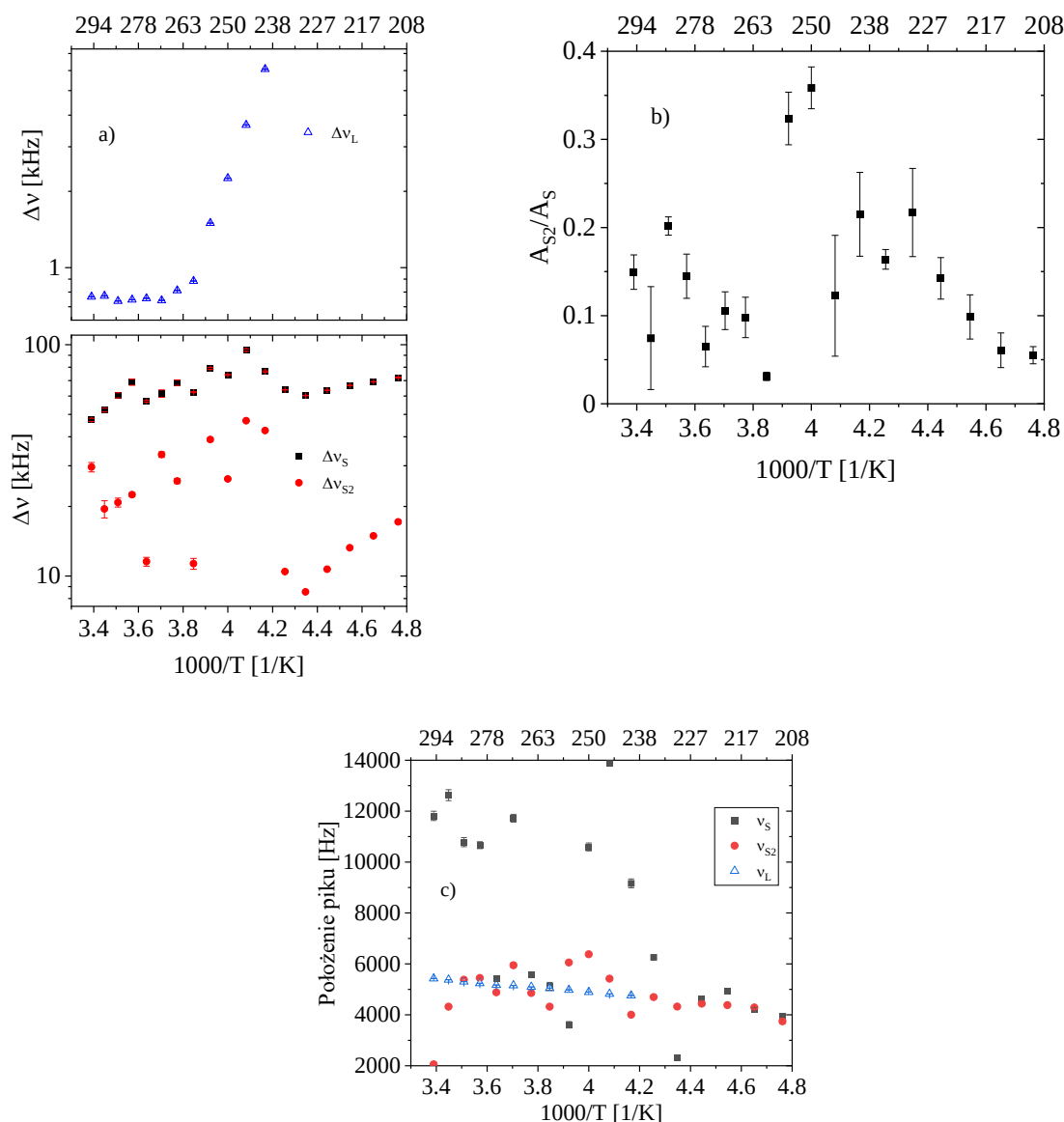
Dla stałego rozproszenia 0,5TD uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,15$ można zaobserwować przechłodzenie składowej ciekłej obserwowane przynajmniej do 260 K; gwałtowne poszerzenie linii do 240 K (T_{2L}) sygnalizuje raczej obecność stanu amorficznego. Stosunek pól powierzchni w zależności od temperatury jest na poziomie $A_{S2}/A_S = 0,15 \pm 0,1$ z niską wartością w wysokich temperaturach i jest dwukrotnie mniejszy niż dla próbki suchej. Dodatkowo można zaobserwować większą chaotyczność położenia pików w porównaniu do próbki suchej.



Rysunek IV.29. Zależność od temperatury czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 ^1H -NMR dla obu składowych stałych magnetyzacji stałego rozproszenia 0,5TD uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,15$.

Na podstawie uzyskanych wartości czasów relaksacji widocznych na Rys. IV.30a stwierdzono reżim szybkiej wymiany spinowej, uśrednienie czasów relaksacji T_1 dla wszystkich frakcji łącznie z frakcją ciekłą, stąd w dopasowaniu modelu BPP wszystkie wartości ujęto w jednym dopasowaniu. Uzyskana z modelu wartość energii jest równa $E = 30 \pm 1$ kJ/mol i odległością między spinami równą $r = 2,18 \pm 0,03$ Å. W przypadku tej próbki minimum wartości uległo znacznemu przesunięciu i wynosi 278 K dla $\omega \cdot \tau_c \approx 1$.

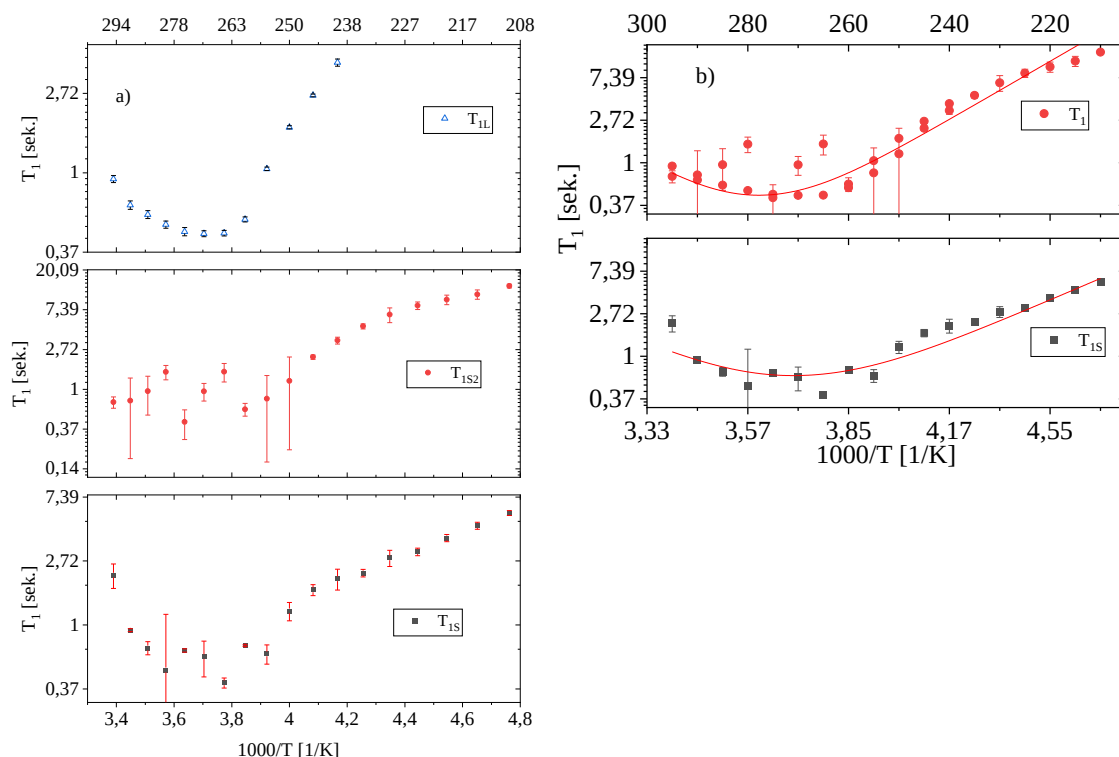
3.3. Wyniki spektroskopii relaksacyjnej ^1H -NMR dla stałego rozproszenia tadafilu w Soluplus® uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,30$



Rysunek IV.30. Zależności szerokości połówkowej (a), stosunku pól powierzchni frakcji stałej (b), oraz położenia pików (c) widm ^1H -NMR od temperatury dla próbki ($\Delta m/m_0 = 0,3$) 0,5TD.

