

Določanje površinskih lastnosti vzorcev laktoze, pripravljene s sušenjem z razprševanjem, z liofilizacijo in z obarjanjem

Determination of surface properties of lactose samples prepared by spray-drying, lyophilization and precipitation

Odon Planinšek, Jernej Zadnik, Matjaž Kunaver, Marjan Bele, Stane Srčič

POVZETEK: Farmacevtske učinkovine in pomožne snovi izoliramo iz raztopin z uporabo različnih postopkov, ki vplivajo na njihovo morfologijo in fizikalno-kemijske lastnosti. Za analizo in vrednotenje takšnih delcev uporabljamo različne metode, ki jih lahko delimo na tiste, kjer merimo in opazujemo celotni vzorec (diferenčna dinamična kalorimetrija, rentgenska praškovna analiza, kalorimetrija z raztapljanjem) ali samo njegovo površino (merjenje stičnega kota, gravimetrična sorpcija, inverzna plinska kromatografija).

Namen naše raziskave je bil pripraviti različne vzorce laktoze in jim z različnimi metodami proučiti površinske lastnosti. Vzorce laktoze smo pripravili iz vodnih raztopin s sušenjem z razprševanjem, z liofilizacijo in z vakuumskim sušenjem.

Razlike med vzorci smo dokazali z inverzno plinsko kromatografijo z merjenjem pri eni in več temperaturah. Ugotovili smo, da postopek priprave laktoze vpliva na površinske lastnosti vzorca (γ_s^D , K_A , K_D).

Potrdili smo, da je IGC primerna metoda za proučevanje majhnih razlik v površinskih lastnostih vzorcev laktoze.

Ključne besede: fizikalno-kemijske lastnosti, površinske lastnosti, inverzna plinska kromatografija, laktoza

ABSTRACT: Pharmaceutical powders are often isolated from solutions by procedures that influence their morphology and physico-chemical properties. Different methods can be used to characterize and evaluate dried powders. They can be divided into those where the bulk sample is analysed (differential scanning calorimetry, x-ray powder diffractometry, solution calorimetry) and those where only the surface of the sample is studied (contact angle measurements, gravimetric sorption, inverse gas chromatography).

The purpose of this research was to produce and characterize surfaces of different lactose samples. Spray drying, lyophilization and rota vacuuming were used for preparation of the samples.

Differences between samples were confirmed with inverse gas chromatography by measuring at only one and more temperatures. It was established that the method of sample preparation influences the surface properties of lactose (γ_s^D , K_A , K_D).

It was shown that inverse gas chromatography can be used successfully for detecting differences between surfaces of lactose samples.

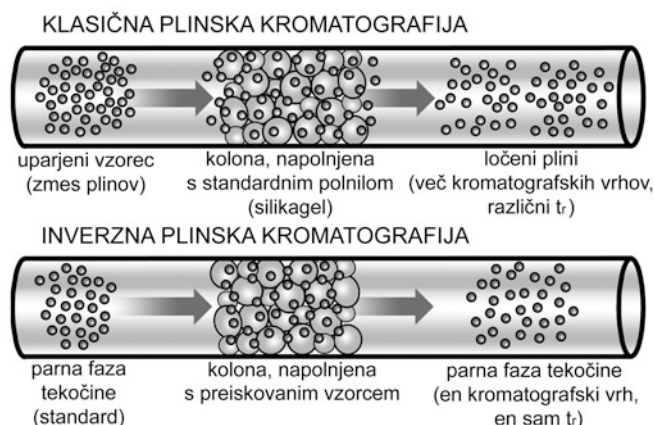
Key words: physico-chemical properties, surface properties, inverse gas chromatography, lactose

