

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PRIMOŽ NOVAK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



PRIMOŽ NOVAK

**PROUČEVANJE DELCEV V BINARNIH PRAŠKASTIH
ZMESEH KARVEDILOLA S POMOŽNIMI SNOVMI,
MLETIH V KROGLIČNEM MLINU**

**STUDY OF PARTICLES IN BINARY POWDER MIXTURES
OF CARVEDILOL WITH EXCIPIENTS MILLED IN A
BALL MILL**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju, prof. dr. Odonu Planinšku, za posredovanje strokovnega znanja, usmerjanje pri eksperimentalnem delu ter pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge. Hkrati se zahvaljujem dr. Borutu Kovačiču, mag. farm. ter doc. dr. Iliji Iliću, mag. farm. za pomoč pri eksperimentalnem delu in številne koristne nasvete.

Posebna zahvala je namenjena moji družini in prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani ter me spodbujali v težkih trenutkih po neprespanih študijskih nočeh.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Primož Novak

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Člani diplomske komisije: doc. dr. Izidor Sosič, mag. farm.

Ljubljana, 2016

VSEBINA

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
Seznam okrajšav in enot.....	V
1 UVOD.....	1
1.1 Mletje v farmaciji.....	1
1.2 Proces mletja.....	2
1.3 Energija pri mletju	4
1.4 Vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti snovi na izid mletja	6
1.4.1 Trdota	7
1.4.2 Young-ov modul.....	8
1.4.3 Natezna trdnost in kritični obremenitveni intenzivnostni faktor	8
1.4.4 Velikost in morfologijadelcev	9
1.5 Vpliv okolja na rezultat mletja.....	9
1.6 Metode mletja	10
1.6.1 Vlažno mletje.....	10
1.6.2 Suho mletje	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali.....	17
3.1.1 Preiskovanimateriali	17
3.1.2 Topila in pomožne snovi	17
3.1.3 Laboratorijski priborinnaprave	17
3.2 Karvedilol	18
3.2.1 Osnovni podatki.....	18
3.2.2 Delovanje in uporaba.....	19
3.3 Metode	20
3.3.1 Priprava fizikalnih zmesi.....	20
3.3.2 Mletje.....	20
3.3.3 Določanje prave gostote s helijevim piknometrom	21
3.3.4 Določanje porazdelitve velikosti delcev z lasersko difrakcijo	21

3.3.5	Vrstična elektronska mikroskopija	22
3.3.6	DSC termična analiza	22
4	REZULTATI	23
4.1	Ponovljivost mletja in določanja velikosti delcev	23
4.1.1	Ponovljivost merjenja porazdelitve velikosti delcev z lasersko difrakcijo ...	23
4.1.2	Ponovljivost mletja	24
4.2	Določanje gostote čistih spojin s helijevim piknometrom.....	25
4.3	Termična analiza karvedilola.....	26
4.4	Določanje porazdelitve velikosti delcev karvedilola, mletega pri različnih temperaturah	27
4.4.1	Analiza z lasersko difrakcijo	27
4.4.2	Optična analiza z elektronskim mikroskopom	28
4.5	Določanje porazdelitve velikosti delcev glutarne kisline, mlete pri različnih temperaturah	29
4.5.1	Analiza z lasersko difrakcijo	29
4.5.2	Optična analiza z elektronskim mikroskopom	30
4.6	Določanje porazdelitve velikosti delcev fumarne kisline, mlete pri različnih temperaturah	31
4.6.1	Analiza z lasersko difrakcijo	31
4.6.2	Optična analiza z elektronskim mikroskopom	32
4.7	Določanje porazdelitve velikosti delcev oksalne kisline, mlete pri različnih temperaturah	33
4.7.1	Analiza z lasersko difrakcijo	33
4.7.2	Optična analiza z elektronskim mikroskopom	34
4.8	Analiza binarnih zmesi karvedilola	35
4.8.1	Določanje gostote binarnih zmesi karvedilola s helijevim piknometrom	35
4.8.2	Določanje velikosti delcev karvedilola po mletju binarnih zmesi.....	36
4.8.3	Optična analiza z elektronskim mikroskopom	38
5	SKLEP	40
6	LITERATURA	41

POVZETEK

Mletje je farmacevtski industrijski proces, ki se v prvi vrsti uporablja za zmanjševanje velikosti delcev, tako z namenom izboljšanja raztapljanja zdravilnih učinkovin kot tudi z namenom doseganja želenih lastnosti pomožnih snovi za uporabo v tehnoloških procesih. Kljub temu, da proces mletja že dolga leta intenzivno raziskujemo na več nivojih, pa pogosto še vedno temelji na empiričnih podatkih za vsako preiskovano snov posebej.

V diplomski nalogi smo proučevali, kako proces mletja ter procesni pogoji vplivajo na velikost in morfologijo produkta. Proučevali smo karvedilol, glutarno kislino, fumarno kislino, sukcinso kislino in oksalno kislino. Z metodo laserske difrakcije smo proučevali velikost delcev pred in po mletju pri različnih temperaturah, z uporabo elektronske mikroskopije pa morfologijo delcev. Rezultati kažejo, da učinkovitost mletja narašča z nižanjem temperature. Prav tako lahko mletje in pogoji mletja izrazito vplivajo na površino novonastalih delcev in s tem na njihove lastnosti. S termično analizo smo testirali vzorce ter zaznali nestabilno amorfno stanje karvedilola, ki pri sobnih pogojih hitro spontano rekristalizira.

Proučevali smo tudi vpliv šestih pomožnih snovi na rezultat mletja binarne zmesi s karvedilolom. Z uporabo natrijevega klorida smo v primerjavi z ostalimi uporabljenimi pomožnimi snovmi dobili večje delce karvedilola, kar nakazuje, da pomožna snov lahko vpliva na velikost delcev produkta. Hkrati pa smo pokazali, da nekatere pomožne snovi spremenijo morfološke značilnosti delcev karvedilola.

Zaradi preprostosti metode je smiselno nadaljevati zastavljeno raziskavo, ki bo pokazala in dodatno razjasnila, kakšen je vpliv dodajanja pomožnih snovi k materialu, ki ga meljemo. Hkrati pa rezultati vpliva temperature na mletje zahtevajo dodatne raziskave procesa mletja, predvsem z vidika doseganja želenih lastnosti mletega materiala ter energijske učinkovitosti procesa.

ABSTRACT

Milling in pharmaceutical industry is primarily used to reduce the particle size so as to improve the dissolution of the active substances as well as for the purpose of achieving the desired properties of the excipients used in the technological processes. Despite the fact that the milling process has been thoroughly studied on several levels, it is often still based on empirical data for each substance separately.

The aim of this thesis was to study the effect of process of milling and processing conditions on the size and morphology of the product. We used carvedilol, glutaric acid, fumaric acid, succinic acid and oxalic acid. The particle size before and after milling at different temperatures was determined using the method of laser diffraction. The morphology of the samples was studied using electron microscopy. The results showed that the effectiveness of grinding increases with decreasing temperature. Furthermore, milling and milling conditions markedly affect the surface of milled particles and consequently their properties. The thermal analysis was used to test samples of carvedilol. Unstable amorphous state was detected which is the reason for spontaneous recrystallization of carvedilol even at room temperature.

We studied the effect of excipients on the result of milling of binary mixtures of carvedilol and six excipients. The use of sodium chloride as an excipient results in larger particles of carvedilol, suggesting that the excipient can affect the particle size of the product. At the same time, we have shown that certain excipients alter the morphological characteristics of the particles of carvedilol.

Due to the simplicity of the method it is sensible to continue conceived the study, which will assess and further clarify the effect of the addition of excipients to the material to be milled. At the same time, the results of the effect of temperature on milling call for further study of the process of milling, especially in terms of achieving the desired characteristics of the studied material and energy efficiency of the process itself.

SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT

α LM	- α – laktoza monohidrat
BIK	- natrijev bikarbonat
BU	- biološka uporabnost
CIT	- citronska kislina
CYP	- citokrom P450
DSC	- diferenčna dinamična kaloremetrija (angl. differential scanning calorimetry)
E	- Young-ov modul (prožnostni modul) [Pa]
ϕ	- omejitveni faktor (angl. constraint factor)
FUM	- fumarna kislina
GIT	- gastrointestinalni trakt
GLU	- glutarna kislina
H	- trdota (hardness) [Pa]
J	- joule
K	- kelvin
K_C	-kritični obremenitveni intenzivnostni faktor [$\text{Pa/m}^{1/2}$]
KAR	- karvedilol
kg	- kilogram (10^3 g)
LD	- laserska difrakcija (angl. laser diffraction)
MIE	- minimalna energija vžiga (angl. minimum ignition energy)
MALE	- maleinska kislina
MALO	- malonska kislina
μm	- mikrometer (10^{-6} m)
NaCl	- natrijev klorid
OKS	- oksalna kislina
Pa	- Pascal [N/m^2]
RI	- refrakcijski indeks
SEM	- vrstični elektronski mikroskop (angl. scanning electron microscope)
σ_y	- natezna trdnost [N/m^2 , Pa]
SUK	- sukcijska kislina
VIN	- vinska kislina
ZU	- zdravilna učinkovina

1 UVOD

Kakovost farmacevtskih izdelkov je poleg njihove učinkovitosti in varnosti eden od glavnih dejavnikov v fazi razvoja, proizvodnje in trženja. Tako postajajo zahteve po kakovosti izdelkov in kontinuiranemu doseganju le-te v farmacevtski industriji čedalje bolj striktne. Na področju zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi, ki vstopajo v tehnološke procese pogosto želimo zagotavljati ozko porazdelitev velikosti delcev z znanimi lastnostmi. Po kristalizaciji moramo izolirane delce pogosto tehnološko obdelati, predvsem v smislu zagotavljanja ustrezne velikosti delcev in površinske energije (1).

1.1 Mletje v farmaciji

Mletje je najstarejši mehanski postopek za zmanjševanje velikosti delcev trdnih snovi in predstavlja pomemben proces v proizvodnji končnega produkta. Primarno se mletje uporablja za zmanjševanje velikosti delcev in za povečanje površine ter s tem povezanim izboljšanjem raztapljanja zdravilnih učinkovin (2) (3).

Velikost delcev zdravilne učinkovine je pomemben dejavnik pri procesih formulacije farmacevtskih oblik, saj vpliva na učinkovitost mešanja učinkovine s pomožnimi snovmi, stisljivost tabletirne mase, pretočne lastnosti prahov in lastnosti suspenzij. Da bi zadostili formulacijskim zahtevam, so potrebni delci zdravilne učinkovine ustrezne velikosti. Pogosto se v zadnji stopnji proizvodnje zdravilne učinkovine uporablja mletje z namenom normalizacije velikosti delcev med serijami, zožanja porazdelitve velikosti delcev (doseganjeboljših pretočnih lastnosti) ali priprave delcev podobne velikosti kot so delci pomožne snovi (4) (5).

Hitrost raztapljanja je sorazmerna topnosti zdravilne učinkovine kot tudi površini delcev (Fick-ov zakon, Noyes-Whitney-jeva enačba), zato z mletjem, s tem, ko povečamo skupno površino delcev, neposredno vplivamo na hitrost raztapljanja (4).

Mletje se uporablja tudi za zmanjševanje velikosti delcev z namenom lajšanja in ciljanja dostave zdravilnih učinkovin v telesu. Praški za inhalacijo za dostavo učinkovine v pljuča morajo biti ustreznih dimenzij, običajno med 1 in 6 μm , da lahko dosežejo ciljano področje v pljučih, kar lahko zagotovimo z nadzorovanim mletjem (1).

Mletje pa lahko vpliva tudi na druge lastnosti, kot sta pretočnost in stabilnost. V raziskavi so Florence in sodelavci opazili spremembo v kristalni strukturi digoksina med mletjem. Do podobnih ugotovitev sta z učinkovino metisazon prišla tudi Lee in Hersey. Topnost in

biološka uporabnost omenjenih slabo topnih učinkovin se je z mletjem povečala. Müller in Polke v svoji raziskavi navajata, da telo drobne amorfnе delce absorbira hitreje kot večje kristalne snovi (5), (6).

Mletje se uporablja tudi kot metoda za izdelavo kokristalov. To so kristalinične snovi, sestavljene iz najmanj dveh različnih komponent (atom, molekula, ion), ki sta (so) povezani z medmolekulskimi interakcijami. Mletje kot alternativna metoda pripravi kokristalov iz raztopine ponuja določene prednosti. Z mletjem se izognemo tvorbi solvatov, ki so v proizvodnji kokristalov nezaželeni, prav tako pa se izognemo težavam s topnostjo komponent v toplih za kokristalizacijo. Zaradi odsotnosti topil pa je ta metoda favorizirana tudi z okoljskega vidika (7), (8), (9), (10), (11). Kokristale lahko pripravimo s suhim mletjem ali pa z dodatkom tekočine. Rehder in sodelavci so v raziskavi pokazali, da lahko na ta način pripravimo kokristale piracetama s citronsko oziroma vinsko kislino, tvorba kokristalov pa je hitrejša v primeru mletja z dodatkom minimalne količine tekočine (12).

1.2 Proces mletja

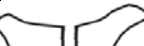
Procese mletja lahko v grobem razdelimo na podlagi medija, v katerem proces mletja poteka, in sicer na vlažno, kjer je medij tekoč, in suho mletje, kjer kot medij uporabljamo različne pline. V obeh skupinah prihaja do zmanjševanja velikost delcev zaradi trkov delcev z elementi mlina kot tudi zaradi trkov med delci samimi, s tem da igrajo pri vlažnem mletju pomembno vlogo tudi strižne sile v tekočini ter kavitacija (4).

Drug način delitve procesov mletja temelji na mehanizmih, preko katerih prihaja do zmanjšanja velikosti delcev. Kot glavne mehanizme literatura navaja več mehanizmov, opozoriti pa velja, da je lahko pri enem samem postopku mletja ali eni sami napravi vpletenih več mehanizmov (4), (13):

- Udarjanje (angl. impact) – sila udarca deluje pravokotno na površino delca. Lahko pride do trkov med delci ali med delci in stenami komore mlina.
- Obraba (angl. attrition) – zmanjšanje delcev dosežemo z uporabo sile, ki je vzporedna površini delca.
- Stiskanje (angl. compression) – sila pri stiskanju deluje proti središču delca.
- Rezanje (angl. cutting, shear) – dosežemo z delovanjem strižne sile.

Zmanjšanje velikosti delcev zahteva delovanje mehanske sile na delce, ki jih meljemo, pri čemer prihaja do deformacije površine in/ali notranjosti delcev. V Preglednici 1 so zbrani primeri poteka mletja (14).

Preglednica 1: Mehanizem mletja (14).

Mehanizem mletja	Vhodni material	Delec med obremenitvijo	Produkt mletja
Slabljenje (Weakening)			
Pokanje (Cracking)			
Lomljenje (Breaking)			
Drobljenje (Crumbling)			
Krušenje (Chipping)			
Deljenje (Splitting)			
Razpad (Disintegrating)			

Do **slabljenja** prihaja zaradi ponavljajočih se obremenitev, z vsakim ciklom obremenitve pa je material bolj utrujen, čeprav na koncu obdrži svojo prvotno obliko. Če material odpove zaradi prevelike obremenitve, pride do **poka** delca, delec pa vseeno obdrži svojo obliko, saj zaradi nezadostne količine prejete energije, razpoka ne napreduje preko celotnega delca. Če pa je količina dovedene energije zadostna, pride do **loma** na dva manjša delca. Do **drobljenja** prihaja, če je dovedena količina energije ravno zadostna, da poškoduje površino delca. Produkt predstavlja množica finih delcev ter rahlo zmanjšan vhodni delec. Pri delcih nepravilnih oblik pogosto prihaja do odpadanja robov, kar imenujemo **krušenje**. Pri višanju dovedene energije pa se lahko delec **razdeli** na več manjših delcev ali pa pride do **razpada** delca, kadar količina dovedene energije znatno presega energijo, potrebno za nastanek razpok ali lom delca. V slednjem primeru je rezultat mletja več fragmentov različnih velikosti (14).

Materiale lahko, glede na časovni potek deformacije v odvisnosti od obremenitve, razvrstimo v spekter od elastičnih do plastičnih. Pri obremenitvah, nižjih od obremenitev, kjer prihaja do loma, se popolnoma elastične substance deformirajo, po razbremenitvi pa se povrnejo v prvotno stanje. V nasprotju pa ostanejo popolnoma plastične substance po razbremenitvi deformirane. Večina trdnih snovi, ki se uporabljajo v farmaciji, se nahaja med omenjenima ekstremoma. Tudi lastnosti spojine, kot so Young-ov modul, krušljivost

(angl. friability) in odpornost na lomljenje, igrajo pomembno vlogo v procesu tako vlažnega kot suhega mletja (4) (15).

Cilj mletja je v večini primerov doseganje specifikacij glede velikost delcev, kar lahko izrazimo kot sprejemljiv interval povprečne velikosti delcev (angl. mean particle sizes) ali kot omejitev vsebnosti velikih ali majhnih delcev. Ker tudi pri najbolj zahtevnih tehnikah ne moremo proizvesti specifično velikih delcev, je rezultat mletja vedno material, sestavljen iz različno velikih delcev. Porazdelitev velikost v mnogo primerih sledi naravni logaritemski distribuciji, ni pa nenavadno, da dosežemo bimodalno porazdelitev (4).

Poleg lastnosti snovi pa so pomemben dejavnik tudi procesni parametri ter okoljski dejavniki. Med prve prištevamo način obremenitve delcev (stiskanje, strižna sila), intenziteto mletja in čas mletja, okoljske dejavnike pa običajno povezujemo s prisotnostjo vlage ali površinsko aktivnih snovi. Popolno razumevanje procesa je zaradi kompleksnosti oteženo in ga do določene mere lahko opišemo samo na ravni posameznih delcev (16).