Dla stałego rozproszenia 0,5TD uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,30$, szerokości połówkowe linii dopasowanej funkcją Lorentza zachowują się podobnie jak w przypadku próbki średnio uwodnionej dla frakcji ciekłej. Są one widoczne do temperatury -33°C , a już od temperatury -13°C linia zaczyna się poszerzać. Natomiast szerokości połówkowe składowych opisanych funkcjami Gaussowskimi zachowują się bardziej chaotycznie. Stabilizują się dla temperatur poniżej zaniku składowej ciekłej. Stosunek pól powierzchni w zależności od temperatury zachowuje się podobnie jak w przypadku próbki średnio uwodnionej, lecz charakteryzuje się większymi skokami wartości i błędami. Dodatkowo można

zaobserwować większą chaotyczność położenia pików pierwszej frakcji stałej w stosunku do próbki suchej. Natomiast druga oscyluje w pobliżu wartości składowej ciekłej zajmując jej miejsce po poszerzeniu się szerokości połówkowej funkcji Lorentza. Dodatkowo można zaobserwować przesuwanie się położenia wraz z temperaturą w kierunku zera. Efekt ten także był widoczny dla średnio uwodnionej próbki, lecz nie tak dokładnie.



Rysunek IV.31. Zależności temperaturowe czasów relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów (a - wszystkich frakcji, b – uśrednienia drugiego Gaussa i Lorentza) uwodnionego stałego rozproszenia 0,5TD.

Podobnie jak w przypadku średnio uwodnionego stałego rozproszenia, próbka znajduje się w reżimie szybkiej wymiany spinowej, gdyż czasy relaksacji spinowo-sieciowej T_1 składowych mają podobne wartości. Zebranie punktów do jednego dopasowania wykonano dla bardziej mobilnej składowej oraz składowej ciekłej. Uzyskana z modelu wartość energii aktywacji dla ruchów molekularnych jest równa $E_a = 24 \pm 1$ kJ/mol i odległością między spinami wynoszą $r_s = 2,10 \pm 0,02$ Å, oraz $E_a = 31 \pm 2$ kJ/mol i $r = 1,98 \pm 0,01$ Å dla składowej pośredniej. W przypadku tej próbki minimum wartości uległo przesunięciu i wynosi 285 K dla sumy frakcji z $\omega \cdot \tau_c \approx 1$, oraz 269 K dla składowej stałej z $\omega \cdot \tau_c \approx 1$.

V. Dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań dla trzech przykładowych układów z matrycami stałymi o różnych typach mikroheterogenności, analizowano zachowanie śladowej ilości wody adsorbowanej z pary wodnej. Badania wykonano dla próbek substancji leczniczych trudno rozpuszczalnych w wodzie, których połączenie z hydrofilowymi polimerami może zapewnić zwiększenie dostępności biologicznej, a tym samym poprawę bezpieczeństwa i skuteczności terapeutycznej. Dla porównania analizie poddano próbki porostu *Niebla tigrina*, reprezentującego organizmy przystosowane do przetrwania bez wody w otoczeniu, które z fazy gazowej łatwo adsorbują wodę.

Ocena kinetyki hydratacji z fazy gazowej, pozwoliła wyodrębnić trzy do czterech frakcji wody o różnym stopniu wiązania w próbce, jednakże metodami $^1\text{H-NMR}$ nie dało się ich wszystkich wyróżnić w pomiarach. Wynika to z faktu, że kinetyka hydratacji wyróżnia frakcje wody na podstawie siły ich wiązania do powierzchni, natomiast $^1\text{H-NMR}$ rozdziela podukłady sygnału różniące się dynamiką molekularną protonów. W próbkach stałych rozproszonych substancji leczniczych, dopasowano maksymalnie cztery frakcje wody. W układzie ulegającym hydratacji do niższego poziomu, czyli dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus®, jednoznacznie obecność czterech składowych wyznaczono jedynie dla próbki czystego polimeru – Soluplus®. Stwierdzono zależność między poziomem uwodnienia próbki, a zawartością hydrofobowej substancji leczniczej w stałym rozproszeniu. Poziom ten zmniejsza się w miarę zwiększania ilości substancji leczniczej [71]. W próbkach bozentanu zależność jest zbliżona, jak w przypadku tadalafilu. Monohydrat bozentanu wykazuje dodatkowo inne ciekawe zjawiska, a mianowicie w trakcie wykonywania tras hydratacyjnych, zaobserwowano hydratację zmielonego amorficznego bozentanu, czego nie obserwowano dla tadalafilu. Drugim aspektem jest znaczny wzrost nasyceniowego poziomu uwodnienia obserwowany dla próbek uwadnianych w wilgotności względnej $p/p_0 = 88\%$ i wyższych. W próbkach *N. tigrina* dopasowano maksymalnie trzy frakcje wody związanej z bardzo dużą różnicą w poziomie uwodnienia między próbką hydratowaną w atmosferze o wilgotności względnej 100%, a resztą badanych próbek. Z tras hydratacyjnych wynika, że farmaceutyczne stałe rozproszenia charakteryzują się niższą wartością parametru $A_0 \approx 2\%$, czyli frakcją wody, która jest bardzo silnie związana z układem i nie jest usuwana podczas dehydratacji do fazy gazowej. Parametr ten jednak zmienia się w zależności od układu, a dla próbek zawierających tadalafil, jego wartość zmniejsza się wraz ze wzrostem ilości polimeru Soluplus, natomiast w przypadku bozentanu wartość ta rośnie do $A_0 \approx 7\%$, przewyższając wartość uzyskaną dla *N. tigrina*. Czasy hydratacji także zachowują się odmienne, a mianowicie mają wartości stałe dla stałych rozproszonych tadalafilu w Soluplus, natomiast zmieniają się w przypadku stałego rozproszenia bozentanu, tj. czas t_1^h wydłuża się, natomiast czas t_2^h jest krótszy. Dla porównania, *Niebla tigrina* charakteryzuje się podobnym czasem t_1^h (0,5h), jak próbki bozentanu bez dodatku polimeru, oraz dłuższym t_2^h (15h) niż bozentan (30 h) lub stałe rozproszenia tadalafilu (ok. 12h). Jednak wartość t_2^h dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidnie ulega znacznemu skróceniu do ok. 7h.

