

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA DEJAK (ADAMIČ)

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA DEJAK (ADAMIČ)

**IZDELAVA KOKRISTALOV FLUKONAZOLA TER
VREDNOTENJE NJIHOVIH FIZIKALNIH IN
MEHANSKIH LASTNOSTI**

**PRODUCTION OF FLUCONAZOLE COCRYSTALS
AND ASSESSMENT OF THEIR PHYSICAL AND
MECHANICAL PROPERTIES**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm. in somentorstvom dr. Biljane Janković.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Odonu Planinšku, za posredovanje strokovnega znanja, usmerjanje pri eksperimentalnem delu ter pomoč in nasvete pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi somentorici dr. Biljani Janković za številne nasvete in pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju. Prav tako se zahvaljujem Jožetu Kastelicu, mag. farm. z Oddelka za stabilnost, d.d. Krka, Novo mesto, za pomoč in dragocene nasvete pri eksperimentalnem delu in dr. Ilji Iliću, mag. farm za pomoč pri eksperimentalnem delu. Posebna zahvala je namenjena moji družini in Marku za podporo, razumevanje in spodbudo tekom študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Odonu Planinška in somentorstvom dr. Biljane Janković.

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	KOKRISTALI	2
1.2	POMEN IN LASTNOSTI FARMACEVTSKIH KOKRISTALOV	3
1.2.1	Temperatura tališča	4
1.2.2	Topnost	4
1.2.3	Hitrost raztapljanja	5
1.2.4	Biološka uporabnost	5
1.2.5	Stabilnost	6
1.2.6	Mehanske lastnosti	7
1.2.7	Farmacevtski kokristali in intelektualna lastnina	7
1.3	MOLEKULARNE OSNOVE NASTANKA KOKRISTALOV	8
1.4	METODE PRIPRAVE KOKRISTALOV	9
1.4.1	Kokristalizacija iz raztopine	10
1.4.2	Kokristalizacija z mletjem	12
1.5	VREDNOTENJE KOKRISTALOV	14
1.6	VREDNOTENJE POVRŠINSKIH IN MEHANSKIH LASTNOSTI SNOVI NA NIVOJU POSAMEZNEGA KRISTALA	16
1.6.1	Instrumentalna nanoindentacija	18
1.6.2	Analiza krivulje sila/globina vtisa	19
1.6.3	Mikroskopija na atomsko silo (atomic force microscopy –afm)	21
1.7	VREDNOTENJE MEHANSKIH LASTNOSTI SNOVI NA NIVOJU PRAHOV (BULK)	22
1.8	FLUKONAZOL	23
1.8.1	Delovanje in uporaba	23
1.8.2	Osnovni podatki	24
1.8.3	Kokristali flukonazola	24
2	NAMEN DELA	26
3	MATERIALI IN METODE	27
3.1	MATERIALI	27
3.2	METODE IZDELAVE KOKRISTALOV	28
3.2.1	Izdelava kokristalov z mletjem z dodatkom topila	28
3.2.2	Priprava fizikalnih zmesi	29

3.2.3	Priprava kokristalov iz raztopine z metodo odparevanja topila	29
	Monokristal flukonazol polimorfna oblika III	30
	Monokristal flukonazol : fumarna kislina 2:1	30
	Monokristal flukonazol : glutarna kislina 1:1	30
	Monokristal flukonazol : salicilna kislina 1:1	31
	Monokristal flukonazol : malonska kislina 1:1	31
3.3	METODE VREDNOTENJA KOKRISTALOV	31
3.3.1	Termična analiza.....	31
	Preizkus raztapljanja	32
3.3.2	HPLC ANALIZA	32
3.3.3	Vrstični elektronski mikroskop - sem.....	33
3.3.4	Elektronsko mikroskopske slike – AFM	33
3.3.5	Instrumentalna nanoindentacija.....	33
3.3.6	Merjenje prave gostote	34
3.3.7	Tabletiranje.....	34
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	35
4.1	TERMIČNA ANALIZA KOKRISTALOV IN POSAMEZNIH KOMPONENT	35
4.2	VREDNOTENJE HITROSTI RAZTAPLJANJA KOKRISTALOV IN FIZIKALNIH ZMESI	39
4.3	ELEKTRONSKO MIKROSKOPSKE SLIKE (SEM).....	43
4.4	MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO (AFM).....	44
4.5	NANOINDENTACIJA	46
4.6	KORELACIJA MED MEHANSKIMI LASTNOSTMI NA NIVOJU POSAMEZNEGA KOKRISTALA IN NA RAZSEŽNOSTNEM NIVOJU (»BULK«).....	47
5	SKLEP.....	49

POVZETEK

Med novo odkritimi kandidati za zdravilne učinkovine narašča število tistih, pri katerih je biološka uporabnost omejena s topnostjo. To predstavlja izziv industriji pri razvoju učinkovite spojine z visokim izkoristkom po aplikaciji. Pri razvoju formulacije poskušamo te lastnosti izboljšati s tvorbo soli, hidratov/solvatov in različnih polimorfni oblik. Poleg tega se raziskovalci čedalje bolj zavedajo tudi možnosti, ki jih ponuja izdelava kokristalov. S kokristalizacijo lahko vplivamo na različne lastnosti zdravilne učinkovine med katerimi so najpomembnejše topnost in hitrost raztapljanja, stabilnost ter mehanske lastnosti. Zaradi velikega nabora potencialnih tvorcev kokristalov in možnosti patentne zaščite je področje zelo perspektivno, kar se kaže tudi z velikim številom novih patentnih prijav.

Kokristale je mogoče pridobivati na različne načine, med njimi pa sta najbolj uveljavljena kokristalizacija iz raztopine in izdelava z mletjem v krogličnem mlinu, ki jo lahko nadgradimo z uporabo majhne količine topila.

Flukonazol je znana zdravilna učinkovina, ki je relativno slabo topna, zaradi njene bazičnosti pa je zelo omejena tudi tvorba soli. Zaradi teh lastnosti je pritegnila zanimanje raziskovalcev. Kastelic in sodelavci so z metodo kokristalizacije iz raztopine že uspeli izdelati kokristale flukonazola z maleinsko, fumarno in glutarno kislino. Karlo Lovrić se je v svoji diplomski nalogi ukvarjal s pripravo kokristalov z metodo mletja z dodatkom topila in karakterizacijo pripravljenih kokristalov. Poleg kokristalov z maleinsko, fumarno in glutarno kislino mu je uspelo pripraviti še kokristale z malonsko jabolčno, vinsko in salicilno kislino. V sklopu diplomske naloge smo poskušali smiselno nadaljevati njihovo delo. V prvem delu smo poskušali izpopolniti postopek preizkušanja hitrosti raztapljanja tako, da smo kokristale pripravljene z mletjem polnili v želatinske kapsule in testirali sproščanje v vodi. Ugotovili smo, da s to modifikacijo rezultati ne pokažejo bistvenih razlik glede na predhodne ugotovitve.

V drugem delu smo se osredotočili na proučevanje mehanskih lastnosti kokristalov. Monokristale pripravljene z metodo kokristalizacije iz raztopine smo testirali s pomočjo nanoindenterja in mikroskopa na atomsko silo. Kokristale enake sestave pripravljene z mletjem smo stiskali in merili odvisnost odmika pečatov od sile stiskanja. Ugotovili smo, da se s tvorbo kokristalov izboljšajo plastične lastnosti učinkovine ter da nam opazovanje mehanskih lastnosti materialov na mikroskopskem nivoju omogoči razumevanje in predvidevanje obnašanja kokristalov pri tabletiranju.

ABSTRACT

The number of novel drug candidates with solubility limited bioavailability is increasing and this presents an industry wide challenge to effective and efficient drug development. In formulation development stage, there are several approaches to improve those properties through the formation of salts, hydrates/solvates and various polymorphic forms. In addition, scientists are increasingly becoming aware of possibilities, gained by the formation of cocrystals. With the cocrystallization, various properties of active ingredients may be influenced, the most important among those being solubility, dissolution rate, stability and mechanical properties. Due to a great number of potential cocrystal formers and the possibility to protect it with patents, this field is becoming very promising, which also reflects in a large number of new patent applications.

Cocrystals may be produced in different ways. The most established methods are cocrystallization from a solution and grinding in a ball mill, which may be upgraded by the use of small quantities of solvent.

Fluconazole is an established active pharmaceutical ingredient (API), slightly soluble and with limited salt formation possibility due to its basic properties. These properties have drawn scientists' attention. Kastelic and his co-workers have managed to form fluconazole cocrystals with maleic, fumaric and glutaric acid through the process of cocrystallization from a solution. In his diploma thesis, Karlo Lovrić concerned himself with the preparation of cocrystals using the grinding method (adding some solvent), and with the characterisation of prepared cocrystals. In addition to cocrystals with maleic, fumaric and glutaric acid, he managed to prepare cocrystals with malonic, malic, tartaric and salicylic acid. In my diploma thesis we intended to continue their work. In the first part, we tried to improve the process of dissolution rate testing, so that the cocrystals formed by grinding were formulated into gelatine capsules and their release in water was tested. It was found that these modifications show no essential differences compared to previous findings.

In the other part, we focused on mechanical properties of cocrystals. Single crystals prepared by cocrystallization from a solution were tested using a nanoindenter and an atomic force microscope. Cocrystals with the same structure prepared by grinding were compressed, and the dependence between force and displacement was measured. It was found that through cocrystal formation plastic properties of active ingredients are improved, and that the observation of mechanical properties of materials at the microscopic level enables us to understand and predict tableting behaviour of cocrystals.

SEZNAM OKRAJŠAV IN ENOT

AFM – mikroskopija na atomsko silo (Atomic force microscopy)

BCS – biofarmacevtski klasifikacijski sistem (Biopharmaceutics Classification System)

CSD – podatkovna baza CSD (Cambridge Structural Database)

CSM – kontinuirano merjenje togosti (Continuous stiffness measurement)

DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija (Differential scanning calorimetry)

E – Young-ov modul

EAFUS - vse kar se lahko dodaja k hrani v ZDA (Everything added to food in the United States)

FDA – Ameriška agencija za hrano in zdravila (food and drug administration)

GRAS – splošno varne substance (Generally recognized as safe)

HPLC – Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (High pressure liquid chromatography)

IR spektroskopija – infrardeča spektroskopija

K – Kelvin

NMR – jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)

SEM – vrstični elektronski mikroskop (scanning electron microscope)

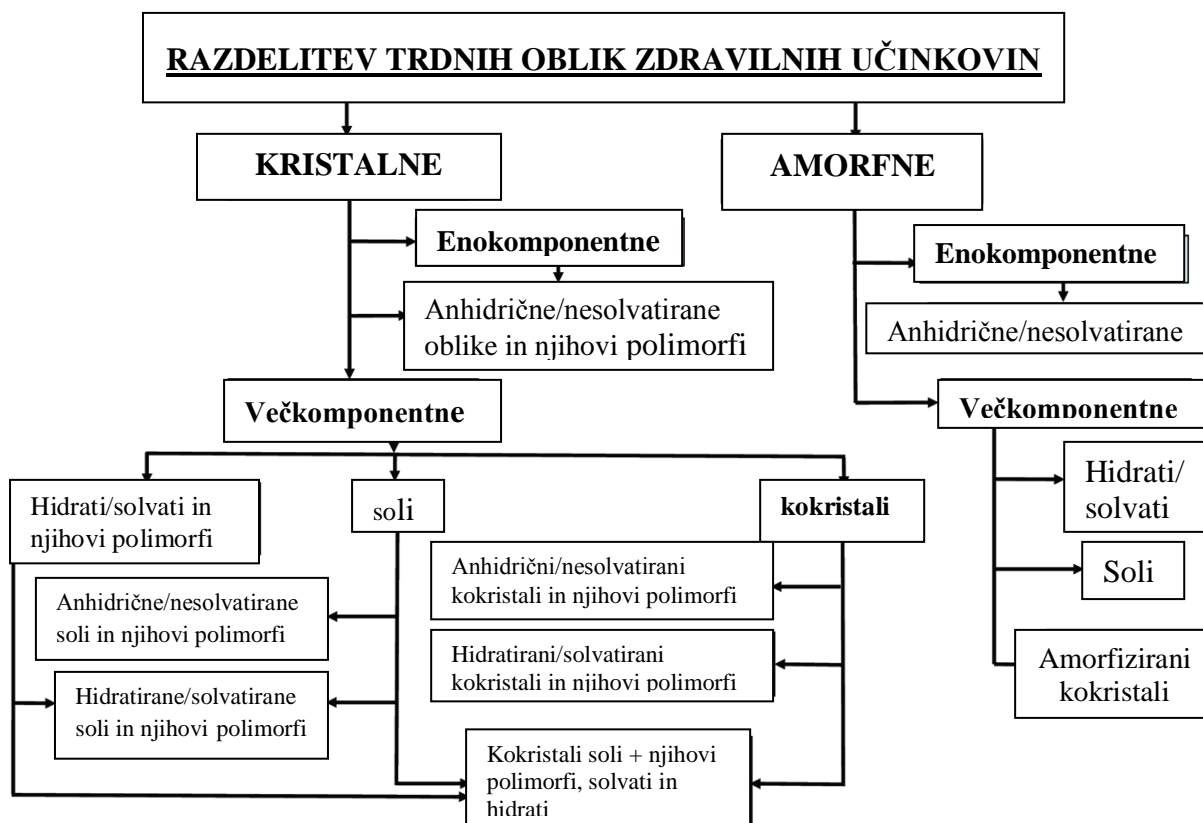
SSNMR – jedrska magnetna resonanca v trdnem (solid-state nuclear magnetic resonance)

XRPD – rentgenska praškovna difrakcija (X-ray powder diffraction)

ZU – zdravilna učinkovina

1 UVOD

Zdravilne učinkovine so pri sobni temperaturi največkrat v trdnem agregatnem stanju in so vgrajene v trdne farmacevtske oblike, tablete in kapsule. Kljub navidezni podobnosti ločimo več trdnih oblik zdravilne učinkovine, ki se lahko med seboj močno razlikujejo v kemijskih, fizikalnih in mehanskih lastnostih. Te lahko vplivajo na hitrost raztapljanja in posledično biološko uporabnost aktivne farmacevtske učinkovine, pa tudi na potek in možnosti tehnološke obdelave ter na izbiro primerne farmacevtske oblike. Lastnosti trdne snovi niso odvisne le od molekul, ki jo sestavljajo, temveč tudi od razporeditve molekul v prostoru. Glede na razporeditev molekul v prostoru delimo trdne snovi na kristalne in amorfne, kakor prikazuje Slika 1 (1). Za amorfno obliko je značilna boljša topnost in večja hitrost raztapljanja od kristalnih oblik, vendar se v farmacevtski industriji, zaradi slabše stabilnosti, relativno malo uporablja. Kristalna snov lahko tvori različne kristalne rešetke, kar imenujemo polimorfizem. Različne kristalne oblike (polimorfi) zdravilne učinkovine se lahko med seboj razlikujejo v temperaturi tališča, topnosti, stabilnosti, hitrosti raztapljanja, intrinzični topnosti, biološki uporabnosti, obliki delcev, gostoti, barvi in mehanskih lastnostih (2).



Slika 1: Razdelitev trdnih oblik zdravilnih učinkovin (1).

