# UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEŠA DULAR

# DIPLOMSKA NALOGA

# UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEŠA DULAR

# VPLIV POGOJEV KRISTALIZACIJE NA IZBRANE LASTNOSTI DELCEV MODELNE ZDRAVILNE UČINKOVINE

# THE INFLUENCE OF CRYSTALLIZATION CONDITIONS ON SELECTED PROPERTIES OF MODEL ACTIVE INGREDIENT PARTICLES

Ljubljana, 2012

Diplomsko nalogo sem opravljala v Krki, tovarni zdravil, d. d., Novo mesto, v Razvoju in raziskavah, na Oddelku za strukturne analize in Oddelku za raztapljanje, pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja, mag. farm.

Za strokovno pomoč, nasvete in spodbudo pri pripravi diplomske naloge se najlepše zahvaljujem mentorju prof. dr. Francu Vrečerju.

Za usmerjanje med eksperimentalnim delom ter dragocene nasvete pri pisanju diplomske naloge se zahvaljujem Poloni Bukovec.

Iskrena zahvala za neprecenljivo pomoč in koristne nasvete pri pripravi diplomske naloge gre tudi dr. Darku Uršiču.

Za nesebično pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela diplomske naloge se zahvaljujem Andreju Blatniku, Davidu Jakšetu in Matjažu Pajku. Hvala tudi Biserki, Maji, Silvi, Nini, Marku in vsem drugim, ki so mi kakor koli pomagali pri analizah.

### Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Franca Vrečerja, mag. farm.

Aleša Dular

Ljubljana, junij 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

# VSEBINA

P	OVZE	ТЕК		6
S	EZNA	ΜO	KRAJŠAV	8
1	1 13			0
1		VOD.	ICT & I 17 & CII &	9
	1.1		ISTALIZACIJA	9
	1.1	ו. כ	Nukleogije	. 10
	1.1	.2	Nukleacija	11
	1.1	.5 NO	TDANIA ZCDADDA IN ZUNANU VIDEZ VDISTALOV	10
	1.2		I VI DOGOLEV KDISTALIZACHE NA MODEOLOGHO KDISTALOV	۲۹ دد
	1.3	vг. 1	Vnliv kristalizacijskih tonil	22 22
	1.3	יד. ר	Vpliv prepasičenja	22
	1.3	.2	V pliv prisotnosti nečistot in aditivov	23 23
	1.3	.5	Viliv mečanja	23 24
	1.5	.+	v priv mesanja	24
2	ME	ETO	DE	25
	2.1	RE	NTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA – XRPD	25
	2.2	VR	STIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA – SEM	26
	2.3	VR	EDNOTENJE SPECIFIČNE POVRŠINE	27
	2.4	DO	LOČANJE VELIKOSTI DELCEV Z LASERSKO DIFRAKCIJO	27
	2.5	MC	)ČLJIVOST IN DOLOČANJE STIČNEGA KOTA	28
	2.6	PR	EIZKUS RAZTAPLJANJA	30
	2.6	.1	Intrinzična hitrost raztapljanja	30
	2.6	.2	Pretočni sistem	31
	2.7	MI	KROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO	33
	2.7	.1	Uporaba mikroskopa na atomsko silo za spremljanje raztapljanja	34
3	NA	ME	N DELA	36
4	EK	SPE	RIMENTALNI DEL	37
	4.1	UP	ORABLJENI MATERIALI IN NAPRAVE	37
	4.2	PR	IPRAVA VZORCEV K-3005	38
	4.3	AN	ALIZNE METODE	40

	4.3	.1	Rentgenska praškovna difrakcija	40
	4.3	.2	Diferenčna dinamična kalorimetrija	40
	4.3	.3	Termogravimetrična analiza	40
	4.3	.4	Analiza oblike delcev	41
	4.3	.5	Analiza porazdelitve velikosti delcev	41
	4.3	.6	Specifična površina	42
	4.3	.7	Merjenje stičnega kota	42
	4.3	.8	Določanje topnosti	43
	4.3	.9	Določanje intrinzične hitrosti raztapljanja	43
	4.3	.10	Preizkus raztapljanja s pretočno celico	44
	4.3	.11	Spremljanje raztapljanja z mikroskopom na atomsko silo	45
5	RE	ZUL	TATI IN RAZPRAVA	46
	5.1	REN	NTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA	46
	5.2	TEF	RMIČNA ANALIZA	48
	5.2	.1	Diferenčna dinamična kalorimetrija	48
	5.2	.2	Termogravimetrična analiza	49
	5.3	AN	ALIZA OBLIKE DELCEV	50
	5.4	POF	RAZDELITEV VELIKOSTI DELCEV	55
	5.5	SPE	CIFIČNA POVRŠINA	56
	5.6	DO	LOČANJE TOPNOSTI	56
	5.7	STI	ČNI KOT	57
	5.8	DIN	AMIKA IN MEHANIZEM RAZTAPLJANJA DELCEV	58
	5.8	.1	Profil raztapljanja s pretočno celico	58
	5.8	.2	Določanje intrinzične hitrosti raztapljanja	61
	5.8	.3	Določanje hitrosti raztapljanja z mikroskopom na atomsko silo	63
6	SK	LEP		69
7	LI	ΓER <i>A</i>	ATURA	71

## POVZETEK

(Pre)kristalizacija se v farmacevtski industriji pogosto uporablja za čiščenje in izolacijo zdravilnih učinkovin. S spreminjanjem pogojev kristalizacije lahko vplivamo tako na notranjo obliko kot tudi na zunanji videz kristalov, vpliv pa se kaže v različnih fizikalnokemijskih lastnostih pripravljenih vzorcev. Ena od najpomembnejših lastnosti je vpliv na hitrost raztapljanja zdravilne učinkovine, ki je povezana tudi z njeno biološko uporabnostjo.

Z diplomsko nalogo smo želeli proučiti vpliv kristalizacijskega topila in načina kristalizacije na izbrane fizikalno-kemijske lastnosti modelne zdravilne učinkovine. V ta namen smo iz izbranih kombinacij topil na različne načine pripravili kristale preiskovane zdravilne učinkovine ter z instrumentalnimi tehnikami okarakterizirali njihovo strukturo in zunanjo obliko, površinske lastnosti ter hitrost raztapljanja.

Z rentgensko praškovno difrakcijo in DSC-analizo smo najprej pokazali, da imajo kristali naših vzorcev enako notranjo strukturo, kar so potrdili tudi rezultati študija topnosti pripravljenih vzorcev. Kljub enaki notranji strukturi so imeli pripravljeni kristali različno zunanjo obliko, velikost delcev in specifično površino, kar smo pokazali z rezultati analize porazdelitve velikosti delcev, BET-analize ter z opazovanjem morfologije vzorcev z optičnim in elektronskim mikroskopom.

S preizkusi raztapljanja smo želeli določiti predvsem vpliv polarnosti kristalizacijskega topila na hitrost raztapljanja. Rezultati vrednotenja raztapljanja s pretočno celico so pokazali, da se je najhitreje raztapljal vzorec, prekristaliziran iz bolj polarnega topila, vendar sta imela na rezultate te analize bistven vpliv velikost delcev in specifična površina vzorcev, zato smo za naslednji preizkus izbrali določanje intrinzične hitrosti raztapljanja, na katero omenjena parametra nimata vpliva. Pri tej analizi smo dokazali, da se vzorec, pripravljen iz bolj nepolarnega topila, raztaplja hitreje kot vzorec, prekristaliziran iz topila z višjo dielektrično konstanto. Vpliv polarnosti topil na hitrost raztapljanja modelne zdravilne učinkovine smo želeli preveriti še na posameznih delcih le-te, zato smo z

izbranih topil. Pri tej analizi se je najhitreje raztapljal kristal, pripravljen iz bolj polarnega topila, kar je sicer v nasprotju z rezultati intrinzične hitrosti raztapljanja, ki pa za razliko od rezultatov atomske mikroskopije, kjer smo lahko pri posameznem kristalu spremljali le ploskev kristala z največjo površino, odsevajo lastnosti celotne populacije delcev.

Rezultati torej kažejo, da uporaba različnih topil in načina kristalizacije povzroči različno rast kristalnih ravnin, vpliva polarnosti prekristalizacijskega topila na hitrost raztapljanja modelne zdravilne učinkovine pa ne moremo povsem pojasniti.

# SEZNAM OKRAJŠAV

AFM	mikroskopija na atomsko silo
As	površina skupka molekul
$\mathbf{B} + \mathbf{S}$	birth and spread
BET	Braun-Emmett-Teller
D	razdalja med dvema ravninama v kristalu
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija
$\Delta G$	sprememba Gibbsove proste energije za tvorbo jedra
$\Delta G_{het}$	sprememba Gibbsove proste energije za heterogeno nukleacijo
$\Delta G_{hom}$	sprememba Gibbsove proste energije za homogeno nukleacijo
$\Delta G_{s}$	sprememba Gibbsove proste energije za tvorbo površine jedra
$\Delta G_{\rm v}$	sprememba Gibbsove proste energije na enoto volumna pri fazni spremembi
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
IDR	intrinzična hitrost raztapljanja
r	polmer kristalizacijskega jedra
r*	kritični polmer kristalizacijskega jedra
RPM	število obratov na minuto
SDS	natrijev dodecil sulfat
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
TGA	termogravimetrična analiza
USP	ameriška farmakopeja (United States Pharmacopoea)
V	volumen skupka molekul
XRPD	rentgenska praškovna difrakcija
α	stopnja tveganja
β	kontaktni kot med kristalnim depozitom in površino tuje snovi
γ	površinska napetost
$\gamma_{sv}$	površinska energija trdne snovi
$\gamma_{sl}$	medfazna napetost med tekočino in trdno snovjo
$\gamma_{lv}$	površinska napetost tekočine
θ	lomni kot
λ	valovna dolžina žarka

## 1 UVOD

Trdne farmacevtske oblike so zaradi relativne enostavnosti proizvodnje in številnih prednosti za bolnika najštevilneje zastopane na trgu zdravil (1). Sestavljene so iz trdnih substanc za farmacevtsko uporabo, tj. zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi, zato je v farmacevtski industriji pomembno poznavanje njihovih strukturnih karakteristik, predvsem pa poznavanje lastnosti delcev zdravilnih učinkovin. Ti delci lahko nastopajo v različnih pojavnih oblikah, tako kristalnih kot amorfnih, ki izkazujejo različne fizikalno-kemijske, mehanske in biofarmacevtske lastnosti. Večina zdravilnih učinkovin je v kristalni obliki (5), kar pomeni, da so njihovi gradniki pravilno in periodično urejeni znotraj kristala. Poleg notranje strukture pa je pri kristalnih oblikah pomembna tudi njihova zunanja oblika oz. kristalni habitus, saj lahko kljub isti notranji strukturi pogojuje hitrost raztapljanja in pogosto bistveno vpliva na procesibilnost in stabilnost zdravilnih učinkovin ter končnih farmacevtskih izdelkov (3, 4).

Poznavanje in razumevanje procesa kristalizacije je torej ključno pri načrtovanju in optimiziranju lastnosti zdravilnih učinkovin, ki jih želimo vgraditi v farmacevtsko obliko. Ko pa je zdravilna učinkovina že vgrajena v končno trdno farmacevtsko obliko, je najpomembneje, da se le-ta raztopi pri določenih pogojih z določeno hitrostjo, saj sta od tega odvisni kinetika in obseg njene absorpcije v krvni obtok. Preizkusi raztapljanja, s katerimi ponazarjamo oz. simboliziramo kinetiko absorpcije, se v farmacevtski industriji običajno izvajajo z napravami, ki jih predpisujejo farmakopeje, pri spremljanju raztapljanja pa si lahko pomagamo tudi z drugimi metodami, npr. z mikroskopom na atomsko silo (5, 6).

#### 1.1 KRISTALIZACIJA

Kristalizacija je eden najpomembnejših načinov pridobivanja trdnih snovi v čisti obliki. Gre za separacijski proces, pri katerem prihaja do izločanja trdne faze iz homogene raztopine ali emulzije, lahko pa tudi iz suspenzije, če so suspendirani delci preiskovane snovi v amorfni obliki. Je eden od osnovnih procesov v proizvodnji zdravilnih učinkovin, in sicer se uporablja kot metoda čiščenja končnega produkta ali kot metoda, s katero dobivamo kristale želene velikosti in drugih izbranih fizikalno-kemijskih lastnosti (3). Proces kristalizacije lahko razdelimo v tri stopnje. Te stopnje so: doseganje prenasičenosti raztopine, nukleacija in rast kristalov.

#### 1.1.1 PRENASIČENJE

Predpogoj za začetek tvorbe kristalov je doseganje stanja prenasičenja raztopine. Taka raztopina, v kateri je topnost določene substance v topilu pri dani temperaturi in tlaku presežena, je termodinamsko manj stabilna in pomeni odstopanje od ravnotežnega stanja, v katerem se nahaja nenasičena raztopina. Razlog, da lahko prenasičeno stanje obstaja, je v prisotnosti specifične energijske bariere, ki jo imenujemo prosta aktivacijska energija in izvira iz energetskih zahtev za tvorbo trdne snovi iz raztopine (7).

Nizke stopnje prenasičenja ne zagotavljajo zadostne energije za prekoračenje te energijske bariere, zato v takih raztopinah začetno tvorbo kristalizacijskih jeder in posledično rast kristalov težko dosežemo. Tako stanje imenujemo metastabilno stanje. Ko pa je sistem dovolj prenasičen, da preseže prosto aktivacijsko energijo, molekule topljenca začnejo koalescirati v agregate, ki pri določeni velikosti začnejo tvoriti jedra kritičnih velikosti, s čimer se začne nukleacijska faza kristalizacije (7).



Slika 1: Odvisnost koncentracije topljenca od temperature med procesom kristalizacije (povzeto po 7).

Omenjena področja z različno termodinamsko stabilnostjo kot funkcijo temperature predstavlja slika 1. Prehod iz stabilnega nenasičenega področja v nestabilno prenasičeno področje, ki omogoča nukleacijo in nadaljnjo rast kristalov, lahko dosežemo prek dveh poti, in sicer s pomočjo zmanjševanja topnosti topljenca (pot x) ali prek povišanja koncentracije topljenca (pot y) (8). Slednje lahko dosežemo z odparevanjem topila, s čimer povišamo kemijski potencial topljenca v raztopini. Do prenasičenja, ki je gonilna sila kristalizacije, namreč pride, ko je kemijski potencial trdne faze nižji od kemijskega potenciala iste snovi v raztopljeni obliki pri določeni temperaturi in tlaku.

Z odparevanjem topila najprej prečkamo krivuljo nasičenja, kjer je raztopina v ravnotežju s trdno fazo. Z nadaljnjim višanjem koncentracije topljenca se na diagramu pomaknemo v metastabilno področje, ko pa na grafu prečkamo krivuljo prenasičenosti, lahko v sistemu pride do nukleacije in rasti kristala, kar prikazuje puščica y na sliki 1. Drugi način priprave prenasičene raztopine pa je na sliki 1 predstavljen s puščico x, kjer prečkamo omenjena področja na grafu v istem zaporedju, le da do nestabilnega prenasičenega področja v tem primeru pridemo zaradi znižanja topnosti topljenca v raztopini. To lahko dosežemo z ohlajanjem raztopine, pri kateri se z nižanjem temperature topnost substance zmanjšuje, z dodatkom topil, ki zmanjšajo topnost preiskovane substance antitopila oz. netopila (»antisolvent«), s spremembo pH-ja ali z dodajanjem ionov, ki pripomorejo k obarjanju (izsoljevanju) topljenca (8).

#### 1.1.2 NUKLEACIJA

Tvorba nove kristalinične entitete iz raztopine se začne s procesom nukleacije. Nukleacija je definirana kot zaporedje atomskih ali molekularnih procesov, pri katerem se atomi ali molekule reaktivne faze preuredijo v jedro, ki je dovolj veliko, da lahko zraste do makroskopske velikosti (9). Z vidika spontanosti procesa je nukleacija energetsko najbolj problematična stopnja procesa kristalizacije.