Wyniki uzyskane dla stałego rozproszenia bozentanu (Tab. IV-4) różnią się od wyników otrzymanych dla stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus (Tab. IV-2), jak również od wartości parametrów wyznaczonych dla porostu. Parametry modelu sorpcji GAB-Dent dla stałego rozproszenia bozentanu są podobne tych obliczonych dla stałych rozproszeń tadalafilu. Natomiast kopowidon stosowany w tych stałych rozproszeniach wykazuje wartość parametru $\Delta M/m_0$ zbliżoną do wartości uzyskanej dla *N. tigrina*. Duża różnica jest widoczna w parametrze $1/b_1$, który w większości próbek farmaceutycznych wynosi nie więcej niż 3%, z wyjątkiem polimeru Soluplus (14,3%), choć i jego wartość jest ponad dwukrotnie mniejsza od tej wyznaczonej dla *Niebla tigrina* (35%).

Analiza pomiarów relaksacyjnych $^1\text{H-NMR}$ w domenie czasu nie pozwoliła na wyodrębnienie w próbkach farmaceutycznych dwóch rodzajów wody, jak miało to miejsce w przypadku badanego porostu, *N. tigrina*, innych anhydrobiotycznych grzybach zlichenizowanych [73, 74] lub kompleksach DNA – surfaktant [2]. W próbkach farmaceutycznych, efektywny czas relaksacji spinowo-spinowej dla krótszej składowej relaksacyjnej ma wartości krótsze i z wyboru został dopasowany funkcją Gaussa, ponieważ w widmach wyodrębniono dwie składowe gaussowskie.

W próbkach substancji leczniczych składowa sygnału pochodząca od frakcji protonów unieruchomionych zachowuje się odmiennie od obserwowanej w innych skrajnie wysuszonych układach biologicznych, czy w organizmach anhydrobiotycznych [75]. Efektywny czas relaksacji spinowo-spinowej dla frakcji protonów unieruchomionych wyniósł $T_2^* \approx 13\text{--}28 \mu\text{s}$ dla próbek tadalafilu, jednak zwiększał się w miarę zwiększania zawartości substancji leczniczej. W przypadku stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie, czasy relaksacji są na podobnym poziomie jak dla substancji leczniczej bez dodatku polimeru, natomiast w stałym rozproszeniu ulegają znacznemu wydłużeniu do nawet $50 \mu\text{s}$, czy nawet $90 \mu\text{s}$ w wysokich uwodnieniach. Pod tym względem czas relaksacji tej składowej dla porostu mieści się w granicach $20\text{--}30 \mu\text{s}$. Czasy relaksacji T_2^* wyznaczone dla próbek farmaceutycznych są znacznie krótsze od wartości typowych dla suchych układów biologicznych, takich jak np. dehydratowany kompleks DNA-BA [2].

Zachowanie przesunięć chemicznych, jak i położeń pików w widmie $^1\text{H-NMR}$ jest odmienne dla każdego z badanych układów. W próbkach tadalafilu przesunięcie chemiczne między frakcjami ciekłymi zwiększa się do 400 Hz wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia. W próbkach bozentanu przesunięcie chemiczne wynosi 800 Hz i nie zmienia się pod wpływem uwodnienia. Natomiast dla plechy *Niebla tigrina*, przesunięcie chemiczne jest podobne jak w przypadku próbek bozentanu i utrzymuje się na poziomie ok. 700 Hz. Położenie pików frakcji stałej w próbkach bozentanu jest stabilne w przeciwieństwie do chaotycznego, stwierdzonego dla próbek tadalafilu. W odniesieniu do bozentanu może to wynikać z przemiany fazowej w układzie, podczas gdy dla tadalafilu może to sugerować reorganizację struktury związku.

W trakcie pomiarów tras hydratacyjnych próbek farmaceutycznych oraz pomiaru ^1H -MRJ zaobserwowano zmiany morfologiczne próbek opisane w Tabelach IV-1 i IV-3. W pomiarach zarówno relaksometrycznych, jak i w spektroskopii ^1H -MRJ, zależności L/S czy A_S/A_L w próbkach farmaceutycznych znacznie się różnią, gdyż pomimo podobnych zmian widocznych optycznie przy wyższych uwodnieniach dla próbek tadalafilu, te zależności są opisywane funkcjami liniowymi, natomiast w przypadku próbek 0,5BS i kopowidonu, są to funkcje wymierne sugerujące rozpuszczanie lub przemianę fazy z stałej w ciekłą. Podobne zachowanie zaobserwowano częściowo w próbce badanego organizmu, lecz tam proces ma inną naturę. Mianowicie zachodzi rozpuszczanie jednego ze składników struktury, obecnego w ograniczonej ilości. Dla wyższych poziomów uwodnienia, zależność jest już opisana funkcją liniową. Spowodowane może to być małą ilością rozpuszczalnych składników.

Pomiary spektroskopii relaksacyjnej uwodnionych stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus® pokazały, że układ znajduje się w reżimie szybkiej wymiany spinowej. Czasy relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla wody i dla matrycy stałej były identyczne. Czynnikiem odpowiedzialnym za relaksację protonów jest woda, gdyż dla próbki odwodnionej można mówić jedynie o reżimie wymiany pośredniej. Na podstawie wyników pomiarów spektroskopii relaksacyjnej stwierdzono, że wartości energii aktywacji odpowiadają wartościom energii wiązań wodorowych. W badanych próbkach energia aktywacji dla próbki suchej jest rozróżnialna na poziomie ok. 20 kJ dla pierwszej frakcji stałej i 30 kJ dla drugiej frakcji. Wraz z uwodnieniem energia ta ulega uśrednieniu do wyższej wartości. Wartość pierwszej składowej odpowiada wiązaniu O-H...O z matrycy stałej, natomiast większa wartość może odpowiadać wiązaniom O-H...N matrycy stałej lub modyfikacji wcześniejszego typu przez większą ilość molekuł wody lub wiązaniu między zaadsorbowanymi molekułami wody. Odległości między spinami zwiększają się w miarę zwiększania uwodnienia od ok. 1,9 Å do 2,1 Å. Sugeruje to występowanie wiązań z matrycą stałą, gdyż dla wiązań między molekułami wody byłyby one dłuższe (ok. 3 Å). Wyniki spektroskopii relaksacyjnej potwierdziły obecność wiązań wodorowych między grupami hydroksylowymi polimeru i karbonyłowymi tadalafilu, co jest komplementarne z wynikami analiz ATR FT-IR [71].

W badaniach spektroskopii relaksacyjnej widoczne są dwa trendy. Pierwszy dotyczy przesuwania się minimum zależności czasu T_1 w kierunku wyższych temperatur wraz z uwodnieniem. Drugi dotyczy zmiany położenia pików, a co za tym idzie, częstotliwości rezonansowej pików frakcji ciekłej wraz ze zmniejszaniem temperatury. Efekt ten jest tym lepiej widoczny im wyższe jest uwodnienie próbki.

Na podstawie przeprowadzonych badań, opracowanych wyników i ich dyskusji, sformułowano poniższe wnioski, które podsumowują najważniejsze zależności, dotyczące zachowania śladowych ilości wody w próbkach farmaceutycznych i organizmach anhydrobiotycznych.