1.1 KOKRISTALI

Vsako leto raziskovalci in farmacevtska industrija razvijejo množico potencialnih učinkovin, od katerih se jih manj kot 1 % pojavi na tržišču. Poleg toksičnosti in neučinkovitosti je eden najpomembnejših vzrokov nizka biološka uporabnost, ki je posledica slabe topnosti odkrite učinkovine (3).

Z namenom izboljšanja fizikalnih lastnosti pogosto uporabljamo večkomponentne kristalne oblike, kamor uvrščamo soli, hidrate/solvate in kokristale. Solvati so večkomponentni kristali pri katerih je ena od komponent pri sobni temperaturi v tekočem agregatnem stanju. Soli in kokristale sestavljajo le komponente v trdnem agregatnem stanju, razlikujejo pa se v načinu povezovanja molekul. V kokristalih se molekule večinoma povezujejo z neionskimi interakcijami (komponente so v nevtralni obliki), medtem ko so pri solih interakcije največkrat elektrostatske (komponente so v ionizirani obliki). Kokristali nam torej omogočajo pripravo novih trdnih oblik tudi tistih zdravilnih učinkovin, ki nimajo primernih funkcionalnih skupin za tvorbo soli, in tako omogočijo pridobivanje materialov s širokim spektrom lastnosti (4). Tudi zaradi tega se je v zadnjem času precej povečalo zanimanje za proučevanje kokristalov. Kokristali ponujajo potencialne možnosti za izboljšanje topnosti, hitrosti raztapljanja, biološke uporabnosti in fizikalne stabilnosti. Poleg tega lahko tvorba kokristalov izboljša tudi druge pomembne lastnosti zdravilne učinkovine, kot so pretočne lastnosti, kemijska stabilnost in stisljivost (5).

V literaturi ne najdemo enotne definicije kokristala. Definicije različnih avtorjev so povzete v preglednici I. Zaradi velikega zanimanja in potrebe po regulatorni ureditvi na področju kokristalov, je decembra 2011 FDA objavila osnutek priporočil za industrijo na področju kokristalov. FDA definira kokristal kot trdno snov, sestavljeno iz dveh ali več molekul, v skupni kristalni rešetki (6). Definicija in klasifikacija še nista dokončni, saj je osnutek naletel na velik odziv strokovne javnosti.

V diplomski nalogi se bomo držali definicije, ki se je že uveljavila v znanstveni literaturi in se glasi: kokristali so enotne kristalne snovi, njihovo kristalno rešetko sestavljajo nevtralne molekule v stehiometrijskem razmerju, ki so pri sobnih pogojih v trdnem agregatnem stanju (7).

V farmacevtskem kokristalu nastopa kot tarčna molekula zdravilna učinkovina, tvorec kokristala pa je lahko neaktivna snov ali druga zdravilna učinkovina. Kot tvorce kokristala lahko uporabimo vse snovi, ki se v prehranski ali farmacevtski industriji uporabljajo kot

pomožne snovi, oz. vse substance, ki jim FDA dodeli oznako GRAS (angl. Generally regarded as safe – splošno varne substance) (8).

Preglednica I: Definicije kokristala in farmacevtskega kokristala (*) v različnih literaturnih virih

AVTOR	DEFINICIJA KOKRISTALA	LIT. VIR
Aakeröy and Salomon 2005	»strukturno homogene kristalne snovi, ki vsebujejo dve ali več komponent v točno določenem stehiometrijskem razmerju« »sestavljene so iz reaktantov ki so pri sobni temperaturi v trdnem stanju«	(9)
Jones 2006	»kristalni kompleks dveh ali več nevtralnih molekularnih komponent, ki so povezane v kristalno rešetko z nekovalentnimi povezavami, pogosto z vodikovo vezjo«	10
Vishweshawar 2006	*»enotna kristalna trdna snov, ki vsebuje dve nevtralni molekuli, od katerih je ena aktivna farmacevtska snov in druga tvorec kokristala«	(8)
Rodriguez-Hornedo 2007	»sestavljene so iz enotne kristalne faze sestavljene iz več komponent v določenem stehiometrijskem razmerju, kjer se različne molekularne enote povezujejo z vodikovimi ali drugimi nekovalentnimi vezmi«	(4)
Shan, Zavorotko 2008	»večkomponentni kristal v katerem so vse komponente v čisti obliki trdne pri atmosferskih pogojih. Tarčna molekula ali ion in nevtralni tvorec kokristala sta prisotna v stehiometrijskem razmerju.«	(11)
Schuldheiss and Newman 2009	»sestavljene so iz nevtralne ali ionske zdravilne učinkovine in nevtralnega tvorca kokristala, ki sta povezana z nekovalentnimi, prosto reverzibilnimi povezavami«	(12)
Weyna D.R 2012.	*»so večkomponentni kristali, ki vključujejo dve ali več komponent, ki so trdne pri atmosferskih pogojih, so prisotne v stehiometrijskem razmerju in interagirajo z vodikovimi vezmi. Vsaj ena komponenta je nevtralna in vsaj ena komponenta je aktivna učinkovina.«	(13)
FDA 2011	»trdna snov sestavljena iz dveh ali več molekul v trdni kristalni rešetki«	(6)

1.2 POMEN IN LASTNOSTI FARMACEVTSKIH KOKRISTALOV

Glavni cilj razvoja farmacevtskih kokristalov je izboljšanje fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilne učinkovine in posledično izboljšanje njene stabilnosti ter učinkovitosti (14). Ker pri farmacevtskih kokristalih obstaja večje število potencialnih tvorcev kokristala, kot pri soleh, polimorfih, solvatih ali hidratih, imajo kokristali velik potencial za izboljšanje teh lastnosti. S tvorbo kokristala se lahko spremeni temperatura tališča, stabilnost,

higroskopnost, topnost, hitrost raztapljanja in z njimi povezana biološka uporabnost. Poleg tega pa se lahko s tvorbo kokristala spremenijo tudi mehanske lastnosti snovi, ki močno vplivajo na izbiro in potek tehnološkega procesa, pri določeni zdravilni učinkovini.

1.2.1 TEMPERATURA TALISČA

Temperatura tališča je fizikalna lastnost, ki je opredeljena kot tista temperatura, pri kateri sta trdna in tekoča faza v ravnotežju. Če je mogoče, določamo tališče s pomočjo DSC (diferenčne dinamične kalorimetrije), saj lahko tako poleg temperature tališča pridobimo še dodatne informacije, kot je entalpija taljenja.

Namen mnogih raziskav je bil ugotoviti, ali se temperatura tališča spreminja glede na posamezne komponente in ali lahko v seriji kokristalov napovemo temperaturo tališča. Ugotovili so, da se temperatura tališča kokristalov razlikuje od temperatur tališča posameznih komponent. Po vrednosti je lahko višja, nižja ali med vrednostmi posameznih izhodnih komponent (15,12). Zanimivo je, da pod temperaturo tališča kokristala ni nobenih drugih termičnih dogodkov (4).

Aakelröy in sodelavci so preučevali povezavo med temperaturo tališča in topnostjo kokristalov v vodi. V ta namen so pripravili kokristale zdravilne učinkovine (heksametilenbisacetamid) z različnimi tvorci kokristala, ki so imeli podobno strukturo, vendar različno temperaturo tališča (alifatske dikarboksilne kisline). Uspeli so dokazati, da so temperature tališča kokristalov direktno povezane s temperaturami tališča dikarboksilnih kislin. Topnost kokristalov ni izkazovala takšne linearne korelacije.(16) Določene povezave med temperaturo tališča in topnostjo sicer obstajajo, vendar je obseg dosedanjih raziskav na tem kompleksnem področju premajhen, da bi lahko potegnili jasne zaključke. Ena redkih ugotovitev je, da je posledica visoke temperature tališča slabša topnost kokristalov, vendar so tudi ti rezultati pridobljeni na premajhnem številu vzorcev.(17)

Znižanje temperature tališča nam lahko prihrani težave, ko poskušamo termolabilne učinkovine oblikovati s tehnološkimi procesi, ki zahtevajo spojino v obliki taline (4).

1.2.2 TOPNOST

Topnost (intrinzična) je maksimalna koncentracija topljenca, ki z danim volumnom topila daje nasičeno homogeno molekularno disperzijo pri določeni temperaturi (20°C). Koncentracija nasičene raztopine je torej merilo topnosti snovi.

Tradicionalne metode za izboljšanje topnosti zdravilne učinkovine vključujejo predvsem tvorbo soli, trdne disperzije in zmanjšanje velikosti delcev (mikronizacijo) (18). Med

sodobnimi tehnikami pa je priprava kokristalov ena od možnosti za izboljšanje topnosti v vodi slabo topnih učinkovin. Topnost kokristala je odvisna od koncentracij komponent kokristala in od pH, če je katera od komponent ionizirana (19).

1.2.3 HITROST RAZTAPLJANJA

Hitrost raztapljanja je hitrost prehoda substance iz trdnega v raztopljeno stanje. Substanca mora biti v gastrointestinalnem traktu v raztopljenem stanju, da je na voljo za absorpcijo. Obstaja več različnih metod za izboljšanje hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin in sicer: zmanjšanje velikosti delcev, s čimer se poveča površina delcev, tvorba vodotopnih kompleksov, solubilizacija z dodatkom površinsko aktivnih snovi, derivatizacija ZU (tvorba soli), sprememba trdnega stanja ZU (tvorba kokristalov) ter tvorba trdnih disperzij. Velikost delcev je pomemben parameter zdravilnih učinkovin, tudi kokristalov, saj poleg raztapljanja vpliva tudi na absorpcijo (20).

Hitrost raztapljanja opisuje Noyes-Whitneyeva enačba (*enačba 1*):

$$DR = \frac{dc}{dt} = \frac{D \cdot S}{h \cdot V} (c_s - c) \quad \text{enačba 1}$$

kjer je DR hitrost raztapljanja, S površina, ki je na voljo za raztapljanje, D je difuzijski koeficient učinkovine, h predstavlja debelino difuznega sloja, c_s je absolutna oz. nasičena topnost učinkovine, c je količina raztopljene učinkovine v času t, V pa je prostornina medija za raztapljanje.

Pri raztapljanju se na površini delca pojavi nasičena koncentracija snovi c_s , ki se z oddaljevanjem od delca spreminja in na razdalji h pade na koncentracijo c. V tej plasti poteka difuzija raztopljene učinkovine zaradi difuzijskega gradienta.

1.2.4 BIOLOŠKA UPORABNOST

Namen izdelave kokristalov je pogosto izboljšanje biološke uporabnosti, predvsem z izboljšanjem topnosti in hitrosti raztapljanja učinkovin, ki spadajo v drugi razred biofarmacevtskega klasifikacijskega sistema (BCS), za katere je značilna slaba topnost in dobra permeabilnost skozi biološke membrane. Pri teh spojinah je namreč slaba topnost oz. nizka hitrost raztapljanja odločilni faktor, ki omejuje prehajanje učinkovine v krvni obtok in zmanjšuje njeno biološko uporabnost.

O topnosti že odkritih kokristalov imamo ogromno podatkov, ravno nasprotno pa so podatki o farmakokinetičnih lastnostih veliko bolj skromni. Še manj je raziskan odnos med *in vitro* testi raztapljanja ter *in vivo* farmakokinetičnimi testi. V raziskavi, kjer so preverjali *in vitro/in vivo* korelacijo meloksikama in njegovih kokristalov z različnimi pomožnimi

snovmi (karboksilnimi kislinami) na podganah so ugotovili, da je korelacija dobra znotraj poskusa na istovrstnih kokristalih. Ravno tako je korelacijska analiza, ki je temeljila na kokristalih pripravljenih z različnimi tvorci pokazala, da se tisti kokristali, ki izkazujejo večjo hitrost raztapljanja *in vitro*, tudi hitreje absorbirajo po peroralni aplikaciji. Kot medij za raztapljanje so uporabili 25 mM fosfatni pufer s pH=6,5 pri temperaturi 37°C (13). Kljub majhnemu številu raziskav s tega področja se raziskovalci strinjajo, da kokristali lahko občutno povečajo biološko uporabnost slabo topnih zdravilnih učinkovin, vendar direktne *in vitro/in vivo* korelacije ni vedno mogoče določiti (12, 21).

1.2.5 STABILNOST

Testiranje stabilnosti novega kokristala vključuje štiri vidike in sicer stresni test v prisotnosti vlage, odpornost na toplotno obremenitev, kemijsko stabilnost in stabilnost v raztopini.

Stresni test v prisotnosti različne relativne vlažnosti zraka uporabljamo za določitev najprimernejših pogojev shranjevanja, ker lahko previsoka vsebnost vode vodi do mikrobiološke nestabilnosti (22). Vpliv vlage na stabilnost praškastih farmacevtskih snovi lahko zelo hitro in enostavno preučimo z metodo dinamične sorpcije pare (angl.: Dynamic Vapour Sorption – DVS), ki temelji na zelo natančnem gravimetričnem sistemu, ki meri sorpcijo in desorpcijo ekstremno majhnih količin vode, v odvisnosti od relativne nasičenosti zraka. Sorpcijske eksperimente izvajamo z vodo ali z organskimi topili (23).

Odpornost na toplotno obremenitev in kemijska stabilnost sta najmanj raziskani področji lastnosti kokristalov (24). Primer izboljšanja kemijske stabilnosti je tvorba kokristalov karbamazepina. Karbamazepin je namreč fotosenzibilen S tvorbo kokristala spremenimo strukturo kristala in molekularno ureditev ter tako preprečimo fotodegradacijo (4).

Stabilnost v raztopini je definirana kot zmožnost komponent kokristala, da ostanejo v raztopini ne da bi takoj kristalizirale (24). Pomembno je, da stabilnost v raztopini ocenimo med razvojem farmacevtske oblike, kar velja tako za raztopine in suspenzije, kot tudi za trdne farmacevtske oblike, saj se le-te raztapljajo v gastrointestinalnem traktu. Kot medij za preiskavo lahko uporabimo vodo ali raztopine s katerimi ponazarjamo okolje prebavnega trakta. Stabilnost v raztopini pogosto opazujemo vzporedno s preizkusi raztapljanja ali topnosti, saj tako dobimo natančnejši vpogled v dogajanje. Ker pri kokristalih večkrat pride do disociacije, je stabilnost v raztopini pri kokristalih potrebno opazovati. Pomen rezultatov moramo nato seveda pretehtati glede na ostale lastnosti (potencialne prednosti).

1.2.6 MEHANSKE LASTNOSTI

Mehanske lastnosti učinkovine so predvsem pomembne v farmacevtski tehnologiji, saj odločilno vplivajo na potek izdelave končne farmacevtske oblike. Pomembni lastnosti trdnih kristalnih snovi sta oblika in velikost delcev ZU, ker lahko vplivata na razvoj in proces izdelave zdravil (pretočne lastnosti, stisljivost, sedimentacija, hitrost raztapljanja) (25). Zaradi drugačne notranje strukture kristala, se lahko spremeni tudi zunanja oblika ali morfologija in s tem mehanske lastnosti delcev, vendar se moramo pri tem zavedati, da ima na obliko delcev zelo velik vpliv tudi postopek kristalizacije (25,26). Eden izmed načinov izboljšanja mehanskih lastnosti predstavlja kokristalizacija. Mehanizem, s katerim kokristali vplivajo na izboljšanje elastičnih in plastičnih lastnosti materialov, je sprememba molekularnega pakiranja oziroma tvorba plastne urejenosti kristalnih ravnin.