Obstajata dve vrsti nukleacije, in sicer primarna in sekundarna. Do primarne nukleacije pride v odsotnosti trdnih delcev v sistemu, sekundarna nukleacija pa je pogojena s prisotnostjo kristalov oz. trdnih delcev (cepiva).

Primarno nukleacijo delimo na homogeno, do katere pride v čisti raztopini, in heterogeno, ki je katalitično sprožena s tujo površino (stena reakcijske posode, delci druge snovi oz. prisotnost specifičnih nečistot v raztopini itd.).

#### • HOMOGENA NUKLEACIJA

Pri primarni homogeni nukleaciji se molekule topljenca združujejo v skupke (agregate oz. aglomerate), dokler ti ne dosežejo kritične velikosti za formacijo kristalizacijskega jedra. Dokler je polmer jedra manjši od polmera kritične velikosti delcev, t. i. kritičnega polmera (r\*), se jedro raztaplja, ko pa postanejo skupki molekul večji in je njihov polmer večji od r\*, pride do nukleacije, ki vodi do spontane rasti kristala (10, 11).

Sprememba proste energije, ki je pri homogeni nukleaciji potrebna za tvorbo jedra, je vsota spremembe proste Gibbsove energije za tvorbo površine jedra, ki je pozitivna, in spremembe Gibbsove proste energije pri fazni spremembi, ki je negativna.

$$\Delta G = \Delta G_{s} + \Delta G_{v} = A_{s} \gamma + V \Delta G_{v}$$
 /1/

$\Delta G$	sprememba Gibbsove proste energije za tvorbo jedra
$\Delta G_s$	sprememba Gibbsove proste energije za tvorbo površine jedra
$\Delta G_{\rm v}$	sprememba Gibbsove proste energije na enoto volumna pri fazni spremembi
As	površina skupka molekul
γ	površinska napetost
V	volumen skupka molekul

Prvi člen enačbe predstavlja prispevek površine in je produkt površinske napetosti ( $\gamma$ ) in površine skupka molekul (A<sub>s</sub>), medtem ko je drug člen enačbe prispevek volumna in ga predstavlja produkt volumna skupka molekul in  $\Delta G_v$ , ki predstavlja spremembo proste energije na enoto volumna pri spremembi med tekočo in plinasto fazo (10, 11, 12).

Če privzamemo, da je jedro sferične oblike, lahko enačbo 1 zapišemo kot:

$$\Delta G = 4 r^2 \pi \gamma + \frac{4}{3} r^3 \pi G_v \qquad (2/$$

 $\Delta G$  sprememba Gibbsove proste energije za tvorbo jedra

- r polmer kristalizacijskega jedra
- γ površinska napetost
- G<sub>v</sub> Gibbsova prosta energija na enoto volumna pri fazni spremembi



Slika 2: Sprememba Gibbsove proste energije nukleacije kot funkcija velikosti jedra (povzeto po 12)

Sprememba proste Gibbsove energije za tvorbo površine jedra in sprememba proste Gibbsove energije na enoto volumna pri fazni spremembi ter njuna vsota za sferično jedro je predstavljena tudi na sliki 2. Iz nje je razvidno, da skupki molekul, katerih premer je večji od kritičnega premera, lahko sodelujejo v procesu nukleacije, saj pri radijih, večjih od r\*, pride do padca Gibbsove proste energije. Kritično velikost jedra določimo tako, da odvajamo prosto Gibbsovo energijo za ta proces po polmeru in določimo ekstrem funkcije.

d(∆G) dr	$= 8\pi r^* + 4\pi (r^*)^3 \Delta G_v = 0 \qquad /3/$
ΔG	sprememba Gibbsove proste energije za tvorbo jedra
r*	kritični polmer kristalizacijskega jedra
$G_v$	sprememba Gibbsove proste energije na enoto volumna pri fazni spremembi

S preureditvijo enačbe *3* in z upoštevanjem enačbe *2* so raziskovalci izpeljali enačbo za izračun kritičnega polmera:

$r^* = -\frac{2\gamma}{\Delta Gv}$	/4/
r*	polmer kristalizacijskega jedra
$\Delta G_v$	sprememba Gibbsove proste energije na enoto volumna pri fazni spremembi
γ	površinska napetost

Iz enačb 3 in 4 lahko izpeljemo enačbo za izračun kritične spremembe Gibbsove proste energije, ki je potrebna, da pride do nastanka kristalizacijskega jedra ( $\Delta G^*$ ).

$$\Delta G^* = \frac{4}{3} \pi (r^*)^2 \gamma \qquad (5/$$

r\* polmer kristalizacijskega jedra

 $\Delta G^*$  kritična sprememba Gibbsove proste energije za nastanek kristalizacijskega jedra  $\gamma$  površinska napetost

#### • HETEROGENA NUKLEACIJA

Pri heterogeni nukleaciji prisotnost tujih delcev v raztopini zmanjšuje energijo, potrebno za nukleacijo, tako da do nje pride na nižji stopnji prenasičenosti kot v homogenem sistemu (energijska bariera je za heterogene sisteme nižja). V tem primeru jedra namreč ne nastanejo z agregacijo molekul topljenca, ampak z nalaganjem molekul topljenca na trdne delce, prisotne v sistemu, kar zmanjša površinsko energijo in pospeši nukleacijo. Da pa se molekule topljenca sploh vežejo na tujo trdno površino, mora med njo in površino kristalnega depozita obstajati določena afiniteta (10, 11).

Vpliv tujih delcev v sistemu na proces kristalizacije je teoretično proučeval že Volmer (10), ki je predvidel, da je kontaktni kot med kristalnim depozitom in površino tuje snovi ( $\beta$ ) merilo za učinkovitost vpliva prisotnosti tujih delcev na proces nukleacije.

Energijsko razliko med heterogeno in homogeno nukleacijo lahko izračunamo s pomočjo enačbe 6, ki jo je predpostavil Volmer (10).

$$\Delta G_{hom} = \frac{1}{4} (2 + \cos\beta)(1 - \cos\beta)^2 \Delta G_{het}$$
 /6/  

$$\Delta G_{hom}$$
 sprememba Gibbsove proste energije za homogeno nukleacijo  

$$\Delta G_{het}$$
 sprememba Gibbsove proste energije za heterogeno nukleacijo  

$$\beta$$
 kontaktni kot med kristalnim depozitom in površino tuje snovi

Ta enačba pojasnjuje nižji nivo prenasičenja, ki je potreben v primeru primarne heterogene nukleacije. Če je kontaktni kot 0, potem se kristalni depozit razprostre po površini in aktivacijska energija za formacijo jedra ni vprašljiva. Ta primer popolne afinitete med dvema površinama je v realnosti težko dosegljiv, je pa možen pojav delne afinitete med površinama, npr. da imajo podobno kristalno rešetko ali razporeditev atomov v prostoru.

Preckshot, Brown in Telkes (10) so ugotovili, da do primarne heterogene nukleacije pride le, če so razlike v morfologiji manjše od 15 %. V nasprotnem primeru je stični kot  $\beta$ približno 180°, kar pomeni, da med površinama kristalnega depozita in tuje snovi ni afinitete in da prosta Gibbsova energija v tem primeru ustreza energiji, ki bi bila potrebna za homogeno nukleacijo.

#### SEKUNDARNA NUKLEACIJA

Sekundarna nukleacija je posledica prisotnosti kristalov snovi v njeni prenasičeni raztopini. Seme oz. cepitveni kristal (jedro, nukleus) ima vlogo katalizatorja, zato do nukleacije pride pri nižjih nivojih prenasičenja kot v primeru primarne nukleacije. Za pojasnitev sekundarne nukleacije je v literaturi opisanih več teorij, ki jih lahko razvrstimo v dve skupini. V prvo skupino sodijo teorije, ki predpostavljajo izvor sekundarnega jedra iz cepitvenega kristala. Pri prašnem gojenju naj bi ta kristal, ki ga damo v prenasičeno raztopino, imel na površini prisotne drobne kristale, ki so posledica fragmentacije kristala med shranjevanjem ali prehitrega izparevanja topila med procesom sušenja in med procesom kristalizacije služijo kot sekundarna jedra. Njihov polmer je namreč večji od kritičnega polmera jedra, zato je v tem primeru hitrost nukleacije neodvisna od stopnje prenasičenja in mešanja raztopine. Pri visoki prenasičenosti začnejo iz takih jeder rasti kristali iz vseh smeri in tvorijo kristale igličastih oblik, ki ob fragmentaciji tvorijo nova nukleacijska jedra, zato se tovrstna sekundarna nukleacija imenuje igličasto gojenje. Pri še višji stopnji prenasičenja pa lahko nastanejo polikristalni agregati, katerih fragmenti ravno tako lahko predstavljajo nova kristalizacijska jedra. Ta način sekundarne kristalizacije se imenuje polikristalni način gojenja kristalov. Četrti mehanizem priprave kristalov, ki predpostavlja izvor jeder iz semena kristala, se imenuje gojenje s trkom. Do trkov lahko pride med mešanjem prenasičene raztopine oz. suspenzije, in sicer med kristalom in steno posode, med kristalom in mešalom ter med samimi kristali. Če v tem primeru jedra nastanejo z makroabrazijo, z zaokroževanjem robov delcev zaradi trkov, govorimo o drobljivostnem gojenju (»attrition breeding«), v primeru, da sekundarno jedro nastane z mikroabrazijo, kjer spremembe površine kristala zaradi stikov s trdnimi površinami niso vidne, pa se to imenuje kontaktno gojenje.

Drugi raziskovalci utemeljujejo svojo razlago mehanizma sekundarne kristalizacije na izvoru sekundarnega jedra iz topljenca v tekočem stanju. Če se v prenasičeni raztopini kristali, ki rastejo na izhodnem kristalu, odlomijo zaradi strižnega toka tekočine in tvorijo sekundarna jedra, govorimo o nukleaciji, povzročeni s strigom. Drugi način, ki sodi v to kategorijo razlage sekundarne nukleacije, pa je teorija nukleacije koncentracijskega gradienta nečistote. Ta temelji na razlagi, da je raztopina v bližini kristala bolj strukturirana in predstavlja tudi vir kristalizacijskih jeder. Nečistote so lahko vgrajene v strukturo kristala in ustvarijo razliko v koncentracijskem gradientu, kar poveča verjetnost za nastanek jeder (10, 11).

#### 1.1.3 RAST KRISTALA

Naslednja faza procesa kristalizacije je rast kristala, ki skupaj z nukleacijo kontrolira končno razporeditev velikosti kristalov v sistemu (11).

Rast kristalov je zaporedje procesov, pri katerem se atom ali molekula vgradi na površino kristala, kar se kaže kot povečanje velikosti kristala.

Ta proces lahko povzamemo v štirih korakih:

- 1. potovanje atomov/molekul iz raztopine,
- 2. adsorpcija atomov/molekul na površino kristala,
- 3. potovanje atomov/molekul na površini kristala,
- 4. pripajanje atomov/molekul na robove in zajede na površini kristala.

Prvi korak je transportni proces, medtem ko se drugi trije dogajajo na površini kristala. Najpočasnejši korak narekuje hitrost rasti kristalov, tako da je lahko rast kristala bodisi transportno bodisi površinsko kontrolirana.

Mehanizme rasti kristalov lahko glede na vmesno strukturo razdelimo v tri skupine: kontinuirano rast, spiralno rast in rast s površinsko dvodimenzionalno (2D) nukleacijo. Slednji dve predstavljata rast v primeru, da je površina ravna, če pa je struktura groba, do rasti pride z adhezijo rastnih enot, kar predstavlja kontinuirano rast. Kontinuirano rast najlažje predstavimo s pomočjo Kosselovega modela predstavitve površine kristala. Ta model predpostavlja, da je površina kristala zgrajena iz kubičnih enot, ki tvorijo plasti z višino enega atoma/molekule. Te stopnice vsebujejo veliko zajed po njihovi dolžini. Površina med dvema stopnicama se imenuje terasa in lahko vsebuje samostojne adsorbirane enote, adsorbirane skupke ali prazne prostore.



Slika 3: Kosselov model površine kristala (povzeto po 8)

V skladu s tem modelom lahko predvidimo, da če se nova kubična rastna enota pritrdi na površino, pri tem tvori eno vez, če se pritrdi na stopnico, tvori dve, v primeru, da se pritrdi na zajedo, pa tri vezi, zato zajede zagotavljajo najstabilnejšo konfiguracijo. Rast se torej nadaljuje s pripajanjem novih kubičnih enot na stopničaste in na predele ter zajede. Te se nato premikajo po stopnici, s čimer se tvori nova vrsta kubičnih enot, dokler ne pride do roba kristala oz. dokler niso zapolnjeni vsi defekti le-tega.

V tej fazi procesa so površine kristala gladke in je za njegovo rast potreben drug mehanizem. Nove molekulske enote namreč ne pridejo takoj do ugodne rastoče enote, zato se vrnejo v raztopino ali ostanejo adsorbirane na površini, kjer koalescirajo z drugimi molekulami in tvorijo dvodimenzionalno kristalizacijsko jedro. Ker ta proces poteka na površini kristala, se omenjeni mehanizem imenuje površinska nukleacija. Opisujemo jo z modelom B + S (birth and spread), ki je predstavljen na sliki 4.



Slika 4: B + S-model rasti kristala (13)

Energetika plastovite rasti predvideva, da rast kristalov poteka pri relativno visoki stopnji prenasičenja. Kljub temu pa so opazili, da do kristalizacije pride tudi pri nižji stopnji saturacije. Tovrstni model rasti je pojasnil Frank, nadgradil pa ga je skupaj s Cabrero in Burtonom, zato se ta model imenuje tudi BCF-model. Omenjeni raziskovalci so predvideli, da so na kristalnih ploskvah prisotne vijačne dislokacije, ki so v obliki stopnic, na katere se lahko vežejo nove rastne enote. S tako rastjo se ustvari spiralni vzorec okoli dislokacijskega jedra, zato ta način rasti kristalov imenujemo spiralna rast (slika 5). Kontinuirano ustvarjanje stopnic zagotavlja manjšo potrebo po energiji kot za kontinuirani rastni model v plasteh, saj za rast kristala v tem primeru ni potreben nastanek 2D-kristalizacijskih jeder.



Slika 5: BCF-model rasti kristala (14)

### 1.2 NOTRANJA ZGRADBA IN ZUNANJI VIDEZ KRISTALOV

Kristali so sestavljeni iz atomov, molekul ali ionov, ki so v prostoru periodično urejeni, razporejeni in povezani z intramolekularnimi kovalentnimi in ionskimi vezmi ter z intermolekularnimi nekovalentnimi vezmi. Za njih je značilno, da ima vsak gradnik enako okolico oz. identično ureditev sosednjih gradnikov. Po urejenosti se kristali razlikujejo tudi od amorfnih snovi, kjer so gradniki razporejeni brez daljnosežnega reda in je njihova zgradba podobna zgradbi tekočin, le da tu gradniki niso prosto gibljivi.

Če pogledamo kristale z geometrijske perspektive, lahko vsakega od njih opišemo z osnovno celico, torej z najmanjšo tridimenzionalno enoto, ki se ponavlja po celotni površini kristala. Gre za paralelepiped, ki ga določa šest parametrov – a, b, in c označujejo njegove robove,  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  pa kote med njimi. Odnos med temi parametri opredeljuje kristalni razred, v katerega lahko uvrstimo posamezno osnovno celico (8).

Obstaja sedem različnih kristalnih sistemov, ki so predstavljeni na sliki 6: kubični, heksagonalni, trigonalni, tetragonalni, ortorombični (rombični), monoklinski in triklinski (rombohedralni).