VI. Wnioski

1. Analiza procesu hydratacji z fazy gazowej zarówno w proszkowych układach farmaceutycznych (stałych rozproszeniach), jak również w tkance organizmu żywego w fazie kryptobiozy, pozwoliły zidentyfikować i scharakteryzować frakcje wody wysycające się sekwencyjnie wraz z wydłużaniem czasu uwadniania, a pojawiające się w miarę zwiększania wilgotności względnej, p/p_0 , atmosfery.
2. Niezależnie od tego, czy w układzie mikroheterogennym jeden składnik zapuławkowany jest wewnątrz drugiego (fotobiont wewnątrz matrycy mykobionta), czy oba składniki są poddane procesowi technologicznemu (milenie), w nieobecności hydratacyjnego skokowego zwiększenia powierzchni dostępnej dla wody, kinetyka hydratacji z fazy gazowej ma zbliżony charakter.
3. Pomiar kinetyki hydratacji stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® pozwoliły wyróżnić cztery frakcje wody związanej były to: (a) frakcja A_0 ściśle związana do powierzchni matrycy stałej, (b) frakcja A_1 wody związana najprawdopodobniej do pierwotnych miejsc wiążących wodę, a charakteryzująca się krótkim średnim czasem hydratacji $t_1 = (0,33 \pm 0,08)\text{h}$, (c) frakcja A_2 o dłuższym czasie hydratacji t_2 od 10h do 12h, pojawiająca się dla wilgotności względnych powietrza przekraczających 52%, (d) frakcja A_3 przypisywana wodzie (swobodnej) o czasie t_3 powyżej 67 h.
4. W przypadku kinetyki hydratacji stałych rozproszeń bozentanu można wyróżnić cztery frakcje wody związanej: (a) frakcja A_0 ściśle związana do powierzchni matrycy stałej, (b) frakcja A_1 wody związana najprawdopodobniej do pierwotnych miejsc wiążących wodę, charakteryzująca się krótkim średnim czasem hydratacji $t_1 = (0,52 \pm 0,14)\text{h}$ dla BS_M oraz 1h w granicy błędu dla 0,5BS i kopowidonu, (c) frakcja A_2 o dłuższym czasie hydratacji t_2 od $(30 \pm 5)\text{h}$ dla mielonego bozentanu i wynosząca w granicy błędu 7h dla stałego rozproszenia i kopowidonu, (d) frakcja A_3 przypisywana wodzie (swobodnej) o czasie t_3 powyżej 62 h, nieobecna dla BS_M.
5. Dla wszystkich badanych układów dobrym dopasowaniem dla sygnału zaniku swobodnej precesji $^1\text{H-NMR}$ jest superpozycja funkcji Gaussa i eksponenty, oraz funkcji dla wartości około 100 μs i dłuższych dopasowywanej funkcją eksponencjalną, a znacznie krótszych od 100 μs opisanej funkcją Gaussowską.
6. Relaksometria, jak i spektroskopia $^1\text{H-NMR}$ pozwala zaobserwować śladowe ilości wody zapuławkowanej na poziomie uwodnienia 1 lub 2% $\Delta m/m_0$.
7. Zależność temperaturowa czasów relaksacji spinowo-sieciowej dla odwodnionego stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus wskazuje na reżim pośredniej wymiany spinowej (dwie różne składowe ciała stałego) i w obu przypadkach skutecznie opisywana jest modelem Bloembergen-Purcell-Pound (BPP) z minimum wartości T_1 dla 230 K.
8. Uwodnienie stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® zmienia charakter wymiany spinowej do reżimu szybkiej wymiany. Dowodzi to, że woda jest medium w znacznym stopniu odpowiedzialnym za efektywność procesu relaksacji spinowo-sieciowej.
9. Wyznaczona na podstawie modelu BPP (modelu Bloembergena, Purcella i Pounda) energia aktywacji ruchów molekularnych, odpowiada energii wiązania wodorowego ($E_a = 19 - 30 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$).

10. Wyznaczona na podstawie modelu BPP odległość między parą relaksujących protonów, odpowiada wiązaniom wodorowym o średniej sile ($r = \text{ok. } 2 \text{ \AA}$).
11. Relaksometria i spektroskopia $^1\text{H-NMR}$ są bardzo dobrymi metodami do określenia natury procesu hydratacji układu mikroheterogennego. Potrafią rozstrzygnąć, czy frakcja stała rozpuszczalna w wodzie zaadsorbowanej z fazy gazowej jest w układzie obecna. Na przykładzie stałych rozprożeń tadafilu w Soluplus® wykazano brak rozpuszczalnej frakcji stałej. W plesze rehydratowanego *N. tigrina* była ona obecna w ograniczonym zakresie. Natomiast w procesie hydratacji stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie zachodziło rozpuszczanie stałej matrycy.
12. Dla pochodzącej z pustyni Atacama plechy *Niebla tigrina*, charakteryzującej się ograniczonym udziałem frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie, udało się oszacować ilość tej frakcji, jako wynoszącą $\Delta M_c/m_0 = 0,333$.

Spis rysunków

Rysunek I.1. Diagram fazowy wody z wartościami ciśnienia i temperatury na liniach lub punktach przemian fazowych. Nazwy lodu oznaczono na niebiesko [12, 13].	19
Rysunek I.2. Wzór strukturalny: a) tadalafilu [22], b) polimeru Soluplus®. Na niebiesko zaznaczono część hydrofilową, na czerwono zaznaczono część lipofilową struktury polimeru.	22
Rysunek I.3. Mechanizmy działania tadalafilu i bozentanu w terapii nadciśnienia płucnego [26].	23
Rysunek I.4. Wzór strukturalny monohydratu bozentanu (a) i Kollidonu VA64 (b).	26
Rysunek I.5. Środowisko naturalne porostów na pustyni przybrzeżnej, Park Narodowy Pan de Azúcar, północne Chile; (a) zbocze przybrzeżne i napływająca mgła; (b) kolonia porostów w strefie mgły przybrzeżnej; (c) plecha <i>Niebla tigrina</i> , <i>in situ</i> [52].	28
Rysunek II.1. Ogólna prezentacja modeli izoterm sorpcji według typów.	32
Rysunek II.2 Zakres stosowalności izoterm sorpcji [59].	36
Rysunek III.1. Zdjęcia ze skanigowego mikroskopu elektronowego dla tadalafilu przed procesem mielenia (a), mieszaniny tadalafilu z Soluplus® (0,5TD) przed mieleniem (b), próbki 0,5TD po mieleniu – stałe rozproszenie (c), stałego rozproszenia 0,5TD po hydratacji w wilgotności względnej (RH) 76% przez 7 dni (d).	48
Rysunek III.2. Relaksometr MRJ WNS HB65.	51
Rysunek III.3. Spektrometr Bruker Avance III 300.	52
Rysunek III.4. Sekwencje pomiarowe (a) Impuls $\pi/2$, (b) Sekwencja zaniku inwersji użyte w spektroskopii $^1\text{H-NMR}$. Parametr C oznacza odstęp czasu między impulsami, zmieniany w czasie pomiaru.	52
Rysunek IV.1. Kinetyka hydratacji polimeru Soluplus® (a) oraz stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus® w proporcji 1+9 (b) lub 1+1 (c) zarejestrowana w różnych warunkach wilgotności względnej (%).	55
Rysunek IV.2. Izotermy sorpcji wraz z dopasowanymi modelami Languimira (zielona linia), BET (niebieska linia) oraz model GAB-Dent (czerwona linia) dla stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus®.	57
Rysunek IV.3. Paraboliczna forma izoterm sorpcji z modelem BET (niebieska linia) oraz GAB-Dent (czerwona linia) dla polimeru Soluplus (a) oraz stałych rozprożeń tadalafilu w Soluplus® (b-c).	59
Rysunek IV.4. Kinetyka hydratacji bozentanu mielonego przez 4 h z prędkością 400 obr/min (a), stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (1+1, 4 h, 400 obr./min) (b) oraz kopowidonu (c). Wilgotność względną wyrażono w %.	60
Rysunek IV.5. Izotermy sorpcji wraz z dopasowanymi modelami Langmuira (zielona linia), BET (niebieska linia) oraz model GAB-Dent (czerwona linia) dla bozentanu mielonego (a), stałego rozproszenia bozentanu z kopowidonem (0,5BS) (b) i kopowidonu (c).	63
Rysunek IV.6. Paraboliczna forma izoterm sorpcji dla bozentanu mielonego (a), stałego rozproszenia bozentanu z kopowidonem – 0,5BS (b), kopowidonu (c); zamknięte kwadraty - dane doświadczalne; niebieska linia – model BET, czerwona linia –model GAB-Dent .	64
Rysunek IV.7. Wykres kinetyki hydratacji z fazy gazowej dla plechy <i>Niebla tigrina</i> [50].	65
Rysunek IV.8. Izoterma sorpcji dla <i>N. tigrina</i> wraz z dopasowanymi modelami Languimira (zielona przerywana linia), BET (niebieska przerywana linia) oraz model GAB-Dent (czerwona linia) [50].	66