V primeru kokristalov kofeina in metil galata v razmerju 1:1 so opazili izboljšanje kompaktilnosti, ki je pomemben parameter pri tabletiranju. Tablete pripravljene iz teh kokristalov imajo večjo trdnost in ne izkazujejo laminacije niti pri uporabi zelo visokih tlakov stiskanja. Ugotovili so, da se te lastnosti izboljšajo zaradi plastne urejenosti molekul (angl.: slip planes), ki služijo kot drsne ravnine in se odražajo v večji plastičnosti (27). Podobno so boljšo kompaktilnost odkrili pri kokristalih s paracetamolom. Tudi v tem primeru sklepajo, da je za izboljšanje mehanskih lastnosti odgovorna plastna struktura kokristalov (28). Plastičnost in kompaktilnost kokristalov teofilin: metil galat je boljša od kristalov metil galata, a slabša od kristalov teofilina, kar pripisujejo razlikam v trdnosti med kristali (29).

1.2.7 FARMACEVTSKI KOKRISTALI IN INTELEKTUALNA LASTNINA

Zaščita intelektualne lastnine je zelo pomembna na vseh področjih, vendar se je najpogosteje poslužujejo farmacevtska in biotehnoška podjetja, kjer so stroški razvoja bistveno višji od stroškov proizvodnje. Zaradi visokih stroškov raziskav in razvoja obstaja tveganje, da se ti stroški ne bodo povrnili v času trženja izdelka. Patentni zahtevki, ki se nanašajo na kemijsko strukturo zdravilne učinkovine, ponavadi predstavljajo primarni nivo, na katerem patentno zaščitijo inovacijo. Za dodelitev patenta mora biti izum nov, inventiven ter industrijsko uporaben. Tem pogojem lahko zadostijo tudi kokristali in tako predstavljajo široko področje možnosti patentne zaščite, saj obstaja veliko število potencialnih tvorcev kokristalov s seznama EAFUS (vse snovi, ki se lahko dodajajo k hrani v ZDA, angl.: everything added to food in the United States) in GRAS (30).

Novost: S kokristalizacijo pridobimo alternativne modifikacije zdravilne učinkovine v trdnem stanju. S tem dosežemo podobno spremembo kot pri tvorbi soli, novo in posebno kristalno obliko učinkovine. Tako kot soli tudi kokristali zadostijo kriteriju novosti(30).

Inventivnost: Za koncept inventivnosti pri kokristalih lahko najdemo podobnost v kristalnih oblikah zdravilnih učinkovin. Dodatni patenti na novih kristalnih oblikah že znanih učinkovin pogosto podaljšajo ekskluzivno dobo zdravila na tržišču(30).

Industrijska uporabnost: Kokristali imajo ponavadi enako terapevtsko uporabnost, kot sama zdravilna učinkovina, ki je že patentno zaščitena z originatorjevo prijavo. Industrijska uporabnost se v primeru kokristalov kaže predvsem v izboljšanih fizikalno-kemijskih lastnostih. Postopek pridobivanja kokristalov je izvedljiv v industrijskem merilu(30). Razlog za vložitev patentne prijave je lahko tudi izboljšanje mehanskih lastnosti.

1.3 MOLEKULARNE OSNOVE NASTANKA KOKRISTALOV

Kokristalizacija je rezultat različno močnih molekulskih povezav med istovrstnimi molekulami – homomeri in med različnimi molekulami – heteromeri (31). Komponenti kokristala se med seboj povezujejo v stehiometrijskem razmerju. Pri tem sodelujejo nekovalentne interakcije, med katere spadajo vodikove vezi, koordinacijske vezi, hidrofobne interakcije, Van der Waalove vezi, π - π interakcije in elektrostatske vezi (9). Zaradi jakosti in usmerjenosti je vodikova vez najpomembnejša interakcija v kokristalni formaciji (4). V primeru načrtovane priprave kokristalov je prvi korak analiza obstoječih kristalnih oblik. Pri tem si pomagamo z uporabo Cambridge-ske strukturne podatkovne baze (CSD- angl.: Cambridge Structural Database), ki nam posreduje statistično analizo kristalnih oblik in razporeditve molekul v kristalu. S tem poda empirično informacijo o tem, kako so orientirane funkcionalne skupine in kakšne so možnosti medmolekulskih povezav preko supramolekulskih sintonov (8).

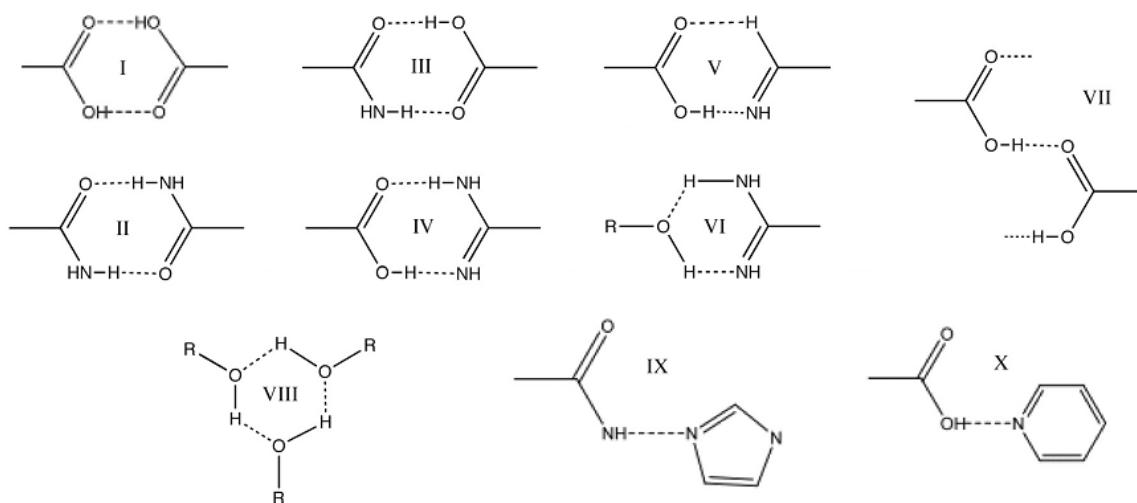
Raziskave dokazujejo, da obstajajo določene vodikove vezi, ki se pogosto pojavljajo v kokristalih in jih imenujemo sintoni. Primeri so prikazani na Slika 2. Sintone razdelimo na homosintone in heterosintone. V homosintonih se z vodikovo vezjo povežeta dve enaki funkcionalni skupini, v heterosintonih pa se povežeta dve različni funkcionalni skupini (32).

Zdravilni učinkovini, ki smo jo izbrali za kokristalizacijo je potrebno izbrati ustrezno netoksično pomožno snov, ki ima glede na strukturo potencial, da postane tvorec kokristala. Nemogoče je zagotovo napovedati, ali bo kokristalizacija med dvema

komponentama potekla, saj je sposobnost zdravilne učinkovine in tvorca kokristala, da tvorita skupno kristalno rešetko, povezana z njunima molekulskima strukturama, lego molekul v kristalu, možnostjo nastanka vodikovih vezi in gibljivostjo molekul, zato so glede na dosedanje znanje potrebni empirični poskusi (4). Pri razvoju si lahko pomagamo s pravili tvorbe vodikovih vezi med trdnimi komponentami

- vsi dobri donorji in akceptorji vodikove vezi sodelujejo pri tvorbi vodikove vezi,
- šestčlenski obroč, ki ga tvorijo medmolekulske vodikove vezi, nastane lažje kot znotrajmolekulske vodikove vezi,
- najboljši donorji in akceptorji vodikove vezi, ki ostanejo prosti po tvorbi medmolekulskih vezi, tvorijo znotrajmolekulske vodikove vezi med seboj (8).

Na splošno so heterosintoni bolj robustni od homosintonov. Tvorba heterosintona med kislino in amidom je tako ugodnejša od tvorbe homodimerov med dvema karboksilnima ali dvema amidnima skupinama (8). V opisanih kokristalih najpogosteje nastopa povezava med karboksilno skupino prve molekule in duškovim heterociklom druge molekule. Med farmacevtsko sprejemljivimi tvorci kokristalov najpogosteje najdemo karboksilne kisline, amide, ogljikove hidrate, alkohole in aminokisliline (24).



Slika 2: Sintoni z vodikovimi vezmi, ki so pogosti v farmacevtskih kokristalih. Številke I-II predstavljajo primere homosintonov in številke III-X predstavljajo primere heterosintonov (32).

1.4 METODE PRIPRAVE KOKRISTALOV

Kokristale lahko pripravimo na različne načine. Najpogosteje se uporablja kokristalizacija iz raztopine in priprava kokristalov z mletjem sestavin v krogličnem mlinu. Znana je tudi priprava kokristalov iz taline, iz koncentrirane suspenzije, z uporabo superkritičnih tekočin, s »hot-stage« mikroskopijo, s pomočjo ultrazvoka, z uporabo sušenja z razprševanjem (angl.: spray drying), z delikvescenco sestavin pri visoki relativni vlažnosti

ali s sublimacijo sestavin (33,34,35,36,37). Te metode so bolj zapletene in primerne za manjši spekter ZU, zato se redkeje uporabljajo.

Poleg tega so raziskovalci dokazali, da se lahko v določenih primerih kokristali tvorijo v zmesih prahov spontano, brez mehanske aktivacije, odvisno od časa in pogojev shranjevanja npr. relativne vlažnosti (38,39).

1.4.1 KOKRISTALIZACIJA IZ RAZTOPINE

Kokristalizacija iz raztopine je zelo pomembna, ker je edina metoda s katero lahko pridobimo kokristale primerne kakovosti za rentgensko difrakcijo na monokristalu (Angl.:Single crystal X-ray diffraction - SXRD). Kristalizacija iz raztopine poteka v treh stopnjah. Najprej pride do prenasičenja, sledi tvorba nukleacijskih jeder in nato rast kristalov. Glede na način, s katerim dosežemo prenasičenje, ločimo štiri postopke kristalizacije iz raztopine: z ohlajanjem raztopine, s počasnim odparevanjem topila, z dodajanjem netopila ali s kemijsko reakcijo, ki spremeni naravo raztopine (40). Med seboj se razlikujejo po nujnosti uporabe stehiometrijskega razmerja med komponentami, ki tvorijo želeni kokristal. Uporaba stehiometrijskega razmerja je najpomembnejša pri metodi z odparevanjem topila, predvsem kadar pustimo topilo odpareti do suhega. Pri ostalih metodah, kjer topila iz sistema ne odstranimo popolnoma uporaba stehiometrijskega razmerja ni nujna (41).

Najpogosteje se uporablja tehnika z odparevanjem topila, pri kateri moramo poleg uporabe stehiometrijskega razmerja veliko pozornosti posvetiti izbiri primerne topila. V izbranem topilu/zmesi topil morajo imeti vse komponente kokristala podobno topnost. V nasprotnem primeru se bo manj topna komponenta izoborila hitreje. Rezultat takšne kristalizacije so lahko kokristali pomešani s kristali manj topne osnovne komponente ali pa le kristali manj topne komponente. Topilo v katerem imajo vse komponente zadostno in primerljivo topnost pa ne zagotavlja uspešnega poteka kokristalizacije, saj lahko topilo vpliva na medmolekulske interakcije in postane del kristalne rešetke. Tako lahko nastane solvat, ki ovira nastanek načrtovanega kokristala.

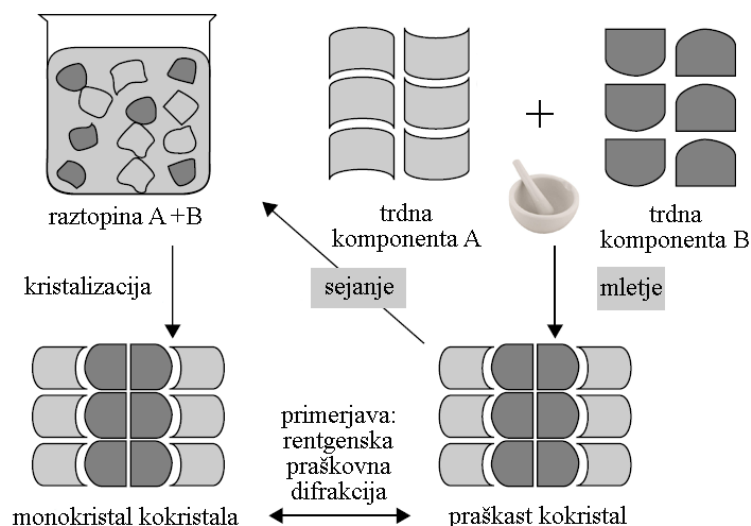
Priporočljivo je, da uporabimo za kokristalizacijo z molekulo učinkovine takšno pomožno snov, ki tvori več polimorfnih oblik. Takšne molekule imajo večjo strukturno gibljivost in niso ujete le v določen tip kristalne rešetke. To pomeni večjo verjetnost, da se molekula postavi v primerno konformacijo za hkraten obstoj v kristalni rešetki z drugo molekulo (42). Sam polimorfizem pa ne zagotavlja ustreznosti spojine za kokristalizacijo. Zelo

pomembno vlogo ima velikost heteromernih medmolekulskih interakcij preko sintonov, ki morajo presegati homomerne znotrajmolekulske interakcije (3).

Ostali postopki kokristalizacije iz raztopine so manj raziskani in se redkeje uporabljajo. Mogoče velja omeniti postopek kokristalizacije z ohlajanjem raztopine, ker je potencialno lahko primeren za pripravo večjih serij kokristalov (43).

Pomanjkljivosti pridobivanja kokristalov iz raztopin so predvsem povezane z zagotavljanjem zadostne in primerljive topnosti začetnih komponent v izbranem topilu in z dejstvom, da tudi podobna topnost ne zagotavlja uspešne kokristalizacije (tvorba solvatov). Dodatno težavo predstavljajo velika poraba topil, nizek izkoristek in slaba ponovljivost.

Raziskovalci čedalje bolj uporabljajo metodo sejanja kokristalov (angl.: cocrystal seeding), ki pogosto olajša pridobivanje monokristalov - kokristalov ustrezne velikosti in kakovosti za rentgensko analizo kokristalov. Pridobivanje kokristalov s sejanjem je nadgradnja metode pridobivanja iz raztopine. Obe komponenti, ki ju želimo združiti v kokristal, ob segrevanju raztopimo v topilu. Ko se topilo ohladi in preden se začne kokristalizacija, dodamo v raztopino semena kokristalov, ki vzpodbudijo nukleacijo in rast kokristalov iste oblike kot so v semenih (slika 3). S sejanjem lahko pridobimo obliko kokristala, katerega nastanek je kinetično manj ugoden, poleg tega pa s sejanjem pridobimo na čistoti želene kokristalne oblike. Tako lahko kokristale, pridobljene z mletjem ali s katero drugo metodo, pretvorimo v dovolj velike monokristale, primerne za rentgensko analizo(43,44,45).



Slika 3: Pridobivanje kokristalov iz raztopine ali z mletjem (46).

1.4.2 KOKRISTALIZACIJA Z MLETJEM

Tvorba kokristalov z mletjem temelji na mehanski aktivaciji komponent. Mletje je alternativna metoda kokristalizaciji iz raztopine, ki se je v praksi lepo uveljavila, saj prinaša številne prednosti. Ta proces je hitrejši, enostavnejši in bolj primeren z okoljevarstvenega vidika (ni potrebna uporaba večjih količin topil), zato je primeren za reševanje. Glavne izzive predstavljajo možnost prenosa tehnologije na večje serije, stabilnost reaktantov med samim procesom in obseg pretvorbe (47).