1 Uvod

Površinska energija trdnih snovi je lastnost, ki vpliva na medfazne interakcije (npr. trdno-trdno ali trdno-tekoče). Metoda, ki jo lahko uporabimo za njeno določitev, je tudi inverzna plinska kromatografija (IGC). Pri tej metodi je postopek merjenja obraten kot pri klasični plinski kromatografiji (slika 1). Kolono napolnimo s trdnim vzorcem (praškom) katerega lastnosti proučujemo in vanjo injiciramo parno fazo znanih tekočin. Retencija plina v koloni omogoča oceno lastnosti trdne površine. V farmaciji je bila metoda uspešno uporabljena za razlikovanje različnih proizvodnih serij učinkovin (1) in pomožnih snovi (2), proučevanje vpliva mletja na lastnosti površine praškov (3, 4, 5), proučevanje vpliva topila za kristalizacijo na lastnosti površine (6), razlikovanje optičnih oblik manitola (7), vpliva vlage na lastnosti površine itd. (8, 9).

Slika 1: Primerjava principov klasične plinske kromatografije in IGC

Figure 1: Comparison of conventional and inverse gas chromatography



Laktoza se lahko nahaja v dveh osnovnih kristalnih oblikah α in β ali v amorfem stanju. α -laktoza je lahko monohidrat ali brezvodna. Polimorfne oblike laktoze imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti kot so: hitrost raztapljanja, gostota in trdnost.

Sušenje z razprševanjem, vakuumsko sušenje in liofilizacija so metode s pomočjo katerih lahko izdelamo snovi v amorfni obliki oziroma spremenimo njihovo kristaliničnost. Amorfno stanje je v primerjavi s kristalnim nestabilno zato se snovi v tehnoloških procesih proizvodnje oziroma med shranjevanjem in uporabo zdravil različno obnašajo.

2 Materiali in metode

Materiali

Kot izhodni vzorec smo uporabili α -laktozo monohidrat (NF, 200 mesh, DMV International, Nizozemska). Metan (Messer, Slovenija) smo pri določanju retencijskih časov uporabljali kot standard, ki ne reagira. N-heksan, n-heptan (Kemika, Hrvaška), n-oktan, n-nonan, n-dekan (Ridel de Haën AG, Nemčija), aceton (Merck, Nemčija), kloroform, tetrahidrofuran in etilacetat (Kemika, Hrvaška) smo uporabljali kot standarde za IGC-meritve.

Pridobivanje vzorcev laktoze

10-odstotno vodno raztopino laktoze smo sušili z razprševanjem v aparatu GPCG1 (Glatt, Nemčija). Uporabili smo naslednje pogoje sušenja: tlak zraka za razprševanje 1,5 barov, pretok tekočine 4 ml/min, pretok zraka skozi procesno komoro 2,5 m/s, vhodna temperatura 80 °C in izhodna temperatura 60 °C.

Liofilizirano laktozo smo izdelali s kapljanjem 10-odstotne vodne raztopine v posodo s tekočim dušikom in 48-urno liofilizacijo nastalih kroglic pri 20 mTorr in -35 °C.

Oborjeno laktozo smo izdelali z vakuumskim sušenjem 10-odstotne vodne raztopine z uporabo aparata IKA Labortechnik RV05-ST (Nemčija) pri tlaku 100 mbar in temperaturi vodne kopeli 95 °C.

Vse vzorce smo hranili nad silikagelom.

Termična analiza

Vzorce smo analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (Pyris 1, Perkin-Elmer, ZDA). Temperaturo in konstanto grelca smo kalibrirali z uporabo indija. 5-8 mg vzorca smo natehtali in zaprli v aluminijast lonček in ga analizirali v temperaturnem območju 0-240 °C s hitrostjo 10 °C/min v dušikovi atmosferi (40 ml/min).

Rentgenska praškovna analiza

Vzorce smo analizirali z rentgenskim praškovnim difraktometrom (Philips PW 1710, Nizozemska).

Elektronska mikroskopija

Za določitev morfologije delcev smo uporabili vrstični elektronski mikroskop (JEOL T220, Nemčija).