Slika 6: Kristalni sistemi (14)

Ko kemijska entiteta obstaja v več kot enem kristaliničnem stanju, govorimo o prisotnosti polimorfov, solvatov oz. kokristalov. Vsaka od teh oblik ima različno razporeditev atomov v prostoru oziroma različno kristalno strukturo, posledično pa so različne tudi njihove fizikalno-kemijske, lahko tudi biofarmacevtske lastnosti (8).

Čeprav lahko kristale razvrstimo v sedem glavnih sistemov, so lahko relativne velikosti posameznih ploskev pri kristalih enake substance iz istega kristalnega razreda različne, saj lahko zaradi uporabe različnih topil ali prisotnosti primesi med procesom kristalizacije posamezni kristali v različnih smereh rastejo z različnimi relativnimi hitrostmi (15). Tako lahko spodbudimo rast enih in zaviramo nastanek drugih kristalnih ploskev, kar imenujemo sprememba zunanje oblike oz. habitusa kristala. To opazimo, na primer, znotraj heksagonalnega sistema, kjer lahko vidimo, da poleg prizmatičnih kristalov obstajajo tudi igličasti, ki v določeni smeri rastejo hitreje, in kristali v obliki ploščic, pri katerih je rast v eni smeri zavrta (16).



Slika 7: Modifikacije znotraj heksagonalnega sistema (14)

Poleg omenjenih oblik kristalov so v literaturi najpogosteje omenjene še kockasta, kjer so vse stranice kristala enako dolge, nitkasta, pri kateri so kristali podobni zelo dolgim in tankim iglicam, dendritična, za katero so značilni kristali v obliki drevesne krošnje, lopatasta, kjer so kristali dolgi, tanki in ploščati, paličasta, kjer so kristali v obliki podolgovatega valja, ter sferulitična, za katero je značilno, da igličasti ali paličasti kristali rastejo v sferični obliki iz skupne točke (8).

Na zunanji videz kristala, tj. njegovo morfologijo, imajo največji vpliv tiste ploskve, ki rastejo najpočasneje. Zaradi različnega števila, vrst in velikosti izraženih površin se kristali z različnimi habitusi med seboj razlikujejo v vrsti in številu na površini prisotnih funkcionalnih skupin, zato lahko izkazujejo tudi različno močljivost in hitrost raztapljanja ter tudi kemijsko reaktivnost. Zunanja oblika kristala lahko vpliva tudi na farmacevtsko-tehnološke lastnosti, npr. na pretočnost (kristali ibuprofena z igličasto zunanjo obliko imajo, na primer, slabše pretočne lastnosti kot kubični kristali iste zdravilne učinkovine), stisljivost, porazdelitev velikosti delcev itd. To posledično vpliva na procese izdelave trdnih farmacevtskih oblik, kot so granuliranje, polnjenje kapsul ali tabletiranje. Pri tabletiranju tolbutamida, npr. pri kristalih v obliki ploščic, pride do pojava kapic, medtem ko se pri tabletiranju iste zdravilne učinkovine z drugačnih habitusom take težave ne pojavljajo (16).

## 1.3 VPLIV POGOJEV KRISTALIZACIJE NA MORFOLOGIJO KRISTALOV

Glavni faktorji, ki poleg notranje strukture vplivajo na obliko kristalov, so vrsta kristalizacijskega topila, stopnja prenasičenja raztopine, mešanje in prisotnost nečistot oz. aditivov.

#### 1.3.1 VPLIV KRISTALIZACIJSKIH TOPIL

Topilo, ki ga uporabljamo kot kristalizacijski medij, lahko vpliva na vse faze nastanka kristala in tako pripomore k oblikovanju notranje kot tudi zunanje oblike kristala. Na izbiro topila za kristalizacijo v največji meri vpliva topnost izbrane substance v njem oziroma interakcije, do katerih pride med molekulami topljenca in topila. Z večanjem topnosti se namreč manjša medfazna energija in povečuje afiniteta med kristalizacijskim topilom ter kristalom topljenca. Posledično se zmanjša tudi nivo prenasičenja, ki je potreben za spontano nukleacijo, pri konstantnem prenasičenju pa nukleacija poteka hitreje. Slednje pa ne velja v primeru prisotnosti močnih vezi med topilom in topljencem. Preden pride do nukleacije, se morajo namreč molekule topljenca desolvatirati, da se lahko povežejo z drugimi molekulami topljenca, to pa je v primeru močnih vezi med topilom in topljencem oteženo, zato nukleacija poteka počasneje (8).

Različna topila vodijo tudi do različnega vzorca kristalne rasti, kar vodi do spremembe zunanje oblike kristala. Specifične interakcije molekul topljenca s topilom različne polarnosti pospešijo ali inhibirajo rast določenih ravnin kristala, raziskovalci pa si v razlagi vpliva polarnosti topil na morfologijo kristala niso enotni (17, 18). Polarna topila naj bi se preferenčno adsorbirala na ploskve z izpostavljenimi hidrofilnimi funkcionalnimi skupinami, nepolarna pa na ravnine, kjer prevladujejo hidrofobne skupine. Če se topilo močno veže na specifično ploskev kristala topljenca z vezavo na specifične funkcionalne skupine, je hitrost rasti kristala pogojena z odstranitvijo topila z omenjene ploskve (19). V prisotnosti hidrofilnih topil lahko pride do vzpostavitve močnih vodikovih vezi s polarnimi skupinami molekul zdravilne učinkovine, ki tvori kristal, zato je rast v tej smeri omejena in kristal hitreje raste v smeri hidrofobnih skupin ter tvori podolgovate kristale. Z zmanjševanjem hidrofilne narave topila je tudi verjetnost za tvorbo močnih vodikovih vezi

med topilom in polarnimi skupinami topljenca manjša, zato kristali začnejo rasti izodimenzionalno v vse smeri (20).

Tudi na primeru ibuprofena so dokazali, da preferenčna adsorpcija topila na specifične ploskve kristala inhibira njeno rast, saj je za odstranitev vezanega topila, ki omogoča nadaljnjo rast kristala, potrebna dodatna energija (21).

Po drugi strani pa Bennema s sodelavci (17, 18) meni, da preferenčne interakcije med topilom in topljencem na specifičnih ploskvah vodijo do zmanjšanja medfazne napetosti, kar povzroči spremembo površine iz gladke v hrapavo in posledično hitrejšo rast omenjenih ploskev.

### 1.3.2 VPLIV PRENASIČENJA

Morfologija kristalov je odvisna tudi od stopnje prenasičenja kristalizacijske raztopine. Površina se namreč spremeni iz ravne v grobo s povečanjem prenasičenosti raztopine, ki je tudi gonilna sila procesa izgradnje kristala. Pri nizki stopnji prenasičenja je površina nastajajočega kristala gladka in prevladuje spiralen mehanizem rasti, ko pa dosežemo kritično koncentracijo prenasičenja, pri kateri lahko nastajajo dvodimenzionalna jedra, pa prevladuje B + S-model s površinsko 2D-nukleacijo. Pri nizki stopnji prenasičenja tako nastaja manjše število večjih kristalov z ravnimi ploskvami oziroma s poliedrično obliko, medtem ko pri visoki stopnji prenasičenja, kjer prevladuje kontinuiran način rasti, nastaja večje število manjših kristalov, ki rastejo v vse smeri ter ustvarjajo sferične in dendritične delce (21).

#### **1.3.3 VPLIV PRISOTNOSTI NEČISTOT IN ADITIVOV**

Obseg spreminjanja oblike kristalov zaradi prisotnosti nečistot je predvsem odvisen od koncentracije teh snovi v sistemu. Že nekaj ppm nečistot (ostanki reaktantov, katalizatorjev, stranskih produktov ... predhodnih sinteznih stopenj) oz. razpadnih produktov lahko bistveno spremeni obliko kristala, zaradi česar je razumevanje takih interakcij pomemben del kristalizacijskega procesa.

Vgradnja drugih molekul (nečistot, aditivov ali molekul kristalizacijskih topil) v osnovne kristale med procesom kristalizacije je neizogibna, da pa do tega pride, mora med

molekulami »gosta« in »gostitelja« obstajati afiniteta, ki je posledica strukturne podobnosti. Dodatki, ki vplivajo na potek kristalizacije, so lahko aditivi, ki jih mediju dodamo z določenim namenom, lahko pa so to nečistote, ki so posledica sinteze ali razpada končnega produkta, npr. zdravilne učinkovine (6). Take substance vplivajo na proces nukleacije in rasti molekularnih kristalov na več načinov, ki jih lahko razdelimo v tri glavne skupine:

- če se molekule adsorbirajo na rastoče jedro, lahko blokirajo rast kristala. Take molekule v svoji strukturi vsebujejo del, ki je sterično in energetsko različen od gostiteljske molekule in onemogoči nadaljnjo rast katere od ploskev ali celotnega kristala;
- drugi mehanizem, prek katerega lahko gostujoče molekule vplivajo na končno obliko kristalov, se imenuje sidranje. V tem primeru se molekula nečistote adsorbira na rastočo kristalno enoto z orientacijo, ki ji omogoča vključitev v kristalno rešetko;
- tretji način vpliva gostujočih molekul na rast gostitelja pa je prek inhibicije nukleacije, ki je lahko posledica sterične in energetske prekinitve vodikove vezi (7).

#### 1.3.4 VPLIV MEŠANJA

Mešanje med procesom kristalizacije vpliva predvsem na velikost nastalih kristalov. Z mešanjem povečamo frekvenco trkov med molekulami topljenca, s čimer prej dosežemo aktivacijsko energijo, potrebno za tvorbo kristalizacijskega jedra, in tako pospešimo primarno nukleacijo. Med mešanjem pa hitreje pride tudi do medmolekulskih trkov ter trkov med molekulami in steno posode ali mešalom, kar predstavlja osnovo za sekundarno nukleacijo. Mešanje kristalizacijske raztopine torej pospeši primarno in sekundarno nukleacijo, kar vodi do nastanka manjših kristalov (22).

## **2 METODE**

# 2.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA – XRPD

XRPD je ena najpomembnejših analiznih metod za strukturne raziskave trdnih vzorcev, saj omogoča spremljanje kristaliničnosti in proučevanje različnih polimorfnih oblik preiskovanih substanc, s primerjavo z difraktogrami iz baze podatkov pa lahko s pomočjo te metode pogosto tudi identificiramo neznane vzorce.

Pri delu z difraktometrom obsevamo vzorec z rentgenskimi žarki določene valovne dolžine, torej z monokromatsko rentgensko svetlobo. Gre za del elektromagnetnega sevanja med gama in UV-žarki z valovnimi dolžinami  $100 - 0,1 \times 10^{-10}$  m (Å) (23).

Ob prehodu tovrstne svetlobe skozi preiskovano snov pride do sipanja rentgenskih žarkov. Če je vzorec amorfen, pride zaradi neurejenosti strukture v vseh smereh do približno enakega sipanja in na difraktogramu vidimo le enega ali več zelo razširjenih vrhov. Če pa je preiskovani vzorec kristaliničen in rentgenski žarek na svoji poti naleti na urejeno strukturo atomov, pride med sipanimi žarki do interference, katere posledica so ukloni rentgenskih žarkov, kar je prikazano na sliki 7 (23).



Slika 7: Shema potovanja rentgenskih žarkov skozi kristal (24)

Kot med izvorom žarkov in površino vzorca označimo s  $\theta$ . Vzorec se med analizo vrti s polovično hitrostjo detektorja, tako da je kot med izvorom žarkov in vzorcem vedno enak kotu med vzorcem in detektorjem, lahko pa se med analizo vrti izvor svetlobe, medtem ko je vzorec statičen. Pri vsakem kotu  $\theta$  se rentgenski žarki odbijejo od površine. Če je fazni

zamik med različnimi rentgenskimi žarki enak večkratniku valovne dolžine, se žarki okrepijo, drugače pa izničijo. Kote  $\theta$ , pri katerih se pojavijo ojačitve, izračunamo z Braggovo enačbo:

$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin^2 \theta$	$\theta$	/7/
n	red refleksije	
λ	valovna dolžina žarka	
d	razdalja med dvema rav	minama v kristalu
θ	lomni kot	

Rezultat rentgenske analize je difraktogram, ki podaja serijo uklonskih (difrakcijskih) črt, ki jih izmerimo pri določenih kotih. Ukloni žarkov na monokristalu nam dajejo podatke o osnovni celici, ukloni na praškastih vzorcih pa omogočajo identifikacijo fizikalne (kristalne oz. amorfne) oblike substance (23).

# 2.2 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA – SEM

SEM omogoča proučevanje morfologije površin trdnih snovi z veliko ločljivostjo, saj kot vir valovanja namesto vidne svetlobe uporablja curek elektronov, ki imajo kratko valovno dolžino.

Pospešeni elektroni nastanejo v elektronski puški in potujejo v vakuumu, da ostane njihov curek čim bolj homogen. Izsevane elektrone elektromagnetne leče zberejo v ozek snop, ki ga nato deflektor v vrsticah vodi po površini preiskovanega vzorca. Pri interakciji curka elektronov s površino vzorca nastanejo odbiti, sekundarni in Augerjevi elektroni ter elektromagnetni valovi v ultravijoličnem in rentgenskem delu spektra. Ojačan signal sekundarnih elektronov, tj. elektronov, ki so bili v vzorcu in so jih iz njega izbili primarni elektroni, potuje v katodno cev in izzove signal, ki ga elektronska vezja pretvorijo v sliko na zaslonu.

Pri analizi z elektronskim mikroskopom preiskovani vzorec v komori namestimo na nosilec, ki omogoča nagib in vrtenje okoli osi, tako da lahko vzorec opazujemo z vseh strani. Topografija vzorcev vpliva na smer in intenziteto sekundarnih elektronov, zato na zaslonu različno orientirane ploskve vidimo kontrastno, kar omogoča globinsko ostrino, torej realno sliko površine (25).

# 2.3 VREDNOTENJE SPECIFIČNE POVRŠINE

Specifična površina je lastnost trdnih snovi, pri kateri določamo površino na enoto mase ali prostornine. Ker trdne snovi vstopajo v reakcije prek svoje površine, je tudi pri trdnih substancah za farmacevtsko uporabo pomembno poznavanje tega parametra, saj vpliva na različne procese, kot so npr. hitrost raztapljanja, adsorpcija plinov itd. Pri snoveh z večjo specifično površino reakcije potekajo hitreje, imajo večjo hitrost raztapljanja in na njih se lahko adsorbira več plina kot na podobno snov z manjšo specifično površino.

Pravih vrednosti specifične površine vzorcev z nepravilnimi oblikami ne moremo izračunati iz informacije o velikosti delcev, zato specifično površino praškastih vzorcev določimo s fizikalno adsorpcijo inertnega plina na površino preiskovanega vzorca in z izračunom količine adsorbiranega plina s pomočjo BET-analize (Braun-Emmett-Teller). Pri tej metodi vzorec natehtamo v merilno celico, ki jo namestimo v postajo za analizo, pod njo pa postavimo Dewerjevo posodo s tekočim dušikom. Instrument na podlagi mase vzorca in prek izmerjenih sprememb tlaka kot posledice monoslojne adsorpcije in desorpcije molekul dušika na površino vzorca s pomočjo matematičnega modela določi specifično površino analiziranih vzorcev (26).

## 2.4 DOLOČANJE VELIKOSTI DELCEV Z LASERSKO DIFRAKCIJO

Laserska difrakcija je metoda, s katero določamo porazdelitev velikosti delcev. Temelji na dejstvu, da delci ob stiku z laserskim žarkom monokromatske svetlobe razpršijo svetlobo pod določenimi koti, ki so odvisni od velikosti delcev. Kot, pod katerim delec razprši svetlobo, logaritemsko raste z zmanjšanjem velikosti delcev. Poleg kota razpršene svetlobe pa je od velikosti posameznih delcev odvisna tudi intenziteta le-te. Večji delci tako sipajo svetlobo pod majhnimi koti z veliko intenziteto, manjši delci pa razpršujejo svetlobo pod večjimi koti z manjšo intenziteto.