Poznamo dva načina priprave kokristalov z mletjem in sicer priprava s suhim mletjem in priprava z mletjem z dodatkom manjše količine topila. Kokristale s (suhih) mletjem pripravimo tako, da pomešamo obe komponenti v izbranem stehiometrijskem razmerju in ju meljemo (ročno s pestilom v možnarju ali z uporabo krogličnega, oziroma vibracijskega mlina). Spoznanje, da majhen kontroliran dodatek topila med mletjem izboljša proces in poveča kinetiko nastanka kokristalov, je prineslo pomemben napredek pri pridobivanju kokristalov s to metodo (48). Mletje z dodatkom topila ima nekaj prednosti pred kokristalizacijo iz raztopine. Pri tej metodi ni potrebno, da sta obe komponenti dobro topni v izbranem topilu, izkoristek reakcije je večji in večja je kristalnost produkta. Z izbiro topila je mogoče kontrolirati nastanek polimorfov in v določenih primerih lahko s to metodo pridobimo kokristale, ki jih ni mogoče pridobiti z drugimi metodami (48,49).

1.4.2.1 Mletje brez dodatka topila

Pri tej metodi komponente kokristala zmešamo v stehiometrijskem razmerju, nato pa jih določen čas mešamo (meljemo) ročno s pestilom v terilnici ali s pomočjo krogličnega ali vibracijskega mlina (50). Postopek priprave kokristalov lahko poteka po različnih mehanizmih, ki se nanašajo predvsem na vrsto prehodnega stanja. Tako ločimo tvorbo kokristalov preko molekulske difuzije, preko vmesne tekoče faze s tvorbo evtektika in preko vmesne amorfne faze. Za vse tri vrste prehodnih stanj pa je značilna povečana mobilnost in/ali večja energija reaktantov (50). Kokristali lahko v praksi nastajajo po enem ali več mehanizmih hkrati.

Kokristalizacija preko molekulske difuzije je mogoča, ko ima vsaj eden od reaktantov visok parni tlak. V takih sistemih se tvorba kokristala lahko pojavi na stiku med trdnima reaktantoma celo brez mletja ali mešanja. *Rastogi* in sodelavci so na podlagi rezultatov kokristalizacije pikrinske kisline z različnimi aromatskimi tvorilci kokristalov ugotovili, da tvorbo kokristalov omogočajo tako hlapi, kakor tudi difuzija molekul s površine. Ugotovili

so, da je prevladujoč mehanizem površinska difuzija, ki je v različnem obsegu spremljana z difuzijo skozi plinsko fazo (51). V takšnih sistemih je vloga mletja povečanje površinske difuzije. Med mešanjem reaktantov namreč naredimo nove površine dostopne za reakcijo. Difuzija molekul pa ni nujno omejena samo na površinski sloj, ampak lahko poteka tudi iz notranjosti, še posebej če je združena in podprta z gibanjem molekul (50).

Pri kokristalizaciji preko vmesne tekoče faze je tvorba kokristala pospešena z vmesno tekočo fazo, ki nato postane del trdnega kokristalnega produkta. Če je ena od komponent kokristala pri sobnih pogojih v tekoči obliki, pride do nastanka solvata. V primeru ko dodamo med dve trdni komponenti še nekaj vode (topila), da pospeši tvorbo kokristala, se lahko nepričakovano tvori kokristal hidrat (solvat) (52). Kokristalizacija z mletjem je lahko posredovana z vmesno tekočo fazo tudi v primerih, ko komponente kokristala tvorijo podhlajeno, metastabilno evtektično fazo, ki se pozneje strdi in tvori kokristal (53). V takšnih primerih pride na stiku posameznih komponent do površinskega taljenja, ki poteka dokler ni večina snovi pri sobnih pogojih v tekočem stanju. Celotna talina nato preide v trdno agregatno stanje in tvori kokristalno fazo (54). Mletje pri tem poskrbi za mešanje in vzpostavitev novih površin reaktantov za tvorbo evtektika ter izboljša tvorbo kokristalov z induciranjem kokristalnih jeder v fazi evtektika (50).

Kokristalizacija preko amorfnе faze je najverjetnejši mehanizem nastanka kokristala iz trdnih izhodnih komponent, ki niso hlapne in so povezane z močnimi medmolekulskimi interakcijami (vodikove vezi) oz. kjer ni difuzije molekul (55). Če kokristalizacija poteka preko amorfnе faze snovi, je hitrost kokristalizacije odvisna od pogojev mletja (temperatura) in od temperature steklastega prehoda reaktantov. Proces hitreje poteka pri tisti temperaturi pri kateri je amorfnа faza manj stabilna (56). Mletje pri nižji temperaturi stabilizira amorfnо fazo na ta način, da zniža mobilnost molekul, kar ima za posledico manjši obseg nastalih kokristalov (31). Temperatura steklastega prehoda amorfnе snovi je pomembna lastnost, ki določa mobilnost molekul in njihovo reaktivnost. Dodatek pomožne snovi z nizko temperaturo steklastega prehoda deluje kot mehčalo, saj zniža temperaturo steklastega prehoda zmesi in tako poveča mobilnost molekul in hitrost kokristalizacije. Primer učinkovitega mehčala je voda, saj je tvorba kokristalov pospešena, ko uporabljamo hidratirano kristalno obliko reaktanta ali ko pri mletju uporabljamo zelo majhno količino vode (4, 31).

1.4.2.2 Mletje z dodatkom topila

To je metoda izdelave kokristalov z mletjem, pri kateri zmesi osnovnih komponent pred mletjem dodamo manjši volumen topila (nekaj kapljic). Topilo izberemo tako, da ima ustrezno polarnost in topi eno komponento ali pa delno topi obe komponenti kokristala. Z dodatkom primerne topila lahko močno pospešimo kinetiko tvorbe kokristalov in nadzorujemo nastanek določene polimorfne oblike kokristala (48, 49).

Za razliko od suhega mletja s tekočo vmesno fazo, kjer se tekoča faza med potekom kokristalizacije pretvori v trdno sestavino kokristala, ima topilo pri mletju z dodatkom topila pomembno katalitično vlogo. Količina topila, ki ga uporabimo pri mletju, se tekom reakcije ne zmanjšuje, razen če se to zgodi naključno z izhlapevanjem (50). Po končani kokristalizaciji dodano topilo odpari.

Trenutno še ni popolnoma pojasnjeno, kako uporaba topila prispeva k večji učinkovitosti mletja v primerjavi s suhim mletjem, kakor tudi z metodami priprave iz raztopine (57). Predvidevajo, da ima majhna količina topila v nekaterih primerih čisto fizikalno vlogo, saj se obnaša kot drsilo v reakciji in priskrbi medij za molekularno difuzijo (58). Po drugi strani pa ima sama narava mletja, v odvisnosti od vrste tekočine, ki je prisotna, lahko velik vpliv na potek kokristalizacije, med drugim tudi z vplivom na tvorbo multikomponentne rešetke (ogrodja) (59).

Vpliv vrste topila na izid mletja so preučevali mnogi raziskovalci. Trask in sodelavci so dokazali, da z izbiro topila vplivamo na nastanek določene polimorfne oblike kokristala kofeina in glutarne kisline. Iz raztopine pridobimo zmes kokristalov oblike A in B. Pri mletju obeh komponent z dodatkom majhne količine cikloheksana nastane izključno kokristal oblike A, če kot topilo uporabimo kloroform, pa dobimo kokristal oblike B (59).

1.5 VREDNOTENJE KOKRISTALOV

Za vrednotenje kokristalov se uporabljajo metode, ki dajejo podatke o kristalni strukturi. Obstaja več metod s katerimi lahko potrdimo nastanek in določimo strukturo novonastalih kokristalov. Najpogosteje uporabljamo praškovno rentgensko difrakcijo (XRPD oz. PXRD), rentgensko difrakcijo na monokristalu (SXR), infrardečo spektroskopijo (IR), Ramansko spektroskopijo, diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), jedrsko magnetno resonanco v trdnem stanju (ssNMR), vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) in teraherčno spektroskopijo.

Najzanesljivejša metoda za potrditev nastanka in vpogled v strukturo kokristala je **rentgenska difrakcija na monokristalu (angl.: Single crystal X-ray diffraction)**. Z njo

lahko določimo strukturo na nivoju atomov. Glavni problem je priprava monokristalov ustrežne velikosti in kakovosti za testiranje (12). Zaradi lažje priprave vzorcev je daleč najbolj priljubljena metoda za karakterizacijo kristalnih materialov **rentgenska praškovna difrakcija (XRPD)**. Omogoča nam identifikacijo s pomočjo običajnega "fingerprinta" s katerim lahko ločimo kokristale od fizikalnih zmesi zdravilne učinkovine in tvorca kokristala. Rentgenska praškovna difrakcija se je izkazala za ključno metodo pri različnih vrstah kokristalov. Njena glavna pomanjkljivost pa je, da ne loči med kokristali in solvati, hidrati ali polimorfi (24,37). Za izboljšanje razumevanja strukture kokristalov je potrebno upoštevati rezultate različnih sodobnih metod primernih za analizo kristalnih snovi. Mednje spadajo tudi spektroskopske metode, ki nam lahko ponudijo dopolnilne informacije na molekularnem nivoju in tako podprejo ostale raziskave za potrditev nastanka kokristalov. Kokristali lahko izkazujejo povsem drugačen spekter ali pa le manjše zamike signalov, glede na izhodne spojine, kar je odvisno od vrste in jakosti medmolekulskih interakcij. S pomočjo analize premikov signalov lahko določimo funkcionalne skupine, ki so udeležene v molekularnih interakcijah. Na kokristalih izvajamo dve vrsti spektroskopskih analiz in sicer **infrardečo (IR) in Ramansko spektroskopijo**. Ramanska spektroskopija je spektroskopska tehnika, ki nam da podatke o vibracijskih, rotacijskih in drugih nizko frekvenčnih dogajanjih v sistemu. Pri tej metodi vzorec obsevamo z žarkom intenzivne monokromatske svetlobe (navadno laserske) in analiziramo svetlobo, ki se odbije od vzorca če molekula vsebuje stalni dipolni moment. Pri IR pa opazujemo absorpcijo svetlobe, ki je posledica vibracije molekul in posledično spremembe dipolnega momenta molekule. Ramanska spektroskopija ima v primerjavi z IR slabšo občutljivost, naprava je dražja in bolj občutljiva na vplive (T) in tresljaje iz okolja. Prednosti Ramanske spektroskopije sta možnost uporabe vodnih medijev in nezahtevnost priprave vzorcev. Ramanska spektroskopija je bolj občutljiva na prisotnost polarnih vezi, infrardeča spektroskopija pa na prisotnost nepolarnih vezi (60). IR je zelo pogosta spektroskopska tehnika, ki se uporablja predvsem za določanje kemijskih konformacij komponent. Z njeno pomočjo lahko ločimo kokristale od soli, ko je v vodikovi vezi udeležena karboksilna skupina (24,37).

Jedrski magnetna resonanca v trdnem stanju (ssNMR) je metoda komplementarna rentgenski difrakciji, ki se pogosto uporablja za vrednotenje trdnih snovi, ki jih ne moremo testirati z SXR. NMR visoke ločljivosti se je izkazal za zelo uporabno orodje za karakterizacijo kokristalov, saj nam omogoča ločevanje polimorfov in vpogled v

interakcije v kokristalu glede na kemijske premike. Z NMR lahko bolje ocenimo atomsko okolje, posebno protone, v primerjavi s SXR. Poleg ločevanja med ionskimi in neionskimi vezmi lahko s pomočjo kemijskih premikov ovrednotimo tudi CH- π interakcije (61,12).

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je najbolj razširjena tehnika testiranja termičnih lastnosti kokristalov. Uporablja se za določanje temperature tališča, poleg tega pa lahko opazujemo tudi druge termične posebnosti, kot je entalpija taljenja. V DSC krivuljah po nastanku kokristala ponavadi vidimo eno samo temperaturo tališča, ki se razlikuje od temperatur tališča izhodnih komponent. DSC analiza se uporablja tudi za preiskavo termičnih lastnosti vmesnih faz v postopku izdelave kokristalov. Poleg uporabe za vrednotenje kokristalov, se pogosto uporablja tudi kot metoda za hitro preiskavo tvorbe kokristalov (24,37).

Vrstična elektronska mikroskopija (SEM) je tehnika, pri kateri z elektronskim mikroskopom slikamo vzorec tako, da ga obsevamo z žarkom visoko energijskih elektronov. Tako pridobimo informacijo o topografiji površine. Uporablja se tudi za določanje velikosti delcev.

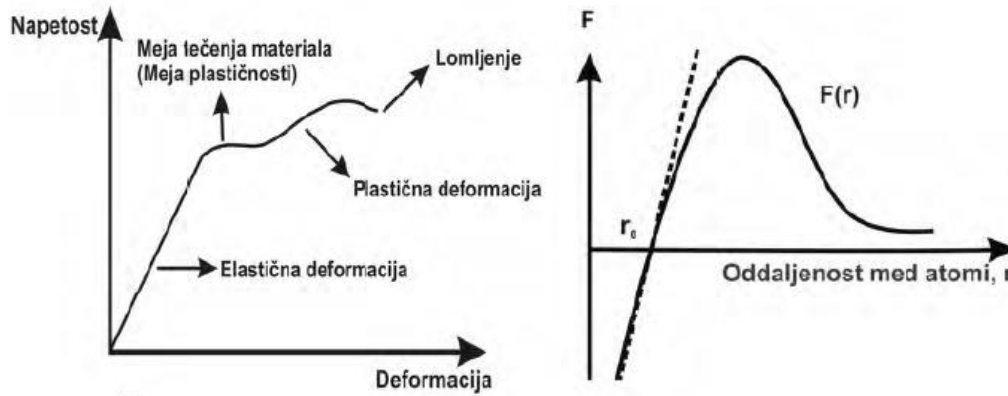
Teraherčna spektroskopija (angl.: tetraherz time-domain-spectroscopy) predstavlja alternativno metodo praškovni rentgenski difrakciji. Omogoča nam, da ločimo med kiralnimi in racemnimi zmesmi kokristalov z vodikovo vezjo.

Pomembno se je zavedati, da z eno samo tehniko ne moremo popolnoma določiti lastnosti kokristala. Da bi bolje razumeli strukturo posameznih kokristalov zato kombiniramo različne tehnike

1.6 VREDNOTENJE POVRŠINSKIH IN MEHANSKIH LASTNOSTI SNOVI NA NIVOJU POSAMEZNEGA KRISTALA

Obnašanje farmacevtskih materialov v procesih mešanja, mletja, suhega in vlažnega granuliranja ter tabletiranja je predvsem odvisno od načina njihove deformacije oziroma njihovih mehanskih lastnosti. Mehanske lastnosti definirajo obnašanje materialov pri obremenjevanju, pri čemer se najpogosteje spremeni njihova oblika, prostornina ter lega.

Mehanske oziroma deformacijske lastnosti snovi so opredeljene kot elastičnost, plastičnost in lomljenje (fragmentacija) (slika 4 levo). Pri začetnem obremenjevanju se materiali deformirajo elastično (prožno), kar pomeni, da deformacija materiala narašča linearno s povečanjem obremenitve. Takšna sprememba je reverzibilna in material se po razbremenjevanju povrne v svojo izhodiščno lego (62).