Inverzna plinska kromatografija

Za analizo vzorcev smo uporabili prirejen plinski kromatograf 6890N (Agilent Technologies, ZDA). Kot nosilni plin smo uporabili helij s pretokom 7 ml/min pri temperaturah 30, 35, 40, 50 in 60 °C. Temperatura injektorja je bila 150 °C in detektorja 250 °C. Vzorce smo redčili s Chromosorbom W (Supelco, ZDA) v masnem razmerju 1:1 in jih s stresalnikom (VanKel, ZDA) stresli v stekleno kolono (dolžina 30 cm, notranji premer 3 mm). Pred merjenjem smo tako pripravljeni vzorec prepihovali s helijem (pretok 7 ml/min, temperatura 30 °C) najmanj pet ur. Nato smo v kolono injicirali tako majhne množine parne faze tekočin, ki ustrezajo meji detekcije aparata, s čimer smo dosegli neskončno razredčenje. Na osnovi izmerjenega retencijskega časa smo z uporabo naslednje enačbe izračunali neto retencijski volumen V_n (10):

$$V_n = jF(t_r - t_0) \quad [1]$$

F = volumski pretok nosilnega plina,

t_r = retencijski čas injicirane kapljevine,

t_0 = retencijski čas kapljevine, ki ne vstopa v interakcije z vzorcem (metan),

j = korekcijski parameter, ki upošteva stisljivost nosilnega plina in ga izračunamo iz naslednje enačbe:

$$j = \frac{3(P_{in}/P_{out})^2 - 1}{2(P_{in}/P_{out})^3 - 1} \quad [2]$$

P_{in} = tlak v koloni

P_{out} = zunanji tlak

Pri tehniki neskončnega razredčenja lahko termodinamsko opišemo naslednje ravnotežje:

$$\Delta G_A = -RT \ln V_n + C \quad [3]$$

pri čemer je ΔG_A sprememba proste energije adsorpcije, R splošna plinska konstanta, T absolutna temperatura in C konstanta adsorpcije, ki je odvisna od izbranega referenčnega stanja.

Prosta energija adsorpcije kapljavine injicirane v kolono je vsota nepolarnega (D) in polarnega (SP) prispevka.

Kadar v kolono injiciramo alkane je sprememba proste energije adsorpcije ΔG_A enaka le spremembi nepolarnega prispevka ΔG_A^D :

$$\Delta G_A = \Delta G_A^D = -RT \ln V_n + C \quad [4]$$

Po metodi, ki so jo razvili Schulz in sodelavci, lahko nepolarni del proste površinske energije trdne snovi γ_s^d izračunamo iz naslednje enačbe (10):

$$RT \ln V_n = 2N_A a \sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + C \quad [5]$$

kjer predstavljajo:

N_A = Avogadrovo število

a = površina adsorbirane molekule

γ_l^d = površinska napetost injiciranega alkan

γ_s^d = disperzijski del proste površinske energije preiskovane trdne snovi

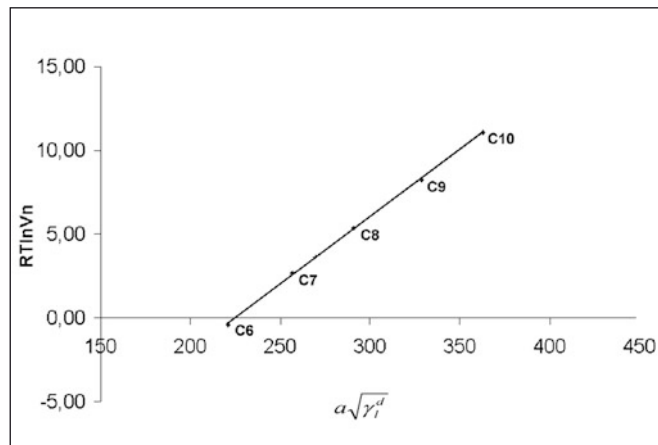
V kolono injiciramo alkane z različno dolžino verige (heksan, heptan, oktan, nonan, dekan) in iz naklona ($2N_A \sqrt{\gamma_s^d}$) premice v grafu $RT \ln V_n = f(a \sqrt{\gamma_l^d})$ določimo vrednost nepolarnega dela proste površinske energije (slika 2).