Naprava za določanje velikosti delcev z lasersko difrakcijo je sestavljena iz enote za pripravo vzorca, ki je odgovorna za disperzijo in enakomerno porazdelitev delcev v zraku

ali tekočini, enega ali dveh laserjev kot izvora svetlobe točno določene valovne dolžine, detektorja, ki meri intenziteto razpršene svetlobe pod različnimi koti, in iz računalniškega sistema, ki na podlagi izbranega matematičnega modela izračuna velikost delcev. Pri izračunu velikosti delcev si najpogosteje pomagamo z Miejevo teorijo. Metoda temelji na predpostavki, da so delci sferične oblike, rezultat analize pa je podan volumsko in je izražen kot povprečni premer krogle, ki bi imela enak volumen kot analizirani delec.

Merjenje porazdelitve velikosti delcev poteka tako, da trden vzorec dispergiramo v ustrezni količini tekočine ali plina, da dobimo primerno koncentracijo suspendiranih delcev. Pri pripravi vzorca moramo biti pozorni na to, da ne pripravimo suspenzije s previsoko koncentracijo in da zagotovimo čim boljšo dispergiranost vzroca (čim manj aglomeriranih delcev), saj to lahko vpliva na končne rezultate meritev. Suspenzijo preiskovanega vzorca nato v merilni celici obsevamo z monokromatsko svetlobo, računalniški sistem pa na podlagi vzorca sipanja svetlobe določi porazdelitev velikosti delcev. Pri interpretaciji rezultatov analize si vedno pomagamo s komplementarnimi tehnikami (npr. z mikroskopijo) saj le tako lahko ugotovimo, kaj dejansko smo merili (primarne delce/aglomerate) in ali je med analizo prišlo do morebitnih sprememb vzorca (lomljenje primarnih delcev, kristalizacija itd.) (27).

## 2.5 MOČLJIVOST IN DOLOČANJE STIČNEGA KOTA

Močljivost je definirana kot sposobnost tekočine, da se razprostira po površini trdne ali tekoče snovi, ki v njej ni topna oziroma se z njo ne meša.

Merilo za močljivost trdnih snovi je stični kot oz. kot močenja ( $\theta$ ), ki ga geometrijsko opišemo s tangento na površino kapljevine ob stiku s trdno snovjo. Stični kot lahko zavzame vrednosti 0–180°. Pri 0° kapljevina popolnoma moči trdno snov, pri 180° pa pride do popolnega nemočenja. Če je kot močenja manjši od 90°, velja, da kapljevina moči trdnino, če pa je večji od 90°, kapljevina ne moči trdne snovi (28).

Na sliki 8 so predstavljene sile, ki delujejo na kapljico tekočine na površini trdne snovi. Površinska energija trdne snovi  $\gamma_{sv}$  povzroča razširjanje kapljice, temu procesu pa nasprotujeta medfazna energija med trdno snovjo in tekočino  $\gamma_{sl}$  ter vodoravna komponenta površinske napetosti tekočine  $\gamma_{lv}$ . cos $\theta$ .



Slika 8: Ravnovesje sil, ki jim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino (28).

Odvisnost stičnega kota od medfaznih napetosti med trdno, tekočo in plinasto fazo opisuje Young-Duprejeva enačba (28):

$\gamma_{sv} - \gamma_{sl} = \gamma_{lv} \cdot \cos \theta_{lv}$	$s\theta$ /8/
$\gamma_{sv}$	površinska energija trdne snovi
$\gamma_{sl}$	medfazna napetost med tekočino in trdno snovjo
$\gamma_{lv}$	površinska napetost tekočine

Obstaja več metod za določanje stičnega kota kapljice na površini trdne snovi s pomočjo metode sedeče kapljice, in sicer neposredno merjenje kota s pomočjo mikroskopa, ki omogoča merjenje s pomočjo vgrajene merilne skale, fotografiranje kapljice, ki mu sledi določitev stičnega kota s pomočjo izmerjene višine in polmera kapljice, ter snemanje kapljice s posebno aparaturo, pri čemer določimo stični kot iz videoslike. Prednost slednje metode je, da lahko kapljico hitro posnamemo in se tako izognemo vplivu spreminjanja stičnega kota zaradi neravne površine ter pronicanja tekočine v vzorec na rezultate naših meritev. Pri analizi posnetkov lahko za izračun stičnega kota uporabimo različne računalniške programe. Teoretično najbolj natančna metoda za izračun stičnega kota je Young-Laplaceovo prileganje ali analiza osnosimetrične oblike kapljice (axisymmetric drop shape analysis – ADSA). Pri tej metodi program obdela celotno obliko kapljice, pri

določevanju prileganja oblike pa upošteva, da poleg medfaznih interakcij vpliva na obliko kapljice tudi njena masa (29).

### 2.6 PREIZKUS RAZTAPLJANJA

Raztapljanje je ključen proces pri sproščanju zdravilne učinkovine iz farmacevtske oblike, saj je z njim pogojena absorpcija zdravilne učinkovine iz gastrointestinalnega trakta v krvni obtok. Proces raztapljanja je kontroliran z afiniteto med trdno zdravilno učinkovino in topilom, njegova hitrost pa je definirana kot količina trdnega topljenca, ki v časovni enoti preide v raztopino (3030). Na hitrost raztapljanja slabo topne zdravilne učinkovine vplivajo velikost njenih delcev in njihova topografija površine ter njena notranja zgradba, ki pogojuje njene površinske lastnosti (31).

Preizkusi raztapljanja se v farmacevtski industriji uporabljajo tako v fazi razvoja farmacevtskih oblik kot tudi pri testiranju njihove kakovosti. Gre za standardizirane postopke, s katerimi na relativno enostaven način dobimo informacijo o fizikalnih lastnostih farmacevtske oblike in obenem sklepamo na njeno biološko uporabnost. Evropska in ameriška farmakopeja za preizkušanje raztapljanja farmacevtskih oblik klasificirata več aparatur (aparatura 1 (vrteča košarica), aparatura 2 (vesla), aparatura 3 (cilinder), aparatura 4 (pretočni sistem), aparatura 5 (veslo nad diskom), aparatura 6 (rotirajoči cilinder)), ki jih lahko uporabimo tudi za karakterizacijo samih zdravilnih učinkovin. Pri teh moramo sicer v predformulacijskih študijah določiti intrinzično hitrost raztapljanja (IDR), kar nam omogoča uporaba Woodove naprave (30).

Pri svojem delu smo želeli spremljati hitrost raztapljanja modelne zdravilne učinkovine na intaktnih praškastih vzorcih, zato smo izvedli preizkus s pretočnim sistemom, ker pa smo želeli določiti hitrost raztapljanja tudi neodvisno od velikosti in specifične površine delcev, smo uporabili še metodo določanja IDR-ja.

### 2.6.1 INTRINZIČNA HITROST RAZTAPLJANJA

IDR (intrinsic dissolution rate) je definirana kot hitrost raztapljanja čiste zdravilne učinkovine s konstantne površine pri konstantnih pogojih (temperatura, hitrost mešanja, pH in ionska jakost medija za raztapljanje) (32).

Naprava za določanje IDR-ja je sestavljena iz pečata in matrice, ki ima na spodnji strani tri navoje, s pomočjo katerih najprej na matrico pritrdimo gladko podložno ploščo. V matrično vdolbino nato stresemo natehtano količino preiskovane snovi, vstavimo pečat in stisnemo s pomočjo hidravlične stiskalnice. Pri tem nastane komprimat, ki ima na spodnji strani površino definirane velikosti (0,5 cm<sup>2</sup>). Po stiskanju komprimata podložno ploščo in pečat odstranimo, matrico pa namestimo na držalo. Držalo z matrico namestimo na napravo za raztapljanje, ki zagotavlja njuno vrtenje s konstantno hitrostjo in omogoča termostatiranje testnega medija za raztapljanje. Držalo z matrico nato potopimo v medij, in sicer tako, da je matrica oz. površina preiskovanega vzorca oddaljena 2,5 cm od dna posode. Pri spuščanju nastavkov v testni medij moramo biti pozorni tudi na to, da preprečimo nastanek zračnih mehurčkov na površini preiskovane snovi, saj bi to lahko vplivalo na rezultate meritev (32, 33).



Slika 9: Woodova naprava (povzeto po 34)

## 2.6.2 PRETOČNI SISTEM

Pretočni sistem se uporablja predvsem za testiranje raztapljanja zdravilnih učinkovin z nizko topnostjo, saj nima omejitve volumna medija in tako omogoča doseganje sink pogojev v času celotnega procesa raztapljanja, kar zagotavlja, da delež raztopljene zdravilne učinkovine odseva raztapljanje, ki ni posledica morebitnega doseganja nivoja

nasičenja med testom sproščanja. Prednost te metode je tudi možnost spreminjanja pH-ja in sestave medija v času poskusa, zaradi česar se pogosto uporablja pri testih raztapljanja gastrorezistentnih farmacevtskih oblik. Zaradi omenjenih prednosti pretočnega sistema rezultati tako zasnovanega »in vitro« sproščanja dobro korelirajo z »in vitro« absorpcijo zdravilne učinkovine. S pomočjo pretočne celice lahko spremljamo raztapljanje praškov, tablet, kapsul in transdermalnih farmacevtskih oblik.

Pretočni sistem, ki smo ga uporabili pri izvajanju poskusov za diplomsko nalogo, je sestavljen iz sedmih osnovnih vzporednih pretočnih celic. Osnovna celica je sestavljena iz navpičnega valja, ki se na dnu zoži v stožec, ki je povezan s cevjo za dotok medija. Ta je v času poskusa usmerjen navzgor, njegov pretok pa je laminaren, kar mu omogočajo steklene kroglice s premerom 1 mm, s katerimi je napolnjen stožčasti del celice. Na dnu celice je steklena kroglica s premerom 5 mm, ki preprečuje prehod materiala in tekočine iz celice v dovodno cev, uhajanje neraztopljenih delcev iz vrha celice pa preprečuje filtrski sistem. Osnovno celico obdaja vodni plašč s temperaturo  $37 \pm 0.5$  °C, ki zagotavlja konstanto temperaturo medija znotraj celice (35).

Sistem je lahko odprt (odprta zanka) ali zaprt (zaprta zanka). V odprtem sistemu se dovaja svež medij v pretočno celico, ki odteka v zbiralnik vzorcev v določenem časovnem intervalu, v zaprtem sistemu pa medij v njem kroži skozi celico (35).



Slika 10: Ponazoritev odprtega sistema pretočne celice (povzeto po 35)

#### 2.7 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO

Mikroskopija na atomsko silo (Atomic Force Microscopy – AFM) je metoda, s pomočjo katere lahko opazujemo topografijo vzorcev v nanometrski do subangstremovski ločljivosti. Ker za razliko od drugih mikroskopij omogoča snemanje površin tako prevodnih kot tudi neprevodnih vzorcev in ker za svoje delovanje ne potrebuje vakuuma, temveč lahko spremljamo topografijo preiskovanih vzorcev v zraku ali tekočini, se pogosto uporablja v fizikalnih, kemijskih in bioloških laboratorijih, čedalje bolj pa se uveljavlja tudi v farmacevtski industriji (**37**37, 38). S to metodo lahko namreč opazujemo površino zdravilnih učinkovin in pomožnih snovi na molekularnem nivoju, omogoča pa nam tudi »in situ« vpogled v raztapljanje zdravilnih učinkovin (5, 7, 39, 40).



Slika 11: Shema delovanja mikroskopa na atomsko silo (povzeto po 37)

Osnovni princip delovanja mikroskopa na atomsko silo je prikazan na sliki 11. Glavni del mikroskopa predstavlja tipalo, ki je narejeno iz silicija ali silicijevega nitrida. Sestavlja ga upogljiva ročica, na koncu katere se nahaja ostra konica stožčaste ali piramidalne oblike. Z vrhom te konice se s pomočjo piezoelektričnega vodila pomikamo po površini vzorca, pri čemer AFM zazna sile (odbojne, van der Waalsove, privlačne, elektrostatske, magnetne) med konico in preiskovano površino vzorca. Posledica detektiranih sil je uklon ročice, ki ga opazimo s pomočjo laserske svetlobe. To namreč usmerimo na tipalo, od koder se odbije do krajevno občutljivega fotodetektorja, ki zazna uklon in posreduje to informacijo do računalniškega sistema. Ta s pomočjo programov pretvori dobljeni signal v tridimenzionalno sliko površine vzorca (37).

Obstaja več načinov snemanja topografije vzorcev s pomočjo AFM-ja. Najpogosteje se uporablja kontaktni način, pri katerem ostane konica v kontaktu z vzorcem v času celotnega poskusa. Med konico in preiskovano površino se prek povratne zanke med fotodiodo in piezoelektričnim vodilom vzdržuje konstantna sila ročice, pri čemer pride do uklona ročice v smeri z. Ta informacija skupaj z informacijo o x- in y-položaju tipala pomaga sestaviti tridimenzionalno sliko preiskovanega vzorca. Kontaktni način se uporablja predvsem za opazovanje zelo trdnih in gladkih površin, saj lahko ob prehodu skozi stopničasto površino ali pa zgolj zaradi privlačnih sil med konico in preiskovano površino pride do poškodbe vzorca ali konice (37).

Če imamo krhke vzorce, ki se zlahka deformirajo, je bolje, da uporabimo katerega od drugih dveh načinov AFM-snemanja, torej nekontaktni ali mešani način. Pri nekontaktnem načinu ročica oscilira nekaj nanometrov nad površino vzorca z majhno amplitudo. Konstantnost amplitude zagotavlja povratna zanka med fotodiodo in piezoelektričnim vodilom. Ko se konica približa vzorcu, se med njima vzpostavijo daljnosežne sile (van der Waalsove, elektrostatske), ki povzročajo različne uklone in tako dajejo informacijo o površini vzorca.

Za občutljive vzorce lahko uporabimo tudi mešan način snemanja z AFM, pri katerem konica tipala na nosilcu oscilira z resonančno frekvenco. Konica se pri vsakem nihaju dotakne površine, pri tem pa pride do zmanjšanja amplitude osciliranja, to pa predstavlja merilo za ohranjanje konstantne razdalje med konico in preiskovanim vzorcem. Tudi na ta način prek računalniške pretvorbe signalov dobimo informacijo o topografiji vzorca (37).

### 2.7.1 UPORABA MIKROSKOPA NA ATOMSKO SILO ZA SPREMLJANJE RAZTAPLJANJA

Pri spremljanju raztapljanja površine kristala se najpogosteje uporabljata kontaktni in mešani način snemanja površine, in sicer zato, ker omogočata stik tipala s preiskovanim vzorcem, s tem pa lahko dobimo natančnejšo sliko le-tega. Proces raztapljanja lahko spremljamo na dva načina. Prvi je »ex situ«, ko vzorec v določenih časovnih intervalih odstranjujemo iz medija in snemamo njegovo površino na zraku, drugi pa »in situ«, ko spremljamo spremembo površine kristala v mediju za raztapljanje, in tako dobimo informacijo o dinamiki procesa (5, 7, 39, 40). Glavna slabost te metode je, da se zaradi

premikanja vzorca zelo težko znova vrnemo na osnovno področje, ki ga analiziramo skozi čas.

S pomočjo »in situ« metode so raziskovalci, ki so preiskovali raztapljanje različnih ploskev kristala acetilsalicilne kisline, določili tudi IDR. Med raztapljanjem so namreč na določeni površini merili spremembo položaja roba stopnice oziroma potopitev teras v odvisnosti od časa. Ugotovili so, da imajo različne ravnine različne hitrosti raztapljanja, ki pa so odvisne od orientacije molekul na površini in od mehanizma raztapljanja (5). Razlike v vzorcih raztapljanja posameznega kristala je pokazal tudi Li s sodelavci (39) na primeru paracetamola. Ugotovil je, da je v različnih topilih mehanizem raztapljanja različen, odvisen pa je od kristalne strukture in interakcije topila z molekulami paracetamola na površini kristala.