Rysunek IV.9. Paraboliczna forma izotermy sorpcji z modelem BET (niebieska przerywana linia) oraz modelem GAB-Dent (czerwona linia) dla <i>N. tigrina</i> .	67
Rysunek IV.10. Maksymalne uwodnienia stałych rozproszeń tadalafilu z Soluplus® uzyskane podczas pomiarów ¹ H-MRJ w zależności od składu formułacji i parametrów procesu mielenia tj. prędkości obrotowej 100-400 obr./min oraz czasu mielenia 60-720 min.	68
Rysunek IV.11. Maksymalne poziomy uwodnienia uzyskane w ¹ H-MRJ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS) w porównaniu z BS_M, kopowidonem i plechą porostu <i>Niebla tigrina</i> .	68
Rysunek IV.12. Wykres sygnału ¹ H-NMR FID dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (0,5TD 200/240) uwodnionego do poziomu $\Delta m/m_0 = 0,26$.	70
Rysunek IV.13. Zależność hydratacyjna czasów relaksacji T_2^* protonów wyznaczona w ¹ H-MRJ dla stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus (0,1TD 200/240, 0,5TD 200/240) w porównaniu do samej substancji leczniczej i polimeru [71].	70
Rysunek IV.14. Wykres amplitudy sygnału ¹ H-NMR pochodzącej od protonów mobilnych, wyrażonej w jednostkach sygnału stałego, L/S dla dwóch wybranych stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® w porównaniu do samego polimeru [63].	72
Rysunek IV.15. Widmo ¹ H-NMR zarejestrowane w domenie częstotliwości dla stałego rozproszenia tadalafilu w Soluplus® (0,1TD 200/240) o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0,28$.	73
Rysunek IV.16. Widma ¹ H-NMR stałego rozproszenia 0,1TD 100/720 przedstawione w funkcji narastającego poziomu uwodnienia.	74
Rysunek IV.17. Zależność szerokości połówkowej widma ¹ H-NMR dla stałego rozproszenia 0,1TD 100/720 od poziomu uwodnienia (a), stosunku pól powierzchni pod linią od protonów mobilnych do takiej od protonów o małej mobilności (b), położenia pików(c).	75
Rysunek IV.18. Sygnał ¹ H-NMR FID dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS) uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,09$ wraz z dopasowaniem.	77
Rysunek IV.19. Czasy relaksacji T_2^* ¹ H-MRJ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS) (a) i kopowidonu (b).	77
Rysunek IV.20. Zależność hydratacyjna stosunku amplitud sygnałów swobodnej precesji ¹ H-NMR, L/S, dla stałego rozproszenia (0,5BS) bozentanu w kopowidonie (a) i kopowidonu (b).	78
Rysunek IV.21. Zależność szerokości połówkowej linii ¹ H-NMR, położenia pików oraz stosunku pól powierzchni pod wykresami od poziomu uwodnienia dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (a-c) oraz kopowidonu (d-f).	80
Rysunek IV.22. Zależność hydratacyjna czasów relaksacji T_2^* ¹ H-MRJ dla próbki <i>Niebla tigrina</i> [50].	82
Rysunek IV.23. Zależność hydratacyjna stosunku sygnałów L/S i L_1/L ¹ H-MRJ obserwowanego w domenie czasu dla próbek <i>Niebla tigrina</i> .	83
Rysunek IV.24. Zależności szerokości połówkowej linii ¹ H-NMR (a), stosunku pól powierzchni pod wykresami (b) oraz położenia pików (c) od uwodnienia dla <i>Niebla tigrina</i> .	85
Rysunek IV.25. Widma spektroskopii relaksacyjnej stałych rozproszeń o 50% zawartości tadalafilu (0,5TD) i o poziomie uwodnienia (a) $\Delta m/m_0 = 0$, (b) $\Delta m/m_0 = 0,15$, (c) $\Delta m/m_0 = 0,3$; rejestrowane w temperaturze 275 K.	86
Rysunek IV.26. Wykresy zależności szerokości połówkowej (a), stosunku pól powierzchni frakcji stałej (b), oraz położenia pików (c) ¹ H-NMR od temperatury dla suchego stałego rozproszenia 0,5TD.	87
Rysunek IV.27. Zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 od temperatury dla obu składowych stałych magnetyzacji suchego stałego rozproszenia 0,5TD ($\Delta m/m_0 = 0$).	88
Rysunek IV.28. Zależności szerokości połówkowej (a), stosunku pól powierzchni frakcji stałej (b), oraz położenia pików (c) widm ¹ H-NMR od temperatury dla próbki ($\Delta m/m_0 = 0,15$) dla stałego rozproszenia 0,5TD.	89

Rysunek IV.29. Zależność od temperatury czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 ^1H -NMR dla obu składowych stałych magnetyzacji stałego rozproszenia 0,5TD uwodnionego do $\Delta m/m_0 = 0,15$	90
Rysunek IV.30. Zależności szerokości połówkowej (a), stosunku pól powierzchni frakcji stałej (b), oraz położenia pików (c) widm ^1H -NMR od temperatury dla próbki ($\Delta m/m_0 = 0,3$) 0,5TD.	91
Rysunek IV.31. Zależności temperaturowe czasów relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów (a - wszystkich frakcji, b – uśrednienia drugiego Gaussa i Lorentza) uwodnionego stałego rozproszenia 0,5TD.	92