Polarne kapljavine vstopajo v interakcije s trdnimi površinami z nepolarnimi in polarnimi silami. Tako leži točka za polarno kapljavino v diagramu odvisnosti $RT \ln V_n$ od $a \sqrt{\gamma_l^d}$ nad premico, ki jo tvorijo alkani. Na osnovi raziskav Draga (11, 12), Gutmana (13) in Fowkesa (14) opredeljujemo polarne interakcije kot Lewisove kisló-bazične ali kot elektron donor-elektron akceptor interakcije. Tako pride do polarnih interakcij le med kislino in bazo, ne pa med dvema kislinama ali bazama, kljub njihovim velikim polarnostim.

Po Gutmanu (13) in Riedlu in Fowkesu (15) lahko kapljavine opredelimo glede na akceptorsko (AN*) ali donorsko število (DN). Lastnosti kapljev, ki jih uporabljamo pri inverzni plinski kromatografiji so zbrane v preglednici 1.

Slika 2: Diagram linearne odvisnosti $RT \ln V_n$ od $a \sqrt{\gamma_l^d}$. Iz naklona premice določimo nepolarni del proste površinske energije γ_s^d

Figure 2: Schematic diagram showing the dependence of $RT \ln V_n$ on $a \sqrt{\gamma_l^d}$. The dispersive component of surface free energy γ_s^d can be obtained from the slope of the line



Preglednica 1: Površine molekul, površinske napetosti, elektron donorska in elektron akceptorska števila nekaterih kapljev

Table 1: Surface area, surface free energy, donor and acceptor numbers of some liquids

	a [Å²]	γ_l^d [mJ/m²]	DN [kJ/mol]	AN* [kJ/mol]
Heksan	51,5	18,4	0	0
Heptan	57,0	20,3	0	0
Oktan	63,0	21,3	0	0
Nonan	69,0	22,7	0	0
Dekan	75,0	23,4	0	0
Tetrahidrofuran	45,0	22,5	84,4	2,1
Kloroform	45,0	25,0	0	22,7
Aceton	42,5	16,5	71,4	10,5
Etilacetat	50,0	19,6	71,8	6,3

Pri določeni vrednosti $a \sqrt{\gamma_l^d}$ predstavlja razlika med točko, ki usreza polarni kapljavini in referenčno premico za alkane, specifični (polarni) del spremembe proste energije adsorpcije ΔG_A^{SP} . Iz krivulje odvisnosti ΔG_A^{SP} od temperature lahko izračunamo spremembo specifične proste entalpije ΔH_A^{SP} in spremembo specifične proste entropije adsorpcije ΔS_A^{SP} z uporabo naslednje enačbe:

$$\Delta G_A^{SP} = \Delta H_A^{SP} - T \cdot \Delta S_A^{SP} \quad [6]$$

Spremembo specifične proste entalpije adsorpcije uporabljamo za izračun kislih (K_A) in bazičnih (K_B) lastnosti trdnih površin:

$$\frac{\Delta H_A^{SP}}{AN^*} = K_D + K_A \cdot \frac{DN}{AN^*} \quad [7]$$

V literaturi pogosto srečamo poenostavljeno enačbo (neupoštevanje entropijskega člena), kjer je prosta entalpija adsorpcije zamenjana s prosto energijo adsorpcije, tako da lahko kisle in bazične lastnosti trdnih površin določimo le pri eni temperaturi:

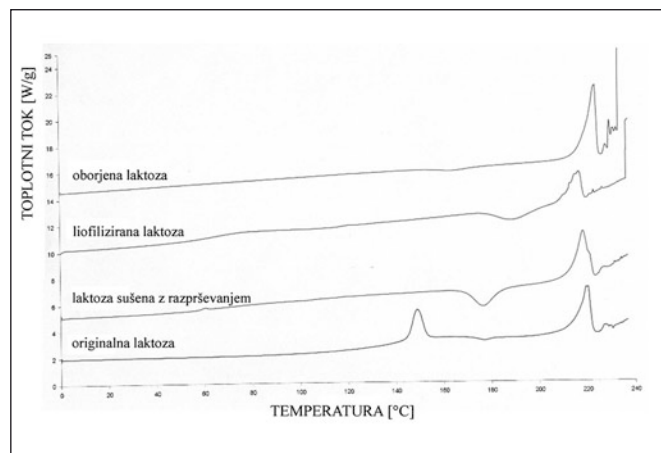
$$\frac{\Delta G_A^{SP}}{AN^*} = K_D + K_A \cdot \frac{DN}{AN^*} \quad [8]$$