Proces mletja vsebuje tudi nekatere pomanjkljivosti. Tako ne moremo kontrolirati oblike nastalih delcev, prav tako težko vplivamo na porazdelitev velikosti delcev. Izbor pogojev in parametrov mletja večinoma temelji na empiričnih podatkih, kar prinaša višje stroške in ceno končnega produkta. Pomanjkljivost mletja je tudi izkoristek, ki je lahko nižji kot pri ostalih fazah proizvodnje. Nekatere surovine pa že same po sebi niso primerne za mletje. Take so na primer učinkovine z nizko odpornostjo na povišan tlak, kjer lahko pride do amorfizacije, snovi, kjer prihaja do taljenja ali prehoda iz ene polimorfne oblike v drugo, tudi do termičnega razpada učinkovine. Problematične so lahko tudi učinkovine v obliki hidratov, kjer se učinkovine tekom mletja lahko delno ali popolnoma dehidrirajo (5).

1.3 Energija pri mletju

Eden od ciljev mletja je zmanjšanje velikosti delcev s porabo minimalne količine dovedene energije. Na splošno velja, da je energija, ki je potrebna, da dobimo delce določene velikosti, odvisna od velikosti delcev, ki jih meljemo. S povezavo med energijo mletja in velikostjo delcev se ukvarja več teorij, ki poizkušajo proces mletja matematično opisati (2) (3) (17).

Rittinger-jev zakon pravi, da je energija sorazmerna novonastali površini, specifična površina pa obratno sorazmerna velikosti delcev. Energija mletja je definirana v Enačbi 1:

$$\frac{E}{M} = C_R (S_p - S_f) \quad \text{Enačba 1}$$

kjer je E/M specifična energija mletja, C_R predstavlja Rattingerjevo konstanto, ki je odvisna od lastnosti materiala, S_f in S_p pa specifično površino vhodnega materiala oziroma produkta.

Rittingerjev model je uporaben predvsem pri finem mletju, kjer je povečanje površine delcev na enoto mase veliko. Ker pa se pri mletju le del dovedene energije porabi za zmanjšanje velikosti delcev, je skupna energija mletja znatno višja od tiste, potrebne za nastanek nove površine (2) (3) (17).

Kick-ov zakon trdi, da je energija, uporabljena za zmanjšanje velikosti delcev, sorazmerna razmerju velikosti delcev med vhodnim materialom in končnim produktom, ne glede na velikost vhodnega materiala. Specifična energija mletja je podana v Enačbi 2:

$$\frac{E}{M} = C_K \ln \left(\frac{x_f}{x_p} \right) \quad \text{Enačba 2}$$

kjer je x_f velikost delcev vhodnega materiala, x_p velikost delcev produkta, C_K pa predstavlja Kick-ovo konstanto, ki je odvisna od mletega materiala (2) (3) (17).

Bond-ov zakon mletje opisuje kot vmesno stopnjo (angl. intermediate stage) v procesu drobljenja neskončno velikega delca do neskončno veliko delcev z ničelno velikostjo. Po Bond-ovi teoriji je skupna količina dela, opravljenega za lom delcev, obratno sorazmerna s kvadratnim korenom velikosti delcev produkta, sorazmerna z dolžino razpok v materialu in sorazmerna s kvadratnim korenom novonastale površine, kot sledi iz Enačbe 3:

$$W = W_i \left(\frac{10}{\sqrt{P_{80}}} - \frac{10}{\sqrt{F_{80}}} \right) = C'_B \left(S_p^{1/2} - S_f^{1/2} \right) \quad \text{Enačba 3}$$

kjer je $W(kWh/t)$ vloženo delo, F_{80} in P_{80} velikost delcev vhodnega materiala oziroma produkta v μm , ki v 80% prehajajo skozi sito z režami 100 μm , $W_i(kWh/t)$ pa predstavlja Bond-ov indeks, ki predstavlja potrebno energijo za zmanjšanje enote mase od neskončno velikih delcev do velikosti, kjer 80% delcev prehaja skozi sito z režami 100 μm (2) (3) (17).

Holme-jev zakon predstavlja modifikacijo Bond-ovega zakona.

$$W = W_i \left(\frac{10}{pr} - \frac{10}{Fr} \right) \quad \text{Enačba 4}$$

kjer r predstavlja tabelirane vrednosti, določene za posamezen material (2) (3) (17).

Chen in sodelavci so proučevali vpliv frekvence mletja in količine polnenja α -laktoze monohidrata (αLM) na mletje v oscilacijskem mlinu. Pri manjši količini mletega materiala

in višjih frekvencah se rezultati najboljše prilagajajo Rittinger-jevemu zakonu, kar ustreza predpostavki, da je pri teh pogojih fragmentacija delcev prevladujoči mehanizem. Pri večji količini mletega materiala in nižjih frekvencah pa najboljše ujemanje daje Kick-ov model, poglavitni mehanizem pa je obraba (17).

Čeprav z nobenim pristopom ne moremo popolnoma natančno napovedati velikosti delcev glede na vloženo energijo, pa iz vseh izhaja, da je za doseganje manjših velikosti delcev potreben večji energijski vložek (2) (3) (18) (17) (19).

1.4 Vpliv fizikalno-kemijskih lastnosti snovi na izid mletja

Zmanjševanje velikosti delcev danes v veliki meri še vedno temelji na empiričnih ugotovitvah, pri čemer se pogoji mletja ugotavljajo za vsak material posebej v t.i. pilotnih poizkusih. Hkrati pa trendi po maksimizaciji proizvodnih kapacitet in minimizaciji porabe energije težijo k skrajšanju časa, namenjenega za razvoj izdelka, zato je potreba po poglobljenem poznavanju zakonitosti procesov mletja vse večja (1).

V splošnem velja, da je obnašanje materiala med mletjem oziroma izid mletja odvisen od njegovih mehanskih lastnosti, procesnih parametrov mletja, kot so na primer intenzivnost mletja, hitrost udarjanja, temperatura ter vplivi okolja. V teoriji mletja se običajno največji vpliv na izid mletja pripisuje elastično-plastičnim lastnostim snovi, ki jo meljemo, saj naj bi te določale odpornost materiala proti mletju in s tem vplivale na zmanjšanje velikosti delcev.

Mehanski karakteristiki, pomembni za lom delcev med mletjem, sta odpornost na lomljenje (angl. fracture strength) in obnašanje med deformacijo (angl. deformation behaviour). Odpornost na lomljenje lahko podamo kot kritično natezno trdnost (angl. critical tensile stress), ki predstavlja energijo, ki je potrebna za sprožitev loma. Obnašanje med deformacijo pa lahko razdelimo na elastično (krhko) in neelastično. Neelastičen odziv vključuje semikrhko, plastično in navidezno krhko obnašanje, kjer gre pri slednjem za postopno akumulacijo poškodb v obliki razpok (20). Lastnosti materiala, kot so trdnost (H, angl. hardness), togost (angl. stiffness) in žilavost (angl. toughness) naj bi tako imele velik vpliv na izid mletja, saj določajo, v kakšni meri bo prihajalo do nastanka razpok v materialu in napredovanja le-teh med mletjem. Poznavanje teh lastnosti je zelo dobrodošlo tekom razvoja in optimizacije procesa mletja (21) (22). Vendar pa študije kažejo, da poleg omenjenih parametrov na rezultat mletja vplivajo tudi predhodne nepravilnosti in razpoke v materialu. Včasih prav slednjima pripisujejo celo večji vpliv na obnašanje med mletjem kot samim mehanskim lastnostim materiala (1).

1.4.1 Trdota

Trdota ni prava notranja lastnost materiala, saj je pri realnih materialih odvisna od vpliva mej med zrnji, napak in razpok ter medsebojnega delovanja različnih odzivov, ki so zelo kompleksni. Trdota materiala (H) je definirana kot razmerje med maksimalno obremenitvijo ($P_{\max}$) in kontaktno površino (A_c) med indenterjem, s katerim merimo lastnost materiala, in vzorcem pri maksimalni obremenitvi (Enačba 5). Trdota opisuje odpornost materiala na plastično oz. trajno deformacijo, poleg tega pa preizkus trdote zagotavlja tudi informacije o elastičnih lastnostih materiala (21) (23).

$$H = \frac{P_{\max}}{A_c} \quad \text{Enačba 5}$$

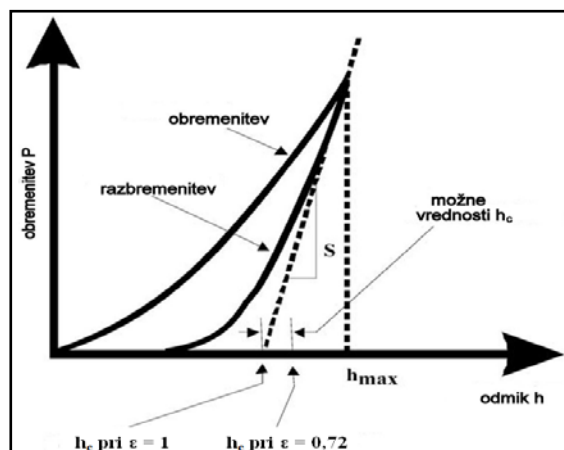
Pri meritvah trdote, še posebej pri določanju mikro oziroma nanotrdote, prihaja do precejšnjih odstopanj rezultatov, zaradi česar je potrebnih več zaporednih meritev, dobljene rezultate pa je potrebno jemati z določeno previdnostjo ter jih pravilno ovrednotiti. Zaprimerljivost rezultatov je potrebno natančno predpisati pogoje merjenja, še posebej obremenitev (23).

Metode merjenja trdote lahko razdelimo v tri skupine:

- metoda razenja, je najstarejši način merjenja trdote. Z uporabo 10-stopenjske Mohs-ove lestvice trdote in sposobnostjo enega telesa da razi drugo telo lahko materiale ovrednotimo glede na njihovo trdoto (18). Lestvica trdote je prikazana v Preglednici 2.
- metode dinamičnega ali odbojnega merjenja, kjer se objekt standardne mase in dimenzij odbije od površine preizkušanca, pri čemer je njegov odboj oz. višina merilo za trdoto materiala preizkušanca.
- metode statičnega vtiskovanja pa temeljijo na pritiskanju kroglice ali diamantne konice v obliki stožca ali piramide v preiskovani material. Zveza med celotno obremenitvijo in površino ali globino vtiska predstavlja merilo trdote. Statično vtiskovanje se uporablja za določanje trdote vseh materialov razen polimerov (22) (23). Primer določanja trdote z metodo statičnega vtiskovanja je prikazan na Sliki 1.

Preglednica 2: Mohs-ova lestvica trdote (24).

Material(mineral)	Mohs-ova trdota
diamant	10
korund	9
topaz	8
kremenjak	7
ortoklaz	6
apatit	5
fluorit	4
apnenec	3
sadra	2
lojevec	1



Slika 1: Grafični prikaz določanja trdote z metodo statičnega vtiskovanja (21).

1.4.2 Young-ov modul

Young-ov modul (E , prožnostni modul, elastični modul) je lastnost materiala, podana kot razmerje med natezno napetostjo in relativnim raztezkom v mejah elastične deformacije materiala (Enačba 6). E je odvisen od jakosti vezi med atomi oziroma molekulami. V praksi se uporablja kot merilo elastičnosti materiala. Močnejše kot so vezi v materialu, težje se te vezi raztegnejo, kar se izraža v višjih vrednostih Young-ovega modula (17) (25).

$$E = \frac{\text{natezna napetost}}{\text{relativni raztezek}} \quad \text{Enačba 6}$$

1.4.3 Natezna trdnost in kritični obremenitveni intenzivnostni faktor

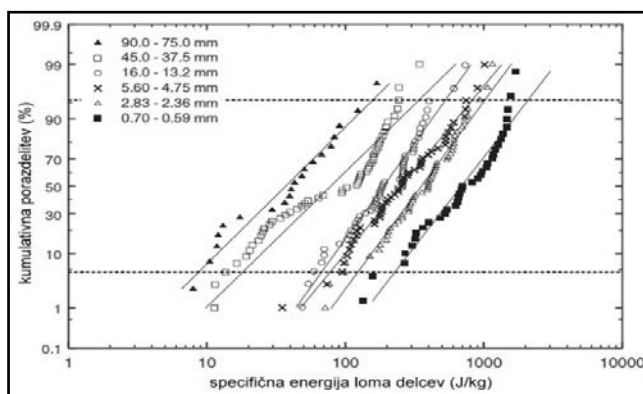
Natezna trdnost (angl. yield stress, σ_y) je mehanska lastnost materiala, definirana kot napetost, pri kateri pride do ireverzibilne plastične deformacije ali loma delca. Izračunamo jo lahko preko trdote materiala (H) in omejitvenega faktorja (ϕ) z uporabo Enačbe 7. Natezna trdnost je odvisna od temperature. Z nižanjem temperature se zmanjšuje gibljivost gradnikov in posledično povečuje natezna trdnost (17) (22) (26).

$$\sigma_y = \frac{H}{\phi} \quad \text{Enačba 7}$$

Kritični obremenitveni intenzivnostni faktor (angl. critical stress intensity factor, K_C) pa predstavlja odpornost materiala na rast razpok. Določanje K_C finih prahov je načeloma zelo težavno. Tehnika z uporabo nanoindenterja je uporabna le v primeru, če je v delcih, kljub velikosti, še vedno obstaja možnost nastanka razpok. Nekateri materiali se namreč močno deformirajo še preden pride do pokanja delcev, zato z nanoindenterjem pogosto ne pridemo v območje, kjer se začnejo pojavljati razpoke (17).

1.4.4 Velikost in morfologijadelcev

Velikost delcev vpliva na številne lastnosti materiala in karakteristike lomljenja. Porazdelitev energije loma delcev je močno odvisna od velikosti izhodnih delcev. Z zmanjšanjem delcev prihaja do premika specifične energije loma k višjim vrednostim (Slika 2). Podobne rezultate lahko opazimo tudi za trdnost delca (angl. particle strength). Porast trdnosti delca z manjšanjem velikosti delcev je signifikanten predvsem pri krhkih materialih in je posledica dejstva, da se v vsakem trdnem materialu pojavljajo nepravilnosti, pore in meje med zrnji. Posledica te strukturne nehomogenosti materiala se kaže v neelastičnih deformacijah in tvorbi razpok. Ker se število strukturnih nepravilnosti zmanjšuje sorazmerno z velikostjo delca, je za tvorbo razpoke potrebna višja obremenitev čim finejši je material, ki ga meljemo. Posledično je za mletje manjših delcev potrebno dovesti več energije (27).



Slika 2: Porazdelitve verjetnosti loma različno velikih delcev minerala sienita (27).

Na rezultate mletja pa lahko vpliva tudi sama morfologija delcev. Na primer, pri mletju učinkovine, ki kristalizira v obliki igličastih kristalov, pričakujemo le majhno povečanje skupne površine delcev v primerjavi z učinkovino, ki tvori heksagonalne kristale. Opazovanje teh fizikalnih lastnosti in njihovega vpliva na proces mletja nam lahko ponudi uporabne podatke za razvoj metode mletja (5).

1.5 Vpliv okolja na rezultat mletja

Okoljske vplive običajno povezujemo s temperaturo mletja, prisotnostjo vlage ter prisotnostjo površinsko aktivnih snovi. Popolno razumevanje vplivov posameznih dejavnikov je ponavadi nemogoče v tako kompleksnem procesu, kot je mletje. Za podrobnejše razumevanje procesa mletja je potrebno dejavnike ovrednotiti na mikro nivoju, to je enem samem delcu, ki je podvržen obremenitvi (angl. single particle impact test) (27).

1.6 Metode mletja

1.6.1 Vlažno mletje

Pri vlažnem mletju delce suspendiramo v tekočem mediju tako, da nastane nekakšna »brozga«. Zaradi večje toplotne prevodnosti tekočin je vlažno mletje bolj primerno za mletje učinkovin, občutljivih na povišano temperaturo. Zaradi velikih sil na delce lahko pride lokalno do precej visokih temperatur, kar lahko povzroči kemijski razpad, fazni prehod, prehod iz kristalne v amorfno obliko, tudi taljenje, če gre za učinkovino z nizkim tališčem. Ustrezno temperaturo lahko dosežemo s predhodnim ohlajevanjem zmesi in/ali z uporabo hladilnika na izhodu iz mlina. Vendar pa lahko izmenjavanje višjih in nižjih temperatur tekom mletja privede do »kalilnega učinka«, kar ima za posledico nastanek večjih delcev. Ta učinek je pomemben predvsem pri submikronskih velikostih delcev, pa tudi pri materialih, katerih topnost je močno odvisna od temperature, kadar le-ta ni ustrezno nadzorovana. Zmanjšanje delcev tekom mletja je odvisno od časa zadrževanja brozge v sistemu (4). Vlažno mletje se priporoča kot metoda izbora za mletje vnetljivih in eksplozivnih snovi ter učinkovin z močnim učinkom, kjer rokovanje s suho snovjo ni zaželeno (6) (28).

1.6.1.1 Mlini za vlažno mletje tipa rotor - stator

Mlini tega tipa se lahko, poleg mletja, uporabljajo tudi za pripravo emulzij in suspenzij, homogenizacijo, raztapljanje in izvedbo kemijskih reakcij. Do zmanjšanja velikosti delcev pride zaradi trkov med delci, med delci in steno posode, delovanja strižnih sil, turbulence in kavitacije, prevladujoči mehanizem pa je odvisen od vrste mlina. Na mehanizem zmanjšanja delcev vpliva tudi trdota in morfologija snovi, ki jo meljemo. Tako pri trdih substancah s kockastimi kristali pričakujemo, da bo prevladovala obraba pred lomljenjem in rezanjem. V to skupino prištevamo nazobčane linearne in koloidne mline (4) (5) (13) (29). Parametri, ki vplivajo na izid mletja, in njihovi vplivi so podani v Preglednici 3.