Naravo preiskovanih površin lahko preverimo z AFM-jem tudi z uporabo konic, ki imajo na svojem vrhu prisotne nepolarne ali polarne funkcionalne skupine. Z merjenjem sil med površinami vzorca in funkcionaliziranimi konicami lahko ocenimo, ali preiskovana površina izkazuje bolj hidrofilne ali hidrofobne lastnosti, in tako pojasnimo različne hitrosti raztapljanja pri različnih morfoloških oblikah kristala (41).

## **3 NAMEN DELA**

V okviru diplomske naloge smo želeli proučiti vpliv izbora kristalizacijskih topil in načina kristalizacije na fizikalno-kemijske lastnosti modelne zdravilne učinkovine K-3005. Za modelno zdravilno učinkovino K-3005 je v literaturi omenjena samo ena kristalna oblika, kar nam je omogočalo, da smo opazovali razlike, ki so bile posledica le drugačne zunanje oblike kristalov.

Da bi proučili vpliv pogojev kristalizacije na zunanjo obliko kristalov, smo na različne načine pripravili kristale izbrane modelne zdravilne učinkovine. Za prekristalizacijo smo uporabili topili različnih polarnosti, ki smo jima v procesu kristalizacije dodali izbrana sotopila in antitopila. Pri izbiri topil je bilo poleg razlike v dielektrični konstanti ključno dejstvo, da so v izbranem razmerju z zdravilno učinkovino in dodatki omogočala pripravo večjih posameznih kristalov, ki smo jih želeli vključiti v svoje analize. Iz izbranih topil smo tako z modifikacijo pogojev kristalizacije dobili praškaste vzorce s primerljivimi velikostmi delcev in specifično površino ter posamezne velike kristale modelne zdravilne učinkovine K-3005. Pripravljene vzorce smo analizirali z različnimi instrumentalnimi tehnikami, iz dobljenih rezultatov pa poskušali ugotoviti korelacije s pogoji kristalizacije, predvsem z naravo (polarnostjo) topila za prekristalizacijo.

Za karakterizacijo kristalne strukture in zunanje oblike delcev, njihovih površinskih lastnosti in določanje profila raztapljanja smo uporabili naslednje metode:

- XRPD,
- termogravimetrična analiza (TGA),
- diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC),
- optična in vrstična elektronska mikroskopija,
- analiza porazdelitve velikosti delcev,
- vrednotenje specifične površine,
- kot močenja,
- določanje topnosti,
- določanje IDR-ja,
- določanje profila raztapljanja s pretočno celico,
- določanje mehanizma raztapljanja z mikroskopom na atomsko silo.
# 4 EKSPERIMENTALNI DEL

# 4.1 UPORABLJENI MATERIALI IN NAPRAVE

# MATERIALI:

- K-3005, Krka, d. d., Slovenija,
- etanol, Riedel de Haën, Nemčija,
- aceton, Merck, Nemčija,
- n-heptan, Merck, Nemčija.

## NAPRAVE ZA PRIPRAVO VZORCEV:

- magnetno mešalo z grelcem RCT basic IKA Labortechnik, Nemčija,
- tehtnica Mettler Toledo PG6002-S Delta Range, Švica.

## NAPRAVE ZA ANALIZO:

- rentgenski difraktometer Philips X'pert Pro, Nizozemska,
- DSC 822e Mettler Toledo, ZDA,
- TGA/DSC1 Mettler Toledo, ZDA,
- optični mikroskop Olympus BX50, povezan z digitalno kamero Olympus DP70, Japonska,
- vrstični elektronski mikroskop ULTRA plus, Carl Zeiss, Nemčija,
- naprava za analizo velikosti delcev Mastersizer 2000, Malvern instruments, Velika Britanija,
- naprava za določanje specifične površine Tristar 3000, Micromeritics, ZDA,
- naprava za določanje IDR-ja VanKel 7000, ZDA,
- inkubator 100 s stresalnikom Unimax 1010, Heidolph, Nemčija,
- naprava za merjenje stičnega kota Drop Shape Analysis System DSA30, Krüss, Nemčija,
- aparatura za testiranje sproščanja (USP4): Sotax pretočna celica CE7 smart Sotax, Švica,
- mikroskop na atomsko silo Innova microscope, Vecco, ZDA.

#### 4.2 PRIPRAVA VZORCEV K-3005

Z različnimi načini prekristalizacije modelne zdravilne učinkovine K-3005 smo pripravili več vzorcev z isto notranjo strukturo in različnimi zunanjimi lastnostmi delcev. Pri tem smo ciljano izbrali kombinacije topil z različnimi površinskimi lastnostmi, saj smo v nadaljevanju eksperimentalnega dela želeli proučiti predvsem vpliv polarnosti topil in vpliv različnih načinov izolacije na fizikalno-kemijske lastnosti modelne zdravilne učinkovine.

Želeli smo izolirati delce s čim bolj podobno velikostjo in specifično površino, da bi lahko v nadaljnjih eksperimentih izključili vpliv teh dveh parametrov na hitrost raztapljanja, ki smo jo izbrali kot indikativni parameter za preverjanje uspešnosti inženiringa delcev s prekristalizacijo s ciljem pospešitve hitrosti raztapljanja modelne zdravilne učinkovine.

Za pripravo vzorcev smo zato izbrali eno nepolarno in eno polarno topilo, in sicer aceton z dielektrično konstanto 20,7 ter heptan z dielektrično konstanto 1,9. V kombinaciji s heptanom smo sicer kot sotopilo uporabili etanol, ki je polarno topilo, a smo zaradi nizke koncentracije le-tega v zmesi topil predpostavili, da je na nastanek kristalov v tem primeru vplival predvsem heptan, ki je nepolarno topilo. Izmed topil, preizkušanih v predposkusih (metanol, etanol, izopropanol, aceton, etilacetat, cikloheksan, heptan), smo se za omenjeni odločili tudi zato, ker sta v kombinacijah z izbranimi sotopili in antitopili ob modifikaciji pogojev izolacije omogočali tudi pripravo večjih posameznih kristalov, ki smo jih želeli vključiti v raziskave vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti na hitrosti raztapljanja. Pri kristalizaciji različnih vzorcev iz posameznega izbranega topila smo vedno uporabili enako razmerje zdravilne učinkovine, topila in dodatkov, da bi izključili vpliv teh parametrov na rezultate analiz. Priprava vzorcev iz istih topil se je tako razlikovala le v hitrosti in času mešanja med procesom kristalizacije ter v hitrosti dodajanja antitopila, tako da smo lahko z analizami pripravljenih vzorcev spremljali tudi vpliv teh parametrov na zunanjo obliko kristalov modelne zdravilne učinkovine.

#### VZOREC K-3005-A1

Za kristalizacijo vzorca K-3005-A1 smo uporabili aceton in vodo, ki je imela v procesu kristalizacije vlogo antitopila. 2 g izhodne substance smo natehtali v 200-mililitrsko erlenmajerico, jo raztopili v 20 ml acetona, nato pa smo med mešanjem na magnetnem

mešalu s hitrostjo 900 RPM v erlenmajerico zlili 30 ml prečiščene vode. Pri tem so se takoj izoborili kristali, ki smo jih s filtriranjem s pomočjo podtlaka ločili od matičnice in posušili v vakuumskem sušilniku.

#### VZOREC K-3005-A2

Vzorec K-3005-A2 smo pripravili na podoben način kot vzorec K-3005-A1, le da smo v tem primeru v 200-mililitrski erlenmajerici v 20 ml acetona raztopili 2 g izhodne substance, nato pa tej raztopini med mešanjem na magnetnem mešalu s hitrostjo 900 RPM dodajali 30 ml prečiščene vode po kapljicah, in sicer s hitrostjo približno 2 ml/min. Nastale kristale smo odfiltrirali s pomočjo podtlaka in posušili v vakuumskem sušilcu.

#### **VZOREC K-3005-H1**

Za pripravo vzorca K-3005-H1 smo v 200-mililitrsko erlenmajerico natehtali 4 g izhodne substance, jo raztopili v 10 ml etanola in dodali 200 ml n-heptana. Pripravljeno raztopino smo mešali na magnetnem mešalu s hitrostjo 900 RPM, v erlenmajerico pa smo uvedli cev s podtlakom. Po približno uri in pol so v erlenmajerici začeli izpadati kristali, ki smo jih izolirali, odnučirali in posušili v vakuumskem sušilniku.

#### VZOREC K-3005-AV

Vzorec K-3005-AV smo pripravili v 100-mililitrski čaši, v katero smo natehtali 2 g izhodne substance in jo raztopili v 20 ml acetona. Nato smo po kapljicah dodajali 30 ml prečiščene vode. V tem primeru so v petih dneh nastali nekaj centimetrov dolgi kristali. Izolacija kristalov iz raztopine v tem primeru ni bila potrebna, saj so topila v času nastanka kristalov odparela.

#### VZOREC K-3005-HV

Pri pripravi vzorca K-3005-HV smo uporabili enak postopek kot pri pripravi vzorca K-3005-H1, le da v tem primeru nismo uporabili mešanja in pospeševanja odparevanja topila s pomočjo podtlaka. 2 g izhodne substance smo raztopili v 10 ml etanola, dodali 200 ml n-heptana in pustili stati sedem dni, ko so iz raztopine zrasli posamezni kristali, dolgi do 5 cm, topila pa so v tem času popolnoma odparela.

# 4.3 ANALIZNE METODE

# 4.3.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

### UPORABLJENA OPREMA:

• rentgenski difraktometer Philips X'pert Pro, Nizozemska.

### POGOJI ANALIZE:

- CuKα-radiacija,
- območje: 2,9280–31,0615° 2Θ,
- korak: 0,0167 2Θ,
- integracijski čas: 250,190 s,
- valovna dolžina: 1,5418 Å.

# 4.3.2 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

### UPORABLJENA OPREMA:

• DSC822e proizvajalca Mettler Toledo, ZDA.

## POGOJI ANALIZE:

- hitrost sevanja: 10°/min,
- atmosfera: N<sub>2</sub>,
- temperaturno območje: 20–220 °C.

## 4.3.3 TERMOGRAVIMETRIČNA ANALIZA

### UPORABLJENA OPREMA:

• TGA/DSC proizvajalca Mettler Toledo, ZDA.

### POGOJI ANALIZE:

- hitrost sevanja: 10°/min,
- atmosfera: N<sub>2</sub>,
- temperaturno območje: 20–220 °C.

### 4.3.4 ANALIZA OBLIKE DELCEV

#### UPORABLJENA OPREMA:

- optični mikroskop Olympus BX50, Japonska,
- vrstični elektronski mikroskop Carl ZEISS ULTRA plus, Nemčija, s programsko opremo ULTRA PLUS 4501 NTS SEM/TEM Machine PC.

### PRIPRAVA VZORCEV

Vzorce, ki smo jih opazovali pod optičnim mikroskopom, smo pred analizo dispergirali v 1-odstotni raztopini Tweena<sup>®</sup> 20, ki je povečala kot močenja med medijem in preiskovano zdravilno učinkovino ter povzročila razpad skupkov kristalov in omogočila ogled posameznih delcev pod mikroskopom. Predpriprava vzorcev za opazovanje pod elektronskim mikroskopom ni bila potrebna.

## 4.3.5 ANALIZA PORAZDELITVE VELIKOSTI DELCEV

#### UPORABLJENA OPREMA:

 naprava za analizo velikosti delcev Mastersizer 2000, Malvern instruments, Velika Britanija.

### PRIPRAVA VZORCEV

Preiskovane vzorce smo najprej dispergirali v 1-odstotni vodni raztopini Tweena<sup>®</sup> 20. Za popolno dispergiranje do primarnih delcev preiskovanih vzorcev smo pripravljeno disperzijo pred analizo obdelali z ultrazvokom (60 sekund s 50 % moči). Pred tem smo se z opazovanjem vzorca pod mikroskopom prepričali, da z omenjeno analizo ne poškodujemo primarnih delcev preiskovanih vzorcev. Uporabljena naprava za analizo velikosti delcev deluje na osnovi laserske difrakcije, rezultati meritev pa so podani v volumskih odstotkih in predstavljajo polmer, ki bi ga imela krogla z enakim volumnom kot analizirani delec.

## 4.3.6 SPECIFIČNA POVRŠINA

#### UPORABLJENA OPREMA:

• naprava za določanje specifične površine Tristar 3000, Micromeritics, ZDA.

#### PRIPRAVA VZORCEV

Vzorce smo pripravili tako, da smo v predhodno stehtano stekleno celico za analizo natehtali ustrezno količino vzorca, tako da je zapolnjevala približno polovico bučke. Vzorec smo nato razplinili s pomočjo vakuuma, da smo s površine vzorcev odstranili snovi, ki so bile nanjo adsorbirane. Tako pripravljene vzorce smo analizirali po predpisanem postopku.

## 4.3.7 MERJENJE STIČNEGA KOTA

#### UPORABLJENA NAPRAVA:

 naprava za merjenje stičnega kota Drop Shape Analysis System – DSA30, Krüss, Nemčija, ki je povezan z računalniškim programom Drop Shape Analysis.

#### PRIPRAVA VZORCEV

Približno 200 mg vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 smo stisnili s silo ene tone (60 s) v tabletke, na katerih smo z metodo sedeče kapljice določili stični kot. Na pripravljeno tabletko smo z injekcijskim delom aparature kapnili po 3  $\mu$ L prečiščene vode, ki smo jo izbrali za testno raztopino. Stični kot smo na izbranih vzorcih predhodno preverili z mediji z različno polarnostjo (dijodometan, formamid, prečiščena voda). Za izbor prečiščene vode smo se odločili, ker se je od vseh izbranih medijev izkazala za najbolj diskriminatorno. Stični koti preiskovanih vzorcev s prečiščeno vodo so bili tudi najbolj podobni stičnim kotom z medijem, ki smo ga kasneje uporabili za določanje IDR-ja (fosfatni pufer pH = 7 z 0,2 % SDS). Ta se najbolj približa pogojem, v katerih se formulacija raztaplja »in vivo«. Kapljico na površini tabletke smo slikali z vgrajeno kamero, pri čemer smo pazili, da je bila kapljica na sliki ustrezno osvetljena in izostrena, da je računalniški program prepoznal njeno velikost in z metodo Young-Laplaceovega prileganja določil stični kot. Pri določanju stičnih kotov vzorcev K-3005-AV in K-3005-HV smo uporabili posamezne monokristale z ravno površino.

## 4.3.8 DOLOČANJE TOPNOSTI

#### UPORABLJENA OPREMA:

• inkubator 100 s stresalnikom Unimax 1010, Heidolph, Nemčija.

### PRIPRAVA VZORCEV

Preiskovanim vzorcem smo topnost določili z metodo stresanja. V erlenmajerico smo natehtali 10 mg preiskovanega vzorca, dodali 10 ml fosfatnega pufra pH = 7 z 0,2 % SDS in ga 3 ure stresali v inkubatorju pri temperaturi 37 °C. Raztopino smo nato filtrirali in po interni metodi določili vsebnost zdravilne učinkovine s pomočjo HPLC-instrumenta z UV-detekcijo.

# 4.3.9 DOLOČANJE INTRINZIČNE HITROSTI RAZTAPLJANJA

### UPORABLJENA OPREMA:

• naprava za določanje IDR-ja VanKel 7000, ZDA.

### POGOJI ANALIZE:

- hitrost vrtenja nastavkov: 50 obratov/min,
- čas analize: 5 ur,
- interval vzorčenja: 1 ura,
- testni medij: fosfatni pufer  $pH = 7 \ge 0.2$ % SDS,
- volumen medija: 500 ml,
- temperatura medija:  $37 \pm 0.5$  °C.

### PRIPRAVA VZORCEV:

- masa vzorca: 150 mg,
- sila stiskanja: 1 t.

