МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Определение характеристик кристаллических твёрдых веществ с помощью микрокалориметрии и калориметрии растворения** |  | **ОФС.1.1.1.0010** |
|  |  | **Вводится впервые** |

|  |
| --- |
|  |

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы определения характеристик кристаллических твёрдых веществ с помощью микрокалориметрии и калориметрии растворения.

**Область применения**

При разработке и последующем производстве лекарственного средства большое значение имеет биодоступность высоко кристаллической субстанции и количественное определение аморфного вещества.

**Основные термины и понятия**

Полностью упорядоченная кристаллическая решётка, в которой каждая молекула занимает предположительно известное положение, является идеальной, но редко встречающейся, если вообще может быть возможной. Другим крайним состоянием является аморфное, где твёрдое вещество содержит максимально возможную плотность дефектов (дефектов различных порядков), обуславливающую полную потерю дальнего порядка и присутствие только ближнего, представленного ближайшими соседними частицами. Реальные кристаллы находятся между кристаллическим и аморфным состояниями твёрдых веществ.

*Кристалличность* - состояние кристалла, находящегося между кристаллическим и аморфным состоянием.

Все реальные кристаллы, даже в чистом состоянии, обладают некоторыми дефектами кристаллической решётки, которые увеличивают как энергию (энтальпию при условии постоянного атмосферного давления), так и неупорядоченность (выраженную через энтропию) кристаллической решётки. Кристалл, имеющий относительно низкую плотность дефектов, называют высоко кристаллическим и обладающим высокой кристалличностью. И наоборот, частицу с относительно высокой плотностью дефектов называют частично аморфной и обладающей низкой кристалличностью. В идеальных условиях полностью аморфной частице соответствует нулевая кристалличность. Аморфные частицы могут содержать в некоторой степени упорядоченные домены, которые могут играть роль ядра кристаллизации; о подобных так называемых аморфных частицах говорят, что они обладают низкой, но ограниченной степенью кристалличности.

При разработке и последующем производстве лекарственного средства большое значение имеет биодоступность и количественное определение аморфного вещества в высоко кристаллической субстанции.

Порошок может содержать частицы различной степени кристалличности и частицы с различными размерами и формой. Чем ниже кристалличность твёрдого вещества, тем больше его энтальпия и энтропия. Увеличение энтальпии не компенсируется полностью увеличением энтропии; поэтому свободная энергия Гиббса, отражающая равновесие между ними, фактически увеличивается. Следовательно, чем меньше кристалличность вещества (порошка) и больше выражен его аморфный характер, тем выше его кажущаяся характеристическая растворимость и скорость растворения, но ниже его термодинамическая стабильность.

Кристалличность также является важным свойством и требует измерения соответствующим методом.

*Полиморфизм* - способность вещества находиться в различных кристаллических формах.

*Гидраты или сольваты* - кристаллы, содержащие молекулы воды или растворителя в кристаллических решётках.

Как правило, гидраты проявляют разные физические свойства, что связано с разной упаковкой кристалла и/или молекулярной структурой и энергией решётки. Для простоты проведения калориметрических измерений при определении степени кристалличности, в данном случае подразумевается, что испытуемый образец имеет только одну кристаллическую форму.

Теория и экспериментальный метод могут распространяться на полиморфную способность веществ при тщательном изучении различий в энтальпии полиморфных веществ.

**Микрокалориметрия (Определение содержания аморфной части)**

Большинство химических, физических и биологических процессов связано с теплообменом. Микрокалориметрия является высокочувствительным методом мониторинга и расчёта экзотермических (выделяющих теплоту) и эндотермических (поглощающих теплоту) превращений, сопровождающих эти процессы.

Метод позволяет определять скорость и глубину протекания химических реакций, фазовых превращений или изменений структуры.

Методом микрокалориметрии могут быть исследованы тепловые процессы. Микрокалориметрия использует принцип теплового потока (тепловое рассеивание), когда теплота, выделяемая (или поглощаемая) в определённом термостойком сосуде, перемещается из (в) него с целью повторного установления теплового равновесия с окружающей средой. Исключительная термическая стабильность по отношению к окружающей среде должна достигаться с помощью теплоотвода или окружающих электронно-регулируемых устройств.

Тепловая энергия испытуемого образца в реакционном сосуде обычно направляется через элементы Пельтье, которые являются термоэлектрическими преобразователями, использующими эффект Зеебека (тепловая энергия конвертируется в сигнал напряжения, пропорциональный тепловому потоку).

Результаты представляют обычно в виде количественной характеристики тепловой энергии, которая образуется в единицу времени (Вт), как функции времени.

**Оборудование**

Микрокалориметры представляют собой парные системы с измерительным сосудом и сосудом сравнения. Сосуды обычно сделаны из стекла или нержавеющей стали. Для определённых целей могут применяться специально сконструированные сосуды, позволяющие добавлять газ, жидкость или твёрдое вещество.

**Калибровка**

Микрокалориметр калибруется по тепловому потоку (энергия в единицу времени) с использованием откалиброванных внешних или внутренних электрических тепловых источников или соответствующей стандартной реакции.