Ta metoda mletja je uporabna, kadar želimo končni produkt z zmerno specifično površino ($1-2\text{g/m}^2$) in velikostjo delcev do nekaj $10\mu\text{m}$, vendar pa sta široka porazdelitev velikosti delcev ali nezadostno zmanjšanje velikosti lahko pomanjkljivosti, zaradi katerih metoda za določene namene ni uporabna (4)

Preglednica 3: Parametri mletja in vpliv na povprečno velikost delcev (4).

Parameter mletja	Učinek na produkt mletja
Hitrost rotorja	Večja hitrost poveča hitrost mletja ter zmanjša velikost delcev
Razmik med rotorjem in statorjem	Manjši razmik poveča hitrost mletja ter zmanjša velikost delcev
Oblika rotorja in statorja, oblika zob	Predvsem na hitrost mletja, tudi na velikost delcev v ravnotežju
Temperatura	Povišana temperatura poveča dispergiranost delcev v mediju, a lahko zmanjša čistost produkta in povzroči raztapljanje manjših delcev.
Gostota brozge	Večja gostota poveča hitrost mletja, ponavadi pa ne vpliva na velikost delcev
Čas zadrževanja v mlinu (pretok skozi mlin)	Daljši čas mletja (manjši pretok) daje delce manjših velikosti

1.6.1.2 Kroglični mlini

Ta tip mlina se uporablja tako za vlažno kot suho mletje. Ločimo rotirajoče in vibrirajoče kroglične mline. Rotirajoči kroglični mlin in ima valjasto ali stožčasto komoro, ki je napolnjena z elementi za mletje, ki so lahko različnih velikosti, oblik in materialov. Elementi za mletje (polnilo) običajno zavzemajo med 30 in 50 odstotki prostornine komore. Pri vrtenju komore elementi mletja padajo na delce trdne snovi z različne višine, odvisno od hitrosti komore, in jih drobijo. Pri vibrirajočem krogličnem mlinu pa komora mlina vibrira v vertikalni smeri, zato elementi za mletje v njej poskakujejo in padajo na delce mletega materiala in jih tako zmanjšujejo (5) (28).

Na učinkovitost mletja ima velik vpliv izbira elementov za mletje. Po literaturnih podatkih so najbolj učinkoviti in največkrat uporabljeni elementi za mletje kroglaste oblike, velikosti od 0,2 - 130 mm, običajno do 6 mm, v uporabi pa so tudi kockasti in valjasti elementi. Materiali, ki se uporabljajo za izdelavo elementov za mletje, se razlikujejo po gostoti in so naštetih po padajočih gostotah: različne vrste jekla, ZrO_2 , $ZrSiO_4$, Al_2O_3 , SiO_2 , kaljeno steklo, politetrafluoroetilen (PTFE) in polistiren. Poleg tega na učinkovitost mletja vplivajo tudi hitrost vrtenja komore mlina, količina elementov za mletje, količina trdne snovi, čas mletja, koncentracija trdne snovi v mediju ter mehanske lastnosti snovi, ki jo meljemo (4) (30). Parametri, ki vplivajo na končno velikost delcev in njihovi vplivi so podani v Preglednici 4.

Metodo vlažnega mletja s krogličnim mlinom lahko nadgradimo z uporabo hladilne tekočine kot medija za mletje in na ta način izvedemo mletje pri izredno nizkih temperaturah, kar je uporabno za termolabilne učinkovine (5).

Preglednica 4: Parametri mletja in vpliv na velikost delcev pri mletju s krogličnim mlinom (4).

Parameter mletja	Učinek na velikost delcev
Velikost elementov za mletje	Manjša velikost elementov za polnjenje daje manjše delce
Gostota elementov za mletje	Večja gostota ne da vedno manjših delcev. V nekaterih primerih so z uporabo elementov večje gostote dobili bolj grobe delce
Delež elementov za mletje	Za zadostno učinkovitost mletja naj bi elementi mletja zavzemali vsaj 30 do 50 % prostornine komore
Hitrost vrtenja komore	Pri večjih hitrostih je učinkovitost mletja večja
Temperatura	Višja temperatura poveča dispergiranost delcev v mediju, a lahko zmanjša čistost produkta in povzroči raztapljanje manjših delcev.
Čas mletja	Po daljšem času mletja lahko dosežemo manjše delce

Težavo pogosto predstavlja odstranjevanje zmlete učinkovine iz zmesi za mletje ter kontaminacija produkta s težkimi kovinami, čemur je potrebno posvetiti posebno pozornost predvsem pri mletju snovi za parenteralno uporabo. Pri uporabi elementov za mletje iz natrijevega stekla lahko oksidi alkalijskih kovin prav tako prehajajo v zmes, kar predstavlja problem predvsem pri mletju snovi, ki so občutljive na povišan pH (4) (30).

S krogličnim mlinom za vlažno mletje lahko pripravimo delce povprečne velikosti 1-2 μm , pa vse do nanometrskih velikosti z uporabo ustreznih elementov za mletje ali različnih dodatkov v suspenzijo za mletje. Z uporabo te tehnike in elementi za mletje iz polistirena, prečno premeženega z divinilbenzenom, so Bruno in sodelavci pripravili delce s povprečno velikostjo 180 nm ter z opazno nižjo stopnjo kontaminacije s težkimi kovinami (30).

1.6.1.3 Hidrodinamični mlini

Še ena metoda, s katero lahko proizvedemo delce manjše od 1 μm , je tako imenovana homogenizacija. To dosežemo z iztiskanjem suspenzije pod visokim tlakom skozi majhno odprtino. Prihaja do izredno visokih strižnih obremenitev in kavitacije, kar povzroči zmanjševanje delcev, suspendiranih v mediju. Kavitacija je tvorba parnih mehurčkov, ko tlak v tekočini pade pod vrednost parnega tlaka, ter nadaljnja implozija le-teh zaradi višjega tlaka v okolici. Kavitacija ustvarja visoke lokalne temperature, turbulence in udarne valove, zaradi česar pride do zmanjšanja delcev. Z uporabo kavitacijskih mlinov

lahko delce zmanjšamo do velikost 4-6 μm , težavo pa lahko predstavlja dodaten korak mletja delcev, preden lahko uporabimo to tehniko, predvsem z vidika preprečevanja zamašitve naprave. Kljub temu pa predhodno mletje zmanjša skupni čas mletja (4) (13).

1.6.2 Suho mletje

Pri suhem mletju so delci v direktnem stiku z deli mlina ali pa jih nosi tok zraka ali inertnega plina. Do manjšanja velikosti delcev prihaja zaradi trkov delcev z deli mlina in delci med seboj. Ta način mletje se kljub nekaterim pomanjkljivostim pogosto uporablja v farmacevtski industriji. Pri mletju pogosto prihaja do zastajanja materiala v mlinu, kar vpliva na učinkovitost mletja, lahko pa pride do aglomeracije delcev zaradi elektrostatskega naboja, ustvarjenega med mletjem. Zaradi sproščene toplote lahko temperatura naraste tudi na 40 - 60 $^{\circ}\text{C}$, kar predstavlja dodatno omejitev, saj lahko pride do taljenja, termičnega razpada, amorfizacije, spremembe kristalne strukture ali oddajanja vezane kristalne vode. Že majhne količine amorfne snovi lahko povzročijo zaplete tekom mletja, saj lahko zamašijo reže za pretok plina ali dodajanje materiala. Za mletje snovi, ki so podvržene termičnemu razpadu ali fizikalnim spremembam, predstavlja možnost metoda kriomletja, kjer vhodno snov pred mletjem ohladimo z uporabo tekočega dušika, lahko pa se hladi plin, ki se uporablja za mletje (npr. v mlinih na zračni tok) (4) (15). Vrste mlinov za suho mletje so predstavljene v Preglednici 5.

Preglednica 5: Vrste mlinov za suho mletje glede na velikosti, ki jih lahko dosežemo, ter trdoto materiala, ki ga lahko meljemo (4).

Vrsta mlina	Najmanjša dosežena velikost (μm)	Primerno za trdote (Mohs-ova lestvica trdote)
Zobati mlin	10 - 50	do 3
Mlin kladivar	10 - 75	do 6
Mlin na zračni tok	2	do 10
Kroglični mlin	< 1	do 8

Pri suhem mletju nastaja tudi večja količina finega prahu, ki lahko predstavlja določeno tveganje pri rokovanju, saj so nekateri prahovi v ustrezni koncentraciji z zrakom eksplozivni. Pri podjetju Merck & Co. navajajo, da je pri 20 % učinkovin iz naključnega seta učinkovin, ki jih proizvajajo, minimalna energija vžiga (MIE, angl. minimal ignition energy) manjša ali enaka 10 mJ. MIE manjša od 20 mJ nakazuje, da že nizko energijski vir, npr. statična elektrika, lahko povzročijo eksplozijo. Večja količina prahov pa lahko

predstavlja tudi vpliv na okolje in zaposlene, zato je potrebno pri uporabi teh metod dodatno poskrbeti za ustrezno zaščito. Vprašanje o ustreznosti suhega mletja se pojavlja tudi pri mletju učinkovin z močnim učinkom (4) (15).

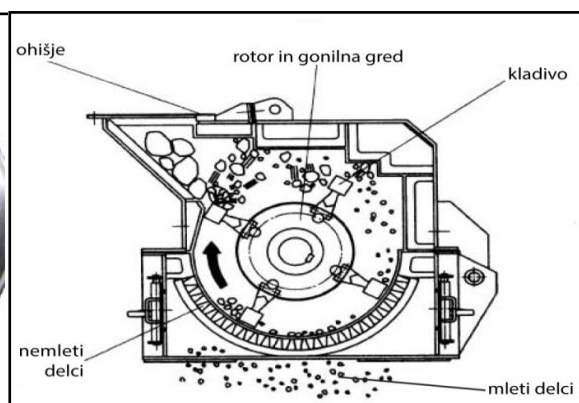
1.6.2.1 Mlini na udarec

Princip mletja v mlinih na udarec predstavlja udarjanje vrtečih delov mlina ob delce snovi ter udarjanje med delci. Na sliki 3 in 4 sta prikazana primera mlina na udarec. Pri **mlinu kladivarju** delci vstopajo v mlin na zgornji strani komore, kjer pridejo v stik z rotirajočimi kladivi, mleti delci pa se izločajo skozi mrežo v zbiralno posodo. Velikost delcev produkta je odvisna od velikosti reže na izstopni mreži, oblike rež, pretoka zraka ter od kota, pod katerim delci padajo na mrežo. Pri večji hitrosti kladiv padajo delci na mrežo pod večjim kotom, zato se z naraščanjem hitrosti velikost izločenih delcev zmanjšuje (4) (13).

Zobati mlin je sestavljen iz statične in rotirajoče plošče s konicami v večih izmeničnih obodih. Delce dodajamo v mlin skozi odprtino v sredini statorja, nato pa zaradi centrifugalne sile potujejo proti obodu. Na velikost izhodnih delcev vpliva hitrost vrtenja, hitrost dovajanja delcev ter pretok plina skozi mlin, ki vpliva na čas zadrževanja v mlinu. Manjše delce dosežemo pri višjih hitrostih vrtenja ter manjših hitrostih dovajanja delcev ter pretoku plina. Poseben tip je mlin z zračnim selektorjem (angl. air-classifying mill, mill with dynamic selector), kjer se za nadziranje velikosti izstopnih delcev uporablja tok plina, ki je speljan preko komore mlina in odnaša delce, ko postanejo ti zadosti majhni (4) (13).



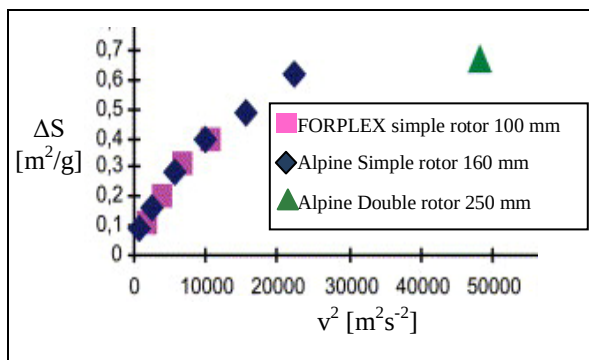
Slika 3: Primer zobatega mlina (31).



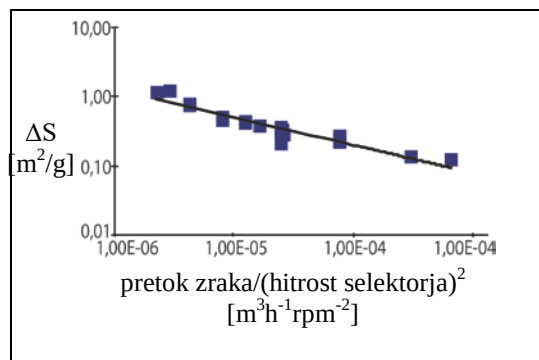
Slika 4: Shema mlina kladivarja (32).

Nakach M. in sodelavci so v raziskavi proučevali vpliv parametrov mletja na različnih tipih mlinov. Uporabili so tri različne zobate mline, mlin kladivar ter zobati mlin z dinamičnim selektorjem, ki ima na obodu mlina rotirajoči selektor, preko katerega lahko z zračnim tokom preidejo samo dovolj majhni delci. Za uporabljene zobate mline so pokazali, da je

sprememba specifične površine produkta linearno odvisna od kvadrata obodne hitrosti (Slika 5). V primeru zobatega mlina z zračnim selektorjem se je izkazalo, da ima obodna hitrost rotirajoče plošče malo, hitrost polnjenja pa praktično nima vpliva na kvaliteto produkta. Le-ta je odvisna predvsem od pretoka zraka skozi mlin in hitrosti zbiralnega obroča. Na Sliki 6 je prikazana sprememba specifične površine v odvisnosti od razmerja $\text{pretok zraka}/(\text{hitrost selektorja})^2$ v zobatem mlinu z dinamičnim selektorjem (33).



Slika 5: Novonastala specifična površina kot funkcija kvadrata obodne hitrosti za tri proučevane zobate mline (33).



Slika 6: Novonastala specifična površina kot funkcija pretoka zraka/(hitrost selektorja)² (33).

1.6.2.2 Mlini na zračni tok

Pri mletju na zračni tok (angl. air jet milling) se energija za zmanjševanje velikosti delcev prenaša preko hitro se gibajočega stisnjenega zraka ali inertnega plina, npr. dušika. Delci nemletega materiala v komoro mlina vstopajo zaradi podtlaka, ki ga ustvari hiter tok zraka. Osnovni mehanizem zmanjševanja velikosti delcev pri mlinih tega tipa je udarjanje delcev med seboj in ob steno komore mlina (34).

Mlin na zračni tok odlikuje hitro in učinkovito mletje, dosežemo pa lahko delce velikosti manjše od $10 \mu\text{m}$. Mlini na zračni tok na splošno omogočajo dobro kontrolo nad velikostjo delcev, so primerni za širok razpon trdot materialov, hkrati pa so konstrukcijsko relativno preprosti in energetsko učinkoviti (35) (36).

1.6.2.3 Valjčni mlini

Pri valjčnih mlinih prihaja do zmanjševanja velikosti delcev zaradi visokih tlačnih obremenitev, ki povzročijo nastanek majhnih razpok in posledično razpad na finejše delce. Ta tip mlina je primeren predvsem za mletje grobih frakcij, pogosto pa se uporablja kot predstopnja v sklopu z drugimi vrstami mlinov, pa tudi za homogenizacijo, npr. v proizvodnji poltrdnih farmacevtskih izdelkov (28).

2 NAMEN DELA

Diplomska naloga bo sestavljena iz dveh delov. V prvem delu bomo preverili vpliv temperature na izid mletja β -zaviralca karvedilola in različnih farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi. Uporabili bomo karvedilol ter pomožne snovi z različnimi fizikalni lastnostmi: glutarna kislina, fumarna kislina, sukcinjska kislina, oksalna kislina. Vzorce bomo mleli pri sobni temperaturi (25 °C) in pri nižji temperaturi (4 °C). Vse vzorce bomo mleli različno dolgo časa, in sicer 5 minut ter 60 minut v intervalih po 10 min, z zadosti dolgim premorom med posameznimi intervali v izogib pregrevanju zmesi za mletje.

V drugem delu bomo preverili vpliv različnih farmacevtsko sprejemljivih pomožnih snovi na mletje karvedilola. Te pomožne snovi bomo uporabili kot polnilo pri mletju karvedilola tako, da bomo polovico količine karvedilola zamenjali s pomožno snovjo. Vse zmesi bomo mleli pri isti temperaturi enako dolgo časa.

Vzorce bomo analizirali z elektronskim mikroskopom, z DSC kalorimetrom ter z metodo laserske difrakcije. Z elektronsko mikroskopijo bomo določili morfologijo delcev ter morebitne nepravilnosti in razpoke v kristalih. Z metodo DSC bomo preverili morebitne prehode iz amorfne v kristalno obliko in obratno, laserska difrakcija pa je hitra, enostavna in učinkovita metoda za določanje porazdelitve velikosti delcev. Vzorcem bomo izmerili tudi gostoto.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Preiskovani materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje spojine:

- karvedilol (Merck, Nemčija);
- glutarna kislina (Merck, Nemčija);
- fumarna kislina (Merck, Nemčija);
- sukcininska kislina (Sigma Aldrich Chemie, Nemčija);
- oksalna kislina (Kemika, Hrvaška).