Vzorčili smo ročno prek filtrskih nastavkov s porami velikosti 0,22 μm, koncentracijo modelne zdravilne učinkovine v vzorcih pa smo določili s pomočjo HPLC-analize.

## 4.3.10 PREIZKUS RAZTAPLJANJA S PRETOČNO CELICO

#### UPORABLJENA OPREMA:

 Aparatura za preizkus raztapljanja (USP4): Sotax pretočna celica CE7 smart Sotax, Švica.

#### POGOJI ANALIZE:

- premer pretočne celice: 22,6 mm,
- testni medij: fosfatni pufer pH = 7 z 0,2 % SDS,
- temperatura medija:  $37 \pm 0.5$  °C,
- pretok medija: 10 ml/min,
- čas analize: 60 minut,
- interval vzorčenja: 15, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 min.

#### PRIPRAVA VZORCEV:

• masa vzorca: 40 mg.

Raztapljanje vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 smo spremljali tudi s pretočno celico, in sicer na odprtem sistemu. Odplavljanje delcev vzorca je preprečeval filter Whatman Grade GF s porami velikosti 1  $\mu$ m, ki smo ga vstavili na vrh pretočne celice. Vzorčenje je potekalo avtomatsko, vzorce pa smo pred analizo na HPLC-ju prefiltrirali skozi filter s porami velikosti 0,22  $\mu$ m.

## 4.3.11 SPREMLJANJE RAZTAPLJANJA Z MIKROSKOPOM NA ATOMSKO SILO

#### UPORABLJENA OPREMA:

- mikroskop na atomsko silo Innova microscope, Vecco, ZDA,
- celica CP-II MicroCell.

#### PRIPRAVA VZORCEV

Za spremljanje raztapljanja monokristalov vzorcev K-3005-AV in K-3005-HV smo uporabili celico CP-II MicroCell, ki omogoča snemanje površine vzorca v tekočini. Preiskovano površino (50  $\mu$ m x 50  $\mu$ m) izbranega kristala smo najprej posneli s kontaktnim načinom v zraku, s čimer smo se prepričali, da je površina, ki jo snemamo, ravna, nato pa smo s pomočjo injekcijske brizge na vzorec dodali medij za raztapljanje, tj. fosfatni pufer pH = 7 z 0,2 % SDS. Slike površine vzorca v tekočini smo snemali v 15-minutnih intervalih. Pred to analizo smo posneli slike preiskovanih kristalov z elektronskim mikroskopom, s čimer smo želeli preveriti, ali so na kristalu prisotne nepravilnosti, ki bi lahko vplivale na proces raztapljanja ali na izvedbo analize.

# 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

# 5.1 RENTGENSKA PRAŠKOVNA DIFRAKCIJA

Za modelno zdravilno učinkovino K-3005 je v literaturi opisana samo ena kristalna oblika. Iz difraktogramov (slika 12) je razvidno, da imajo vzorci K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H3 tako pred kot po stiskanju enako kristalno strukturo. Difraktograme vzorcev smo primerjali s standardnim difraktogramom za modelno zdravilno učinkovino in ugotovili, da se ukloni pri preiskovanih vzorcih in standardu pojavljajo pri enakih kotih. Iz tega je razvidno, da imajo vsi vzorci, ki smo jih pripravili, enako kristalno obliko kot standard, to pa je kristalna oblika, ki je opisana tudi v literaturi.



Slika 12: Primerjava difraktogramov vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 (pred in po stiskanju s silo 1 t) s standardom modelne zdravilne učinkovine

Glede na to, da je namen diplomske naloge proučiti tudi IDR, kjer priprava vzorcev zahteva stiskanje delcev v ploščico, smo želeli preveriti, kako na morfologijo kristalov vzorcev vpliva stiskanje. Iz vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 smo pripravili

ploščice, ki smo jih stisnili z enako silo, kot smo jo uporabili tudi za pripravo vzorcev za določanje IDR-ja. Iz difraktogramov je razvidno, da s stiskanjem nismo spremenili kristalne oblike modelne zdravilne učinkovine, opazimo pa lahko, da je pri stiskanju prišlo do manjših sprememb intenzitet posameznih uklonov, kar je lahko posledica manjših poškodb (lomljenja) primarnih delcev in posledične spremembe preferenčne orientacije delcev naših vzorcev. Po stiskanju pride tudi do delne amorfizacije oz. zmanjšanja kristaliničnosti preiskovanih vzorcev, kar vidimo predvsem v dvigu ozadja in znižanju celokupne površine pod krivuljo uklonov na difraktogramih. Najslabše kristaliničen pred kot tudi po stiskanju je vzorec K-3005-A1, večjo kristaliničnosti pa smo opazili pri vzorcu K-3005-H1 in največjo pri vzorcu K-3005-A2. Stopnja kristaliničnosti oz. amorfnosti vzorca ima pomemben vpliv na potek raztapljanja, saj amorfne oblike praviloma izkazujejo višjo (neravnotežno) topnost in posledično višjo hitrost raztapljanja, ki smo jo pri preiskovanih vzorcih proučevali v nadaljnjih eksperimentih.

Z rentgenskim difraktometrom smo posneli tudi difraktogram posameznih večjih kristalov vzorcev K-3005-AV in K-3005-HV. Uklonska slika takih monokristalov, posneta na klasičnem difraktometru, je odvisna od orientacije kristala in nam daje informacijo predvsem o preferenčno izpostavljeni ravnini preiskovanega delca. Na difraktogramu se višji ukloni pri preiskovanih vzorcih pojavljajo pri različnih kotih, kar nakazuje, da imata kristala na preiskovanih površinah izpostavljene različne funkcionalne skupine, kar je lahko posledica dejstva, da sta preiskovana vzorca K-3005-AV in K-3005-HV pripravljena iz topil z različnima dielektričnima konstantama.



Slika 13: Primerjava difraktogramov vzorcev K-3005-AV in K-3005-HV

# 5.2 TERMIČNA ANALIZA

## 5.2.1 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

Z DSC-jem smo vzorcem K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 določili talilno entalpijo ter temperaturo tališča. Iz posnetega DSC-termograma (slika 14) in podatkov, dobljenih v času analize, je razvidno, da imajo vsi vzorci pričakovano enako tališče (138,39–138,80 °C), ki je tudi enako tališču standarda (138,87 °C), kar lahko pripišemo dejstvu, da imajo vsi posneti vzorci enako kristalno strukturo. Talilni vrhovi v DSC-termogramu so pravilni in ozki, kar nakazuje, da so vzorci čisti oz. da ne vsebujejo primesi in imajo primerljivo porazdelitev velikosti delcev.



Slika 14: Primerjava DSC-krivulj izbranih vzorcev in standarda modelne zdravilne učinkovine

	T <sub>tal</sub> *(°)	T <sub>max</sub> (°)	$\Delta H_{tal} (J/g)$
K-3005-A1	138,80	140,67	66,71
K-3005-A2	138,53	140,67	72,36
К-3005-Н1	138,39	140,67	70,69
STANDARD	138,87	140,50	72,31

\* Tališča so določena kot ekstrapolirane vrednosti temperature začetka taljenja (»onset T«).

## 5.2.2 TERMOGRAVIMETRIČNA ANALIZA

S TGA-analizo smo želeli določiti zaostanek topil po sušenju pripravljenih vzorcev, saj smo hoteli izključiti vpliv adsorbirane vode in drugih hlapnih nečistot iz predhodnih faz sinteze ter izolacije vzorcev na analize, s katerimi smo vzorce ovrednotili. Ta metoda namreč omogoča določitev celokupne vsebnosti hlapnih snovi v preiskovanem vzorcu, v kombinaciji z masno spektroskopijo pa lahko določimo tudi, za katere hlapne snovi gre.

	K-3005-A1	K-3005-A2	K-3005-H1
Vsebnost hlapnih snovi	0,22 %	0,33 %	0,17 %

S TGA-analizo, ki je sklopljena z metodo masne spektroskopije, smo preverili, katere hlapne snovi so prisotne v vzorcih K3005-A1, K3005-A2 in K3005-H1. Pri vseh analiziranih vzorcih smo določili le prisotnost njihovih prekristalizacijskih topil. Pri vzorcih K-3005-A1 in K-3005-A2 sta bila prisotna voda in aceton, pri vzorcu K-3005-H1 pa etanol in heptan. Vsebnost prisotnih hlapnih snovi pri nobenem od vzorcev ni presegala 0,5 %, kar je premalo, da bi vplivalo na rezultate naših analiz.

#### 5.3 ANALIZA OBLIKE DELCEV

Na slikah, posnetih z optičnim mikroskopom, lahko vidimo razlike v morfologiji in velikosti delcev prekristalizirane modelne zdravilne učinkovine K-3005, in sicer vzorcev A1, A2 in H1. Vidimo lahko, da so delci vzorcev K-3005-A1 igličasti in v obliki rezila, podobno, pretežno podolgovato obliko imajo tudi delci vzorca K-3005-H1, vzorec K-3005-A2 pa sestavljajo delci v obliki ploščic. Do razlike v zunanjem videzu kristalov K-3005-A2 in K-3005-H1 je lahko prišlo tako zaradi različnega poteka kristalizacije kot tudi zaradi drugačnega izbora prekristalizacijskih topil pri pripravi omenjenih vzorcev. Vzorca K-3005-A1 in K-3005-A2 pa sta bila pripravljena iz enakih topil, torej je na spremembo morfologije in velikosti kristala vplivala hitrost dodajanja vode, ki je imela v našem primeru vlogo antitopila in je z zmanjšanjem topnosti uporabljene zdravilne učinkovine omogočila doseganje prenasičenja raztopine.

V primeru hitrega dodatka vode v raztopino modelne zdravilne učinkovine v acetonu so nastali igličasti kristali in kristali v obliki rezila (oblika podolgovatih in tankih ploščic), ko smo dodajali antitopilo počasi (po kapljicah), pa so nastali delci v obliki ploščic. V primeru hitrega dodajanja vode je najverjetneje prišlo do oviranja rasti kristala v več smereh, kar je omogočilo rast kristala pretežno v eni smeri in nastanek podolgovatih in igličastih kristalov, medtem ko je pri počasnejšem dodajanju antitopila prišlo do oviranja rasti kristala v eni smeri in nastanka kristalov v obliki ploščic. Mešanje je v primeru kristalizacije vzorcev K-3005-A1 in K-3005-A2 povzročilo tudi lomljenje kristalov, kar je vidno predvsem na sliki 16 pri vzorcu K-3005-A2, predvsem pa je pospešilo kristalizacijo in zmanjšalo velikost nastalih delcev. Pri vzorcu K-3005-AV, ki je pripravljen na enak način kot vzorca K-3005-A1 in K-3005-A2, le da pri kristalizaciji nismo uporabili mešanja, so kristali namreč nastali v petih dneh, bili pa so tudi bistveno večji, in sicer dolgi približno 2 cm, široki nekaj milimetrov ter visoki manj kot 1 mm. Imeli so obliko ploščice, kar glede na hitrost dodajanja vode (po kapljicah) ob pripravi teh velikih kristalov potrjuje, da pri počasnejšem dodajanju topila pride do zaviranja rasti kristala pretežno v eni smeri.

Iz slik 15, 16 in 17 je razvidno tudi to, da so pri pripravi vzorcev nastali tudi skupki kristalov.



Slika 15: Vzorec K-3005-A1, posnet pri 400-kratni povečavi



Slika 16: Vzorec K-3005-A2, posnet pri 400-kratni povečavi



Slika 17: Vzorec K-3005-H1, posnet pri 400-kratni povečavi

Iz slik, posnetih z optičnim mikroskopom, ni opaziti bistvene razlike v morfologiji delcev vzorcev K-3005-A1 in K-3005-H1, zato smo posneli kristale še z elektronskim mikroskopom, ki omogoča tridimenzionalno snemanje vzorcev pri višjih povečavah. Tu lahko opazimo, da je vzorec K-3005-A1 sestavljen pretežno iz delcev v obliki rezila, kar smo predpostavili tudi ob sliki, posneti z optičnim mikroskopom, ko smo ugotovili, da ploščice neenakomernih oblik kristalov sestavljajo vzorec K-3005-A2, kar ravno tako potrjuje opažanja z optičnim mikroskopom, ter da so kristali vzorca K-3005-H1 podolgovati in večinoma prizmatične oblike. Pri pripravi vzorcev iz heptana smo si pomagali z dodatkom sotopila, tj. etanola. V njem je namreč za razliko od heptana modelna zdravilna učinkovina zelo dobro topna, s heptanom pa se etanol dobro meša, tako da nam je izbrani način prekristalizacije omogočal uporabo nepolarnega topila, v katerem izbrana zdravilna učinkovina sicer ni dobro topna. Nastanek kristalov iz heptana smo med kristalizacijo vzorca K-3005-H1 pospešili z mešanjem in dovajanjem podtlaka, s čimer smo povečali koncentracijo topljenca v raztopini in tako hitreje dosegli prenasičenje, ki je gonilna sila kristalizacije. V odsotnosti mešanja in podtlaka je ob uporabi enakega razmerja izbranih topil nastanek kristalov potekal bistveno počasneje. Rast kristalov vzorca K-3005-HV, ki so bili pripravljeni na ta način, je namreč potekala nekaj dni. Do prenasičenja, ki je pogoj za začetek kristalizacije, je v tem primeru prišlo zaradi odparevanja topila iz odprte čaše pri sobnih pogojih, kar je potekalo počasneje kot v

primeru odparevanja topila s pomočjo podtlaka. Pri pripravi velikih kristalov K-3005-HV ravno tako nismo uporabili mešanja in tudi zato je kristalizacija potekala počasneje, nastali kristali pa so bili zaradi tega tudi večji. Zunanja oblika teh velikih kristalov je bila podobno kot pri vzorcu K-3005-H1 prizmatična in podolgovata, pri kristalih sta po velikosti površine izstopali dve vzporedni ploskvi z dolžino približno 5 cm in širino nekaj milimetrov, ploskve med njima pa niso bile večje in širše od 1 mm.



Slika 18: Vzorec K-3005-A1, posnet z elektronskim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi



Slika 19: Vzorec K-3005-A2, posnet z elektronskim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi



Slika 20: Vzorec K-3005-H1, posnet z elektronskim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi

# 5.4 PORAZDELITEV VELIKOSTI DELCEV

Na vzorcih K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 smo izvedli analizo porazdelitve velikosti delcev z lasersko difrakcijo. Pri vseh vzorcih se pojavi vrh pri večjih velikostih (1000 um), kar je posledica skupkov, ki smo jih opazili že pri opazovanju vzorcev pod optičnim mikroskopom. Pri velikostih, ki ustrezajo velikosti posameznih delcev, pa lahko vidimo, da so primarni delci vzorcev K-3005-A2 in K-3005-H1 bolj homogenih velikosti kot v vzorcu K-3005-A1, ki ima precej širšo porazdelitev velikosti primarnih delcev. Povprečni premer delcev in premer, od katerega je manjših 90 % delcev vzorcev, je pri vzorcih K-3005-A1 in K-3005-H1 primerljiv (približno 50 µm), medtem ko so delci vzorca K-3005-A2 večji.

VELIKOSTNI RAZRED (µm)	Porazdelitev velikosti delcev (volumski %)		
	K-3005-A1	K-3005-A2	К-3005-Н1
0,02–2	11,95	3,79	5,34
2–5	21,98	6,67	10,60
5-10	20,59	10,61	15,69
10-20	14,93	18,20	21,72
20-40	12,07	26,56	22,23
40–50	3,89	8,12	5,91
50-100	8,14	15,04	11,87
100–150	1,43	2,44	2,36
150-500	2,52	2,82	1,92
500-800	1,55	2,33	1,16
800–1000	0,52	1,29	0,47
1000–1250	0,25	1,09	0,34
1250-2000	0,18	1,04	0,39
Povprečni premer (µm)	44,862	91,048	51,927
10 % delcev, manjših od (μm)	1,769	4,793	3,298
50 % delcev, manjših od (μm)	8,508	26,851	18,092
90 % delcev, manjših od (µm)	68,045	112,059	76,489

# 5.5 SPECIFIČNA POVRŠINA

Z določitvijo specifične površine z metodo BET smo dobili informacijo o poroznosti površine preiskovanega materiala, ki pomembno vpliva na hitrost raztapljanja. Vzorci z večjo specifično površino se praviloma raztapljajo hitreje kot tisti, ki imajo manjšo površino na enoto mase.