Slika 4: Krivulja napetost/deformacija levo in krivulja odnosa med silo (F) in oddaljenostjo med atomi (r) desno. Strmina krivulje F-r pri ravnovesni legi r_0 predstavlja Youngov modul.

Elastična deformacija snovi izvira iz narave medatomskih sil. Posledično se pri zelo majhnih napetostih atomi le minimalno premaknejo iz svojega ravnotežnega položaja in je napetost linearno sorazmerna odmiku, tam torej velja Hook-ov zakon (slika 4 desno)(63). Hook-ov zakon podaja raztezek ali skrček prožnega telesa ($\Delta L/L$) pri deformaciji (raztezanje, stiskanje) z dano obremenitvijo (F/S).

$$\frac{F}{S} = E \frac{\Delta L}{L},$$

kjer sorazmernosti koeficient predstavlja Young-ov (prožnostni) modul (E).

Young-ov modul je intrinzična lastnost materiala, ki nam opiše tendenco snovi k elastični (reverzibilni) deformaciji oziroma je merilo togosti materiala.

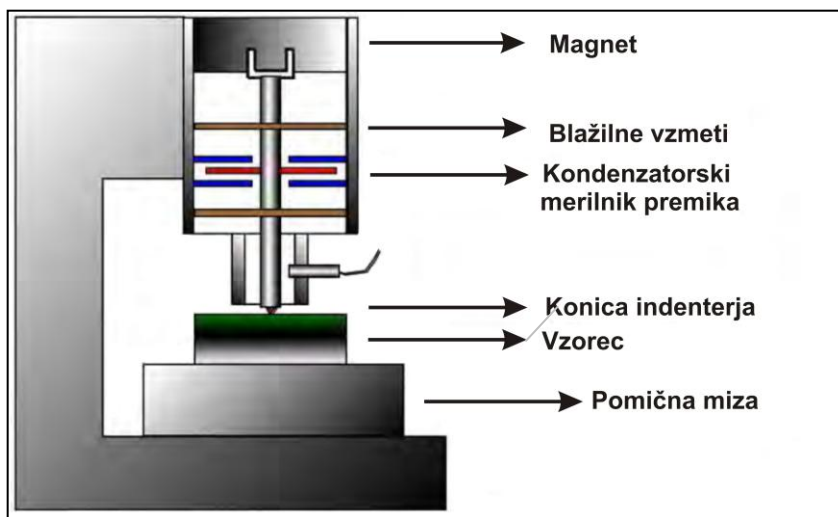
Kadar naraščajoča obremenitev postane močnejša od intermolekularnih sil v delcu, je meja tečenja materiala (angl.: yield stress) presežena in pride do ireverzibilne plastične deformacije. Odpornost materiala proti zunanjim mehanskim vplivom, ki trajno spremenijo njegovo površino, predstavlja trdnost. To je kompleksna lastnost snovi povezana z intrinzičnimi značilnostmi materiala, kot je moč medatomskih vezi, hkrati pa je tudi povezana z zunanjimi dejavniki, kot so nečistote v snovi, dislokacije in razpoke. Ob nadaljnjem povečanju obremenitve se pojavi lomljenje (fragmentacija) snovi. Ko presežemo mejo tečenja, se potek deformacijskih mehanizmov lahko razlikuje tudi v odvisnosti od tendence materiala k raztegovanju ali lomljenju. Na osnovi tega materiale razvrstimo kot žilave (angl.: ductile) in krhke (angl.: brittle).

Nanomehanika je veda o proučevanju lastnosti materialov s pomočjo sil v nN ter deformacij v nm. Osnovni napravi s katerima je možno proučevati lastnosti materialov v nanometrskem območju sta nanoindenter oziroma naprava za zaznavanje globine vtisa ter mikroskop na atomsko silo (AFM). Omenjeni napravi omogočata tudi merjenje mehanskih

lastnosti farmacevtskih materialov s pomočjo tehnike nanoindentacije na nivoju posameznega delca oziroma kristala. Določanje mehanskih lastnosti na nivoju delcev ima pred določanjem na nivoju prahov (klasičen način) tako prednosti kot slabosti. Na nivoju delcev je potrebno izvesti veliko število meritev, da pridobimo zanesljive podatke. Zaželene so primerno gladke površine preiskovanih snovi, saj mehanske lastnosti merimo s konicami nanometrskih dimenzij. Poleg tega je za rezultate meritev na nivoju delcev značilno veliko sipanje podatkov, ki je posledica heterogenosti materialov na nano nivoju. Prednost je, da lahko na nivoju delcev opazujemo različne faze odziva snovi na zunanjo obremenitev od elastične deformacije, pri nizkih obremenitvah, preko plastične deformacije do končne fragmentacije (64).

1.6.1 INSTRUMENTALNA NANOINDENTACIJA

Nanoindenter je naprava, s katero je na osnovi kontroliranega vtiskavanja diamantne konice mogoče določiti mehanske lastnosti različnih vrst materialov, kot so na primer jekla, kovinske zlitine, keramika, biološki materiali, polimeri itd. Shema instrumenta je prikazana na sliki 5.

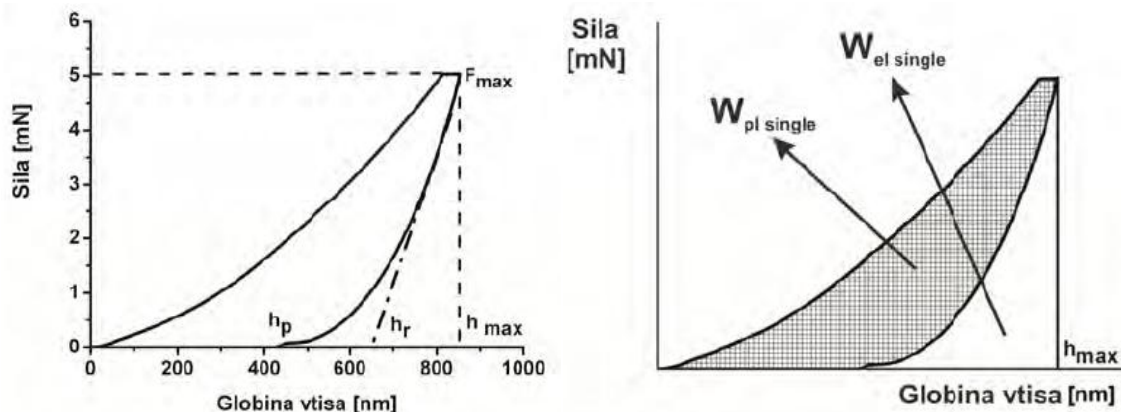


Slika5: Shematičen prikaz nanoindenterja.

Princip delovanja temelji na kontrolirani elektromagnetni obremenitvi konice, ki jo dovajamo proti vzorcu s pomočjo magneta in navitja nad nanoindenterjem. To nam omogoča natančen nadzor obremenitve in merjenje sile v merilnem območju od 10 nN do 10 N.

Ko dosežemo maksimalno silo, konico odmaknemo. Med ciklom (obremenjevanja - *loading* in razbremenjevanja - *unloading*) se zapisujejo podatki o globini in sili konice. Rezultat je krivulja, ki prikazuje odvisnost globine vtisa od uporabljene obremenitve (slika

6 levo). Obremenitveni del krivulje opisuje odpornost vzorca proti prodiranju konice v material in posledično izraža elastične in plastične lastnosti preizkušane materiala. Na drugi strani, pa razbremenitveni del krivulje vsebuje podatke o elastični relaksaciji vtisa (Slika 6 desno) (66).



Slika 6: Krivulja odvisnosti globine vtisa od sile levo (65) in deformacijske energije pri deformaciji vzorca z vtiskavanjem (66). Pomembni parametri so F_{max} – maksimalna sila stiskanja, h_{max} – maksimalna globina vtisa, h_p – globina vtisa po razbremenitvi, h_r – globina vtisa, ki odgovarja tangenti strmine razbremenitvene krivulje, $W_{el\ single}$ – energija elastične deformacije, $W_{pl\ single}$ – energija plastične deformacije.

1.6.2 ANALIZA KRIVULJE SILA/GLOBINA VTISA

Analiza temelji na predpostavki, da se površina pod konico deformira delno elastično in delno plastično. Na podlagi krivulj sila/globina vtisa in z upoštevanjem geometrije konice lahko izračunamo vtisno trdnost (H), Young-ov modul (E) na osnovi Oliver-Pharr-ove teorije in elastično (W_{el}) ter plastično energijo (W_{pl}) vzorca.

Osnovo *Oliver-Pharr*-ovega modela (67,68) je postavil *Sneddon*, ki je prvi izračunal zvezo med silo (F), globino (h) in površino vtisa ob stiku polneskončno elastične površine ter toge konice različnih geometrij (69):

$$F = \alpha(h - h_p)^m \quad \text{enačba 2}$$

kjer sta:

α - konstanta, ki je odvisna od vrste materiala,

m - konstanta, ki je odvisna od geometrije konice ($m = 1$ (ravni pečati); $m = 1.5$ (kroglasta in paraboloidna konica); $m = 2$ (stožčasta konica))

Za določitev vtisne trdote (H) in Young-ovega modula (E) potrebujemo togost (S) in projekcijo površine kontakta med konico in vzorcem (A_p).

S predstavlja začetek strmine razbremenitvene krivulje (slika 6 levo), ki jo lahko predstavimo z *enačbo 3*.

Stik med konico in vzorcem lahko v tem primeru modeliramo kot kontakt med popolnoma togo konico in izotropno snovjo z reduciranim elastičnim modulom E_r .

$$S = \frac{2}{\pi} E_r \sqrt{A_p} \quad \text{enačba 3}$$

A_p je projekcija površine stika pri maksimalni sili, ki jo opisuje funkcija oblike konice $A_p = f(h_c)$. Ta za Berkovich-ev indenter znaša $23.96 h_c^2$.

Globino kontakta konice in vzorca pri maksimalni sili (h_c) dobimo kot:

$$h_c = h_{max} - \varepsilon_k (h_{max} - h_r) \quad \text{enačba 4}$$

Young-ov modul preiskovanega materiala (E), lahko torej izračunamo z upoštevanjem Young-ovega modula (E_i) in Poisson-ovega števila diamantne konice (ν_i) (Enačba 5):

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1-\nu_i^2}{E_i} + \frac{1-\nu^2}{E} \quad \text{enačba 5}$$

H predstavlja kvocient F_{max} in A_p in je merilo odpornosti materiala proti plastični deformaciji. Vtisna trdota je lahko opredeljena tudi kot odpornost materiala proti vdoru drugega telesa.

$$H = \frac{F_{max}}{A_p} \quad \text{enačba 6}$$

Deformacijsko delo (W), kot vsoto elastičnega ($W_{el \text{ single}}$) in plastičnega ($W_{pl \text{ single}}$) prispevka, dobimo z integriranjem krivulje sile v odvisnosti od globine vtisa. Površina med obremenitveno in razbremenitveno krivuljo pomeni energijo plastične deformacije, energija elastične relaksacije pa odgovarja površini pod razbremenitveno krivuljo (slika 6 desno) (70).

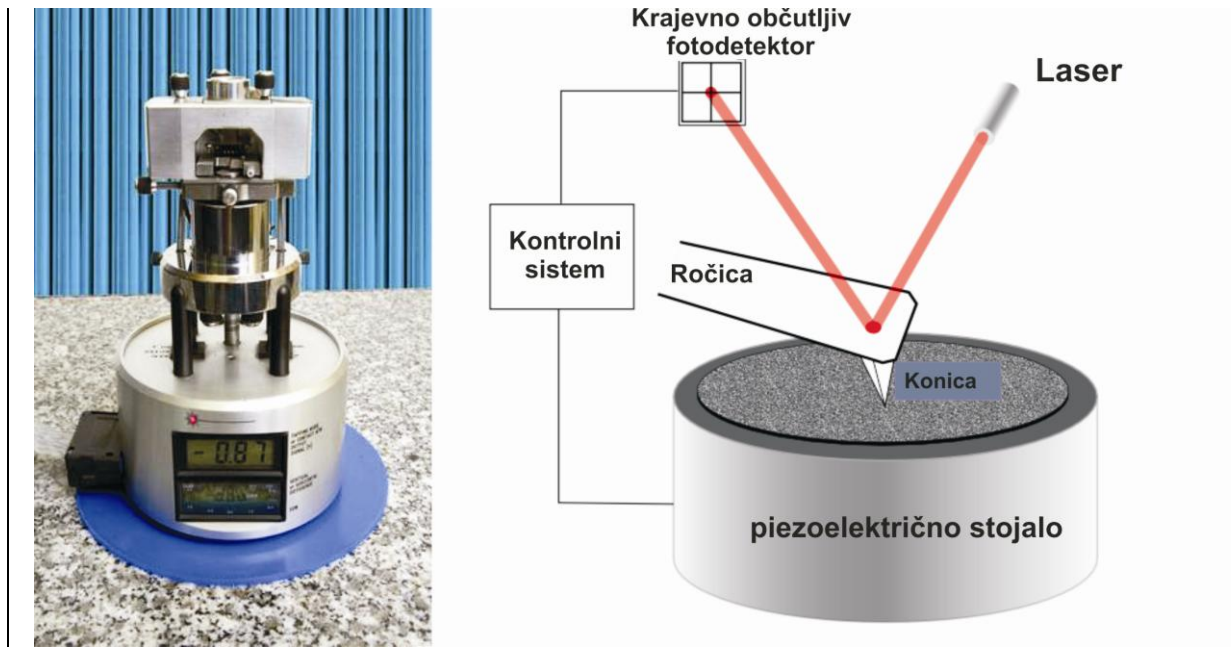
Kontinuirano merjenje togosti (Continuous stiffness measurement - CSM)

CSM tehnika je ena izmed izboljšav klasičnega postopka nanoindentacije. Pri tej tehniki kontinuirano merimo globino, medtem ko vzorec obremenjujemo z manjšim dinamičnim nihanjem signala sile ter merimo fazni zamik pri vsaki določeni globini vtisa. (najpogosteje na vsaka 2 nm) (71). Tako lahko, s pomočjo CSM tehnike, določamo Young-ov modul ter vtisno trdnost iz krivulje obremenjevanja in kot funkcijo globine vtisa.

Opisana tehnika nam ponuja kar nekaj prednosti. Z njo lahko kontinuirano spremljamo mehanske lastnosti kot funkcijo globine, kar je pomembno pri analizi heterogenih vzorcev. Ker osnovne količine mehanskih lastnosti pridobimo iz krivulje obremenjevanja, je čas analize značilno skrajšan. Omogoča nam tudi zelo natančno določitev točke kontakta konice indenterja s površino vzorca, kar je pomemben korak pri analizi večine podatkov pridobljenih z nanoindentacijo.

1.6.3 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO (ATOMIC FORCE MICROSCOPY –AFM)

Mikroskopija na atomsko silo je metoda, ki omogoča opazovanje prevodnih in neprevodnih površin z visoko nanometrsko ločljivostjo. Inštrument so razvili leta 1985. Princip delovanja AFM temelji na merjenju sile med ostro konico in preiskovano površino. Konica tipala je pritrjena na občutljivi gibljivi ročici, ki se upogne, če nanjo deluje sila. Na tipalo svetimo z lasersko svetlobo. Upogib tipala in silo na tipalo merimo na podlagi premika odbite laserske svetlobe na krajevno občutljivem fotodetektorju (slika 7).