3.1.2 Topila in pomožne snovi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednja topila in pomožne snovi:

- aceton (Panreac, Španija);
- heksan (Merck, Nemčija);
- prečiščena voda;
- Na-SDS (Merck, Nemčija);
- citroninska kislina, monohidrat (Pharmachem, Slovenija);
- maleinska kislina (Fluka, Nemčija);
- malonska kislina (Merck, Nemčija);
- vinska kislina (Lex, Slovenija);
- natrijev hidrogen karbonat (Lex, Slovenija);
- natrijev klorid (Lex, Slovenija).

3.1.3 Laboratorijski pribor in naprave

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednji laboratorijski pribor:

- steklovino (čase, merilne valje, epruvete, erlenmajerice);
- spatule;
- plastične kapalke;
- aceton v pršilki;
- škarje, ura;
- obojestranski ogljikov lepilni trak, 12 mm (Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija).

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje aparature:

- analizno tehtnico, AND GH-300 FC, A&D Instruments Ltd, Kanada;
- tehtnico Exacta 2200 EB, Železniki, Slovenija;
- analizno tehtnico Mettler Toledo AG 245, Švica;
- vibracijski kroglični mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija;
- helijev piknometar AccuPyc 1330, Micrometrics, ZDA;
- infrardeči termometer IR 1200-50D, Voltcraft, Nemčija;
- laserski difraktometer Malvern Mastersizer S, opremljen s programsko opremo Mastersizer S v2.19 in QSpec enoto za dispergiranje majhnih volumnov, Velika Britanija;
- osebni računalnik z nameščenim operacijskim sistemom Windows XP, povezan z laserskim difraktometrom;
- diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo, DSC 1 opremljen s programsko opremo STAR[®] software (Švica)
- magnetno mešalo RCT basic, IKA, Nemčija;
- vrstični elektronski mikroskop (SEM): FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija;
- ultrazvočno kadičko Sonis 2, Iskra Pio, Slovenija.

3.2 Karvedilol

3.2.1 Osnovni podatki

IUPAC ime: 1-(karbazol-4-iloksi)-3-[[2-(2-metoksifenoksi)etil]amino]-2-propanol

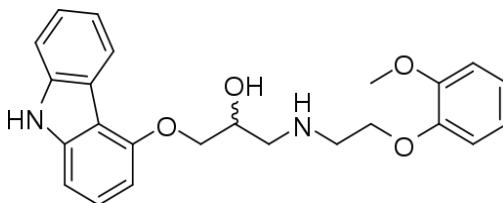
Molekulska formula: $C_{24}H_{26}N_2O_4$

Molekulska masa: 406,48 g/mol

ATC oznaka: C07AG02

Temperatura tališča: 114-115 °C (37)

Strukturna formula:



3.2.2 Delovanje in uporaba

Karvedilol spada med neselektivne adrenergične zaviralce z vazodilatacijskim učinkom; neselektivno zavira β -adrenergične receptorje ter selektivno α_1 -adrenergične receptorje. Ima tudi antioksidativne in antiproliferativne lastnosti. Kemijsko gledano je učinkovina karvedilol racemat, enantiomera se razlikujeta po učinkih in po presnovi. Enantiomer S(-) zavira tako β - kot α_1 -adrenergične receptorje, enantiomer R(+) pa zavira le α_1 -adrenergične receptorje. S kardioselektivnim zaviranjem β -receptorjev znižuje arterijski krvni tlak, zmanjšuje srčno frekvenco in minutni volumen srca in znižuje tlak v pljučni arteriji in desnem atriju. Z zaviranjem α_1 -receptorjev pa povzroča periferno vazodilatacijo in s tem zmanjša sistemski žilni upor. Zaradi teh učinkov razbremeni srčno mišico in preprečuje nastanek angine pectoris (38) (39).

Karvedilol se dobro absorbira iz prebavnega trakta, vendar se ga zaradi učinka prvega prehoda metabolizira kar 70%, predvsem s pomočjo jetrnih encimov CYP2D6 ter CYP2C9. Pri tem nastanejo tudi trije aktivni presnovki, ki zavirajo adrenergične receptorje beta; eden izmed njih (4'-hidroksifenilni derivat) kar 13-krat močnejše kot karvedilol. Aktivni presnovki delujejo v primerjavi s karvedilolom le šibko vazodilatacijsko. Presnova je stereoselektivna, zato je plazemska koncentracija karvedilola R(+) dva- do trikrat večja od karvedilola S(-). Plazemska koncentracija aktivnih presnovkov je približno 10-krat manjša od koncentracije karvedilola. Več kot 98% učinkovine je vezane na plazemske proteine. Biološki razpolovni čas učinkovine znaša 6 do 10 ur. Karvedilol vsebuje α -hidroksi sekundarno amsko skupino, katere pKa je 7,8. Topnost karvedilola v nevtralnem in alkalnem pH je razmeroma nizka, pri pH 9,0 znaša $<1 \mu\text{g/mL}$. (38) (39).

Karvedilol se uporablja za zdravljenje esencialne hipertenzije, kronične angine pectoris, kroničnega srčnega popuščanja. Uporablja se tudi za zdravljenje po miokardnem infarktu z dokazano disfunkcijo levega srčnega prekata. Priporočeni največji dnevni odmerek karvedilola je 2x25 mg (38) (39).

3.3 Metode

3.3.1 Priprava fizikalnih zmesi

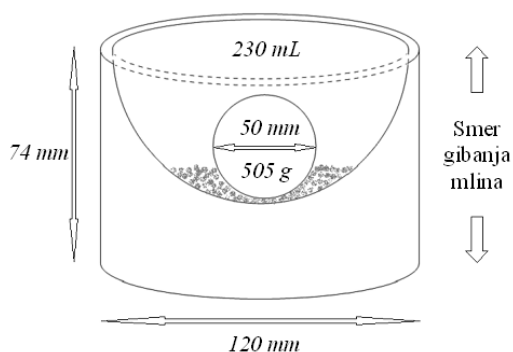
Binarne fizikalne zmesi smo pripravili tako, da smo analitsko tehtnic AND GH-300 FC, proizvajalca A&D Instruments Ltd (Kanada) zatehtali količino učinkovine in pomožne snovi v določenem razmerju ter jo nasuli v terilnico in homogeno premešali s plastično kartico.

3.3.2 Mletje

Shema vibrirajočega krogličnega mlina z eno kroglo je prikazana na Sliki 7. Mlin je sestavljen iz terilnice iz nerjavnega jekla s polkrožno odprtino za mletje s prostornino 230 mL ter 50 mm kroglice iz nerjavnega jekla z maso 505 g. Mlin je izdelan iz nerjavnega jekla z namenom minimizirati odstopanje delov mlina v vzorec med mletjem. Terilnica je s pokrovom pričvrščena na vibrirajočo ploščo vibracijskega stresalnika Pulverisettee 0 (Fritsch, Nemčija), (Slika 8), ki niha v vertikalni smeri. Zaradi nihanja kroglica v posodi poskakuje ter udarja ob delce na dnu posode, sproščena kinetična energija pa se porabi za zmanjšanje velikosti delcev, del pa se je sprosti v obliki toplote, ki se kaže v povišanju temperature vzorca med mletjem. Na začetku je zmanjšanje velikosti posledica udarjanja kroglice ob delce, kasneje pa zaradi drgnjenja delcev ob kroglo in dno možnarja. Material se zaradi vibracij tudi nenehno poseda in s tem premeša (40).

V poskusih, ki smo jih izvajali, smo uporabili po 2 grama čiste snovi oziroma 1 g KAR in 1 g pomožne snovi v binarnih zmesih. Vse vzorce smo mleli pri frekvenci 3.000 – 3.600 nihajev/min ter pri amplitudi 1 mm. Amplitudo stresanja oz. mletja smo določili s spomočjo 3 stopenjske vizualne skale. Vzorce smo mleli različno dolgo, in sicer 5 minut ter 60 minut v intervalih 6 krat 10 minut s 50 minutnim premorom z namenom preprečiti prekomerno segrevanje vzorca. Temperaturo med mletjem smo spremljali z infrardečim brezkontaktnim termometrom IR 1200-50D, proizvajalca Voltcraft (Nemčija), in ni nikoli preseгла 30 °C med mletjem pri sobni temperaturi in 9 °C med mletjem pri nižji temperaturi. Pred mletjem pri nižji temperaturi smo vzorec, možnar, kroglico za mletje ter pokrov mlina v hladni sobi ohladili na 4 °C.

Drugo serijo vzorcev pa smo mleli 5 minut pri temperaturi 25 °C.



Slika 7: Shematski prikaz možnarja krogličnega mlina.



Slika 8: Vibracijski kroglični mlin Pulverisette 0 Fritsch (15).

3.3.3 Določanje prave gostote s helijevim piknometrom

V kalibrirano aluminijasto celico helijevega piknometra AccuPyc 1330, proizvajalca Micrometrics (ZDA), smo zatehtali med 1,000 in 2,000 g vzorca in izvedli meritve. Med posameznimi meritvami smo celico za vzorec temeljito sprali z demineralizirano vodo ter acetonom, do suhega posušili s sušilnikom na vroči zrak in ohladili na sobno temperaturo. Piknometar med vsaki meritvijo izvede tri ponovitve in poda rezultat kot povprečje treh meritev. Za vsak vzorec smo izvedli dve paralelni meritvi.

3.3.4 Določanje porazdelitve velikosti delcev z lasersko difrakcijo

Po mletju vsakega vzorca smo določili porazdelitev velikosti delcev z uporabo laserskega difraktometra Malvern Mastersizer S s QS enoto za dispergiranje (Malvern Instruments, UK). Ker so vse pomožne snovi vsaj delno topne v vodi, smo kot tekočino za dispergiranje uporabili n-heksan za vse čiste spojine, ter prečiščeno vodo za karvedilol in binarne zmesi. Na ta način se pomožna snov raztopi v vodi in določimo lahko velikostno porazdelitev delcev karvedilola. Za noževno konico vzorca smo v ultrazvočni kadički Sonis 2, proizvajalca Iskra Pio (Slovenija), dispergirali v ustreznem mediju ter vnesli v enoto za dispergiranje do nasičenja laserja med 10 in 20%. Meritve smo izvedli pri hitrosti vrtenja mešala 1400 obratov na minuto. Pri meritvah smo določali velikost, pod katero leži 10% vzorca (d_{10}), 50% (d_{50}) in 90% (d_{90}) ter povprečno velikost (d_{pov}). Vse parametre smo za vsak vzorec določili trikrat. Lomni količniki proučevanih snovi in ostali parametri meritev so podani v Preglednici 6.

Preglednica 6: Lomni količniki uporabljenih materialov ter parametri meritev.

Material	RI	Medij	Parametri meritve (RI_{vzorca} ; $RI_{\text{navidezni}}$; RI_{medija})
Voda	1,3290 (41)		
n-heksan	1,3840 (42)		
karvedilol	1,6570 (43)	voda/n-heksan	1,657; 0,1000; 1,330/1,380
glutarna kislina	1,4770 (44)	n-heksan	1,477; 0,1000; 1,380
fumarna kislina	1,5260 (45)	n-heksan	1,526; 0,1000; 1,380
sukcinska kislina	1,4780 (46)	n-heksan	1,478; 0,1000; 1,380
oksalna kislina	1,4800 (47)	n-heksan	1,480; 0,1000; 1,380
citronska kislina	1,5750 (48)	voda	1,657; 0,1000; 1,330
maleinska kislina	1,5260 (49)	voda	1,657; 0,1000; 1,330
malonska kislina	1,4790 (50)	voda	1,657; 0,1000; 1,330
(±)-vinska kislina	1,5860 (51)	voda	1,657; 0,1000; 1,330
NaHCO ₃	1,5000 (52)	voda	1,657; 0,1000; 1,330
NaCl	1,5400 (53)	voda	1,657; 0,1000; 1,330

3.3.5 Vrstična elektronska mikroskopija

Vzorci smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM, angl. Scanning Electron Microscope). Praškaste delce smoprilepili na obojestranski ogljikov lepilni trak (12 mm, Oxon, Oxford instruments, UK). Slike smo posneli na sistemu Supra 32VP (Zeiss, Oberkochen, Nemčija) s pospeševalno hitrostjo 1,0 kV in sekundarnim detektorjem na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.3.6 DSC termična analiza

DSC krivuljesmo izdelali z instrumentom Mettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1, opremljenim s programsko opremo STARe Software v9.30. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi, pretok dušika je znašal 40 ml/min. Hitrost segrevanja ja znašala 3 K/min.

4 REZULTATI

4.1 Ponovljivost mletja in določanja velikosti delcev

4.1.1 Ponovljivost merjenja porazdelitve velikosti delcev z lasersko difrakcijo

Preglednica 7: Primerjava porazdelitve velikost delcev karvedilola, mletega 5 minut pri 25 °C, glede na uporabo ultrazvoka ter medija za dispergiranje.

Medij	Ultrazvok		d_{pov} (μm)	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)
nasičen heksan	brez	povprečje (μm)	511,80	202,44	543,29	751,02
		SD (μm)	±36,86	±75,93	±43,61	±28,70
		RSD (%)	±7,2	±37,51	±8,03	±3,82
nenasičen heksan	brez	povprečje (μm)	408,15	81,48	437,24	711,54
		SD (μm)	±190,87	±98,44	±263,77	±154,47
		RSD (%)	±46,77	±120,82	±60,33	±21,71
nasičen heksan	5 min	povprečje (μm)	294,53	10,14	292,16	595,41
		SD (μm)	±152,66	±9,05	±210,02	±218,02
		RSD (%)	±51,83	±89,26	±71,88	±36,62
nenasičen heksan	5 min	povprečje (μm)	142,60	8,22	108,03	333,13
		SD (μm)	±5,71	±0,74	±1,93	±17,97
		RSD (%)	±4,00	±9,06	±1,79	±5,39

Izbor netopila kot medija za dispergiranje igra pri določanju velikosti delcev z lasersko difrakcijo pomembno vlogo, prav tako odločitev za uporabo ultrazvoka za dispergiranje delcev. Razutalti meritev so prikazani v Preglednici 7. Določili smo d_{pov} , d_{10} , d_{50} in d_{90} vrednosti delcev KAR, mletega 5 minut pri 25 °C. Kot netopilo smo enkrat uporabili n-heksan, drugič pa n-heksan, nasičen s KAR, z in brez uporabe ultrazvočne kadičke, v kateri smo vzorce dispergirali. Z uporabo ultrazvoka smo ne glede na medij določili nižje vrednosti za vse določevane parametre, kar je bilo pričakovano, saj z ultrazvokom razdremo aglomerate, ki so nastali med mletjem. Z uporabo nasičenega heksana smo v obeh primerih izmerili višje vrednosti za vse določevane parametre. Vzrok lahko leži v spremenjenem refrakcijskem indeksu s KAR nasičenega netopila ali pa je tekom meritve prišlo do obarjanja raztopljenega KAR na merjene delce. Najbolj ponovljive rezultate daje kombinacija nenasičenega n-heksana in 5 minutne uporabo ultrazvoka, zato smo to tehniko uporabili za vse preostale meritve.

Preglednica 8: Porazdelitev velikosti delcev izhodnega karvedilola ter karvedilola, mletega 5 in 10 minut pri 25 °C, merjeno v vodi, z uporabo Na-SDS.

Čas mletja (min)	Ponovitev	d_{pov} (μm)	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)
0	1	62,56	10,52	57,62	118,36
	2	66,63	9,39	48,54	118,32
	3	61,30	8,93	50,96	124,77
	SD (μm)	±2,79	±0,82	±4,70	±3,71
	RSD (%)	±4,39%	±8,51%	±8,98%	±3,08%
5	1	51,20	0,46	47,63	97,43
	2	52,61	0,43	49,47	99,43
	3	48,30	0,45	45,51	93,29
	SD (μm)	±2,20	±0,02	±1,98	±3,13
	RSD (%)	±4,33%	±3,42%	±4,17%	±3,24%
10	1	38,09	0,31	31,43	86,50
	2	38,69	0,32	32,10	86,62
	3	37,86	0,32	32,35	83,05
	SD (μm)	±0,43	±0,01	±0,48	±2,03
	RSD (%)	±1,12%	±1,82%	±1,49%	±2,37%

Za zagotovitev ponovljivosti določanja porazdelitve velikosti delcev z lasersko difrakcijo, kjer smo kot netopilo uporabili vodo, smo trem vzorcem (izhodni karvedilol ter karvedilol mlet 5 oz. 10 minut pri enakih pogojih pri 25 °C in enaki amplitudi stresanja mlina) določili d_{pov} , d_{10} , d_{50} in d_{90} . Povzetek teh meritev skupaj s standardnim odklonom in relativnim standardnim odklonom je podan v Preglednici 8. Ponovljivost meritev, izražena s standardnim odklonom, je primerljiva z rezultati meritev, ki so jih izvedli Kwan in sodelavci (5).