	K-3005-A1	K-3005-A2	K-3005-H1
Specifična površina (m²/g)	4,17	1,71	1,75
$SD(m^2/g)$	0,03	0,01	0,02

Vzorec K-3005-A1 ima največjo specifično površino, ki je tudi statistično značilno večja od specifične površine drugih dveh vzorcev, med katerima sicer ni značilne razlike, kar korelira tudi z rezultati laserske difrakcije. Delci K-3005-A2 so večji od delcev K3005-A1, zato imajo tudi manjšo specifično površino, medtem ko je nižja vrednost specifične površine vzorca K-3005-H1 najverjetneje posledica predvsem razlike v obliki delcev. Delci vzorcev K-3005-A1 in K-3005-H1 imajo namreč različno razmerje stranic, ki je pri delcih vzorca K-3005-A1 pomaknjeno proti nižjim vrednostim kot pri vzorcu K-3005-H1.

# 5.6 DOLOČANJE TOPNOSTI

Vzorcem K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-A3 smo določili topnost z metodo stresanja, kot testni medij pa smo uporabili fosfatni pufer pH = 7 z 0,2 % SDS, ki smo ga uporabili tudi pri določanju profila raztapljanja.

	K-3005-A1	K-3005-A2	К-3005-Н1
Topnost (mg/l)	37,81	39,64	38,88
SD (mg/l)	1,57	1,19	1,08

Vrednosti topnosti preiskovanih vzorcev so 37,81–39,64 mg/l, vendar statistično značilno med njimi ne moremo razlikovati. Ta rezultat je glede na to, da gre pri vseh treh vzorcih za isto kristalno obliko modelne zdravilne učinkovine, kjer velja pravilo, da je termodinamska topnost vzorcev enaka, pričakovan. S to analizo smo se prepričali, da do morebitnih razlik

v hitrosti raztapljanja ne bo prišlo zaradi različne topnosti, ki bi bila posledica morebitnih zaostalih nečistot v vzorcih oziroma sprememb v pojavni obliki oz. stopnji kristaliničnosti.

# **5.7 STIČNI KOT**

Pogoj za začetek raztapljanja trdne snovi je, da topilo v dovolj veliki meri moči njeno površino. Informacijo o močljivosti preiskovane snovi dobimo z merjenjem stičnega kota oz. kota močljivosti. Manjši kot je stični kot, boljša je močljivost preiskovane snovi in le-ta se posledično hitreje raztaplja.

Pri svojem delu smo preiskovanim vzorcem določili stični kot z metodo sedeče kapljice, kot testno tekočino pa smo uporabili prečiščeno vodo.

VZOREC	STIČNI KOT* (°)	<b>SD</b> * (°)
K-3005-A1	64,6	1,2
K-3005-A2	65,7	1,4
К-3005-Н1	59,1	2,1
K-3005-AV	42,3	2,2
K-3005-HV	51,3	3,1

\*Rezultati so podani kot povprečne vrednosti vsaj 10 meritev, SD je standardna deviacija teh meritev.

Pri vzorcih, katerim smo kasneje z Woodovo napravo določili IDR, so stični koti med 59,1 in 65,7°. Med pari vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 smo naredili Studentov t-test (n = 11 – 19,  $\alpha$  = 0,05), ki je pokazal, da je stični kot vzorca K-3005-H1 statistično značilno manjši od vzorcev K-3005-A1 in K-3005-A2, medtem ko med stičnima kotoma vzorcev K-3005-A1 in K-3005-A2 ni statistično značilne razlike. Glede na to, da sta bila ta dva vzorca pripravljena z enako kombinacijo topil, pri pripravi vzorca K-3005-H1 pa je bilo uporabljeno bolj nepolarno topilo, lahko sklepamo, da se vzorec K-3005-H1 raztaplja hitreje kot vzorca K-3005-A1 in K-3005-A2, torej da se v našem primeru vzorci, prekristalizirani iz bolj polarnih topil, raztapljajo počasneje kot vzorci, ki so pripravljeni iz topil z nižjim indeksom polarnosti. Primerjali smo tudi meritve stičnih kotov na posameznih kristalih modelne zdravilne učinkovine, katerih raztapljanje smo kasneje spremljali s pomočjo mikroskopa na atomsko silo. Tu smo zajeli le najpogosteje izkazovano kristalno ploskev. Stični kot je bil v tem primeru statistično značilno večji (Studentov t-test med pari vzorcev; n = 10 - 12,  $\alpha = 0,05$ ) pri kristalih vzorca K-3005-HV, ki je pripravljen iz bolj nepolarnega topila kot vzorec K-3005-AV. Ti rezultati napovedujejo višjo hitrost raztapljanja vzorcev, pripravljenih iz bolj polarnih topil, a v tem primeru močljivost ni bila določena povprečju vseh izkazovanih ploskev kot pri vzorcih, ki so bili prekristalizirani iz enake kombinacije topil in so vsebovali manjše delce, zato je to odraz le ene analizirane kristalne ploskve.

#### 5.8 DINAMIKA IN MEHANIZEM RAZTAPLJANJA DELCEV

#### 5.8.1 PROFIL RAZTAPLJANJA S PRETOČNO CELICO

Najprej smo hitrost raztapljanja vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 preverili s pomočjo pretočne celice. Poleg omogočanja spremembe medija v času poskusa je glavna prednost te naprave, da zaradi velikih volumnov medija med raztapljanjem omogoča doseganje sink pogojev, metodo pa smo izbrali predvsem zato, ker z njo lahko analiziramo tudi praškaste vzorce, torej naše intaktne vzorce. Rezultati analiz vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1 so predstavljeni na sliki 21. Za izračun konstante raztapljanja smo upoštevali rezultate, dobljene po 30. minuti raztapljanja, saj je bil ta del krivulje profila raztapljanja najbolj linearen.



Slika 21: Odvisnost odstotka raztopljene zdravilne učinkovine od časa za vzorce K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1

	K-3005-A1	K-3005-A2	K-3005-H1
Konstanta hitrosti raztapljanja (30–60 min)	0,199	0,045	0,043
SD	0,017	0,0088	0,0087

Iz rezultatov je razvidno, da se najhitreje raztaplja vzorec K-3005-A1, kar je glede na analize morfologije pričakovano. Pri tem vzorcu je bil tudi delež amorfne oblike večji kot pri drugih dveh vzorcih, kar je tudi lahko dodaten vzrok za hitrejše raztapljanje – amorfne snovi se namreč zaradi večje neravnotežne topnosti raztapljajo hitreje kot kristalinične substance. Vzorca K-3005-A2 in K-3005-H1 se raztapljata počasneje, glede na določeno konstanto hitrosti pa med njima ni statistično značilne razlike. Omenjene razlike v hitrosti raztapljanja med vzorcem K-3005-A1 ter vzorcema K-3005-A2 in K-3005-H1 so najverjetneje predvsem posledica razlik v specifičnih površinah med vzorci. Vzorca K-3005-A2 in K-3005-H1, ki se raztapljata enako hitro, imata namreč enako specifično površino, specifična površina vzorca K-3005-A1 pa je večja in posledično se tudi ta vzorec raztaplja hitreje od drugih dveh preiskovanih vzorcev. Na rezultate preizkusa raztapljanja praškov s pretočno celico vpliva tudi velikost delcev preiskovane substance, ki sicer pri enaki topografiji površine praviloma korelira z rezultati specifične površine. Manjši delci se načeloma raztapljajo hitreje kot večji, kar v našem primeru velja, če med sabo primerjamo vzorca K-3005-A1 in K-3005-A2, ki sta bila pripravljena iz enakih topil. Delci vzorca K-3005-A1 (iglice) so namreč volumsko manjši ter imajo večjo specifično površino od delcev vzorcev K-3005-A2 (ploščice) in K-3005-H1 ter se zato tudi raztapljajo najhitreje. Glede na to, da so delci K-3005-A2 bistveno večji od delcev K-3005-H1, bi lahko pričakovali tudi značilno razliko v hitrosti raztapljanja med tema dvema vzorcema, vendar pa razlike s tem preizkusom nismo zaznali. To je najverjetneje posledica dejstva, da imata omenjena vzorca kljub različni velikosti delcev slučajno enako specifično površino, lahko pa bi do takih rezultatov analize prišlo tudi zaradi uporabe različnih prekristalizacijskih topil pri pripravi teh dveh vzorcev. Če spremljamo le vpliv tega parametra na hitrost raztapljanja s primerjavo rezultatov vzorcev K-3005-A1 in K-3005-H1, lahko namreč opazimo, da se vzorec K-3005-A1, ki je pripravljen iz bolj polarnega topila, raztaplja hitreje kot vzorec K-3005-H1, ki je pripravljen iz bolj nepolarnega topila. Torej bi na podlagi te analize lahko sklepali, da poteka raztapljanje hitreje pri vzorcih, prekristaliziranih iz bolj polarnih topil, kar je predpostavil tudi Bennema s sodelavci (17, 18). Tako bi se lahko zaradi uporabljenih bolj polarnih topil pri prekristalizaciji vzorec K-3005-A2 raztapljal hitreje kot vzorec K-3005-H1, vendar do tega ne pride, ker so delci vzorca K-3005-A2 bistveno večji od vzorca K-3005-H1, zaradi česar je njegova hitrost raztapljanja manjša in med rezultati omenjenih vzorcev ne opazimo razlik. Našega sklepanja o vplivu polarnosti topil na nastanek kristalov z različnimi površinskimi lastnostmi pa zaradi bistvenega vpliva velikosti delcev in specifične površine preiskovanih vzorcev na rezultate preizkusa raztapljanja s pretočno celico ne moremo zagotovo potrditi, zato smo pripravljene kristale modelne zdravilne učinkovine analizirali še z drugimi tehnikami.

## 5.8.2 DOLOČANJE INTRINZIČNE HITROSTI RAZTAPLJANJA

Da bi se pri določanju hitrosti raztapljanja čim bolj izognili vplivu velikosti delcev in specifične površine preiskovanega vzorca na rezultat, smo izvedli še preizkus raztapljanja z Woodovo napravo, kjer iz preiskovanega vzorca pripravimo komprimat in zagotovimo, da raztapljanje poteka s konstantne površine, s čimer določimo IDR.

Kot medij za določanje IDR-ja se najpogosteje uporabljajo vodni mediji s fiziološkim pHjem. Odločili smo se, da bomo pri našem poskusu uporabili fosfatni pufer s pH = 7, ker pa je modelna zdravilna učinkovina zelo slabo topna v vodi oz. samem pufru, smo mediju dodali 0,2 % SDS-a. Pri taki koncentraciji dodane površinsko aktivne snovi, ki izboljša močljivost in pospeši raztapljanje, so komprimati v času poskusa ostali v matrici Woodove naprave, če pa smo dodali več SDS-a, pa so se začeli komprimati, pripravljeni iz vzorcev K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1, ob stiku z medijem zaradi pronicanja le-tega ob steni matrice v njem raztapljati v tolikšni meri, da je prišlo do izpada komprimata iz matrične vdolbine, zato analize nismo mogli izvesti.

Analize smo za vsak vzorec izvedli v treh paralelkah in iz naklona premice, izračunane po metodi najmanjših kvadratov, določili IDR. Rezultati so podani kot povprečne vrednosti treh določitev IDR-ja.

VZOREC	IDR (mg/cm <sup>2</sup> /h)	SD (mg/cm <sup>2</sup> /h)
K-3005-A1	0,88	0,02
K-3005-A2	0,81	0,05
K-3005-H1	1,16	0,07



Slika 21: Primerjava odvisnosti koncentracije raztopljene učinkovine od časa pri vzorcih K-3005-A1, K-3005-A2 in K-3005-H1

Najvišji IDR ima vzorec K-3005-H1. Njegova vrednost IDR je večja od obeh vzorcev, ki sta prekristalizirana iz acetona in vode, tj. vzorcev K-3005-A1 in K-3005-A2. Med rezultati teh dveh vzorcev ni statistično značilne razlike, kar je najverjetneje posledica dejstva, da sta oba vzorca pripravljena z enako kombinacijo topil, saj ta metoda omogoča razlikovanje ne glede na razlike v velikosti delcev in specifični površini delcev, ki med tema dvema vzorcema sicer obstajajo. Iz rezultata te analize lahko sklepamo, da se vzorec, ki je bil prekristaliziran iz bolj nepolarnega topila, raztaplja hitreje od vzorca, pripravljenega iz bolj polarnega topila, kar potrjuje ugotovitve Di Martina s sodelavci na primeru metronidazola (20) in Muchmora s sodelavci na primeru ibuprofena (21). Tak rezultat določevanja IDR-ja je napovedal tudi določitev stičnega kota na komprimatu, ki smo ga stisnili z enako silo kot vzorec za analizo IDR-ja. Pred pripravo vzorcev smo sicer sklepali, da bomo s stresanjem matrice ob pripravi vzorca povzročili, da bodo na površini komprimata, s katere poteka raztapljanje, večinoma prisotne tiste ploskve kristala, ki so na kristalu izraziteje prisotne (večje). Rezultati rentgenske praškovne analize pa lahko nakazujejo, da smo s stiskanjem delno zdrobili preiskovane kristale in tako porušili njihovo preferenčno orientacijo. Ne glede na te predpostavke drži, da z metodo določanja IDR-ja določimo lastnosti celotne populacije delcev in da s to analizo zajamemo povprečno vrednost vseh izkazovanih ploskev.

### 5.8.3 DOLOČANJE HITROSTI RAZTAPLJANJA Z MIKROSKOPOM NA ATOMSKO SILO

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo poleg lastnosti vzorcev, ki jih predstavljajo skupine manjših delcev, želeli spoznati tudi lastnosti posameznih delcev, kar smo lahko proučevali na monokristalih K-3005-AV in K-3005-HV. Tema vzorcema smo želeli določiti hitrost raztapljanja in hkrati preveriti, ali se obnašajo enako kot manjši delci, prekristalizirani iz istih topil. To bi lahko v celoti potrdili ali ovrgli tako, da bi spremljali raztapljanje vseh ploskev, prisotnih na monokristalih izbranih vzorcev, a smo lahko raztapljanje spremljali le na ploskvah kristalov z največjo površino. Druge ploskve so bile namreč premajhne in niso imele dovolj ravne površine, da bi se jim lahko uspešno približali s konico tipala in snemali njihovo površino.



PRIMER SPREMLJANJA POVRŠINE VZORCA KRISTALA K-3005-AV

Slika 23: Slike vzorca K-3005-AV v označenih časovnih točkah po dodatku topila



Slika 24: Slike vzorca K-3005-AV v označenih časovnih točkah po dodatku topila

Preiskovani kristal smo pred in po raztapljanju slikali tudi z elektronskim mikroskopom.



Slika 25: Kristal vzorca K-3005-AV pred Slika 26: Kristal vzorca K-3005-AV po raztapljanjem raztapljanju

# PRIMER SPREMLJANJA SPREMINJANJA POVRŠINE KRISTALA K-3005-HV



Slika 27: Slike vzorca K-3005-HV v označenih časovnih točkah po dodatku topila



Slika 28: Slike vzorca K-3005-HV v označenih časovnih točkah po dodatku topila

Kristal, katerega raztapljanje smo spremljali, smo pred in po analizi z mikroskopom na atomsko silo slikali tudi z elektronskim mikroskopom.