**Чувствительность**

Чувствительность микрокалориметрического метода может быть оценена с использованием подходящего стандартного образца, проанализированного соответствующим методом, в совокупности с определением флуктуационного шума измерительного прибора.

**Методика**

Испытуемый образец взвешивают в подходящую колбу. Колбу плотно закрывают, чтобы избежать испарения растворителей и помещают колбу в держатель образца. При необходимости уравновешивают колбу при температуре измерения перед помещением её в положение для проведения измерения.

Начинают испытание и фиксируют значения величины теплового потока, откладывая значения времени на оси абсцисс, а теплового потока – на оси ординат (устанавливают направление экзотермического и эндотермического теплового потока).

**Обнаружение и количественное**

**определение содержания аморфной части в порошках**

Аморфное состояние является метастабильным по отношению к кристаллическому состоянию; поэтому может происходить перекристаллизация. Измерение теплоты перекристаллизации позволяет определять содержание аморфной части, используя площадь пика перекристаллизации. Рассчитать содержимое аморфной части образца можно с помощью отношения выходных данных для испытуемого образца к выходным данным для аморфного стандартного образца. Диапазон значений содержания аморфной части, охватываемый данным методом, зависит от конкретного испытуемого образца; в благоприятных случаях могут быть достигнуты пределы обнаружения ниже 1 %.

Перекристаллизация может быть инициирована путем воздействия на испытуемый образец воздушной смесью более высокой относительной влажности или воздушной смесью, содержащей органический пар. Образец обычно помещают в ампулу, которая также содержит небольшую пробирку с водным насыщенным раствором соли, органическим растворителем или смесью растворителей.

Теплота перекристаллизации обычно измеряется с использованием образца фиксированной массы, помещённого в стеклянный или стальной сосуд. Пробирка, содержащая насыщенный раствор соли или органический растворитель, выбирается таким образом, чтобы она была достаточно большой для полного насыщения воздуха над образцом. Масса испытуемого образца и природа пара над ним выбираются таким образом, чтобы в процессе перекристаллизации наблюдался отчётливый пик, чётко отделённый от исходных тепловых эффектов, вызванных введением образца.

Условия, при которых происходит переход аморфной фазы в термодинамически более стабильное кристаллическое состояние, оказывают значительное влияние на время перекристаллизации. В частности, физические смеси из чистых аморфных и чистых кристаллических веществ будут отличаться от частично кристаллического вещества в проявлении своих свойств. Такие влияния следует учитывать при разработке методики.

Типичный отклик для перекристаллизации преимущественно аморфного вещества показан на рисунке. Первая часть кривой отображает несколько конкурирующих процессов, происходящих одновременно, таких как поглощение водяного пара аморфными частями порошка и выделение водяного пара из пробирки. После первоначального отклика отмечается большой экзотермический отклик, вызванный перекристаллизацией аморфного вещества. Имеет место также удаление избытка воды из перекристаллизованных частей и её конденсация.

Таким образом, площадь под этим экзотермическим откликом перекристаллизации пропорциональна теплоте перекристаллизации.



Рисунок – Типичные для микрокалориметрического

измерения выходные данные по мощности (в мкВт) в виде функции времени (в часах): пик разрушения аморфной структуры (I) и пик кристаллизации (II) для преимущественно аморфной лактозы при температуре 25 оС и относительной влажности 75 %.

**Калориметрия растворения (Определение кристалличности)**

Калориметрия растворения устанавливает способы определения энтальпии растворения вещества (то есть теплоту растворения при постоянном атмосферном давлении). Энтальпия растворения определяется как разность между энтальпией вещества, растворенного до определенной концентрации, и энтальпией исходного вещества. Для растворения должен использоваться такой растворитель, чтобы твёрдое вещество определённой массы растворялось в течение периода времени, соответствующего времени отклика калориметра, как это описано ниже.

Энтальпия растворения пропорциональна количеству растворённого твёрдого вещества. Это количество может приниматься за 1 моль – для молярной энтальпии или 1 г – для удельной энтальпии. Если вещество имеет достаточную чистоту (определённую с требуемой степенью точности) и известна его молекулярная масса, то предпочтительной является молярная энтальпия, в ином случае должна использоваться удельная энтальпия. Энтальпия растворения слабо зависит как от температуры, которая обычно составляет 25оС, так и от конечной концентрации растворённого вещества.

Кристалличность вещества *(Pc)*, как правило, выражают в процентах. Для данного метода необходимы два стандарта сравнения, а именно: высококристаллический образец, при условии, что он имеет кристалличность 100 % и измеренную энтальпию растворения $ΔΗ\_{c}^{s}$*,* и аморфный образец, при условии, что он имеет кристалличность 0 % и измеренную энтальпию растворения $ΔΗ\_{α}^{s}$. Кристалличность твёрдого вещества (Pc) в процентах может быть рассчитана, используя значения указанных величин и измеренную энтальпию растворения исследуемого твёрдого вещества $ΔΗ\_{s}^{s}$ по формуле:

$$P\_{c}=\frac{100·(∆H\_{s}^{s}-∆H\_{α}^{s})}{(∆H\_{c}^{s}-∆H\_{α}^{s})}$$

Кристалличность, представленная на шкале процентного содержания, зависит от трёх измеренных величин, а энтальпии растворения могут быть заменены другими подходящими физическими величинами, зависящими от кристалличности. Значение кристалличности образца в процентах зависит не только от природы и метода приготовления двух стандартов сравнения, но также от выбора измеряемой физической величины.