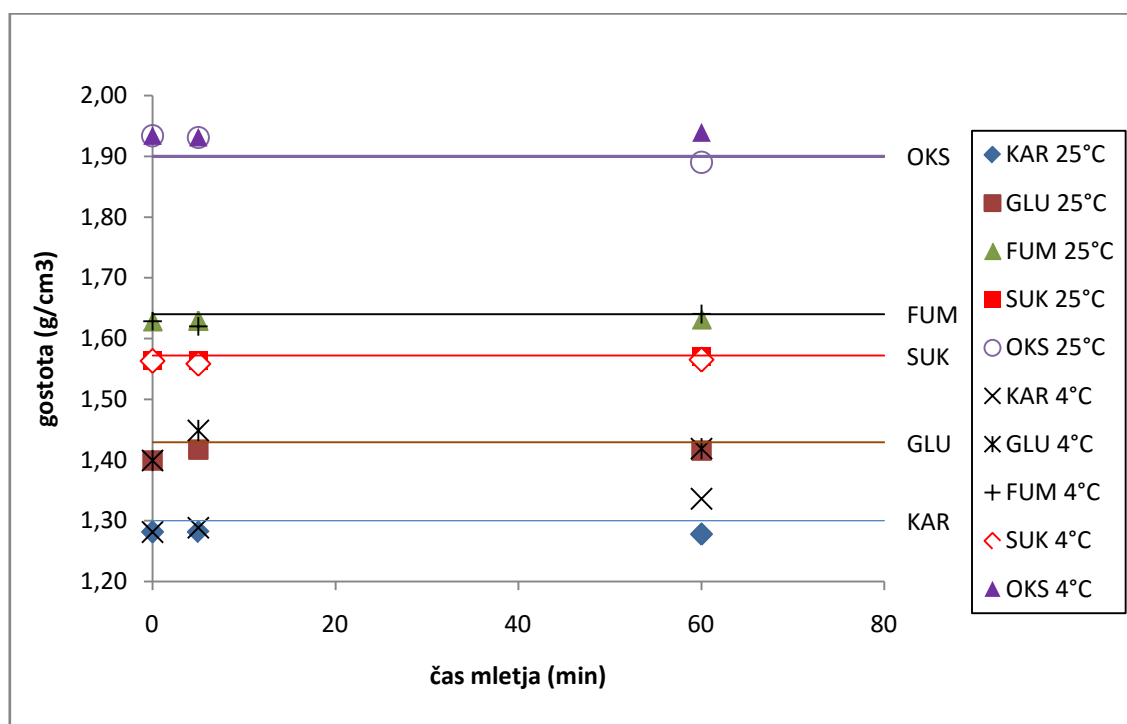
4.1.2 Ponovljivost mletja

Preglednica 9: Porazdelitev velikosti delcev treh vzorcev karvedilola, mletega 5 minut pri 25°C.

Ponovitev	d_{pov} (μm)	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)
1	38,85	0,37	33,73	82,31
2	40,53	0,39	38,32	78,76
3	41,24	0,36	39,71	79,90
SD (μm)	±1,23	±0,02	±3,13	±1,81
RSD (%)	±3,06%	±4,29%	±8,39%	±2,26%

Za zagotovitev ponovljivosti poizkusov mletja smo tri vzorce karvedilola mleli 5 minut pri enakih pogojih pri 25 °C in enaki amplitudi stresanja mlina. Določili smo d_{pov} , d_{10} , d_{50} in d_{90} . Povzetek teh meritev skupaj s standardnim odklonom ter relativnim standardnim odklonom je podan v Preglednici 9. Do primerljivih rezultatov glede ponovljivosti mletja mikrokristalne celuloze v oscilacijskem mlinu je prišel Kwan v svoji raziskavi.

4.2 Določanje gostote čistih spojin s helijevim piknometrom

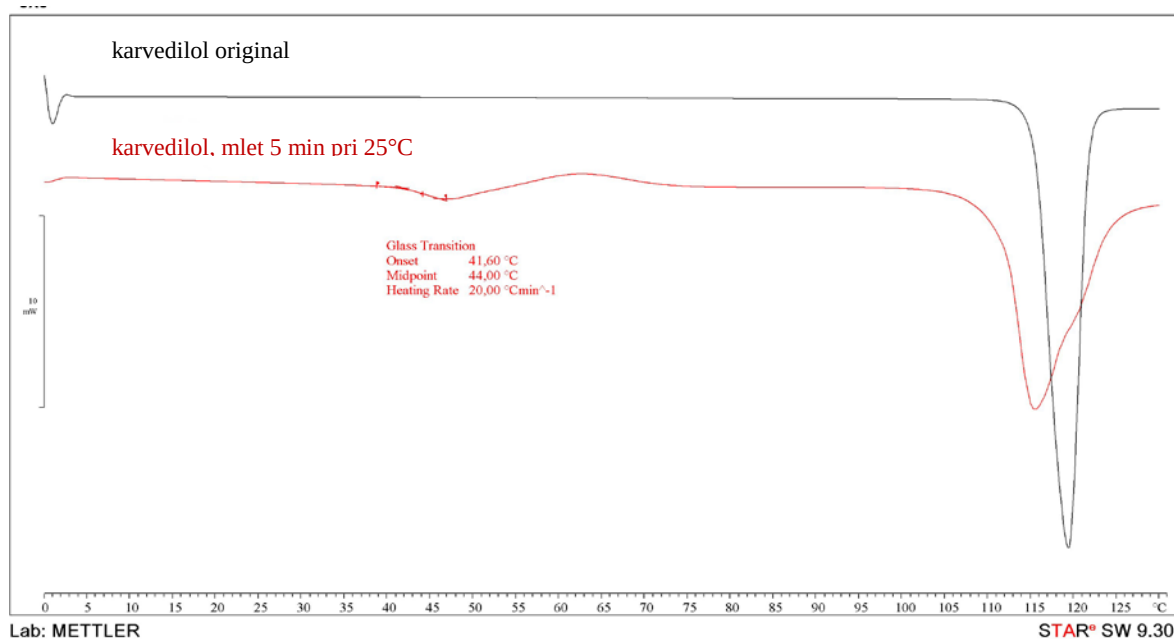


Slika 9: Gostote karevedilola, glutarne kisline, sukcininske kisline, fumarne kisline ter oksalne kisline, v odvisnosti od časa in temperature mletja.

Z določanjem prave gostote vzorcev s helijevim piknometrom smo želeli ugotoviti, ali prihaja tekom procesa mletja do sprememb, ki vplivajo na pravo gostoto snovi. Tekom procesa mletja namreč lahko prihaja do sprememb v kristalni strukturi (amorfizacije vzorca, oddajanja kristalno vezane vode, desorpcije vode iz hidratov...), kar lahko vodi do spremembe gostote. Cao v svoji raziskavi poroča o spremembi prave gostote med kristaliničnim in amorfnim materialom po z mletjem inducirani amorfizaciji (54).

Določili smo pravo gostoto izhodnim vzorcem, ter vzorcem, mletih 5 oziroma 60 min pri 25 °C in 4 °C. Omenjenih vzorcev na podlagi izmerjenih gostot nismo mogli ločevati med seboj. Pokazali smo, da, v kolikor prihaja tekom procesa mletja do sprememb v strukturi delcev, se te spremembe ne odražajo v pravi gostoti (Slika 9). Vodoravne črte predstavljajo literaturne podatke o gostotah preiskovanih snovi (55)(56)(57)(58)(59)(60)(61)(62)(63)(64). Manjše odstopanje opazimo pri meritvi gostote KAR, mletega 60 min pri 4 °C, vendar lahko to odstopanje pripišemo napaki merjenja.

4.3 Termična analiza karvedilola



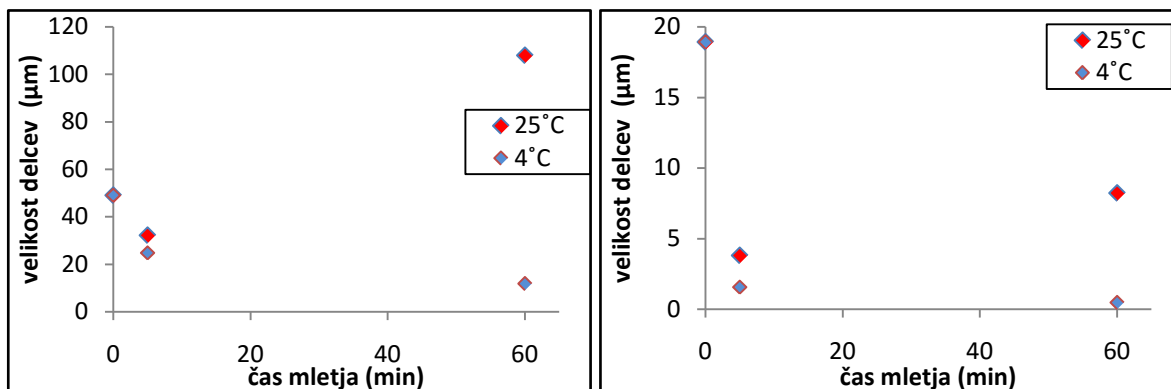
Slika 10: DSC krivulji izhodnega karvedilola ter karvedilola, mletega 5 minut pri 25 °C.

S termično analizo smo želeli ugotoviti, ali pri mletju karvedilola prihaja do sprememb, ki bi lahko vplivale na obnašanje te učinkovine tekom mletja ter na sam rezultat mletja (na primer amorfizacija, polimorfizem). Rezultati analize izhodnega karvedilola ter karvedilova, mletega 5 minut pri 25 °C, so prikazani na Slika 10. Pri izhodnem karvedilolu zaznamo tališče pri 115 °C. Pri mletem karvedilolu zaznamo pri temperaturi 44 °C blag dvig bazne linije, ki označuje temperaturo steklastega prehoda, ter eksotermen vrh pri 60 °C, ki nakazuje na spontano rekristalizacijo karvedilola. Tališče mletega karvedilola zaznamo pri 112 °C. Literaturni podatki sicer navajajo tališče karvedilola pri temperaturi med 114-115 °C.

Temperatura steklastega prehoda pri karvedilolu je relativno nizka, zato lahko hitro pride do rekristalizacije. Termična analiza je pokazala, da lahko z mletjem nastaja amorfen karvedilol, ki pa se v kratkem času zaradi nizke temperature steklastega prehoda spontano pretvori v kristalno obliko.

4.4 Določanje porazdelitve velikosti delcev karvedilola, mletega pri različnih temperaturah

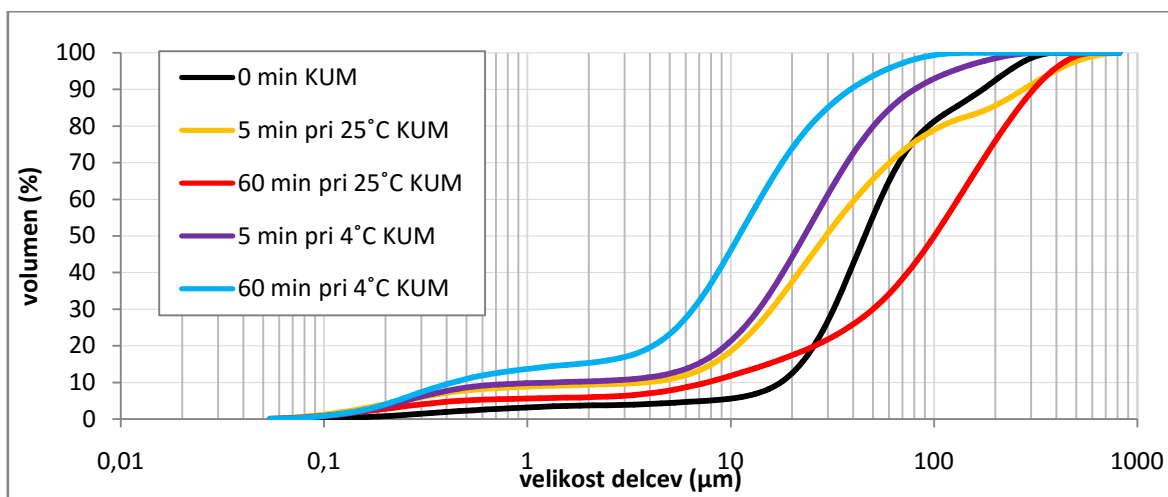
4.4.1 Analiza z lasersko difrakcijo



Slika 11: Vrednost d_{50} (levo) in d_{10} (desno) KAR, mletega pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu.

Velikost delcev in s tem neposredno povezana površina je bistvenega pomena za raztapljanje učinkovine. Z lasersko difrakcijo smo proučevali velikosti delcev karvedilola v odvisnosti od časa mletja in temperature med mletjem. Beležili smo d_{50} , d_{10} , d_{90} , povprečno velikost delcev ter porazdelitev velikosti delcev karvedilola. d_{50} predstavlja velikost delca, od katerega je polovico delcev manjših (mediana), d_{10} velikost delca, od katerega je manjših 10% delcev, ter d_{90} velikost, ki zajame 90% vseh delcev.

Slika 11 prikazuje vrednosti mediane in d_{10} izhodnega karvedilola, ter karvedilola, mletega 5 oziroma 60 minut pri 25 °C in 4 °C. Pri nižji temperaturi smo tako izmerili nižje vrednosti obeh parametrov, kar pomeni, je daje mletje pri nižji temperaturi manjše delce in je bolj učinkovito glede na vloženo energijo. Z nižanjem temperature prihaja do zmanjšanja elastičnosti materiala in posledično zmanjšanja porabe energije za elastične deformacije, ta energija pa se lahko porabi za deformacije delcev, ki vodijo v zmanjšanje velikosti delcev. Po 60 minutah mletja pri višji temperaturi pa smo dobili delce, katerih povprečna velikost je večja od izhodnih. Iz tega ter dejstva, da smo pri nižji temperaturi po 60 minutah mletja dobili pričakovano manjše delce, lahko sklepamo, da prihaja do povečanja velikosti delcev s podaljševanjem časom mletja pri 25 °C zaradi taljenja vzorca. Med mletjem prihaja zaradi dovajanja mehanske energije do sproščanja toplote, tako da lahko temperatura na mikro nivoju preseže tališče in prihaja do aglomeracije.



Slika 12: Porazdelitev velikosti KAR pred in po mletju pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu (KUM - kumulativne porazdelitvene frekvence).

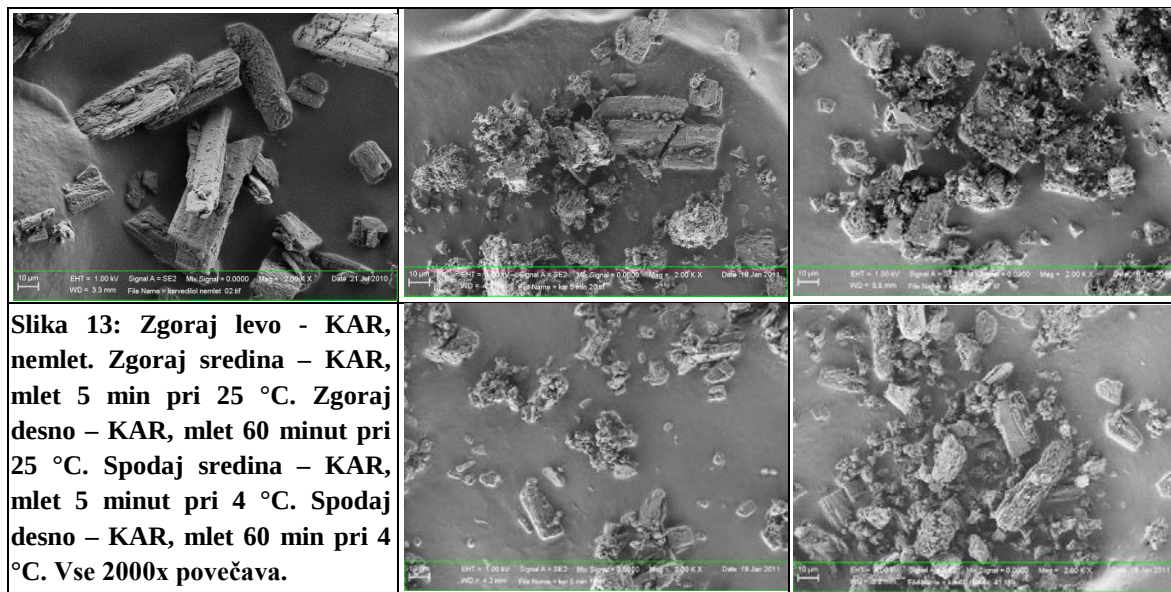
Na Sliki 12 je prikazana porazdelitev velikosti delcev karvedilola v odvisnosti od časa mletja ter temperature mletja. Podatki kažejo, da prihaja pri mletju pri nižji temperaturi do relativno enakomernega zmanjševanja delcev vseh frakcij. Po 5 minutah mletja smo pri vseh vzorcih dobili podoben odstotek delcev, manjših od 10 μm, vendar pa lahko pri višji temperaturi mletja glede na nemleto učinkovino opazimo porast deleža delcev, večjih od 90 μm. Po 60 minutah mletja lahko opazimo rahlo povečanje delcev, manjših od 20 μm ter hkrati izrazit premik v smeri večjih delcev, iz česar lahko sklepamo, da je povečanje povprečne velikosti delcev odgovoren proces aglomeracije predvsem večjih delcev.

4.4.2 Optična analiza z elektronskim mikroskopom

Slika 13 prikazuje delce KAR, mletega različno dolgo časa pri različnih temperaturah. Delci izhodnega KAR so nepravilnih oblik, z zaobljenimi robovi, velikosti večinoma med 30 in 50 μm. Na površini velikih delcev vidimo adherirane delce nanometrskih velikosti. Med delci KAR, mletega 5 min pri 25 °C, opazimo delce s porozno površino, ki so zlepljeni v večje skupke. Pri KAR, mletem 5 minut pri 4 °C, pa vidimo večinoma delce v velikosti 10 in 20 μm ter manj poroznih delcev. Po 60 minutah mletja pri 25 °C dobimo velike porozne delce, ki so združeni v večje agregate, velikosti preko 100 μm. Prav tako vidimo porozne delce pri KAR, mletem 60 minut pri 4 °C, le da v tem primeru delci niso povezani v agregate.