Slike 23, 24, 27 in 28, ki smo jih posneli med raztapljanjem, smo pregledali s pomočjo računalniškega programa NanoScope Analysis, ki omogoča tudi merjenje realnih dimenzij slikane površine v vseh treh smereh. Na vsaki sliki smo na mestu z enakimi koordinatami izmerili dolžino, širino in globino praznih prostorov, ki so nastali pri raztapljanju površine kristala. Glede na tridimenzionalno sliko površine, katere ogled nam prav tako omogoča omenjeni računalniški program, in glede na slike kristalov, ki smo jih po raztapljanju posneli z elektronskim mikroskopom, smo sklepali, da med raztapljanjem na površini kristala nastajajo prazni prostori v obliki tristrane prizme. Iz izmerjenih parametrov smo ocenili volumen teh praznih prostorov in spreminjanje le-tega s časom. Pri predstavitvi rezultatov smo si pomagali s podatkom o približnem volumnu modelne zdravilne učinkovine, ki ga je za nas s programom ChemPropPro določila prof. dr. Marija Sollner Dolenc. Volumen modelne zdravilne učinkovine, določen s to metodo, je 0,4304 nm<sup>3</sup>. Z upoštevanjem tega podatka smo iz izračunanega volumna praznih prostorov ocenili število raztopljenih molekul v časovni enoti (slika 31). Koliko molekul se je raztopilo v minuti, smo ocenili tudi samo glede na spremembo globine praznega prostora, ki je bil posledica

raztapljanja. Pri tem smo predpostavili, da ima molekula obliko kocke, in glede na podatke, ki nam jih je posredovala prof. dr. Sollner Dolenc, izračunali, da ima taka kocka stranico 0,755 nm. Rezultati takega izračuna so predstavljeni na grafu slike 32. Rezultati so podani na podlagi spremljanja treh kristalov istega vzorca in so povprečje ocene števila raztopljenih molekul iz več praznih prostorov na isti sliki.



Slika 31: Odvisnost števila odtopljenih molekul od časa glede na spremembo volumna praznega prostora za kristala vzorcev K-3005-AV in K-3005-HV



Slika 32: Odvisnost števila odtopljenih molekul od časa glede na spremembo globine

Iz obeh primerov predstavitve podatkov spremljanja raztapljanja (sliki 31 in 32) je razvidno, da na preiskovanih ploskvah izbranih monokristalov poteka raztapljanje hitreje pri vzorcu K-3005-AV, ki je pripravljen iz bolj polarnega topila kot vzorec K-3005-HV. Ti rezultati se glede na spremljanje vpliva polarnosti izbranih topil na hitrost raztapljanja delno ujemajo z rezultati analiz na pretočni celici, kjer so na rezultate analiz vplivali tako oblika kot tudi velikost in specifična površina delcev vzorca, ter nasprotujejo rezultatom določanja močljivosti kompaktiranih vzorcev in rezultatom IDR-ja, ki pri analizi izključujejo vpliv prej omenjenih lastnosti delcev in dajejo informacijo o povprečni vrednosti vseh izkazovanih ploskev kristalov preiskovanega vzorca. Rezultate IDR-analize, ki v nasprotju z rezultati AFM-analize nakazujejo hitrejše raztapljanje vzorcev, pripravljenih iz manj polarnih topil, zato težko primerjamo s svojimi rezultati spremljanja raztapljanja kristalov z AFM-jem, kjer smo spremljali raztapljanje le ene ploskve kristala. Z rentgensko analizo smo namreč pokazali, da zaradi stiskanja vzorcev za IDR-analizo ne moremo približno zagotoviti preferenčne orientacije delcev modelne zdravilne učinkovine na ploskvi matrice, s katere poteka raztapljanje, s čimer bi z analizo morda lahko v večji meri spremljali raztapljanje tistih ploskev, ki smo jih lahko spremljali tudi z mikroskopom na atomsko silo.

## 6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo želeli proučiti vpliv izbora kristalizacijskih topil in načina kristalizacije na fizikalno-kemijske lastnosti modelne zdravilne učinkovine. V ta namen smo na različne načine pripravili kristale izbrane učinkovine ter z instrumentalnimi tehnikami okarakterizirali njihovo zunanjo in notranjo obliko, površinske lastnosti ter hitrosti raztapljanja.

Prekristalizacija modelne zdravilne učinkovine iz izbranih kombinacij topil je vodila do tvorbe kristalov z isto kristalno obliko, kar smo dokazali z rentgensko analizo preiskovanih vzorcev in potrdili z DSC-analizo. Tudi topnost, ki smo jo določili preiskovanim vzorcem, je nakazovala, da imajo kristali enako notranjo strukturo, vendar pa so analize pokazale, da se kristali preiskovanih vzorcev med seboj razlikujejo po zunanji obliki (habitusu) in posledično v nekaterih fizikalnih lastnostih.

Proučevanje morfologije vzorcev modelne zdravilne učinkovine z optičnim in elektronskim mikroskopom ter z analizo porazdelitve velikosti delcev in BET-analizo je razkrilo razlike v zunanji obliki, velikosti ter specifični površini kristalov preiskovanih vzorcev. Razlike v zunanji obliki kristalov so posledica različnih pogojev kristalizacije, v našem primeru kristalizacijskih topil z različno polarnostjo, različnega načina dodajanja antitopila, različnega načina mešanja itd., kar povzroči različno rast kristalnih ravnin in razlik v funkcionalnih skupinah, ki so na teh ravninah izražene. Vpliva polarnosti kristalizacijskega topila na izražanje funkcionalnih skupin na površini kristalov in posledično na hitrost raztapljanja vzorcev z rezultati preizkusov raztapljanja nismo mogli povsem pojasniti. Do tega je lahko prišlo tudi zato, ker smo pri pripravi vzorcev iz heptana dodali etanol z namenom pospešitve raztapljanja modelne zdravilne učinkovine. Kljub nizki koncentraciji, za katero smo predhodno predpostavili, da nima bistvenega vpliva na nastanek kristalov, je dodatek polarnega sotopila lahko vplival na rast kristalov in posledično tudi na hitrost raztapljanja, kjer smo pri določevanju dobili nasprotujoče si rezultate. Pri analizi vzorcev s pretočno celico smo namreč opazili trend hitrejšega raztapljanja vzorcev, pripravljenih iz acetona, ki ima višjo dielektrično konstanto kot heptan, ki je predstavljal večji del zmesi topil za pripravo vzorcev, ko pa smo z IDR-

analizo izničili vpliv velikosti in specifične površine delcev, smo dobili drugačne rezultate. Vzorec, pripravljen iz heptana, se je namreč raztapljal hitreje kot vzorca, ki smo ju prekristalizirali iz acetona. Predpostavko, da se kristali, pripravljeni iz bolj nepolarnih topil, raztapljajo hitreje kot tisti, pripravljeni iz bolj polarnih topil, kar je v skladu z literaturnimi viri, smo želeli preveriti še s spremljanjem raztapljanja posameznih ploskev monokristalov, pripravljenih iz enakih izbranih kombinacij topil. Zaradi oblike teh velikih kristalov smo lahko pri posameznih kristalih spremljali le raztapljanje največjih ploskev izbranih vzorcev. Analiza je sicer nakazala hitrejše raztapljanje vzorcev, pripravljenih iz bolj polarnih topil, kar sicer opisujejo tudi nekateri literaturni viri, a bi za natančnejšo informacijo morali posneti raztapljanje vseh izraženih površin kristala. Poudariti je treba tudi, da je šlo pri določanju hitrosti raztapljanja z AFM-jem zgolj za oceno hitrosti raztapljanja in da je pri tem lahko prišlo do nekoliko posplošenih zaključkov.

Iz rezultatov diplomske naloge je razvidno, da lahko z različnimi pogoji kristalizacije, predvsem s spreminjanjem polarnosti prekristalizacijskega topila, pripravimo kristale z različno zunanjo obliko, ki izkazujejo tudi drugačen profil raztapljanja. Vpliva polarnosti prekristalizacijskega topila na hitrost raztapljanja nismo mogli nedvoumno potrditi, saj je analiza praškastih vzorcev pokazala, da lahko pospešimo hitrost raztapljanja modelne zdravilne učinkovine z uporabo bolj nepolarnih prekristalizacijskih topil, ko smo spremljali raztapljanje najpogosteje izraženih ploskev monokristalov modelne zdravilne učinkovine, pa smo opazili, da se hitreje raztapljajo vzorci, pripravljeni iz bolj polarnih topil. Ali so bile na površini preiskovane ploskve vzorcev, prekristaliziranih iz acetona, res v večji meri prisotne polarne funkcionalne skupine modelne zdravilne učinkovine in ali so bile pri vzorcu, pripravljenem iz heptana, na preiskovani ploskvi bolj prisotne nepolarne funkcionalne skupine, bi lahko preverili z uporabo funkcionaliziranih konic tipala mikroskopa na atomsko silo, ki so komercialno dostopne, da pa bi raziskali vzrok razlike rezultatov med našimi analizami, bi bilo smiselno izvesti nadaljnje analize na vseh ploskvah pripravljenih monokristalov. Z nadaljnjimi poskusi pa bi morali preveriti tudi, če naša predpostavka, da v zmesi s sotopilom etanolom zaradi višje koncentracije res prevlada vpliv nepolarnega topila heptana, saj bi le tako lahko potrdili naša sklepanja o vplivu polarnosti prekristalizacijskega topila na nastanek kristalov.

# 7 LITERATURA

- 1. GBI Research, Manufacturing of Solid Dosage Forms 2011, Feb 2011
- Kiand Y. H., Galen Shi H., et al.: Crystal structure and surface properities of an investigational drug – A case study, International Journal of Pharmaceutics 280 (2004), 17–26
- Garekani H. A., Sadeghi F., et al.: Crystal Habit Modifications of Ibuprofen and their physicomechanical characteristics, Drug Development and Industrial Pharmacy, 27(8), 803–809 (2001)
- Keraliya R. A., Soni T. G., et al.: Effect of Solvent on Crystal Habit and Dissolution Behavior of Tolbutamide by Initial Solvent Screening, Dissolution technologies, Feb 2011
- Danesh A., Connell S. D., et al.: An In Situ Dissolution Study of Aspirin Crystal Planes (100) and (001) by Atomic Force Microscopy, Pharmaceutical Research, Vol 18, No. 3, 2001
- Keel T. R., Thompson C., et al.: AFM studies of the crystallisation and habit modification of an excipient material, adipic acid, International Journal of Pharmaceutics 280 (2004), 185–198
- 7. Keel T. R.: The application of in situ AFM to the study of molecular and macromolecular crystallization, doktorsko delo, Jun 2004
- Rodriguez Hornedo N., Kelly R. C. et al.: Crystallization: General Principles and Significance on Product Development, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3<sup>rd</sup> ed. Vol.2, London: Informa Healthcare; 2007, 834–857
- 9. Cejka J., Corma A., Zones S.: Zeolites and Catalysis, Synthesis, Reactions and Applications, WILEY-VCF, Weinheim, 2010, 3–11
- Jančić Paulus S. J., Grootscholten A. M.: Industrial crystallisation, Springer-Verlag, 1984, 15–61
- Myerson A. S.: Handbook of industrial crystallisation, Second edition, Butterworth-Heinemann, 2002
- 12. Yamada Y.: Equation of State for Free Energy of Homogeneous Nucleation in Supersaturated Lennard-Jones Vapor Phase Derived by Monte Carlo Simulations, Hosei University, 2003

- Dinker B. Sirdeshmukh D. B., et al.: Atomistic Properties of Solids, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, 2011
- 14. Kočevar J.: Vloga kristalizacije pri oblikovanju zdravilnih pripravkov, Farmacevtski vestnik 1993; 44: 55–74
- Sarkar M., Perumal O. P., Panchagnula R.: Solid-State Characterization of Nevirapine, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 70, 2008, 619–630
- 16. Florence A. T.: Physiochemical principles of pharmacy, 5<sup>th</sup> ed., Pharmaceutical Press, London, 2006, 8–31
- Lahav M., Leiserowitz L.: The effect of solvent on crystal growth and morphology, Chemical Engineering Science 56 (2001) 2245–2253
- Nokhodchi A., Bolourtchian N., Dinarvand R.: Crystal modification of phenytoin using different solvents and crystallization conditions, International Journal of Pharmaceutics 250 (2003) 85–97
- Sarkar M., Perumal O. P., Panchagula R.: Solid State Characterisation of Nevirapine, Indian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 70, 2008, 619–630
- 20. Di Martino P., Censi R., et al.: Influence of solvent and crystallisation method on the crystal habit of metronidazole, Crys. Res. Technol. 2007; 42 (8): 800–806
- Muchmore D. J., Duchamp C. R., et al.: PD 7255/88/004: A crystal habit Study of Ibuprofen, Memo to Patent Liaison (1988)
- 22. Banga S., Chawla G., et al.: Modification of the crystal habit of celecoxib for improved processability, J. Pharmacol., 2007, Jan., 59 (1), 29–39
- 23. Pechansky V. K., Zavalij P. Y.: Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials, Springer, Binghamton, USA, 2005, 121–122
- 24. http://sl.wikipedia.org/wiki/Rentgenska\_pra%C5%A1kovna\_difrakcija
- 25. Goldstein, G. I., Newbury, D. E., et al.: Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis, Plenum Press, New York, 1981, 479–483
- 26. European Pharmacopoeia 6.6; 2.9.31. Particle size analysis by light diffraction, 5103–5107.
- 27. Monografija <846> Specific surface area iz USP29
- 28. Planinšek 0., Srčič S.: Navodila za vaje pri predmetu Fizikalna farmacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2001, 1–42
- 29. Krüss DSA1 v 1,9 Drop Shape Analysis for DSA 100 User Manual v1, 9-03, Hamburg, 2004, 121–155
- 30. Measurement of Intrinsic Drug Dissolution Rates Using Two Types of Apparatus, Pharmaceutical Technology, June 2001, 44–53
- 31. Sanghvi R. et al.: Solubility of Pharmaceutical Solids; Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice, Elsevier, New York, 2009, 36–40
- 32. Dyas M. A., Shah U. U.: Dissolution and Dissolution Testing. V: Swarbrick J.: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 3rd. Ed, Informa Healthcare 2007, vol. 2: 908–929
- 33. Monografija <1087> Intrinsic dissolution iz USP.
- Varian Intrinsic Dissolution Apparatus Operator's Manual, P/N 70-9022, November 2010, 8–22
- 35. Brown, W.: Apparatus 4 Flow Through Cell: Some Thoughts on Operational Characteristics, Dissolution Technologies, May 2005, 28–30
- 36. Fotaki N.: Flow-Through Cell Apparatus (USP Apparatus 4): Operation and Features, Dissolution Technologies, November 2011, 46–49
- 37. Johnson D., Hilal N., Richard Bowen W.: Basic principles of Atomic Force Microscopy, Atomic Force Microscopy in Process Engineering, Chapter 1, Elsevier, New York, 2009, 1–25
- 38. Keel T. R., Thompson C., et al.: AFM studies of the crystallisation and habit modification of an excipient material, adipic acid, International Journal of Pharmaceutics 280 (2004), 185–198
- 39. Li T., Morris K. R., Park K.: Influence of Solvent and Crystalline Supramolecular Structure on the Formation of Etching Patterns of Acetaminophen Single Crystals: A Study with Atomic Force Microscopy and Computer Simulation, J. Phys Chem. B 104, 2000, 2019–2032
- 40. Mao G., Lobo L., et al.: Nanoscale Visualisation of Crystal Habit Modification by Atomic Force Microscopy, Chem. Mater. 9, 1997, 773–783
- 41. Frisbie D., Razsnyai L. F., et al.: Functional Group Imaginig by Chemical Force Microscopy, Science 265, 1994, 2071
- 42. Vrečer F., Planinšek O., et al: Izbrana poglavja iz načrtovanja lastnosti delcev, FFA, 2011