3 Rezultati in razprava

Vzorci laktoze smo najprej analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC, slika 3). Originalna laktoza je monohidrat, saj je pri 145 °C prisoten dehidracijski vrh, ki mu pri 215 °C sledi taljenje α -laktoze. DSC-krivulji originalne laktoze, sušene z razprševanjem in liofilizirane laktoze vsebujeta rekristalizacijski vrh v območju 160-180 °C. Pri originalni laktozi je rekristalizacija komaj opazna in jo lahko pripišemo restrukturiranju kristala po odparitvi kristalno vezane vode, oziroma prisotnosti amorfnega oblike. Pri laktozi, sušeni z razprševanjem in liofilizirani laktozi je entalpija rekristalizacije večja kot pri originalni laktozi in jo lahko pripišemo rekristalizaciji amorfnega dela vzorca, podobno kot je to storil Elamin s sodelavci prav tako na primeru laktoze (16). Pri obeh vzorcih rekristalizaciji sledi taljenje α -laktoze. DSC-krivulja oborjene laktoze kaže, da je v vzorcu zanemarljiv delež amorfnega oblike. Tako pri laktozi, sušeni z razprševanjem, kot pri liofilizirani in oborjeni laktozi gre za brezvodne vzorce, saj DSC-krivulje ne vsebujejo dehidracijskega vrha.

Slika 3: DSC-krivulje originalne laktoze, laktoze, sušene z razprševanjem, liofilizirane in oborjene laktoze

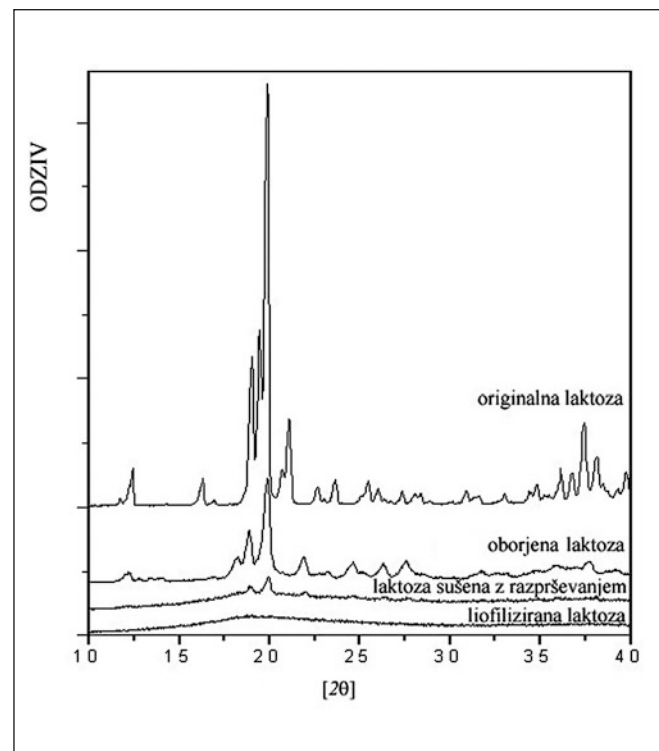
Figure 3: DSC curves of original, spray dried, lyophilized and precipitated lactose