Slika 7: Fotografija mikroskopa na atomsko silo (Nanoscope IIIa, Bruker, USA) levo in shematični prikaz zgradbe mikroskopa desno. Najpomembnejši del mikroskopa predstavlja AFM tipalo, ki ga sestavljata ročica (angl.: *cantilever*) in konica (angl.: *tip*). Princip delovanja mikroskopa temelji na merjenju odmika tipala, ki ga po površini vzorca premikamo. Odmik tipala je posledica delovanja različnih sil med površino vzorca in vrhom konice. Lasersko svetlobo, ki se odbije od tipala detektiramo s krajevno občutljivim fotodetektorjem. Povratna zanka med fotodiodo in piezoelektričnim vodilom zagotavlja vzdrževanje konstantne sile, amplitude ali faze nihanja v ravnovesni legi v odvisnosti od načina snemanja.

Velikost sile, ki jo lahko izmerimo, je odvisna od elastične konstante vzmeti in od razdalje med konico tipala in površino vzorca. Poznamo tri načine snemanja topografije vzorca in sicer kontaktni (angl. *contact mode*), tipalni (angl. *tapping mode*) in nekontaktni način (angl. *non-contact mode*). (72)

Pri **kontaktnem načinu** je konica nenehno v stiku s površino vzorca in nanj ponavadi deluje s konstantno silo. Konica med delovanjem drsi po površini in sledi topografiji vzorca. Prednost tega načina je večja hitrost snemanja površin neobčutljivih vzorcev.

V **tipalnem načinu** konica tipala oscilira z lastno resonančno frekvenco. V določenem delu cikla se dotakne površine vzorca, kar povzroči zmanjšanje amplitude nihanja. Zmanjšanje amplitude nam zagotavlja ohranjanje konstantne razdalje med konico tipala in

površino vzorca. Ta način omogoča visoko ločljivost vizualizacije bolj občutljivih vzorcev (primerna je tudi za biološke vzorce), saj praktično ne poškoduje površine, lahko pa jo elastično deformira. V primerjavi s kontaktnim načinom je počasnejša, saj moramo snemati z manjšo hitrostjo.

V primeru **nekontaktnega načina** konica niha nad površino vzorca (1-10 nm) z majhno amplitudo in določeno lastno frekvenco, tako da med njima prevladujejo daljnosežne sile, kot so Van der Waalove, kapilarne in elektrostatske.

1.7 VREDNOTENJE MEHANSKIH LASTNOSTI SNOVI NA NIVOJU PRAHOV (BULK)

Kompresibilnost predstavlja stopnjo zmanjšanja volumna prahov pod vplivom sile. Stiskanje prahov lahko opišemo kot zaporedje več procesov. V prvi fazi se delci prerazporedijo znotraj matične vdolbine, kar ima za posledico zmanjšanje poroznosti. Zmanjšanje volumna ter povečanje trenja med delci pri nadaljnjem povečevanju sile bo zmanjšalo stopnjo prerazporejanja (73). V drugi fazi (faza deformacije) je zmanjšanje volumna tablet povezano s spremembo velikosti/oblike osnovnih delcev. V fazi deformacije lahko delci spremenijo svojo obliko zaradi elastične (reverzibilne), plastične (ireverzibilne) deformacije ali fragmentacije. Delci, ki nastanejo po fragmentaciji se lahko ponovno prerazporejajo in deformirajo (74).

Najpogostejša načina ocenjevanja stisljivosti farmacevtskih materialov sta:

- vrednotenje tablet po izmetu iz matične vdolbine: porazdelitev velikosti por, specifična površina
- vrednotenje cikla kompresije in dekompresije: zmanjšanje volumna pri določeni zunanji obremenitvi

Obstaja več matematičnih modelov, ki opisujejo proces stiskanja prahov, kot so Heckel-ov (75), Walker-jev (76), Kawakita –Ludde-jev (77) in Celik-ov (78) model. Večina modelov temelji na odvisnosti spremembe volumna prahov od tlaka stiskanja. Normalizacija volumna temelji na začetnem nasipnem volumnu ali pravi gostoti prahov. Walker-jev model temelji na predpostavki, da je velikost spremembe tlaka (dP) glede na spremembo volumna (dV) sorazmerna tlaku (P), kar predstavlja enačba 7:

$$\frac{dP}{dV} = l \cdot P \quad \text{enačba 7}$$

Z integriranjem in logaritmiranjem lahko enačbo spremenimo v naslednjo obliko:

$$\log P = -L \cdot \frac{V'}{V_0} + C_1 \quad \text{enačba 8}$$

Vo predstavlja volumen pri ničti poroznosti, V'/V_0 (relativni volumen) = $V = 1/D$, L pa je stisljivostni modul.

Walker-jevo enačbo lahko predstavimo v končni obliki kot:

$$100 \cdot V = -W \cdot \log(P) + V_{sp} \quad \text{enačba 9}$$

Walker-jev koeficient (W) opisuje spremembo volumna prahov v odstotkih pri povečanju tlaka za faktor 10 in je merilo ireverzibilne (plastične) deformacije materialov. V_{sp} predstavlja specifični volumen pri tlaku 1MPa.

Višje vrednosti W kažejo na večjo plastičnost in boljšo kompresibilnost materialov.

1.8 FLUKONAZOL

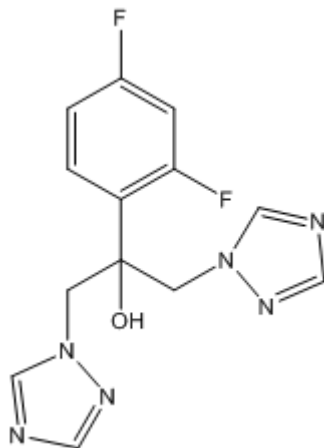
1.8.1 DELOVANJE IN UPORABA

Flukonazol spada v skupino sintetičnih antimikotikov in sicer v skupino triazolov. Triazoli inhibirajo glivični encim citokrom P450 3A (lanozin 14-*o*-demetilazo), ki je odgovorna za pretvorbo lanosterola v ergosterol. Veže se na hemsko skupino lanosterol 14-*o*-demetilaze in s tem prepreči oksidativno demetilacijo lanosterola v ergosterol. Ergosterol je glavni sterol v celični steni glive. Zaradi pomanjkanja ergosterola pride do sprememb v stabilnosti membrane in aktivnosti membranskih encimov. To sproži verižno reakcijo, ki na koncu privede do inhibicije replikacije (79).

Uporablja se v terapiji orofaringealne, ezofagealne in vulvovaginalne kandidoze ter pri terapiji ostalih resnih sistemskih okužb s kandido. Učinkovino se uporablja tudi pri zdravljenju meningitisa, ki ga povzroča *Cryptococcus neoformans*. Poleg tega se flukonazol uporablja tudi kot preventiva pred kompliciranimi glivičnimi okužbami pri bolnikih okuženih s humanim virusom zmanjšane imunske odpornosti (HIV) in pri ostalih bolnikih, ki imajo oslabiljen imunski sistem (bolniki z rakom, po presaditvah kostnega mozga,...) (80).

1.8.2 OSNOVNI PODATKI

Strukturna formula:



IUPAC poimenovanje: 2-(2,4-difluorofenil)-1,3-di(1H-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol.

Molekulska formula: $C_{13}H_{12}F_2N_6O$.

Molska masa: $306,3\text{g mol}^{-1}$

Opis: Flukonazol je bela kristalna snov. Lahko topen je v metanolu, topen v etanolu in acetonu, težko topen v vodi in toluenu ter zelo težko topen v heksanu. Je zelo šibka baza s pKa vrednostjo 1,76 pri 24°C in je posledično nedvomno neprotoniran pri pH vrednostih, višjih od 3,5.

Topnost v vodi: 8g/L (pri 37°C)

Tališče: okoli 140°C odvisno od polimorfne modifikacije

Log P: 0,5.

Farmakokinetične lastnosti: Flukonazol ima dobre farmakokinetične lastnosti. Učinkovina se hitro in skoraj popolnoma absorbira iz gastrointestinalnega trakta in je zato primerna tako za intravensko kot tudi peroralno aplikacijo. Po aplikaciji doseže visoke koncentracije v cerebrospinalni in očesni tekočini, zato ga kot učinkovino prvega izbora uporabljamo pri večini vrst glivičnega meningitisa. Fungicidne koncentracije so dosežene tudi v vaginalnem tkivu, slini, koži in nohtih. Razpolovna doba je po literaturnih podatkih 25 ur. 90% se ga izloči nespremenjenega v urin, 10% pa z blatom.

Viri: (81,79)

1.8.3 KOKRISTALI FLUKONAZOLA

Flukonazol je v vodi slabo topna učinkovina, ki se na tržišču pojavlja večinoma v obliki kapsul in tablet. Za izboljšanje hitrosti raztapljanja in s tem lokalne in sistemske učinkovitosti so bile uporabljene različne metode: izolacija novih polimorfov in solvatov

(82), granuliranje s pomožnimi snovmi, ki dajo granulam hidrofilni značaj (83), priprava trdnih disperzij (84) in priprava orodisperzibilnih farmacevtskih oblik (85).

Glede na to, da flukonazol spada v skupino šibkih baz, je priprava soli omejena na uporabo močnih kislin, ki pa v večini primerov niso sprejemljive v pripravkih za farmacevtsko uporabo. Zato so raziskovalci začeli preiskovati možnost nastanka kokristalov. S pripravo kokristalov flukonazola s karboksilnimi kislinami, kot tvorilci kokristala, so se ukvarjali predvsem Kastelic in sodelavci (87). Kot spojine za tvorbo kokristalov so uporabili različne dikarboksilne kisline, saj se povezuje med dušikovim heterociklom in karboksilno skupino pogosto pojavlja v kokristalih. Poleg tega so dikarboksilne kisline dobro topne v vodi in bi potencialno lahko pripomogle k izboljšanju raztapljanja flukonazola. Z uporabo različnih topil in ustreznim nadzorom pogojev odparevanja so uspeli pripraviti tri kokristale in sicer: flukonazol : maleinska kislina (1:3), flukonazol : fumarna kislina (2:1) in flukonazol : glutarna kislina (1:1). Tem kokristalom so tudi določili zgradbo na podlagi DSC, IR, NMR v trdnem, PXRD in SXR. Z metodo rentgenske difrakcije na monokristalih (SXR) so pridobili podatke o interakcijah znotraj kristalov. Ugotovili so, da je kokristal z maleinsko kislino dejansko kokristal soli, saj je prišlo do izmenjave protonov med flukonazolom in maleinsko kislino. Vsaka molekula flukonazola je sprejela dva protona od dveh molekul maleinske kisline (87). Z metodo mletja z dodatkom topila je bilo pripravljenih še nekaj dodatnih kokristalov. S to metodo so uspeli pripraviti že prej omenjene kristale s fumarno, glutarno in maleinsko kislino, poleg tega pa še flukonazol:jabolčna kislina 1:1, flukonazol:vinska kislina 1:1, flukonazol:malonska kislina 1:1, flukonazol:salicilna kislina 1:1, pri katerih so poleg določevanja strukture preiskovali tudi raztapljanje v vodi. Ugotovili so, da tvorba kokristalov pripomore k povečanju hitrosti raztapljanja glede na čisto učinkovino, vendar so podoben učinek opazili tudi pri fizikalnih zmesih učinkovine in pomožne snovi (86).

2 NAMEN DELA

Namen naše diplomske naloge je izdelava in proučevanje nastanka in lastnosti kokristalov flukonazola z različnimi fizikalnimi metodami. Kokristale bomo izdelali z metodo mletja z dodatkom topila in z metodo kokristalizacije iz raztopine. Za ugotavljanje nastanka kokristalov bomo uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC). Zaradi hitrosti in enostavnosti je splošno uporabna za reševanje in odkrivanje nastanka novih kokristalov. Pri odkrivanju novih kokristalov je potrebno opraviti še druge teste, ki nam povedo več o strukturi nove kristalne oblike. Glede na to, da so bili vsi kokristali, ki jih bomo izdelovali in proučevali v diplomski nalogi že natančneje raziskani (DCS, SEM, IR, XRPD ali SXRD, NMR) (86,87), bomo s primerjavo naših DSC krivulj z že znanimi DSC krivuljami sklepali na nastanek zelene kokristalne oblike.

V prvem delu se bomo osredotočili na proučevanje hitrosti raztapljanja kokristalov. Kokristale flukonazola s fumarno, glutarno in maleinsko kislino, pripravljene z mletjem, bomo polnili v želatinske kapsule in s HPLC spremljali profile sproščanja. S polnjenjem kapsul želimo zagotoviti enakomerno močenje vzorcev.

Nato se bomo lotili preiskovanja mehanskih lastnosti kokristalov. Te so v primerjavi s fizikalnimi lastnostmi veliko slabše opredeljene in raziskane. Z metodo kokristalizacije iz raztopine bomo poskušali pripraviti kokristale flukonazola z glutarno, maleinsko, fumarno, jabolčno, vinsko, malonsko in salicilno kislino (86). V ta namen bomo preizkusili nekaj različnih topil (etanol, metanol, acetonitril, n-heksan) in zunanjih pogojev (hladilnik, sobna T, počasno odparevanje, hitrejše odparevanje topila). Površino monokristalov pripravljenih iz raztopine bomo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in mikroskopom na atomsko silo (AFM). Njihove mehanske lastnosti bomo vrednotili s pomočjo nanoindenterja, ki nam da podatke o plastičnih in elastičnih lastnostih materiala. Tako pridobljene podatke bomo primerjali z mehanskimi lastnostmi praškastih kokristalov med procesom tabletiranja. Za tabletiranje bomo večje količine kokristalov pripravili z metodo mletja z dodatkom topila.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje spojine:

- flukonazol (Krka, Slovenija)
- fumarna kislina (Merck, Nemčija)
- glutarna kislina (Merck, Nemčija)
- jabolčna kislina (Merck, Nemčija)
- maleinska kislina (Merck, Nemčija)
- malonska kislina (Merck, Nemčija)
- salicilna kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- vinska kislina (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- KH_2PO_4 (Merck, Nemčija)

Topila:

- acetonitril (J.T. Baker, Nizozemska)
- etilacetat (Merck, Nemčija)
- etanol (Merck, Nemčija)
- n-heksan (Merck, Nemčija)
- metanol (Merck, Nemčija)
- prečiščena voda

Laboratorijski pribor:

- steklovina (čase, bučke, merilni valji, epruvete, erlenmajerice)
- pipete
- 70% etanol v pršilki
- filtri Minisart® RC 25 0,45 μm (Sartorius, Nemčija)
- parafilm® M (Pechiney Chicago, USA)
- škarje, ura
- hitro sušeče epoksi lepilo UHU plus sofortfest (Baden, Nemčija)

Aparature uporabljene pri eksperimentalnem delu:

- analitska tehtnica AG 245 (Mettler toledo, Švica)
- tehtnica Alba GH-300
- Vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch, Nemčija
- Naprava za raztapljanje Erweka DT6

- HPLC (Knauer, Nemčija) s črpalko HPLC pump K1001 in UV detektorjem K2501
- Diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1 (Columbus, ZDA) in programska oprema STAR[®] Software v9.30.
- Vrstični elektronski mikroskop (SEM): FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija
- Helijev piknometar AccuPyc 1330, Micrometrics, Norcross, ZDA
- Nanoindenter Agilent G200, ZDA
- Mikroskop na atomsko silo Nanoscope IIIa (Veeco, St. Barbara, ZDA)
- Tabletirka Killian SP300 (Killian, IMA, Cologne, Nemčija)

3.2 METODE IZDELAVE KOKRISTALOV

3.2.1 IZDELAVA KOKRISTALOV Z MLETJEM Z DODATKOM TOPILA



Slika 8: Vibracijski mlin Pulverisette 0, Fritsch.