Spis tabel

Tabela III-1. Zestawienie oznaczeń, składów i metod analizy próbek farmaceutycznych opisanych w pracy. Proporcje składników wyrażono w % wagowych.	45
Tabela III-2. Substancje użyte do hydratacji z fazy gazowej.	49
Tabela III-3. Masy próbek użytych do pomiarów relaksometrii i spektroskopii $^1\text{H-NMR}$	50
Tabela IV-1. Wyniki dopasowań superpozycji funkcji eksponencjalnych i zmiana morfologii próbek podczas hydratacji stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus® z fazy gazowej.	56
Tabela IV-2. Wyniki dopasowań parametrów modelu sorpcji GAB-Dent dla stałych rozproszeń tadalafilu zawierające 50% (0,5TD) lub 90% (0,1TD) Soluplus®. Dla porównania przedstawiono dane dla samego polimeru.	59
Tabela IV-3. Wyniki dopasowań funkcji ekponencjalnej i morfologia próbek dla tras hydratacyjnych stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie (0,5BS), mielonego bozentanu (BS_M) oraz niemielonego kopowidonu. Parametry procesu mielenia: 4 h, 400 obr./min.	62
Tabela IV-4. Wyniki dopasowań parametrów modelu sorpcji GAB-Dent dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie. Dla porównania przedstawiono dane dla bozentanu mielonego (BS_M) oraz kopowidonu.	65
Tabela IV-5. Zakresy efektywnych czasów relaksacji T_2^* dla stałych rozproszeń tadalafilu w Soluplus w zależności od parametrów procesu mielenia.	71
Tabela IV-6. Czasy relaksacji T_2^* $^1\text{H-MRJ}$ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidonie, bozentanu mielonego i kopowidonu.	78
Tabela IV-7. Parametry funkcji wymiernej dopasowanej do zależności hydratacyjnej sygnału $^1\text{H-NMR}$ dla stałego rozproszenia bozentanu w kopowidoniem oraz kopowidonu.	79
Tabela IV-8. Parametry dopasowania funkcji wymiernej, oraz funkcji liniowej amplitudy składowej sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, wyrażonej w jednostkach sygnału $^1\text{H-NMR}$ pochodzącego od protonów o znacznym stopniu unieruchomienia, L/S i L_1/L , dla <i>Niebla tigrina</i>	83

Bibliografia

- [1] S. Fos, V. I. Deltoro, Á. Calatayud, and E. Barreno, “CHANGES IN WATER ECONOMY IN RELATION TO ANATOMICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS DURING THALLUS DEVELOPMENT IN PARMELIA ACETABULUM,” *Lichenol.*, vol. 31, no. 4, pp. 375–387, Jul. 1999, doi: 10.1006/LICH.1999.0215.
- [2] H. Harańczyk, J. Kobierski, D. Zaliacz, P. Nowak, A. Romanowicz, M. Marzec, J. Nizioł, E. Hebda, and J. Pielichowski, “Rehydration of CTMA modified DNA powders observed by NMR,” *Acta Phys. Pol. A*, vol. 121, no. 2, pp. 485–490, 2012, doi: 10.12693/APhysPolA.121.485.
- [3] H. Harańczyk, J. Kobierski, J. Nizioł, E. Hebda, J. Pielichowski, D. Zaliacz, M. Marzec, and A. El-Ghayoury, “Mild hydration of didecyldimethylammonium chloride modified DNA by ¹H-nuclear magnetic resonance and by sorption isotherm,” *J. Appl. Phys.*, vol. 113, no. 4, Jan. 2013, doi: 10.1063/1.4789011.
- [4] G. Szinnai, H. Schachinger, M. J. Arnaud, L. Linder, and U. Keller, “Effect of water deprivation on cognitive-motor performance in healthy men and women [1],” *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 289, no. 1 58-1, pp. 275–280, 2005, doi: 10.1152/AJPCGU.00501.2004/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH60070528450002.JPEG.
- [5] Y. Sogame and T. Kikawada, “Current findings on the molecular mechanisms underlying anhydrobiosis in *Polypedilum vanderplanki*,” *Curr. Opin. Insect Sci.*, vol. 19, pp. 16–21, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.COIS.2016.10.008.
- [6] P. B. Hamilton and T. T. Myoda, “Contamination of Distilled Water, HCl, and NH₄OH with Amino Acids, Proteins, and Bacteria,” *Clin. Chem.*, vol. 20, no. 6, pp. 687–691, Jun. 1974, doi: 10.1093/CLINCHEM/20.6.687.
- [7] C. Du, B. Zhao, X. B. Chen, N. Birbilis, and H. Yang, “Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid,” *Sci. Reports 2016 61*, vol. 6, no. 1, pp. 1–14, Jul. 2016, doi: 10.1038/srep29225.
- [8] Y. Hayashi, “In Water or in the Presence of Water?,” *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 45, no. 48, pp. 8103–8104, Dec. 2006, doi: 10.1002/ANIE.200603378.
- [9] D. S. Eisenberg and W. Kauzmann, *The structure and properties of water*. Clarendon Press, 2005.
- [10] E. R. Batista, S. S. Xantheas, and H. Jónsson, “Molecular multipole moments of water molecules in ice Ih,” *J. Chem. Phys.*, vol. 109, no. 11, p. 4546, Sep. 1998, doi: 10.1063/1.477058.
- [11] G. V Barbosa-Cánovas, A. J. Fontana Jr, S. J. Schmidt, and T. P. Labuza, *Water activity in foods: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2002.
- [12] “Water phase diagram.” https://water.lsbu.ac.uk/water/water_phase_diagram.html#r3921 (accessed Jul. 05, 2022).
- [13] “Phase diagram of water and ice.” <https://ergodic.ugr.es/termo/lecciones/water1.html> (accessed Jul. 05, 2022).
- [14] C. L. N. Vo, C. Park, and B. J. Lee, “Current trends and future perspectives of solid dispersions

- containing poorly water-soluble drugs,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 85, no. 3 PART B, pp. 799–813, 2013, doi: 10.1016/j.ejpb.2013.09.007.
- [15] N. G. Patel and A. T. M. Serajuddin, “Moisture sorption by polymeric excipients commonly used in amorphous solid dispersion and its effect on glass transition temperature: I. Polyvinylpyrrolidone and related copolymers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 616, p. 121532, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2022.121532.
- [16] G. M. C. Rosano, A. Aversa, C. Vitale, A. Fabbri, M. Fini, and G. Spera, “Chronic treatment with tadalafil improves endothelial function in men with increased cardiovascular risk,” *Eur. Urol.*, vol. 47, no. 2, pp. 214–222, Feb. 2005, doi: 10.1016/J.EURURO.2004.10.002.
- [17] T. E. King *et al.*, “BUILD-3: A Randomized, Controlled Trial of Bosentan in Idiopathic Pulmonary Fibrosis,” <https://doi.org/10.1164/rccm.201011-1874OC>, vol. 184, no. 1, pp. 92–99, Dec. 2012, doi: 10.1164/RCCM.201011-1874OC.
- [18] R. F. Kefford, P. R. Clingan, B. Brady, A. Ballmer, A. Morganti, and P. Hersey, “A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy,” *Mol. Cancer*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2010, doi: 10.1186/1476-4598-9-69/TABLES/3.
- [19] F. Álvarez Reyes, C. Luna Gámez, and M. Brito Surez, “Effect of the dual endothelin receptor antagonist bosentan on untreatable skin ulcers in a patient with diabetes: A case report,” *J. Med. Case Rep.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–4, Apr. 2011, doi: 10.1186/1752-1947-5-151/FIGURES/1.
- [20] S. Hostenbach, A. Pauwels, V. Michiels, H. Raeymaekers, A. M. Van Binst, A. Van Merhaeghen-Wieleman, P. Van Schuerbeek, J. De Keyser, and M. D’Haeseleer, “Role of cerebral hypoperfusion in multiple sclerosis (ROCHIMS): Study protocol for a proof-of-concept randomized controlled trial with bosentan,” *Trials*, vol. 20, no. 1, pp. 1–7, Mar. 2019, doi: 10.1186/S13063-019-3252-4/FIGURES/1.
- [21] M. Pawłowski *et al.*, *Chemia leków*. PZWL, 2020.
- [22] D. Siram, *Medicinal Chemistry Second Edition*, Second. Pearson, 2010.
- [23] G. B. Brock, C. G. McMahon, K. K. Chen, T. Costigan, W. Shen, V. Watkins, G. Anglin, and S. Whitaker, “Efficacy and Safety of Tadalafil for the Treatment of Erectile Dysfunction: Results of Integrated Analyses,” *J. Urol.*, vol. 168, no. 4, pp. 1332–1336, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0022-5347(05)64442-4.
- [24] K. T. McVary, C. G. Roehrborn, J. C. Kaminetsky, S. M. Auerbach, B. Wachs, J. M. Young, A. Esler, G. D. Sides, and B. S. Denes, “Tadalafil Relieves Lower Urinary Tract Symptoms Secondary to Benign Prostatic Hyperplasia,” *J. Urol.*, vol. 177, no. 4, pp. 1401–1407, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.JURO.2006.11.037.
- [25] N. Galiè *et al.*, “Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension,” *Circulation*, vol. 119, no. 22, pp. 2894–2903, Jun. 2009, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.839274.
- [26] Y. Tamura and M. Kimura, “Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 74, no. 3, pp. 286–294, Oct. 2009, doi: 10.1056/NEJMRA040291.
- [27] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, and S. Onoue, “Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 420, no. 1, pp. 1–10, Nov. 25, 2011. doi:

- 10.1016/j.ijpharm.2011.08.032.
- [28] K. Włodarski, W. Sawicki, A. Kozyra, and L. Tajber, "Physical stability of solid dispersions with respect to thermodynamic solubility of tadalafil in PVP-VA," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 96, pp. 237–246, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.EJPB.2015.07.026.
- [29] K. Włodarski, W. Sawicki, K. Haber, J. Knapik, Z. Wojnarowska, M. Paluch, P. Lepek, L. Hawelek, and L. Tajber, "Physicochemical properties of tadalafil solid dispersions - Impact of polymer on the apparent solubility and dissolution rate of tadalafil," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 94, pp. 106–115, 2015, doi: 10.1016/j.ejpb.2015.04.031.
- [30] K. Włodarski, L. Tajber, and W. Sawicki, "Physicochemical properties of direct compression tablets with spray dried and ball milled solid dispersions of tadalafil in PVP-VA," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 109, pp. 14–23, 2016, doi: 10.1016/j.ejpb.2016.09.011.
- [31] J. F. Alopaeus, E. Hagesæther, and I. Tho, "Micellisation Mechanism and Behaviour of Soluplus®–Furosemide Micelles: Preformulation Studies of an Oral Nanocarrier-Based System," *Pharm. 2019, Vol. 12, Page 15*, vol. 12, no. 1, p. 15, Jan. 2019, doi: 10.3390/PH12010015.
- [32] A. Krupa, M. Descamps, J. F. Willart, B. Strach, E. Wyska, R. Jachowicz, and F. Danède, "High-energy ball milling as green process to vitrify tadalafil and improve bioavailability," *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 11, pp. 3891–3902, Nov. 2016, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00688.
- [33] P. Grobelny, I. Kazakevich, D. Zhang, and R. Bogner, "Amorphization of itraconazole by inorganic pharmaceutical excipients: Comparison of excipients and processing methods," *Pharm. Dev. Technol.*, 2015, doi: 10.3109/10837450.2014.959181.
- [34] European Medicines Agency (EMA), "ICH guideline Q8 (R2) on pharmaceutical development. EMA/CHMP/ICH/167068/2004 Committee for Human Medicinal Products," vol. 8, no. June, 2017.
- [35] J. Rantanen and J. Khinast, "The Future of Pharmaceutical Manufacturing Sciences," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 11, pp. 3612–3638, Nov. 2015, doi: 10.1002/jps.24594.
- [36] K. Dziewic, *Wpływ parametrów procesu mielenia na szybkość rozpuszczania tadalafilu z dwuskładnikowych układów proszkowych z Soluplus*, Praca mgr. Uniwersytet Jagielloński, 2016.
- [37] A. Krupa, D. Majda, W. Mozgawa, J. Szlęk, and R. Jachowicz, "Physicochemical Properties of Bosentan and Selected PDE-5 Inhibitors in the Design of Drugs for Rare Diseases," *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 4, pp. 1318–1331, May 2017, doi: 10.1208/s12249-016-0599-7.
- [38] E. Mutschler *et al.*, *Mutschler farmakologia i toksykologia: podręcznik*. MedPharm Polska, 2016.
- [39] V. Bühler, "Vinylpyrrolidone-vinyl acetate copolymer (Copovidone)," *Polyvinylpyrrolidone Excipients Pharm. Povidone, Crospovidone Copovidone*, pp. 179–219, 2005.
- [40] M. Kurakula and G. S. N. Koteswara Rao, "Moving polyvinyl pyrrolidone electrospun nanofibers and bioprinted scaffolds toward multidisciplinary biomedical applications," *Eur. Polym. J.*, vol. 136, p. 109919, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.109919.
- [41] K. M. Koczur, S. Mourdikoudis, L. Polavarapu, and S. E. Skrabalak, "Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis," *Dalt. Trans.*, vol. 44, no. 41, pp. 17883–17905, Oct. 2015, doi: 10.1039/C5DT02964C.
- [42] A. Kumar, V. Suryadevara, S. R. Lankapalli, A. M. Deshmukh, and L. P. Sambath, "Formulation and Optimization of Ezetimibe Containing Solid Dispersions Using Kollidon VA64," *Turk J Pharm Sci*, vol.

- 11, no. 2, pp. 113–126, 2014.
- [43] A. L. Sarode, H. Sandhu, N. Shah, W. Malick, and H. Zia, “Hot melt extrusion for amorphous solid dispersions: Temperature and moisture activated drug-polymer interactions for enhanced stability,” *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 10, pp. 3665–3675, Oct. 2013, doi: 10.1021/MP400165B/ASSET/IMAGES/LARGE/MP-2013-00165B_0014.JPEG.
 - [44] L. Xu, S. M. Li, and H. Sunada, “Preparation and evaluation of Ibuprofen solid dispersion systems with kollidon particles using a pulse combustion dryer system,” *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 55, no. 11, pp. 1545–1550, Nov. 2007, doi: 10.1248/CPB.55.1545.
 - [45] D. Strojewski and A. Krupa, “Kollidon® VA 64 and Soluplus® as modern polymeric carriers for amorphous solid dispersions,” *Polim. Med.*, vol. 52, no. 1, pp. 0–0, Jun. 2022, doi: 10.17219/PIM/150267.
 - [46] P. A. Bowler and P. W. Rundel, “The Ramalina farinacea Complex in North America: Chemical, Ecological and Morphological Variation,” *Bryologist*, vol. 81, no. 3, p. 386, 1978, doi: 10.2307/3242241.
 - [47] P. W. Rundel, M. O. Dillon, and B. Palma, “FLORA AND VEGETATION OF PAN DE AZUCAR NATIONAL PARK IN,” *Gayana Bot*, vol. 53, p. 2, 1996.
 - [48] M. V Thompson, B. Palma, J. T. Knowles, and N. M. Holbrook, “Multi-annual climate in Parque Nacional Pan de Azúcar, Atacama Desert, Chile,” *Rev. Chil. Hist. Nat.*, vol. 76, no. 2, pp. 235–254, 2003.
 - [49] H. Harańczyk, A. Casanova-Katny, M. Olech, and K. Strzałka, “Dehydration and freezing resistance of lichenized fungi,” *Plant Adapt. Strateg. Chang. Environ.*, pp. 77–102, Dec. 2017, doi: 10.1007/978-981-10-6744-0_3/TABLES/5.
 - [50] R. Cornette and T. Kikawada, “The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: Current status of our knowledge,” *IUBMB Life*, vol. 63, no. 6, pp. 419–429, Jun. 2011, doi: 10.1002/IUB.463.
 - [51] R. Del-Prado and L. G. Sancho, “Water relations and photosynthetic performance of fruticose lichens from the semiarid southeast of Spain,” *Flora*, vol. 195, no. 1, pp. 51–60, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0367-2530(17)30947-7.
 - [52] H. Harańczyk, K. Strzałka, K. Kubat, A. Andrzejowska, M. Olech, D. Jakubiec, P. Kijak, G. Palfner, and A. Casanova-Katny, “A comparative analysis of gaseous phase hydration properties of two lichenized fungi: *Niebla tigrina* (Follman) Rundel & Bowler from Atacama Desert and *Umbilicaria antarctica* Frey & I. M. Lamb from Robert Island, Southern Shetlands Archipelago, maritime Antarctica,” *Extremophiles*, vol. 25, no. 3, pp. 267–283, May 2021, doi: 10.1007/S00792-021-01227-Y.
 - [53] M. Baciór, P. Nowak, H. Harańczyk, S. Patryas, P. Kijak, A. Ligęzowska, and M. A. Olech, “Extreme dehydration observed in Antarctic *Turgidosculum complicatulum* and in *Prasiola crispa*,” *Extremophiles*, vol. 21, no. 2, pp. 331–343, 2017, doi: 10.1007/s00792-016-0905-z.
 - [54] J. Ościk, *Adsorpcja*. Warszawa: PWN, 1973.
 - [55] K. S. W. Sing, “Reporting physisorption data for gas/solid systems,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 54, no. 11, pp. 2201–2218, Jan. 1982, doi: 10.1351/PAC198254112201/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
 - [56] I. Langmuir, “The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 40, no. 9, pp. 1361–1403, Sep. 1918, doi: 10.1021/JA02242A004.