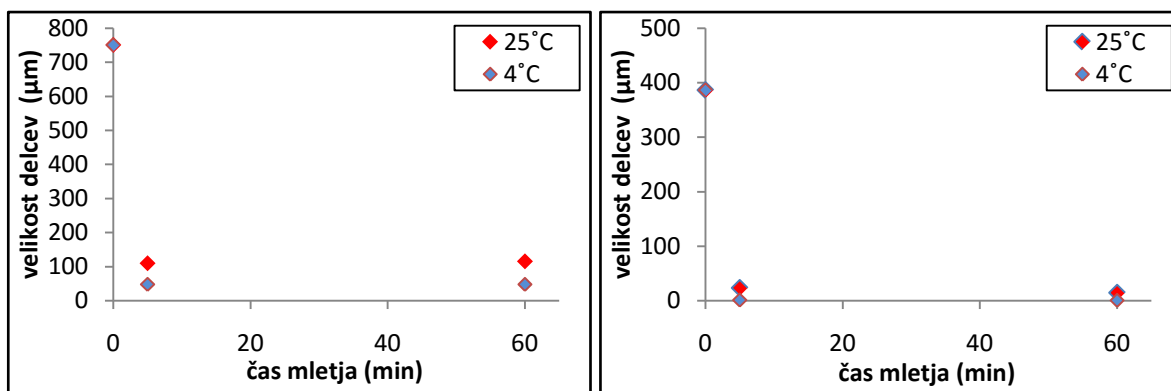
Delci karvedilola so kvadrastih oblik, zaradi česar lahko pričakujemo, da z zmanjšanjem velikosti delcev bistveno povečamo površino in s tem pospešimo raztapljanje. Prav tako je opazna sprememba površine delcev med mletjem. Porozni delci imajo večjo površino od

delcev primerljive velikosti z gladko površino. Ta sprememba morfologije delcev prav tako lahko vpliva na izboljšano raztapljanje.



4.5 Določanje porazdelitve velikosti delcev glutarne kisline, mlete pri različnih temperaturah

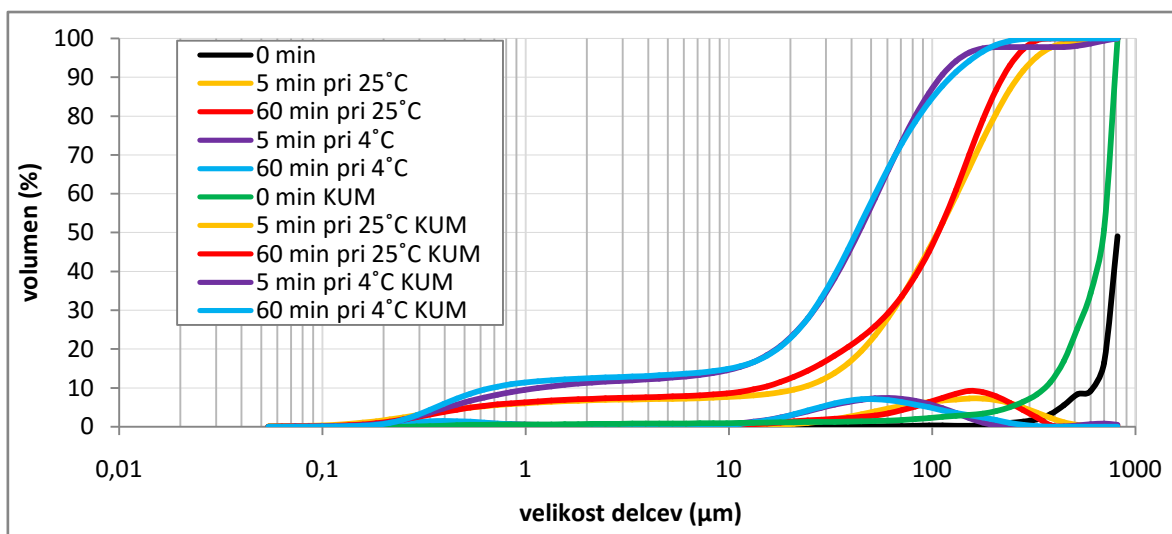
4.5.1 Analiza z lasersko difrakcijo



Slika 14: Vrednost d_{50} (levo) in d_{10} (desno) GLU, mlete pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu.

Na Sliki 14 vidimo rezultate meritev velikosti delcev izhodne glutarne kisline, predstavljeno kot d_{50} in d_{10} , ter glutarne kisline, mlete 5 oziroma 60 minut pri 25 °C in 4 °C. V obeh primerih smo, glede na merjene parametre, dosegli končno velikost delcev že po petih minutah mletja. Pri nižji temperaturi smo obakrat izmerili nižje vrednosti obeh parametrov, kar potrjuje dosedajšnje ugotovitve, da lahko pri nižji temperaturi z enakim energijskim vložkom dobimo manjše delce, hkrati pa rezultati kažejo, da lahko z nižanjem temperature

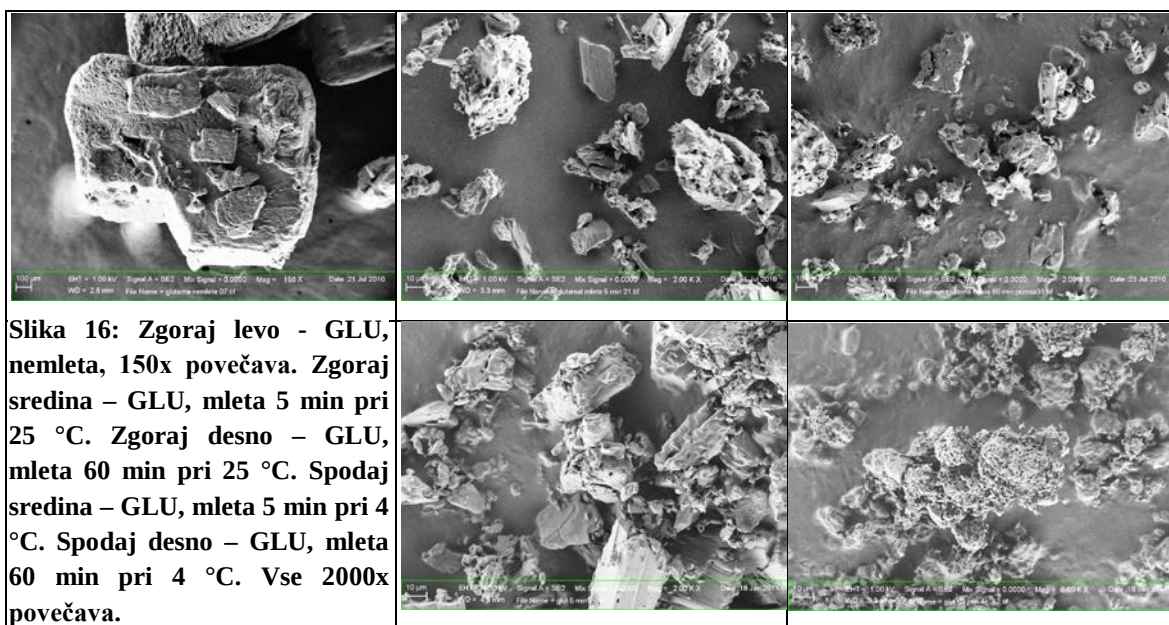
med mletjem dosežemo velikosti delcev, ki jih ne moremo pridobiti s podaljševanjem časa mletja pri višji temperaturi.



Slika 15: Porazdelitev velikosti delcev GLU pred in po mletju pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu (KUM - kumulativne porazdelitvene frekvence).

Iz Slike 15 je razvidno, da je večina delcev izhodne snovi večjih od 600 μm . Po 5 minutah mletja pri nižji temperaturi smo že dosegli limito mletja, pri visoki temperaturi pa smo po 60-ih minutah mletja dobili večji odstotek frakcije med 10 in 60 μm ter malenkostno manjše delce v razredu nad 150 μm . Odstotek delcev, manjših od 10 μm , je po mletju pri nižji temperaturi bistveno večji.

4.5.2 Optična analiza z elektronskim mikroskopom



Slika 16: Zgoraj levo - GLU, nemleta, 150x povečava. Zgoraj sredina - GLU, mleta 5 min pri 25 °C. Zgoraj desno - GLU, mleta 60 min pri 25 °C. Spodaj sredina - GLU, mleta 5 min pri 4 °C. Spodaj desno - GLU, mleta 60 min pri 4 °C. Vse 2000x povečava.

Slika 16 prikazuje delce izhodne glutarne kisline, ter glutarne kisline, mlete 5 in 60 minut pri različnih temperaturah. Delci izhodne glutarne kisline so nepravilnih oblik, z ostrimi robovi, velikosti večinoma nad 300 μm . Na površini velikih delcev vidimo adherirane manjše delce.

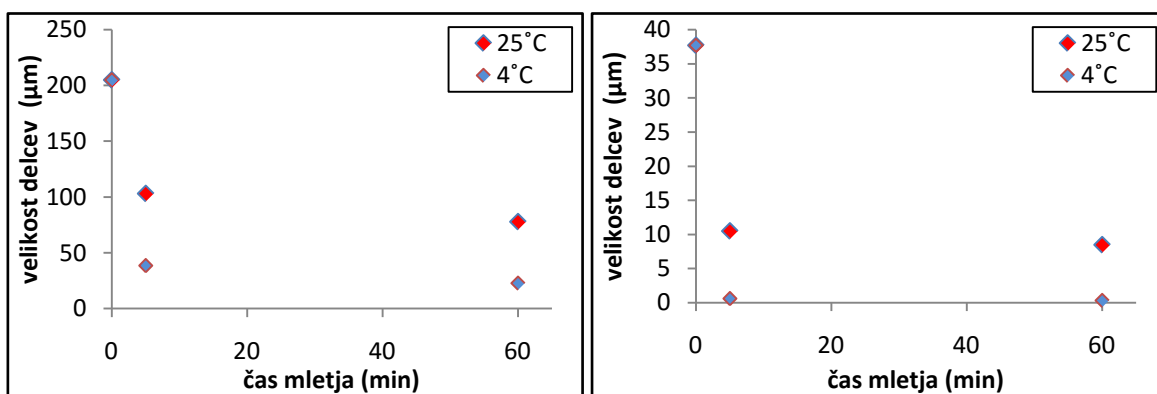
V vseh vzorcih mlete GLU opazimo porozne delce, ki jih v izhodni spojini nismo zaznali. Delež poroznih delcev narašča s časom trajanja mletja. Prav tako opazimo večji delež poroznih delcev v vzorcih, mletih pri nižji temperaturi. Iz tega lahko sklepamo, da je do spremembe površine prišlo preko taljenja, saj prihaja zaradi nižje temperature sistema do taljenja le na površini delcev. Zato tudi težje pride do aglomeracije, kar se kaže v manjših delcih, pridobljenih pri nižji temperaturi..

Limito mletja glutarne kisline smo dosegli že po 5-ih minutah mletja, vsa nadalje dovedena mehanska energija pa ima za posledico spremembo površine delcev glutarne kisline.

Za dokončno potrditev te domneve bi bilo potrebno narediti primerjalno DSC analizo med izhodno snovjo ter mletimi vzorci.

4.6 Določanje porazdelitve velikosti delcev fumarne kisline, mlete pri različnih temperaturah

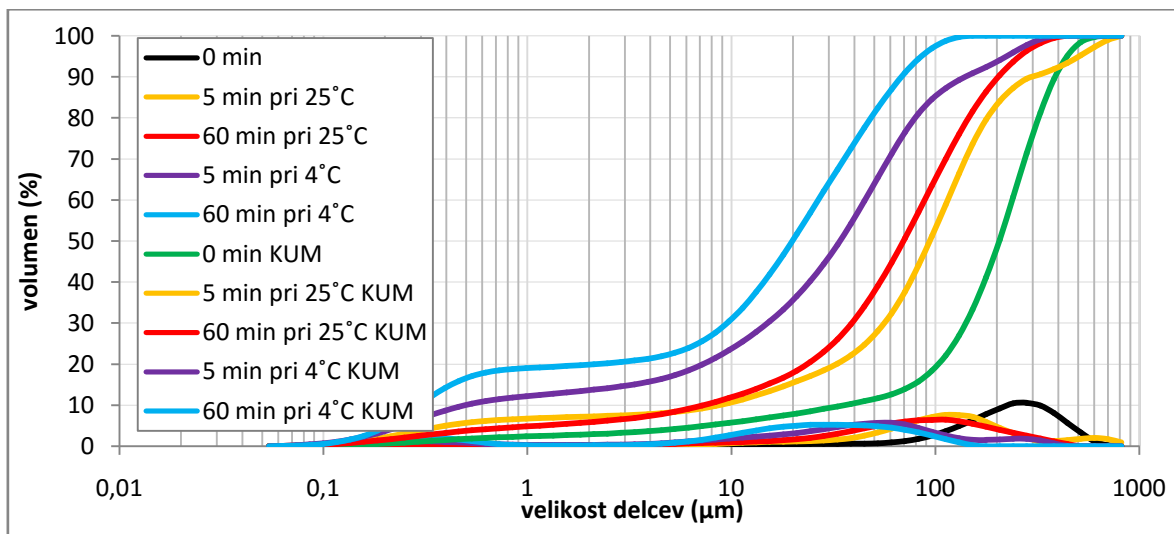
4.6.1 Analiza z lasersko difrakcijo



Slika 17: Vrednost d_{50} (levo) in d_{10} (desno) FUM, mlete pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu.

Slika 17 predstavlja rezultate analize velikosti delcev fumarne kisline z laserskim difraktometrom. Opazimo lahko, da smo končno vrednost d_{10} praktično dosegli že po petih minutah mletja, medtem ko se je vrednost d_{50} še zmanjševala tekom 60 minutnega mletja. Zaradi dejstva, da je za mletje manjših delcev potrebno dovesti več energije kot za mletje večjih, bi sklepali, da bo najprej prišlo do zmanjšanja večjih delcev.

Pri manjših delcih smo dosegli limito mletja v krajšem času kot pri večjih. Na podlagi teh rezultatov pa lahko sklepamo, da je FUM relativno mehka snov, kjer je energija, potrebna za začetek loma, v povprečju manjša kot pri GLU.



Slika 18: Porazdelitev velikosti delcev FUM pred in po mletju pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu (KUM - kumulativne porazdelitvene frekvence).

Rezultati meritev porazdelitve velikosti delcev fumarne kisline z laserko difrakcijo so prikazani na Sliki 18. Ponovno opazimo, da smo pri nižji temperaturi dosegli znatno manjše delce. Pri mletju pri 25 °C smo dobili v obeh primerih podoben delež delcev, manjših od 10 μm , pri 4 °C pa se je delež te frakcije povečeval tudi po prvih petih minutah mletja.

Pri manjših delcih smo dosegli limito mletja v krajšem času kot pri večjih. Na podlagi teh rezultatov pa lahko sklepamo, da je FUM relativno mehka snov, kjer je energija, potrebna za začetek loma, v povprečju manjša kot pri GLU.

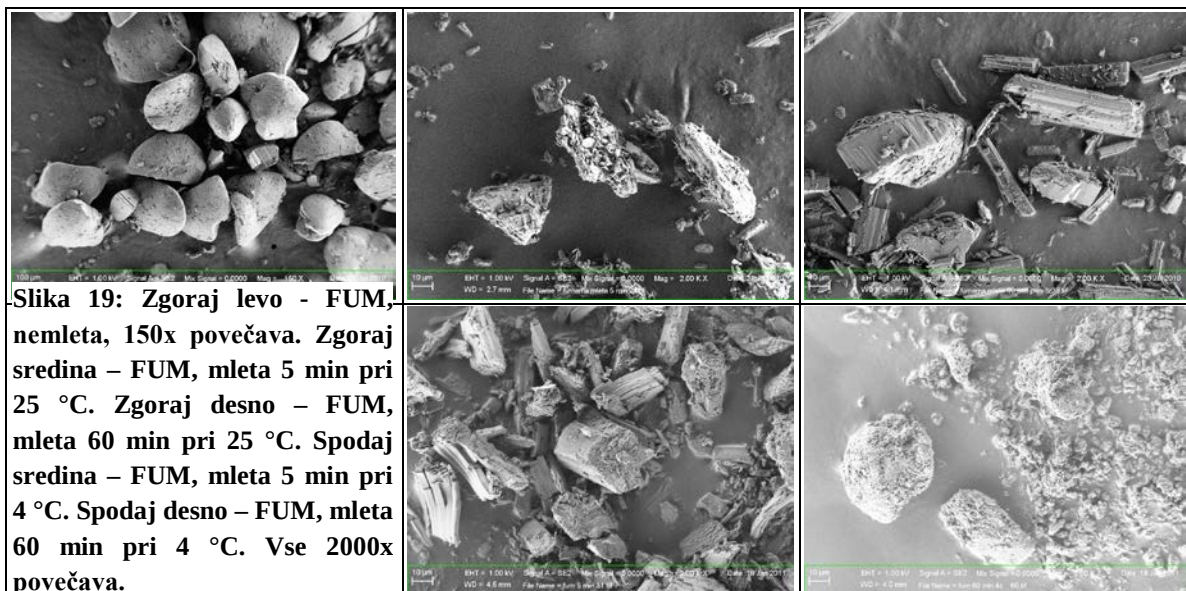
Pri obeh vzorcih mletih 60 minut lahko opazimo rahlo odstopanje od normalne razporeditve velikosti delcev v območju nad 200 μm (25 °C) oz 100 μm (4 °C). Iz tega lahko sklepamo na aglomeracijo večjih delcev.