Kokristale smo izdelali s pomočjo vibracijskega mlina Pulverisette 0 na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani (slika 8). Postopke priprave kokristalov s to metodo je v svoji diplomski nalogi podrobno opisal Karlo Lovrič (86) in so povzeti v Preglednica II. Pri pripravi vseh kokristalov smo najprej z vibracijskim mlinom mleli vsako posamezno komponento 10 min. Nato smo jih v stehiometrijskem razmerju natehtali, prenesli v možnar in rahlo pomešali s pestilom. Omočili smo jih z izbranim topilom za olajšanje tvorbe kokristalov. Na zmes prahov smo nato položili kroglo in vse skupaj mleli predpisani čas, ki je bil eksperimentalno določen. Količine, ki so navedene v tabeli predstavljajo maksimalne količine, ki jih lahko še dovolj učinkovito meljemo v uporabljenem mlinu in smo jih uporabljali tudi mi pri našem eksperimentalnem delu.

Preglednica II: Postopki izdelave kokristalov z mletjem (86).

Kokristal	Uporabljene količine	Topilo	Čas mletja
Flukonazol : glutarna kislina 1:1*	2,0 g (6,53 mmol) + 0,86 g (6,53 mmol)	300 µl n-heksana, 300 µl acetonitrila	35 min
Flukonazol : maleinska kislina 1:3*	1,6 g (5,23 mmol) + 1,82 g (15,7 mmol)	400 µl acetonitrila	35 min
Flukonazol : fumarna kislina 2:1*	2,0 g (6,35 mmol) + 0,38 g (3,26 mmol)	200 µl metanola	80 min
Flukonazol : malonska kislina 1:1*	2,0 g (6,35 mmol) + 0,68 g (6,35 mmol)	Brez topila	35 min**
Flukonazol : salicilna kislina 1:1*	2,0 g (6,35 mmol) + 0,90 g (6,35 mmol)	200 µl acetona	40 min

* Vsi kokristali in monokristali flukonazola, ki se pojavljajo v diplomski nalogi so pripravljene v navedenem stehiometrijskem razmerju. Zaradi preglednosti bomo v nadaljevanju opustili navajanje stehiometrijskega razmerja pri posameznih kokristalih.

** Po mletju nastane evtektik, talina, ki pri sobnih pogojih počasi kristalizira (10 dni).

3.2.2 PRIPRAVA FIZIKALNIH ZMESI

Za pripravo fizikalnih zmesi smo najprej mleli vsako čisto sestavino posebej. Čas mletja smo določili glede na čas mletja pri pripravi kokristalov. Tako smo zagotovili primerljivo velikost delcev v istovrstnem kokristalu in fizikalni zmesi. Nato smo zmlete komponente v stehiometrijskem razmerju nasuli v ahatno terilnico in rahlo mešali s pestilom 10 minut.

3.2.3 PRIPRAVA KOKRISTALOV IZ RAZTOPINE Z METODO ODPAREVANJA TOPILA

Kokristale, ki smo jih pripravili z metodo kokristalizacije iz raztopine z odparevanjem topila, bomo v nadaljnjem besedilu imenovali monokristali. Pripravili smo jih tako, da smo natehtali učinkovino in tvorec kokristala v ustreznem stehiometrijskem razmerju, dodali topilo in raztopine segrevali toliko časa, da sta se obe komponenti raztopili in je odparelo presežno topilo. Bistri raztopini smo dodali nekaj predhodno z mletjem pridobljenih kokristalov (semena), ki so predstavljali nukleacijska jedra in nato pustili topilo počasi odparevati, dokler niso zrasli monokristali ustrezne velikosti in kakovosti.

Kristalizacijo smo izvajali pri različnih pogojih in z različnimi topili. Pripravili smo dva monokristala, ki so jih v članku opisali Kastelic in sodelavci (87), monokristal čistega

flukonazola polimorfne oblike III in še dva nova monokristala. Monokristalov z maleinsko, jabolčno in vinsko kislino nam ni uspelo pripraviti. Monokristal čiste učinkovine smo pripravili, da smo lahko nato rezultate, ki smo jih dobili pri proučevanju posameznih kokristalov direktno primerjali z rezultati pridobljenimi s čisto ZU.

MONOKRISTAL FLUKONAZOL POLIMORFNA OBLIKA III

V manjšo čašo smo natehtali 100 mg flukonazola in ga ob segrevanju raztopili v 2 ml etanola. Segrevali smo na električni plošči toliko časa, da se je raztopila vsa učinkovina in je odparelo presežno topilo. Nato smo raztopino pustili, da se je ohladila na sobno temperaturo. V raztopino smo vsuli manjšo količino uprašenega flukonazola. Čašo smo nato pokrili s parafilmom in tako zagotovili pogoje za počasno odparevanje topila in rast kristalov. Ko so kristali po približno dveh dneh zrasi do primerne velikosti, smo jih pobrali iz raztopine in jih posušili pri sobni temperaturi.

MONOKRISTAL FLUKONAZOL : FUMARNA KISLINA 2:1

V manjšo čašo smo natehtali 140 mg flukonazola in 27 mg fumarne kisline, ter vse skupaj prelili z 2 ml metanola. Raztopino smo nato segrevali pri temperaturi nižji od vrelišča toliko časa, da sta se obe komponenti raztopili in je odparelo presežno topilo. Ko se je raztopina ohladila (hladilnik, sobna T) smo dodali semena. Za sejanje smo uporabili kokristale pripravljene z mletjem in predhodno določeno strukturo (DSC, IR, NMR in XRPD). Nato smo čašo pokrili s parafilmom in pustili topilo počasi odparevati pri sobnih pogojih približno en teden. Ko so kokristali dosegli želeno velikost, smo jih pobrali iz raztopine in posušili pri sobni temperaturi.

MONOKRISTAL FLUKONAZOL : GLUTARNA KISLINA 1:1

V manjšo čašo smo natehtali 100 mg flukonazola in 34 mg glutarne kisline, ter vse skupaj prelili z 1 ml acetonitrila in 2 ml n-heksana. Raztopino smo nato segrevali pri temperaturi nižji od vrelišča toliko časa, da sta se obe komponenti raztopili in je odparelo presežno topilo. Ko se je raztopina ohladila (hladilnik, sobna T) smo dodali semena. Za sejanje smo uporabili kokristale pripravljene z mletjem in predhodno določeno strukturo (DSC, IR, NMR, XRPD). Nato smo čašo pokrili s parafilmom in pustili topilo počasi odparevati pri sobnih pogojih približno en teden. Ko so kokristali dosegli želeno velikost, smo jih pobrali iz raztopine in posušili pri sobni temperaturi.

MONOKRISTAL FLUKONAZOL : SALICILNA KISLINA 1:1

V manjšo čašo smo natehtali 70 mg flukonazola in 32 mg salicilne kisline, ter vse skupaj prelili s 3ml acetonitrila. Raztopino smo nato segrevali pri temperaturi nižji od vrelišča toliko časa, da sta se obe komponenti raztopili in je odparelo presežno topilo. Ko se je raztopina ohladila (hladilnik, sobna T) smo dodali semena. Za sejanje smo uporabili kokristale pripravljene z mletjem in predhodno določeno strukturo (DSC, IR, NMR, XRPD). Nato smo čašo pokrili s parafilmom in pustili topilo počasi odparevati pri sobnih pogojih približno en teden. Ko so kokristali dosegli želeno velikost, smo pustili topilo odpareti do suhega pri sobnih pogojih.

MONOKRISTAL FLUKONAZOL : MALONSKA KISLINA 1:1

V manjšo čašo smo natehtali 70 mg flukonazola in 24 mg malonske kisline, ter vse skupaj prelili z 2 ml acetonitrila. Raztopino smo nato segrevali pri temperaturi nižji od vrelišča toliko časa, da sta se obe komponenti raztopili in je odparelo presežno topilo. Ko se je raztopina ohladila (hladilnik, sobna T) smo dodali semena. Za sejanje smo uporabili kokristale pripravljene z mletjem in predhodno določeno strukturo (DSC, IR, NMR, XRPD). Nato smo čašo pokrili s parafilmom in pustili topilo počasi odparevati pri sobnih pogojih približno 4 dni.

3.3 METODE VREDNOTENJA KOKRISTALOV

3.3.1 TERMIČNA ANALIZA



Slika 9: Diferenčni dinamični kalorimeter DSC1 Mettler-Toledo.

DSC krivulje smo posneli z instrumentom Mettler-Toledo Differential Scanning Calorimeter DSC1 na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Rezultate smo ovrednotili s programsko opremo STAR^e Software v9.30. Meritve so bile izvedene v dušikovi atmosferi. Pretok dušika je znašal 40 mL/min. Hitrost segrevanja je znašala 2 K/min oz. pri nekaterih monokristalih 3 K/min. Aparat smo kalibrirali z indijem.

PREIZKUS RAZTAPLJANJA

Slika 10: Naprava za raztapljanje Erweka DT6.

Raztapljanje smo proučevali po dveh postopkih in sicer z aparaturo z vesli (Apparatus 2) in s košaricami (Apparatus 1) po postopku iz evropske farmakopeje (60). Uporabili smo napravo za raztapljanje Erweka DT6 (slika 10). Za izboljšanje močenja smo praške polnili v kapsule. Pri poskusu z vesli smo kapsule obtežili s tako imenovanimi kovinskimi potapljači (»sinkerji«). Uporaba nekaj spiralnih zavojev žice okrog odmerne enote je dovoljena modifikacija glede na farmakopejo, ki smo jo uporabili, saj so kapsule v nasprotnem primeru plavale na površini medija za raztapljanje.

Poskuse smo izvajali v 900 ml deionizirane vode pri $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Hitrost vrtenja je bila pri obeh uporabljenih metodah enaka in sicer 100 obratov/min. V določenih časovnih intervalih (5, 10, 15, 30, 45, 60 min) smo iz raztopine odvzeli 10 ml vzorca za testiranje. Vzorec smo po odvzemu filtrirali z uporabo membranskih filtrov z velikostjo por $45 \mu\text{m}$ in brez redčenja analizirali s HPLC. Topila nismo nadomeščali, smo pa zmanjšanje volumna upoštevali pri izračunih.

3.3.2 HPLC ANALIZA

Koncentracijo flukonazola v vzorcih, ki smo jih odvzeli pri preizkusu raztapljanja smo analizirali s pomočjo HPLC (Knauer, Nemčija) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Uporabili smo nepolarno kolono X-BridgeTM C18 ($5 \mu\text{m}$; $4,6 \times 150 \text{mm}$). Mobilna faza je bila sestavljena iz 70% 0,05M raztopine kalijevega dihidrogen fosfata (KH_2PO_4), 20% acetonitrila in 10% metanola. Pretok mobilne faze je znašal 1,0 ml/min. Injicirali smo 20 μl vzorca. Ločba je potekala pri 25°C . Flukonazol smo detektirali z UV detektorjem K2501 pri valovni dolžini 261 nm.

Za izdelavo umeritvene krivulje smo pripravili raztopine z znano koncentracijo flukonazola (Krka, Slovenija) v acetonitrilu. Osnovno raztopino smo nato redčili z mešanico topil (70% H₂O, 20% acetonitrila in 10% metanola). Za izdelavo krivulje smo uporabili le odzive redčenih raztopin.

3.3.3 VRSTIČNI ELEKTRONSKI MIKROSKOP - SEM

Morfologijo monokristalov smo analizirali s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM, ang. Scanning Electron Microscope). Monokristale smo prilepili na obojestranski ogljikov lepilni trak (premer 12 mm, Oxon, Oxford Instruments, UK). Slike smo posneli na sistemu Supra 32VP (Zeiss, Nemčija) s pospeševalno napetostjo 0,8 in 1,0 kV ter sekundarnim detektorjem na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

3.3.4 ELEKTRONSKO MIKROSKOPSKE SLIKE – AFM

Slike morfologije kokristalov smo pridobili s tipalnim načinom na mikroskopu na atomsko silo v zraku (Nanoscope IIIa multimode, ZDA) z uporabo E piezoelektričnega vodila. Za ta namen smo uporabili silicij nitridne konice (NTESPA5, Veeco, St. Barbara, Kalifornija, ZDA) s konstanto vzmeti 42 N/m in resonančno frekvenco 256-349 kHz. Hitrost slikanja je bila 1.5 Hz. Pridobljene slike smo shranili v formatu 512x512 piksla.

3.3.5 INSTRUMENTALNA NANOINDENTACIJA

Monokristale smo pred testiranjem prilepili na kovinski nosilec s hitro sušečim epoksi lepilom (UHU plus sofortfest, Baden, Nemčija). Za meritve smo izbrali največje vodoravne površine kristalov, saj imajo te največji vpliv na obnašanje materialov med stiskanjem.

Za testiranje mehanskih lastnosti flukonazola in njegovih kokristalov smo uporabili nanoindenter Agilent G200 (Agilent, ZDA) opremljen z modulom za kontinuirano merjenje togosti (continuous stiffness measurements – CSM) na Naravoslovnotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Za določanje mehanskih lastnosti smo uporabili Berkovich-ev indenter, ki ima obliko tristrane piramide. Preizkuse smo izvajali pri sobni temperaturi. Kot kriterij za nadaljnje izvajanje analize oziroma cikel obremenjevanja (približevanje konice površini vzorca z nastavljenom hitrostjo) smo postavili vrednost termičnega lezenja (angl.: thermal drift) manjšo kot 0.05 nm/s.

Vsi preizkusi so izvedeni v CSM načinu, pri čemer smo kontinuirano spremljali odvisnost E in H od globine vtiskovanja. Hitrost obremenitve in razbremenitve je bila 0,05/s. Pri maksimalni globini vtisa (1000 nm) smo indenter zadržali 10 s preden smo vzorec

razbremenili. S tem smo zmanjšali vpliv časovno odvisne plastične deformacije (lezenje-crip) na elastično relaksacijo v razbremenitveni fazi.

Na vsakem vzorcu smo izvedli najmanj 30 poizkusov. Za obdelavo podatkov smo uporabili Oliver in Pharr-ovo teorijo (67,68).

3.3.6 MERJENJE PRAVE GOSTOTE

Pravo gostoto smo določali kokristalom flukonazola pripravljenim z mletjem in sicer s helijevim piknometrom (AccuPyc 1330, Micrometrics, Norcross, ZDA). Kot rezultat smo uporabili povprečje treh meritev.