- [57] K. Kubat, A. Krupa, W. Brniak, A. Węgrzyn, D. Majda, A. Bogdał, and H. Harańczyk, "Data regarding particle size distribution, thermal properties and gaseous phase hydration of co-milled solid dispersions composed of tadalafil and Soluplus," *Data Br.*, vol. 43, p. 108451, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.DIB.2022.108451.
- [58] R. W. Dent, "A Multilayer Theory for Gas Sorption: Part I: Sorption of a Single Gas," *Text. Res. J.*, vol. 47, no. 2, pp. 145–152, Jul. 2016, doi: 10.1177/004051757704700213.
- [59] P. Nowak, *Badanie molekularnych mechanizmów odporności na przemarzanie i wysuszanie u krzaczkowatych grzybów zlichenizowanych*, Praca dr. Uniwersytet Jagielloński, 2013.
- [60] M. Black and H. W. Pritchard, "Desiccation and survival in plants : drying without dying," p. 412, 2002.
- [61] H. Harańczyk, *On water in extremely dry biological systems*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2003.
- [62] V. Aroulmoji, M. Mathlouthi, L. Feruglio, E. Murano, and M. Grassi, "Hydration properties and proton exchange in aqueous sugar solutions studied by time domain nuclear magnetic resonance," *Food Chem.*, vol. 132, no. 4, pp. 1644–1650, Jun. 2012, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.110.
- [63] R. H. Hashemi Bradley, William G., Lisanti, Christopher J., Ovid Technologies, Inc., *MRI : the basics*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- [64] N. Bloembergen, E. M. Purcell, and R. V. Pound, "Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption," *Phys. Rev.*, vol. 73, no. 7, p. 679, Apr. 1948, doi: 10.1103/PhysRev.73.679.
- [65] P. Nowak, H. Harańczyk, P. Kijak, M. Marzec, J. Fitas, M. Lisowska, E. Baran, and M. A. Olech, "Bound water behavior in *Cetraria aculeata* thalli during freezing," *Polar Biol.*, vol. 41, no. 5, pp. 865–876, May 2018, doi: 10.1007/S00300-017-2249-2.
- [66] H. Harańczyk, P. Nowak, M. Bacior, M. Lisowska, M. Marzec, M. Florek, and M. A. Olech, "Bound water freezing in Antarctic *Umbilicaria aprina* from Schirmacher Oasis," *Antarct. Sci.*, vol. 24, no. 4, pp. 342–352, Aug. 2012, doi: 10.1017/S0954102012000041.
- [67] H. Harańczyk, A. Leja, P. Nowak, E. Baran, and K. Strzałka, "The effect of mild rehydration on freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) multilamellar membranes as observed by proton NMR and sorption isotherm," *Acta Phys. Pol. A*, vol. 129, no. 2, pp. 179–184, Feb. 2016, doi: 10.12693/APHYSPOLA.129.179.
- [68] H. Harańczyk, P. Nowak, M. Lisowska, M. Florek-Wojciechowska, L. B. Lahuta, and M. A. Olech, "A method of water-soluble solid fraction saturation concentration evaluation in dry thalli of Antarctic lichenized fungi, in vivo," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 6, pp. 226–235, 2016, doi: 10.1016/j.bbrep.2016.04.010.
- [69] H. Harańczyk, W. P. Węglarz, and Z. Sojka, "Investigation of hydration processes in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*, L.) and pine (*Pinus silvestris*, L.) bark and bast using proton magnetic relaxation," *Holzforschung*, vol. 53, no. 3, pp. 299–310, 1999, doi: 10.1515/HF.1999.050.
- [70] A. Krupa, M. Descamps, J. F. Willart, R. Jachowicz, and F. Danède, "High energy ball milling and supercritical carbon dioxide impregnation as co-processing methods to improve dissolution of tadalafil," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 95, pp. 130–137, 2016, doi: 10.1016/j.ejps.2016.05.007.
- [71] P. Nowak, A. Krupa, K. Kubat, A. Węgrzyn, H. Harańczyk, A. Ciulkowska, and R. Jachowicz, "Water vapour sorption in tadalafil-Soluplus co-milled amorphous solid dispersions," *Powder Technol.*, 2019,

doi: 10.1016/j.powtec.2019.02.010.

- [72] H. Harańczyk, M. Florek, P. Nowak, and S. Knutelski, “Water bound in elytra of the weevil *Liparus glabrirostris* (Küster, 1849) by NMR and sorption isotherm (Coleoptera: Curculionidae),” *Acta Phys. Pol. A*, vol. 121, no. 2, pp. 491–496, 2012, doi: 10.12693/APhysPolA.121.491.
- [73] H. Harańczyk, P. Nowak, M. Bacior, M. Lisowska, M. Marzec, M. Florek, and M. A. Olech, “Bound water freezing in Antarctic *Umbilicaria aprina* from Schirmacher Oasis,” *Antarct. Sci.*, vol. 24, no. 4, pp. 342–352, Aug. 2012, doi: 10.1017/S0954102012000041.
- [74] H. Harańczyk, M. Bacior, and M. A. Olech, “Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm,” *Antarct. Sci.*, vol. 20, no. 6, pp. 527–535, Dec. 2008, doi: 10.1017/S0954102008001363.
- [75] L. J. Schreiner, I. G. Cameron, N. Funduk, L. Miljković, M. M. Pintar, and D. N. Kydon, “Proton NMR spin grouping and exchange in dentin,” *Biophys. J.*, vol. 59, no. 3, pp. 629–639, Mar. 1991, doi: 10.1016/S0006-3495(91)82278-0.