4.6.2 Optična analiza z elektronskim mikroskopom

Na Sliki 19 prikazuje delce izhodne fumarne kisline, ter fumarne kisline, mlete 5 in 60 minut pri 25 °C in 4 °C. Delci nemlete fumarne kisline so nepravilnih oblik z zaokroženimi ploskvami in ostrimi robovi. Na prelomih delcev vidni vzporedne linije, ki predstavljajo meje heksagonalnih kristalov, ki tvorijo posemezen delec. Pri mletju pri višji temperaturi se velikost delcev zmanjšuje sorazmerno s časom mletja, aglomeriranih delcev ne

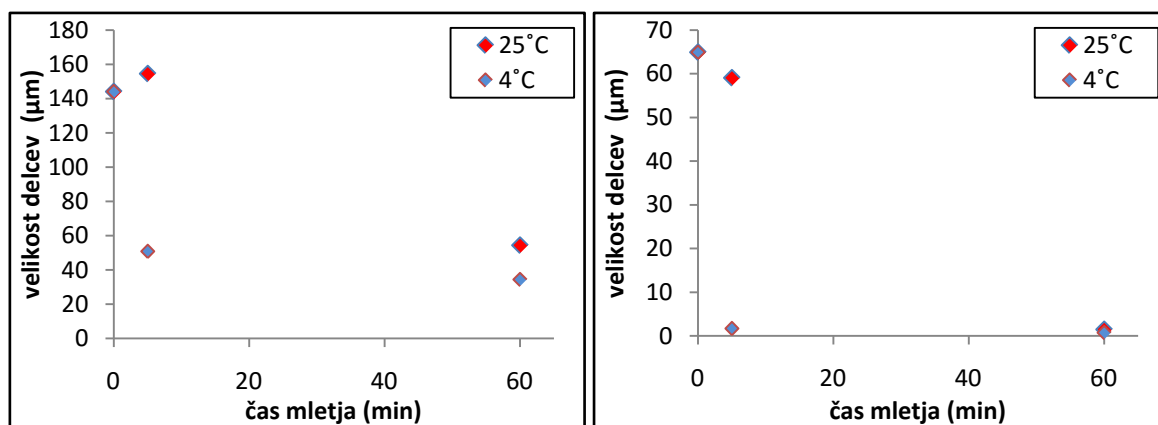
opazimo. Pri vzorcu, mletem 5 minut lahko opazimo delec s porozno površino, ki se bistveno razlikuje od nemletih delcev.

V vzorcu, mletem 60 minut pri 4 °C vidimo popolnoma porozne delce. Podobno kot v primeru glutarne kisline lahko sklepamo, da je prišlo do spremembe površine delca potem, ko smo že dosegli limito mletja, in je ta sprememba posledica taljenja vzorca zaradi ponavljajoče mehanske obremenitve.



4.7 Določanje porazdelitve velikosti delcev oksalne kisline, mlete pri različnih temperaturah

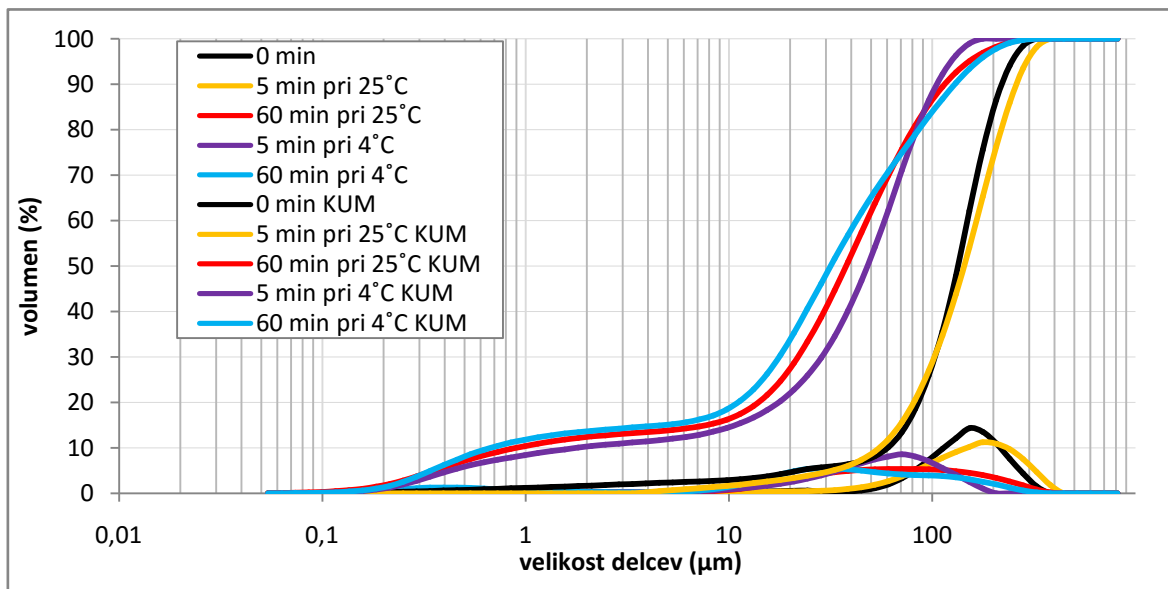
4.7.1 Analiza z lasersko difrakcijo



Slika 20: Vrednost d_{50} (levo) in d_{10} (desno) OKS, mlete pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu.

Na Sliki 20 so predstavljeni rezultati meritev d_{50} in d_{10} oksalne kisline v odvisnosti od časa in temperaure mletja. Vrednost d_{10} praktično doseže minimalno končno vrtdnost po 5 minutah mletja pri 4 °C, medtem ko je sprememba d_{10} pri 25 °C minimalna. Po 60-ih

minutah mletja se ti dve vrednosti izenačita. Vrednost d_{50} po 5 minutah mletja pri višji temperaturi naraste, medtem ko se pri nižji temeperaturi v prvih minutah mletja ta vrednost hitro zniža ter nato z daljšim časom mletja počasi pada. Za mletje oksalne kisline ne moremo trditi, da smo dosegli limito mletja.



Slika 21: Porazdelitev velikosti delcev OKS pred in po mletju pri 25 °C in 4 °C, izmerjeno v heksanu (KUM - kumulativne porazdelitvene frekvence).

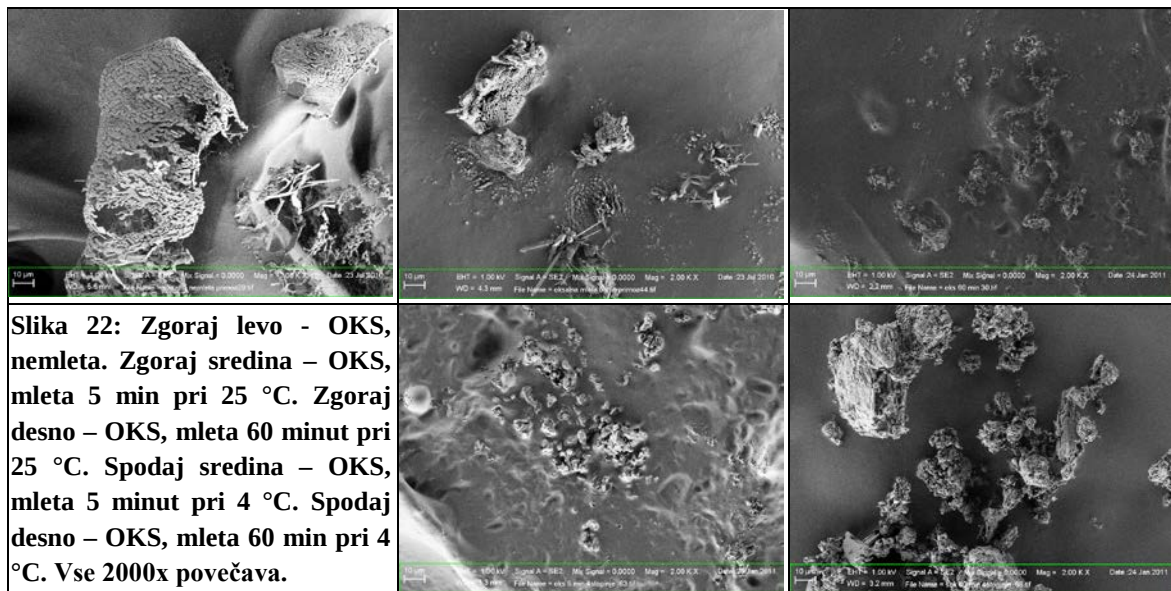
Pri proučevanju rezultatov analize porazdelitve velikosti delcev oksalne kisline (Slika 21) opazimo rahel premik k večjim delcem po 5-minutnem mletju pri 25 °C, predvsem na račun aglomeracije delcev, manjših od 40 μm , in delcev, večjih od 150 μm . Po 60 minutah mletja pri višji temperaturi pa je opazen znaten premik v smeri manjših delcev. Pri mletju pri 4 °C pa največjo spremembo opazimo tekom prvih 5 minut mletja. 60 minut mletja oksalne kisline pri nižji temperaturi pa se kaže v povečanju deleža delcev, manjših od 80 μm ter v zmanjšanju deleža delcev, večjih od 100 μm .

4.7.2 Optična analiza z elektronskim mikroskopom

Optična analiza vzorcev oksalne kisline, mlete pri različnih temperaturah različno dolgo časa nam daje zanimiv vpogled v obnašanje delcev na mikro nivoju. Na sliki nemlete oksalne kisline vidimo aglomerate delcev v velikosti od 50 do 100 μm , ki so sestavljeni iz mikrometrskih delcev enakomernih pravokotnih oblik, ki oblikujejo nekakšno tri dimenzionalno votlo strukturo. V vzorcu, mlemem 5 minut pri sobni temperaturi vidimo posamezne paličaste delce, velike 30 do 40 μm ter večje aglomerate, v vzorcu, mlemem 60

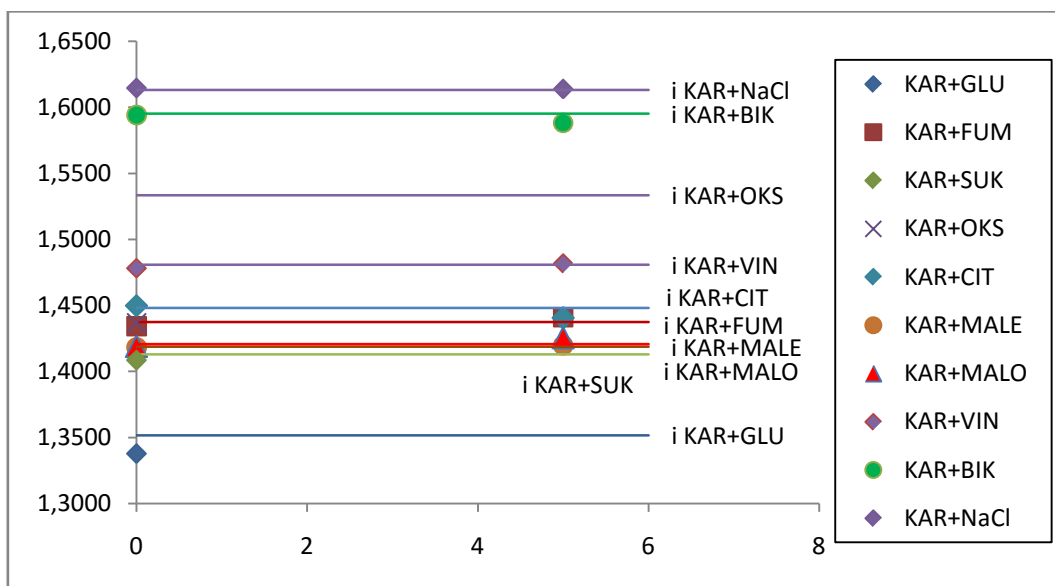
minut pri isti temperaturi pa so vidni pretežno 10 do 50 μm delci s porozno površino (Slika 22).

Z mletjem pri nižji temperaturi smo v obeh primerih dosegli manjše delce kot pri višji temperaturi, hkrati pa je bila sprememba površine bolj očitna pri nižjih temperaturah, kar potrjuje prejšnje domneve, da delce s hrapavo površino lažje pridobimo pri nižjih temperaturah.



4.8 Analiza binarnih zmesi karvedilola

4.8.1 Določanje gostote binarnih zmesi karvedilola s helijevim piknometrom



Slika 23: Gostote binarnih zmesi karvedilola v odvisnosti od časa mletja.

Z analizo prave gostote binarnih zmesi karvedilola (Slika 23) smo želeli ugotoviti, ali je mogoče zaznati spremembe, nastale kot posledice mletja karvedilola s pomožno snovjo. Tekom mletja namreč lahko prihaja do nastankov kokristalov, kar bi lahko vodilo v spremembo gostote. Pavlin v svoji diplomski nalogi poroča o možnostih izdelave binarnih kokristalov karvedilola z metodo mletja (65).

Določili smo pravo gostoto fizikalnim zmesem iz izhodnih surovin ter zmesem, mletih 5 minut. Dobljene rezultate smo primerjali s teoretično izračunanimi gostotami za posamezno binarno zmes. Teoretične gostote smo izračunali iz literaturno dostopnih podatkov o gostotah snovi, masnega deleža posamezne komponente v zmesi ter predpostavki, da v fizikalni zmesi ne potekajo procesi, ki bi lahko vplivali na spremembo prave gostote. Vodoravne črte predstavljajo teoretične gostote binarnih zmesi (55)(56)(57)(58)(59)(60)(61)(62)(63)(64).

Meritev gostote binarne zmesi KAR + GLU in KAR + SUK, mletih 5 minut, nismo opravili, saj je prišlo do taljenja sestavin in zato meritev gostote s helijevim piknometrom ni bila izvedljiva. Ostali podatki so prikazani na Sliki 23 in kažejo veliko mero ujemanja z izračunanimi teoretičnimi gostotami.

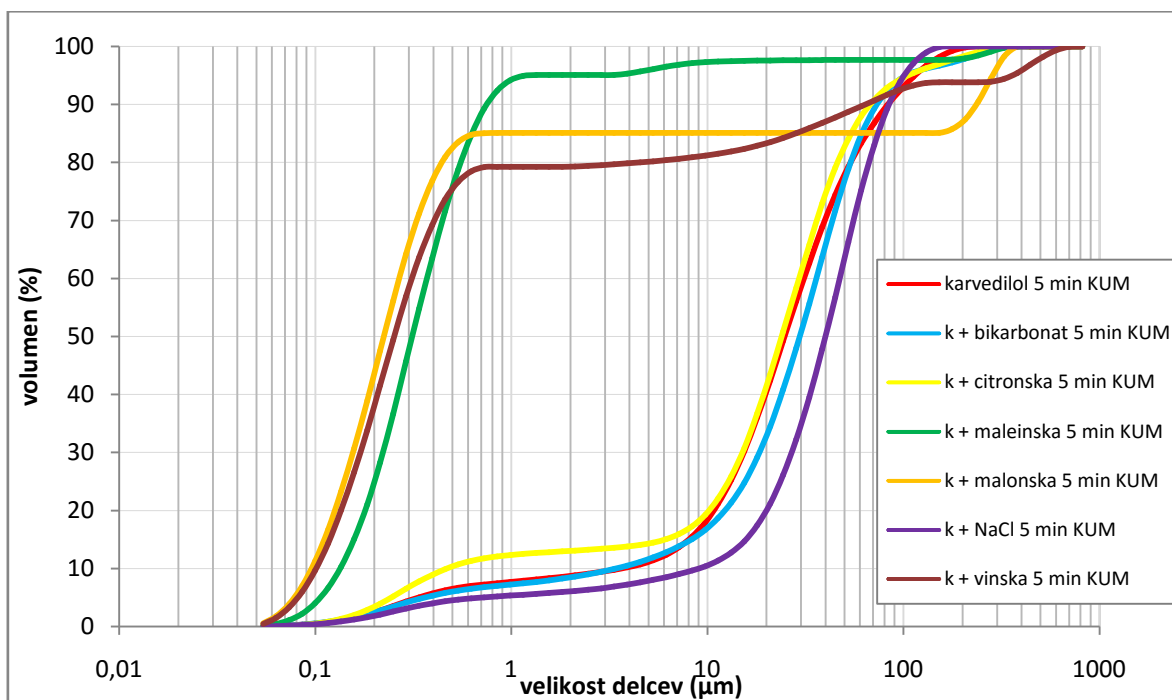
4.8.2 Določanje velikosti delcev karvedilola po mletju binarnih zmesi

Preglednica 10: Porazdelitev velikosti delcev karvedilola ter binarnih zmesi karvedilola s pomožnimi snovmi, mletih 5 minut pri 25 °C. Izmerjeno v vodi.

Material	Čas mletja (min)	T _{mletja} (°C)	d_{pov} (μm)	d_{10} (μm)	d_{50} (μm)	d_{90} (μm)
KAR	0		69,09 ± 4,98	7,71 ± 0,19	32,07 ± 0,37	273,21 ± 32,62
KAR	5	25 °C	53,18 ± 1,60	6,01 ± 0,14	37,50 ± 0,74	120,66 ± 5,94
KAR + BIK	5	25 °C	42,59 ± 1,00	3,69 ± 0,30	31,82 ± 0,05	78,79 ± 1,00
KAR + CIT	5	25 °C	37,11 ± 1,98	0,51 ± 0,01	25,78 ± 0,22	73,16 ± 4,63
KAR + MALE	5	25 °C	7,31 ± 0,11	0,15 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,81 ± 0,01
KAR + MALO	5	25 °C	42,26 ± 7,61	0,10 ± 0,00	0,24 ± 0,01	250,33 ± 21,94
KAR + NaCl	5	25 °C	47,81 ± 0,32	9,73 ± 0,45	43,09 ± 0,07	90,90 ± 0,87
KAR + VIN	5	25 °C	37,76 ± 1,33	0,11 ± 0,01	0,27 ± 0,02	68,90 ± 5,52

Binarne zmesi smo mleli karvedilola in pomožne snovi smo mleli 5 minut pri 25 °C. Te rezultate smo nato primerjali z vrednostmi porazdelitve velikosti delcev karvedilola, ki smo ga mleli 5 minut.