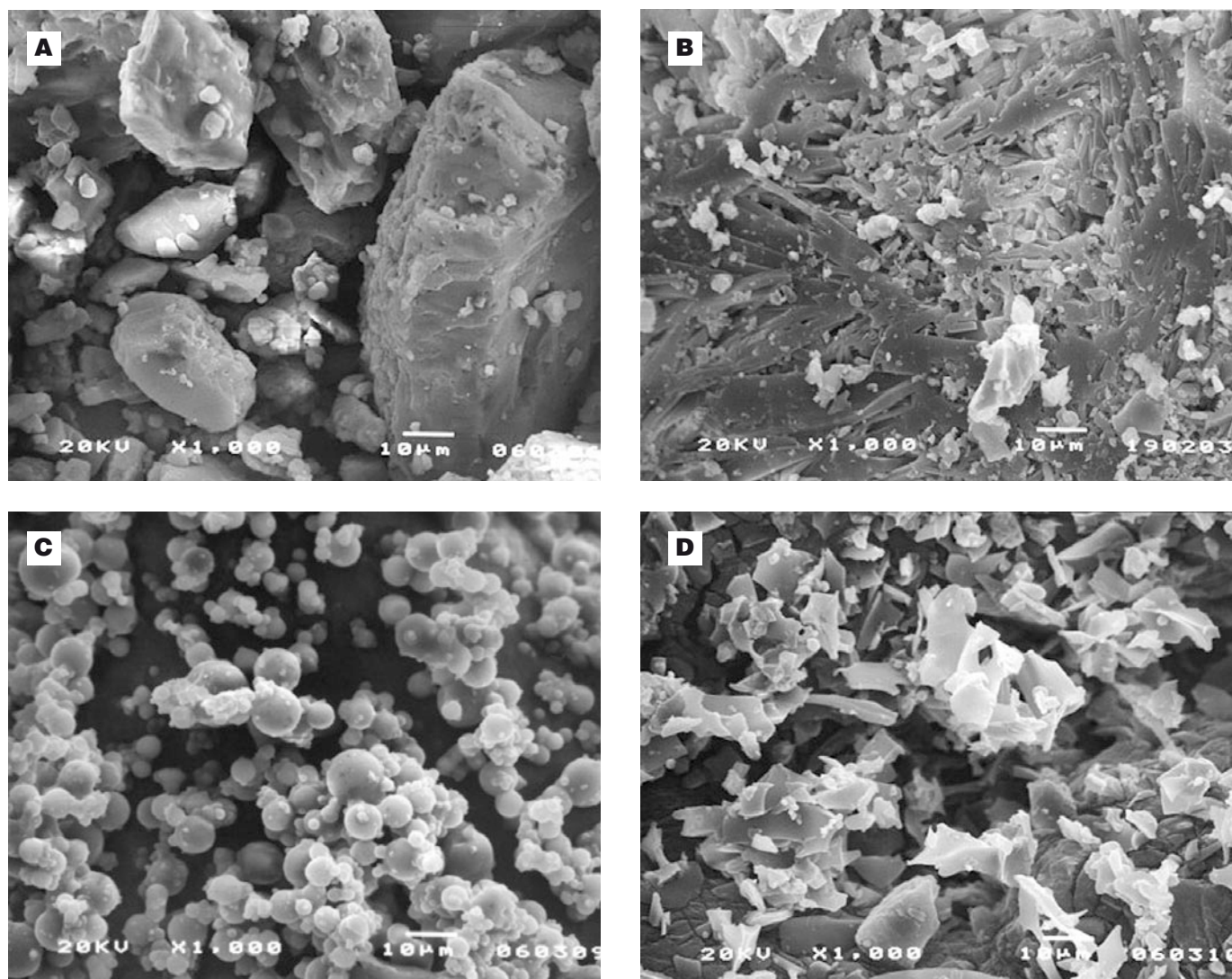
Stopnjo kristaliničnosti in prisotnost različnih kristalnih oblik v vzorcu smo proučevali tudi z rentgensko praškovo analizo (slika 4). Ugotovili smo, da se različno sušeni vzorci razlikujejo od originala. Uklonski maksimumi originalne laktoze pripadajo laktozi monohidratu (Powder Diffraction File: 27-1947) (17). Rezultat se ujema z DSC-analizo vzorca. V primeru oborjene laktoze uklonski maksimumi pripadajo brezvodni obliki laktoze (Powder Diffraction File: 39-1762) (17). Tudi pri laktozi, sušeni z razprševanjem, sklepamo, da je brezvodna, čeprav je ta vzorec pretežno amorfen in je intenziteta uklonskih maksimumov manjša kot pri oborjeni laktozi. Odsotnost vode v tem vzorcu smo potrdili tudi z DSC-analizo. Najbolj amorfnna je liofilizirana laktoza, manj laktoza, sušena z razprševanjem, in še manj oborjena laktoza. Originalna laktoza izkazuje med vsemi proučevanimi vzorci največjo kristaliničnost. Rezultat je pričakovan.