Энтальпия растворения измеряется с помощью изопериболической жидкостной калориметрии (температура оболочки (рубашки) поддерживается постоянной), а температура калориметрической системы отличается от температуры оболочки) или изотермической жидкостной калориметрии (оболочка и калориметрическая система имеют постоянную и равную температуру). Обычно проводится не менее 3 измерений для каждого образца. Затем рассчитывается среднее значение этих величин. Конкретные требования будут зависеть от возможностей оборудования и необходимой степени точности.

**Изопериболическая жидкостная калориметрия**

В изопериболическом жидкостном калориметре теплообмен в течение процесса растворения вызывает соответствующее изменение температуры в системе растворитель-растворенное вещество (т.е. раствор). Данное изменение температуры измеряется температурным датчиком, включённым в электрическую цепь, который записывает электрический сигнал, соответствующий изменению температуры. Обычно такое изменение температуры, представляемое в электронной форме, измеряется в точно определенные интервалы времени для получения данных температура-время, которые регистрируются, анализируются с помощью компьютера и затем отображаются графически. Контрольный опыт без прибавления твердого вещества к растворителю обычно не показывает заметное изменение наклона графика зависимости температура-время.

Для изопериболических жидкостных калориметров отклик достаточно быстрый, но необходимо делать поправки на возможные потери теплоты на баню или на поступление теплоты от неё. Следовательно, если процесс растворения относительно быстрый, то изопериболические жидкостные калориметры имеют преимущества перед изотермическими жидкостными калориметрами. Для измерения энтальпии растворения с использованием изопериболических жидкостных калориметров важным является выбор растворителя. Природа растворителя и масса испытуемого образца должны быть такими, чтобы общий теплообмен, соответствующий полному растворению твёрдого вещества, закончился в течение 5 минут при интенсивном перемешивании со скоростью вращения в пределах 400-600 об/мин.

Эффективная теплоёмкость калориметрической ячейки и её содержимого определяется для каждого калориметрического измерения. Это определение сопровождается электрическим нагревом содержимого калориметрической ячейки. Эффективная теплоёмкость определяется следующим образом: выполнение первого определения перед растворением, а второго – после растворения и затем – усреднение двух результатов. Точность и надёжность электрического нагрева устанавливаются на основании точности и надёжности вышеупомянутых химических калибровок.

**Изотермическая жидкостная калориметрия**

В изотермическом (постоянная температура) жидкостном калориметре изменение теплоты в течение процесса растворения компенсируется равным, но противоположным, изменением энергии – таким, чтобы температура системы растворитель-растворённое вещество (то есть раствора) оставалась преимущественно постоянной. Измеряется равное, но противоположное, изменение энергии, которое при изменении знака на обратный, обуславливает энтальпию растворения. Для изотермических калориметров отклик относительно медленный, но компенсационный процесс уменьшает эффекты потери теплоты на баню или поступления теплоты от неё. Следовательно, изотермические жидкостные калориметры имеют преимущества перед изопериболическими жидкостными калориметрами в случае, когда процесс растворения относительно медленный.

**Калибровка калориметров растворения**

Для обеспечения точности калориметра необходимо регулярно проводить калибровку. Для эндотермического процесса растворения калибровка калориметра выполняется посредством измерения теплоты, поглощённой в течение процесса растворения калия хлорида в дистиллированной воде при температуре 298,15 K (25 оС). Установленное изменение энтальпии в данном эндотермическом процессе составляет 235,5 Дж/г (17,56 кДж/моль). Для экзотермического процесса растворения проверка калориметра осуществляется измерением теплоты, выделенной при растворении 5 г/л трометамола (Трис(гидроксиметил)аминометан) в хлористоводородной кислоты растворе 0,1 М при температуре 25оС. Установленная теплота для указанного выше процесса составляет -246,0 Дж/г (-29,80 кДж/моль).

**Правила работы с образцами**

Химическая и физическая стабильность твёрдых веществ может снижаться с уменьшением кристалличности. Твёрдые вещества с низкой кристалличностью, особенно аморфные твёрдые вещества, стремятся поглощать пары воды из атмосферы, что приводит к кристаллизации и соответствующему увеличению кристалличности. В связи с этим перед проведением определения кристалличности безводные образцы должны храниться при нулевой влажности или при значениях влажности ниже критического уровня в закрытых камерах, содержащих поглотитель влаги, предпочтительно, с индикатором эффективности. Если необходимо провести исследования кристалличность-влажность, то для обеспечения определенной влажности образец должен храниться в герметично закрытой камере, содержащей насыщенный раствор соли.