V Preglednici 10 so zbrani rezultati določanja vrednosti d_{pov} , d_{10} , d_{50} in d_{90} , skupaj s standardnim odklonom. Izstopajo predvsem rezultati meritev zmesi karvedilola z MALE, MALO in VIN.



Slika 24: Porazdelitev velikosti delcev izhodnega karvedilola ter binarnih zmesi karvedilola, mletih 5 minut pri 25 °C, izmerjeno v vodi (KUM - kumulativne porazdelitvene frekvence).

Rezultati analize binarnih zmesi karvedilola z lasersko difrakcijo so grafično prikazani na Sliki 24, kjer prav tako izstopajo rezultati prej omenjenih snovi. Po mletju KAR skupaj z MALE, MALO in VIN opazimo, da je krivulja porazdelitve velikosti delcev pomaknjena izrazito v levo, kar kaže na prisotnost delcev, večinoma manjših od 1 μm. Ti rezultati na prvi pogled kažejo na ogromno spremembo v procesu mletja karvedilola z omenjenimi snovmi. Tehten razmislek pa nas vodi do zaključka, da gre za napako metode. Omenjene tri snovi so kisline, ki po dispergiranju vzorca v netopilu zadosti spremenijo pH mikro okolja, da pride do raztapljanja karvedilola. Karvedilol je v nevtralnih vodnih raztopinah sicer praktično netopen, se pa topnost in hitrost raztapljanja večja z nižanjem pH. Na hitrost raztapljanja lahko vpliva tudi Na-SDS, površinsko aktivna snov, ki smo jo uporabili za povečanje močenja delcev karvedilola. Znano je namreč, da dodatek površinsko aktivne snovi kot tudi samo dodatek pomožne snovi lahko poveča hitrost raztapljanja (66)(67).

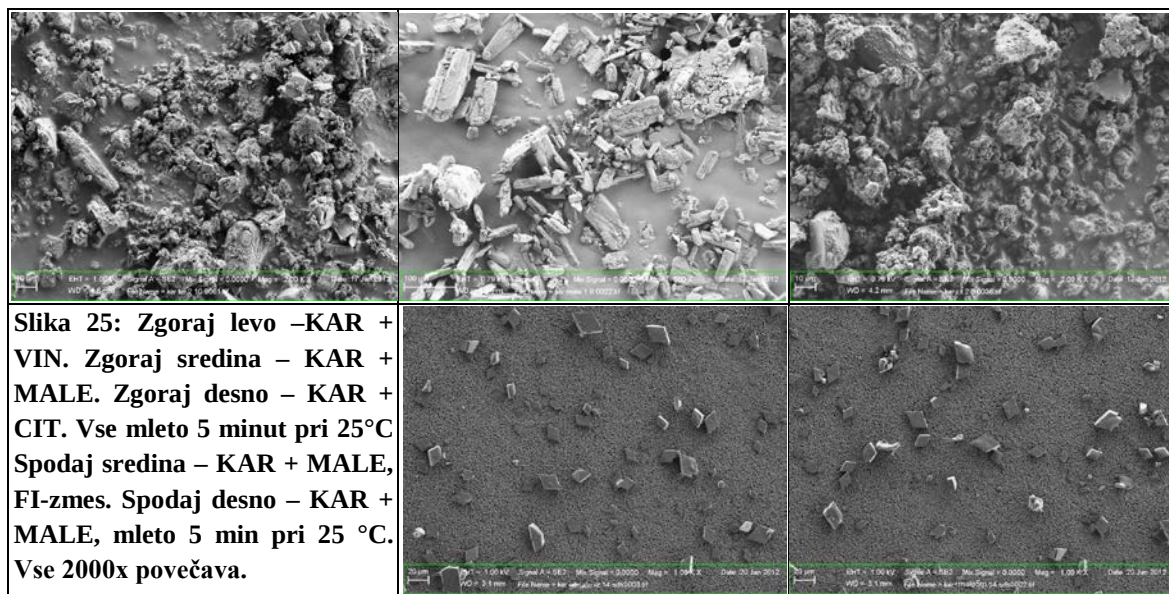
Mletje v kombinaciji s citronsko kislino daje večji odstotek delcev manjših od 10 μm kot v primeru mletja ekvivalentne količine čistega karvedilola. Z uporabo natrijevega klorida kot pomožne snovi pa smo dobili delce večje kot pri mletju čistega karvedilola. Iz tega lahko

sklepamo, da gre v primeru NaCl za elastičen material, ki je težaven za mletje in absorbira veliko energije, ki se ne uporabi za mletje karvedilola.

Za rezultate meritev porazdelitve velikosti delcev karvedilola po mletju z natrijevim hidrogen karbonatom pa lahko rečemo, da je porazdelitev velikosti delcev enaka porazdelitvi velikosti delcev čistega karvedilola po enakem času mletja.

Iz omenjenih rezultatov ni mogoče podati enoznačnega zaključka. Ker gre pri karvedilolu in ostalih snoveh za realne vzorce, je multimodalna razporeditev velikosti povsem običajna. Ker se za mletje manjših delcev porabi več energije na enoto, je možno, da heterogenost preiskovanih materialov onemogoča bolj natančne pogled na problem. Večje delce načeloma lažje meljemo, zato je možno, da s tem, ko le-ti razpadajo na veliko število manjših, prekrijejo spremembe delcev manjših velikosti. Za bolj podrobno razlago bi bilo potrebno poizkus ponoviti z ožjimi velikostnimi porazdelitvami posameznih snovi z uporabo samo določenih frakcij. Hkrati pa bi bilo potrebno določiti Young-ov modul, ki je merilo elastičnih lastnosti material, ter trdoto posameznih snovi, saj bi nam to dalo dodatno merilo za vrednotenje preiskovanega problema.

4.8.3 Optična analiza z elektronskim mikroskopom



Pri mletju karvedilola s pomožnimi snovmi opazamo, da prihaja do tvorbe aglomeratov, pri čemer se delci pomožne snovi adherirajo na delce karvedilola. V zgornji vrsti na Sliki 25 so od leve proti desni prikazani vzorci zmesi KAR + VIN, KAR + MALE ter KAR + CIT. Slike teh vzorcev so bile posnete takoj po mletju.

V spodnji vrsti pa je posnetek vzorca fizikalne zmesi izhodnega karvedilola in maleinske kisline (levo) ter iste zmesi po 5 minutnem mletju pri 25 °C (desno) po raztapljanju pomožne snovi v vodi ter filtriranju preostalih delcev.

Maleinska kislina je v vodi dobro topna, zato lahko v mikro okolju pride do zadostnega znižanja pH-ja, ki lahko privede do raztapljanja sicer v vodi netopnega karvedilola. To domnevo potrjuje tudi dejstvo, da so opazovani delci praktično identični v mletem in nemletem vzorcu.

5 SKLEP

Proučevali smo vpliv temperature na mletje učinkovine karvedilola ter štirih pomožnih snovi ter vpliv pomožne snovi na rezultat mletja binarne zmesi karvedilola in šestih pomožnih snovi. Preizkuse smo izvajali z uporabo laserske difrakcije, analize gostote, vizualne analize z elektronskim mikroskopom ter diferenčno dinamično kalorimetrijo.

Kljub morfološkim spremembam delcev ni prišlo do spremembe prave gostote vzorcev, ne glede na čas in temperaturo mletja. Podobno nismo opazili spremembe pravih gostot med mletjem binarnih zmesi karvedilola. Zaključimo lahko, da morebitne spremembe molekulske strukture v delcih z merjenjem gostote nismo zaznali.

Rezultati termične analize karvedilola kažejo na spremembe inducirane z mletjem. Pri mletem karvedilolu smo zaznali amorfnost vzorca, ki pri segrevanju kristalizira. Amorfnost stanja karvedilola je nestabilno. Rekristalizacija spontano in hitro poteče že pri sobni temperaturi.

Proučevanje morfoloških lastnosti delcev v kombinaciji z analizo porazdelitve velikosti nas vodijo do sklepa, da temperatura bistveno vpliva na izid mletja, tako glede same porazdelitve velikosti delcev kot tudi njihove morfologije. Ugotovili smo, da z znižanjem temperature med mletjem lahko hitreje in energetsko učinkoviteje dosežemo želene cilje mletja. Hkrati pa smo pokazali, da pri nižji temperaturi mletja nastanejo bolj porozni delci s hrapavo površino, kar je posledica hitrejšega ohlajanja staljene površine delcev.

Z uporabo natrijevega klorida smo v primerjavi z ostalimi uporabljenimi pomožnimi snovmi sicer dobili večje delce karvedilola, vendar to nakazuje, da pomožna snov lahko vpliva na velikost delcev produkta. Zaradi preprostosti metode je smiselno nadaljevati zastavljeno raziskavo, ki bo pokazala in dodatno razjasnila, kakšen je vpliv dodajanja pomožnih snovi k materialu, ki ga meljemo. Po drugi strani pa smo pokazali, da določene pomožne snovi lahko drastično povečajo hitrost raztapljanja nekaterih slabo topnih snovi, kar kliče po dodatnem raziskovanju vpliva pomožnih snovi, morfologije in temperature na hitrost raztapljanja.

6 LITERATURA

1. De Vegt O, Vromans H, den Toonder J, van der Voort Maarschalk K: Influence of flaws and crystal properties on particle fracture in a jet mill. *Powder Tech* 2009; 191: 72-77.
2. Tanaka T, Kanda Y: *Powder Technology Handbook 3rd Ed: Chapter 5.1: Crushing and Grinding*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006: 503-526.
3. Kanda Y, Kotake Y: *Handbook of Powder Technology Vol 12 - Particle Breakage: Chapter 12: Comminution Energy and Evaluation in Fine Grinding*. Elsevier B.V., Amsterdam, 2004: 529-550.
4. Fisher ES: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Ed*. Informa Healthcare, USA, 2007: 2339-2351.
5. Kwan CC, Chen YQ, Ding YL, Papadopoulos DG, Bentham AC, Ghadiri M: Development of a novel approach towards predicting the milling behaviour of pharmaceutical powders. *E J Pharm Sci* 2004; 23: 327-336.
6. Lee I, Variankaval N, Lindermann C, Starbuck C: Rotor-stator Milling of APIs - Empirical Scale-up Parameters and Theoretical Relationships Between the Morphology and Breakage of Crystals. *APR* 2004; 7 (5): 120-123.
7. Trask AV, Motherwell S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *ChemCommun* 2004; 890-891.
8. Schultheiss N, Newman A: Pharmaceutical Cocrystals and Their Physicochemical Properties. *Cryst Growth Des* 2009; 9: 2950-2967.
9. Stahly GP: Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. *Cryst Growth Des* 2007; 7: 1007-1026.
10. Jones W, Motherwell WDS, Trask AV: Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. *MRS Bull* 2006; 31: 875-879.
11. Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ: Pharmaceutical Co-Crystals. *J Pharm Sci* 2006; 95: 499-516.
12. Rehder S, Klukkert M, Löbmann KAM, Strachan CJ, Sakmann A, Gordon K, Rades T, Leopold CS: Investigation of the Formation Process of Two Piracetam Cocrystals during Grinding. *Pharmaceutics* 2011; 3: 706-722.
13. Ferlan A, Vrečer F: Metode amorfizacije zdravilnih učinkovin. *Farm Vestn* 2004; 55: 11-21.
14. Unland G: *Handbook of Powder Technology Vol 12 - Particle Breakage: Chapter 4: The Principles of Single-Particle Crushing*. Elsevier B.V., Amsterdam, 2004: 117-228.

15. Morales JO, Watts AB, McConville JT: Formulating Poorly Water Soluble Drugs: Chapter 4: Mechanical Particle-Size Reduction Techniques. Springer, New York, 2012: 133-170.
16. Bentham AC, Kwan CC, Boerefijn R, Ghadiri M: Fluidised-bed jet milling of pharmaceutical powders. Powder Tech 2004; 141: 233-238.
17. Ghadiri M, Kwan CC, Ding Y: Handbook of Powder Technology Vol 12 - Particle Breakage: Chapter 14: Analysis of Milling and the Role of Feed Properties. Elsevier B.V., Amsterdam, 2004: 605-634.
18. Troy DB, Beringer P: Remington: The Science and Practice of Pharmacy: Chapter 37: Powders. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2006: 702-719.
19. Abdel-Magid AF, Caron S: Fundamentals of Early Clinical Drug Development: From Synthesis Design to Formulation. Wiley, New Jersey, 2006: 255-266.
20. Sandler N: Photometric imaging in particle size measurement and surface visualization. Int J Pharm 2011; 417: 227-234.
21. Zügner S, Marquardt K, Zimmermann I: Influence of nanomechanical crystal properties on the comminution process of particulate solids in spiral jet mills. Eur J Pharm Biopharm 2006; 62: 194-201.
22. Ghadiri M: Powder Technology Handbook 3rd Ed: Chapter 1.5: Hardness, Stiffness and Toughness of Particles. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006: 53-66.
23. http://www.ssfs.si/download/Mehanika_kontakta/V4_Merilne%20metode.pdf. Dostopano 27.11.2013.
24. <http://www.geology.com/minerals/mohs-hardness-scale.shtml>. Dostopano 8.2014.
25. <http://www.matter.org.uk/schools/Content/YoungModulus/introduction.html>. Dostopano 20.8.2014.
26. www.engineersedge.com/material_science/yield_strength.htm. Dostopano 28.12.2015.
27. Tavares LM: Handbook of Powder Technology Vol 12 - Particle Breakage: Chapter 1: Breakage of Single Particles: Quasi-Static. Elsevier B.V., Amsterdam, 2006: 3-69.
28. Yokoyama T, Inoue Y: Handbook of Powder Technology Vol 12 - Particle Breakage: Chapter 10: Selection of Fine Grinding Mills. Elsevier B.V., Amsterdam, 2004: 487-508.
29. Paul EL, Atiemo-Obeng VA, Kresta SM: Handbook of Industrial Mixing. John Wiley and Sons, New York, 2003: 479-506.

30. Bruno JA, Dity DB, Gustow E, Illig K, Rajagopalan N, Sarpotdar P: Methods of grinding pharmaceutical substances. United States Patent, Patent number 5,518,187, Datum patenta Maj 21, 1996.
31. <http://www.crushtechengineers.com/pin-mill.html>. Dostopano 20.11.2015.
32. <http://www.feedtechinternational.com/ghm-hammer-mill.html>. Dostopano 20.11.2015.
33. Nakacha M, Authelin JR, Chamayou A, Dodds J: Comparison of various milling technologies for grinding pharmaceutical powders. *Int J Miner Process* 2004; 74: 173-181.
34. Lieberman HA, Lachman L, Schwartz JB: *Pharmaceutical dosage forms: Tablets*. 2nd Ed. Marcel Dekker, New York, Basel, 1990: 107-145.
35. Gibson M: *Pharmaceutical preformulation and formulation*. IHS Health Group, Enlewood, 2001: 176-181.
36. Chamayou A, Doods JA: *Handbook of Powder Technology Vol 12 - Particle Breakage: Chapter 8: Air Jet Milling*. Elsevier B.V., Amsterdam, 2004: 421-435.
37. <http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carvedilol>. Dostopano 28.5.2014.
38. Sweetman SC: *Martindale - The Complete Drug Reference* 34th Ed. The Pharmaceutical Press: 881.
39. Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC): Coryol (uč. carvedilolum), Baza podatkov o zdravilih (www.draagle.com). Dostopano 26.8.2014.
40. <http://www.fritsch.de/en/sample-preparation/products/milling/ball-mills/pulverisette-0/description/>. Dostopano 20.8.2014.
41. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.937>. Dostopano 28.5.2014.
42. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7767>. Dostopano 28.5.2014.
43. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2487.html>. Dostopano 28.5.2014.
44. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.723.html>. Dostopano 28.5.2014.
45. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10197150.html>. Dostopano 28.5.2014.
46. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1078.html>. Dostopano 28.5.2014.
47. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.946.html>. Dostopano 28.5.2014.
48. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.305.html>. Dostopano 28.5.2014.
49. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.392248.html>. Dostopano 28.5.2014.
50. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.844.html>. Dostopano 28.5.2014.
51. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.852.html>. Dostopano 28.5.2014.

52. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7492884.htm.
Dostopano 28.5.2014.
53. <http://www.hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/tables/indrf.html>. Dostopano 28.5.2014.
54. Cao S, Bennett TD, Keen DA, Goodwin AL, Cheetham AK: Amorphization of the Prototypical Zeolitic Imidazolate Framework ZIF-8 by Ball-milling. Royal Soc Chem 2012; 10: 34-45.
55. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+110-94-1>.
Dostopano 28.8.2016.
56. http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1173. Dostopano 28.8.2016.
57. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+110-15-6>.
Dostopano 28.8.2016.
58. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+144-62-7>.
Dostopano 28.8.2016.
59. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+77-92-9>.
Dostopano 28.8.2016.
60. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+110-16-7>.
Dostopano 28.8.2016.
61. http://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_card_id=1085. Dostopano 28.8.2016.
62. http://www.chemicalbook.com/chemicalproductproperty_en_cb8212874.htm.
Dostopano 28.8.2016.
63. <http://cameochemicals.noaa.gov/chemical/21013>. Dostopano 28.8.2016.
64. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+7647-14-5>.
Dostopano 28.8.2016.
65. Pavlin T: Mletje karvedilola s pomožnimi snovmi kot metoda rešetanja za izdelavo kokristalov. 2011: .
66. Monografija (1087) Intrinsic dissolution iz USP.
67. Kincl M: Hitrost sproščanja diklofenak natrijeve soli iz tablet z lipofilnim ogrodnim sistemom. Doktorsko delo. Ljubljana 2003: 38-42.