Slika 4: Difraktogrami originalne laktoze in vzorcev laktoze pridobljene s sušenjem

Figure 4: XRD patterns of original lactose and samples obtained after drying



Tudi morfologija delcev je odvisna od postopka izdelave vzorcev. Elektronsko mikroskopska slika originalne laktoze (slika 5) kaže prisotnost kristalov velikih 1-100 nm. Pri oborjeni laktozi so prisotni aglomerati. S sušenjem z razprševanjem so nastali delci sferičnega oblika, z liofilizacijo pa delci v obliki ploščic.



Slika 5: Elektronsko mikroskopske slike originalne (A), oborjene (B), sušene z razprševanjem (C) in liofilizirane (D) laktoze

Figure 5: SEM micrographs of original lactose (A), precipitated lactose (B), spray-dried lactose (C) and lyophilized lactose (D) samples

Po uspešnem razlikovanju vzorcev, z uporabo nekaterih standardnih metod za določanje fizikalno-kemijskih lastnosti praškov, smo vzorce laktoze analizirali še z inverzno plinsko kromatografijo (IGC). Za vrednotenje površine vzorcev smo uporabili tri pristope. Najprej smo izračunali nepolarni del proste površinske energije z uporabo alkanov (C6-C10, preglednica 2). Ugotovili smo, da se vrednost glede na originalno laktozo pri oborjeni laktozi in laktozi, sušeni z razprševanjem, zniža, pri liofilizirani laktozi pa zviša. Vrednost nepolarnega dela proste površinske energije pri oborjeni laktozi in laktozi, sušeni z razprševanjem, znaša približno 33 mN/m^2 in ju s tem parametrom ne moremo razlikovati.

Za razlikovanje vzorcev smo kislini (K_a) in bazični del (K_b) proste površinske energije najprej določili pri 30°C z uporabo enačbe, kjer

ni upoštevan entropijski člen adsorpcije. Ta pristop je v farmacevtski literaturi najpogosteje uporabljan, saj je meritev kratka. Kljub temu, da je pristop termodinamsko nepravilen, so rezultati ponovljivi in pogosto uporabni za razlikovanje med vzorci, ki so si po večini izmerjenih fizikalno-kemijskih lastnostih podobni. K_a je za vse vzorce podoben, tako da razlikovanje vseh vzorcev na osnovi tega parametra ni možno (preglednica 2). Relativno majhne razlike med vzorci kažejo tudi vrednost K_b . Največjo bazičnost izkazuje originalna in laktoza, sušena z razprševanjem, najmanjšo pa liofilizirana laktoza.

Če za izračun K_a in K_b uporabimo ΔH , se le-te med vzorci razlikujejo signifikantno. Vrednost K_a je podobna le pri oborjeni in laktozi, sušeni z razprševanjem. Vrednosti K_b se najbolj razlikujejo. Najbolj bazična je laktoza, sušena z razprševanjem, najmanj pa oborjena laktoza.

Preglednica 2: Izračunani parametri proste površinske energije vzorcev laktoze

Table 2: Calculated surface free energy parameters of lactose samples

	γ_s^d [mN/m ²]	K_A (pri 30 °C)	K_D (pri 30 °C)	K_A (iz ΔH)	K_D (iz ΔH)
VZOREC					
Originalna laktoza	38.0 (0.9)	0.11 (0.01)	0.53 (0.02)	0.50 (0.04)	0.79 (0.09)
Oborjena laktoza	33.8 (0.1)	0.12 (0.01)	0.50 (0.03)	0.42 (0.03)	0.40 (0.08)
Laktoza, sušena z razprševanjem	32.3 (0.2)	0.10 (0.01)	0.54 (0.02)	0.40 (0.01)	1.24 (0.08)
Liofilizirana laktoza	42.3 (0.7)	0.08 (0.01)	0.47 (0.03)	0.19 (0.02)	0.71 (0.02)

4 Zaključek

Raziskava je pokazala, da lahko z uporabo inverzne plinske kromatografije uspešno razlikujemo med površinami vzorcev laktoze pripravljene z različnimi metodami sušenja. Rezultati so pokazali, da je potrebno za popolno razlikovanje vseh vzorcev meritve izvesti pri več temperaturah. Vzorci se razlikujejo tako v nepolarnih kot v specifičnih prispevkih proste površinske energije. Dodatno smo z DSC in rentgensko analizo ugotovili, da se vzorci razlikujejo tudi v tistih lastnostih, ki niso vezane samo na površino.

5 Literatura

1. Ticehurst MD, Rowe RC, York P. Determination of the surface properties of two batches of salbutamol sulphate by inverse gas chromatography. *Int J Pharm* 1994; 111: 241-249.
2. Ticehurst MD, York P, Rowe RC et al. Characterization of the surface properties of α -lactose monohydrate with inverse gas chromatography, used to detect batch variation. *Int J Pharm* 1996; 141: 93-99.
3. Roberts RJ, Rowe RC, York P. The relationship between indentation hardness of organic solids and their molecular structure. *J Matter Sci* 1994; 29: 2289-2296.
4. York P, Ticehurst MD, Osborn JC et al. Characterization of the surface energetics of milled DL propranolol hydrochloride using inverse gas chromatography and molecular modeling. *Int J Pharm* 1998; 174: 179-186.
5. Trowbridge L, Grimsey IM, York P. Influence of milling on the surface properties of acetaminophen. *Pharm Sci* 1998; (Suppl) 1(1): 310.
6. Storey RA. The nucleation, growth and solid state properties of particulate pharmaceuticals, PhD Thesis, 1997, UK, University of Bradford.
7. Grimsey IM, Sunkersett MR, Osborn JC et al. Interpretation of the differences in the surface energetics of two optical forms of mannitol by inverse gas chromatography and molecular modeling. *Int J Pharm* 1999; 191: 43-50.
8. Đorđević NM, Rohr M, Hintnerleitner M et al. Adsorption of water on cyclosporine A, from zero to finite coverage. *Int J Pharm* 1992; 81: 21-29.
9. Sunkersett MR, Grimsey IM, Doughty SW et al. The changes in surface energetics with relative humidity of carbamazepine and paracetamol as measured by inverse gas chromatography. *Eur J Pharm Sci* 2001; 13: 219-225.
10. Schulz J, Lavielle L, Martin C. The role of the interface of carbon fiber epoxy composites. *J Adhesion* 1987; 23: 45-60.
11. Drago RS, Vogel GC, Needham TE. A four parameter equation for predicting enthalpies of adduct formation. *J Am Chem Soc* 1971; 93: 6014-6026.
12. Drago RS, Parr LB, Chamberlain CS. Solvent effects and their relationship to E and C equation. *J Am Chem Soc* 1977; 99(10): 3203-3209.
13. Gutmann V. The donor acceptor approach to molecular interactions. Plenum press, New York 1982.
14. Fowkes FM, Maruchi S. Surface acidity and basicity of polymers. *J Am Chem Soc* 1977; 173: 110-117.
15. Riddle FL, Fowkes FM. Spectral shifts in acid base chemistry 1. Van der Waals contributions to acceptor numbers. *J Am Chem Soc* 1990; 112: 3259-3269.
16. Elamin AA, Sebhatu T, Ahlneck C. The use of amorphous model substances to study mechanically activated materials in the solid state. *Int J Pharm* 1995; 119: 25-36.
17. PDF-2 Powder Diffraction File Database, The International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA, USA. <http://www.icdd.com/>.