3.3.7 TABLETIRANJE



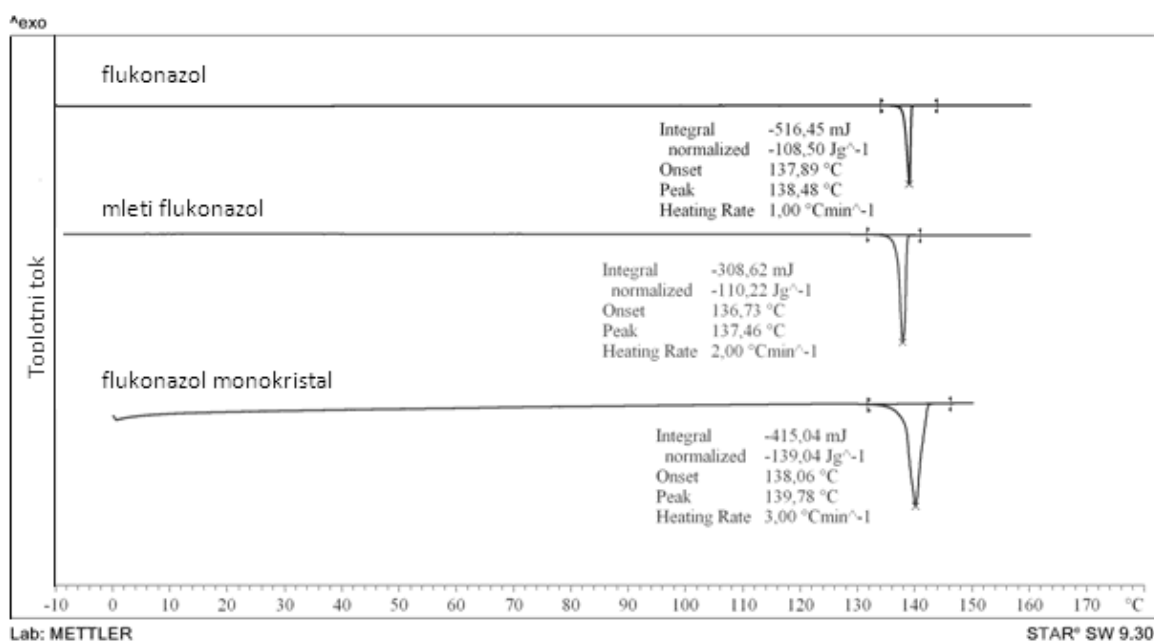
Slika 11: Tabletirka na udarec IMA Killian SP300.

Čisti flukonazol in njegove kokristale, smo stiskali na tabletirki na udarec (IMA, Killian, Nemčija) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Za kristalne zdravilne učinkovine je običajno značilna izrazita elastična relaksacija v dekompresijski fazi, zaradi česar smo izvajali vse poskuse z znotraj matrično metodo (angl.: in die). Pri tabletiranju smo uporabili EURO B ravne pečate premera 12 mm. Uporabili smo sile stiskanja med 125 in 154 MPa, pri katerih smo stisnili le eno tableto. Znotraj matrične vdolbine se hkrati deformira veliko število delcev, zato so povprečne mehanske lastnosti ene tablete relevantne za oceno obnašanja materialov med procesom tabletiranja. Masa posamezne tablete je bila približno 745 ± 1 mg in smo jo določili z analitsko tehtnico AG245 (Mettler Toledo, Švica). Hitrost tabletiranja je bila 25 tablet na minuto.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 TERMIČNA ANALIZA KOKRISTALOV IN POSAMEZNIH KOMPONENT

V diplomski nalogi smo uporabili DSC, kot glavno orodje za preverjanje nastanka kokristalov z mletjem in z metodo kokristalizacije iz raztopine. Samo uporaba te metode sicer ne zadostuje niti za zagotovo potrditev nastanka kokristalov, niti za njihovo karakterizacijo. Podobne odzive kot kokristali nam dajejo tudi evtektične zmesi in soli. Iz primerjave grafov kokristalov in izhodnih komponent lahko sklepamo, ali so vse izhodne komponente reagirale in ali je nastala neka nova struktura.

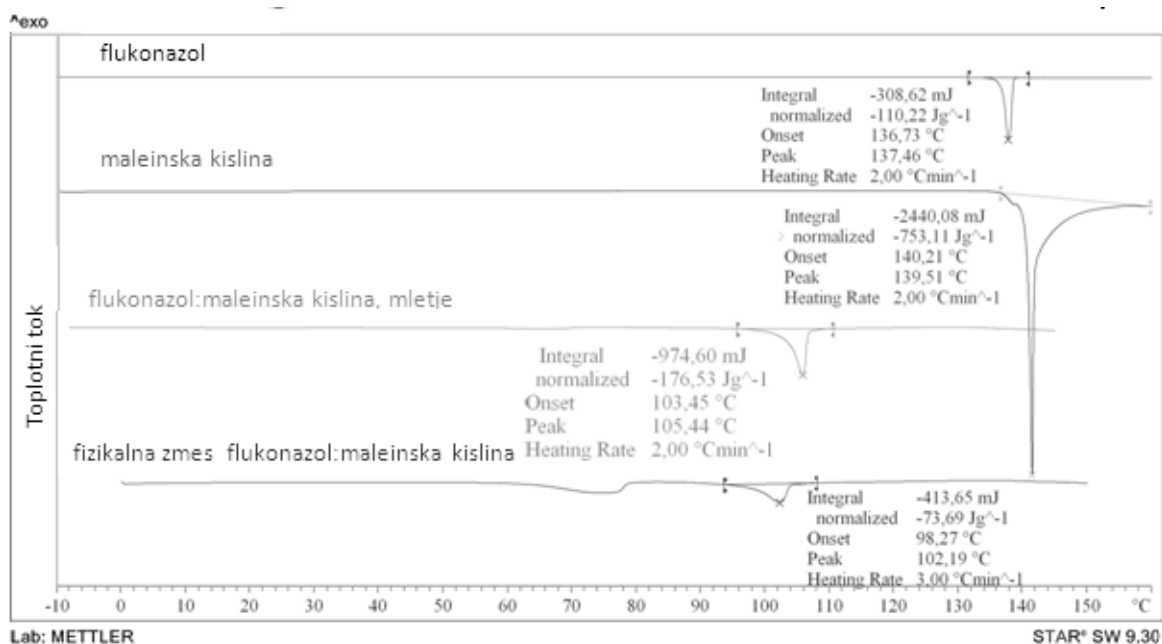


Slika 12: DSC krivulje flukonazola, mletega flukonazola in monokristala flukonazola pridobljenega iz EtOH.

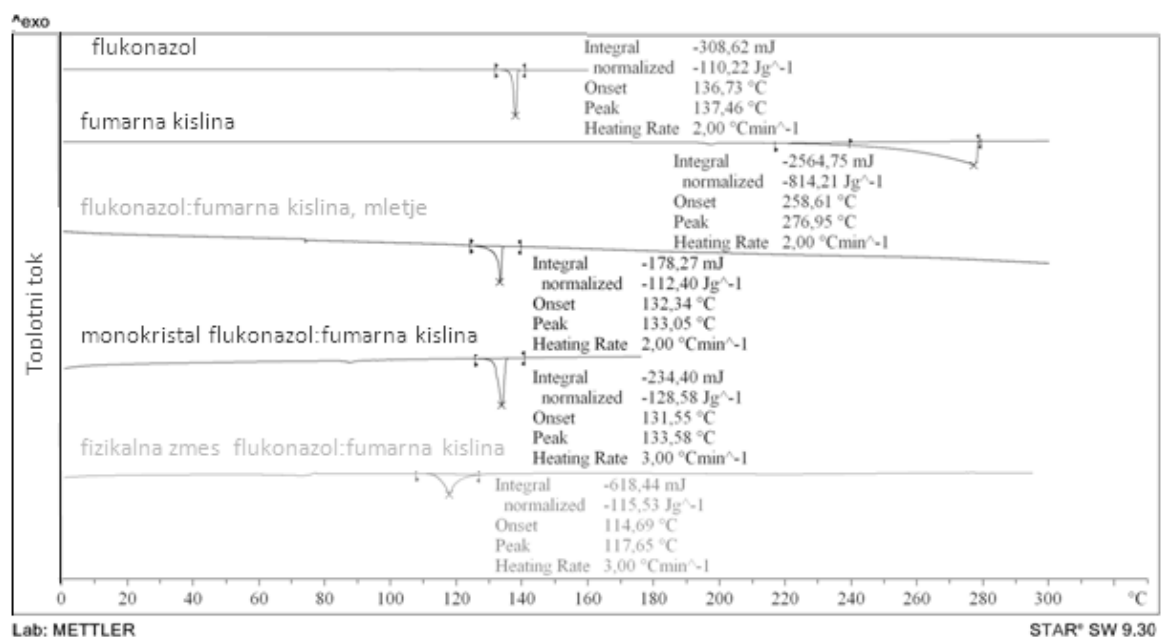
Na sliki 12 so prikazane DSC krivulje izhodnega flukonazola, ki smo ga uporabljali pri izdelavi vseh kokristalov, mletega flukonazola (30 min) in monokristala flukonazola polimorfne oblike III, ki smo ga pridobili z metodo odparevanja topila iz etanola. Vse tri krivulje imajo en izrazit endotermen vrh ki se prične pri 137°C in je značilen za flukonazol. V DSC krivuljah ne opazimo nobenih drugih termičnih dogodkov. Temperatura tališča mlete učinkovine je rahlo nižja od temperature tališča nemlete učinkovine, kar lahko pripišemo zmanjšanju velikosti delcev.

Na sliki 13 so prikazane DSC krivulje izhodnih spojin (flukonazol, maleinska kislina), kokristala flukonazol:maleinska kislina izdelanega z mletjem in fizikalne zmesi. Temperatura tališča našega kokristala (103°C) se rahlo razlikuje od temperature tališča, ki

jo je opisal Karlo Lovrč (106°C), kar je lahko posledica bolj učinkovitega mletja. Iz DSC krivulje fizikalne zmesi lahko sklepamo na tvorbo evtektika, ki se stali pri nižji temperaturi kot kokristal, delno pa nastane kokristal že med shranjevanjem fizikalne zmesi z interakcijami med površinami delcev.

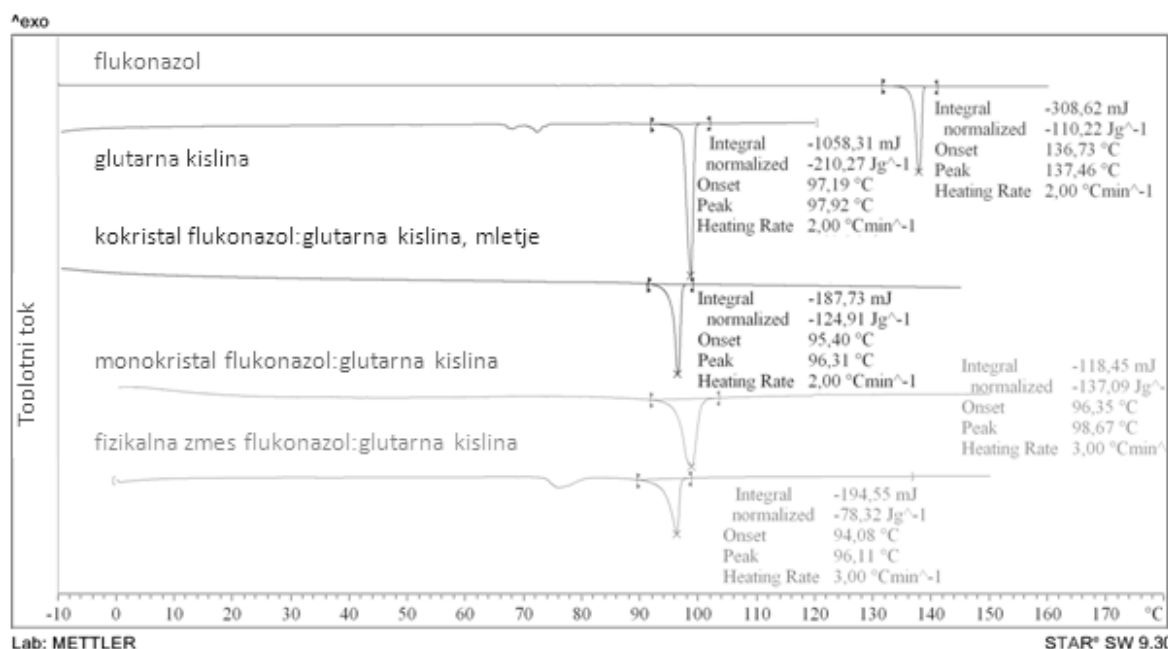


Slika 13: DSC krivulje flukonazola, maleinske kisline, kokristalov flukonazol:maleinska kislina pridobljenih z mletjem in fizikalne zmesi.



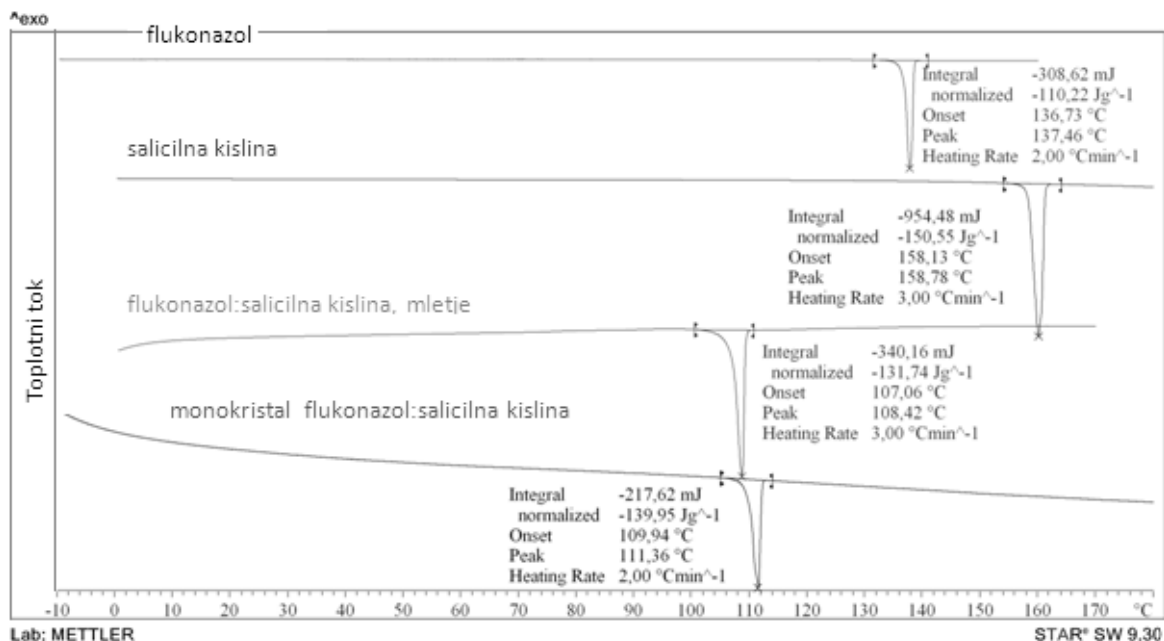
Slika 14: DSC krivulje flukonazola, fumarne kisline, kokristalov flukonazol:fumaric acid pridobljenih z mletjem in iz raztopine ter fizikalne zmesi.

Na sliki 14 so prikazane DSC krivulje flukonazola, fumarne kisline, kokristalov pridobljenih z mletjem in iz raztopine ter fizikalne zmesi. Pri krivuljah kokristalov opazimo en endotermni vrh, ki je primerljiv pri kokristalih pridobljenih po obeh postopkih (132°C) in se pojavi pri temperaturi, ki je nižja od obeh izhodnih komponent. Na DSC krivulji, ki predstavlja fizikalno zmes opazimo le en endotermen vrh pri temperaturi 115°C. To nam nakazuje, da je lahko do določenih sprememb in interakcij med komponentama prišlo že med rahlim mešanjem, med shranjevanjem zmesi oziroma med samo analizo.



Slika 15: DSC krivulje flukonazola, glutarne kisline, kokristalov flukonazol:glutarna kislina pridobljenih z mletjem in iz raztopine ter fizikalne zmesi.

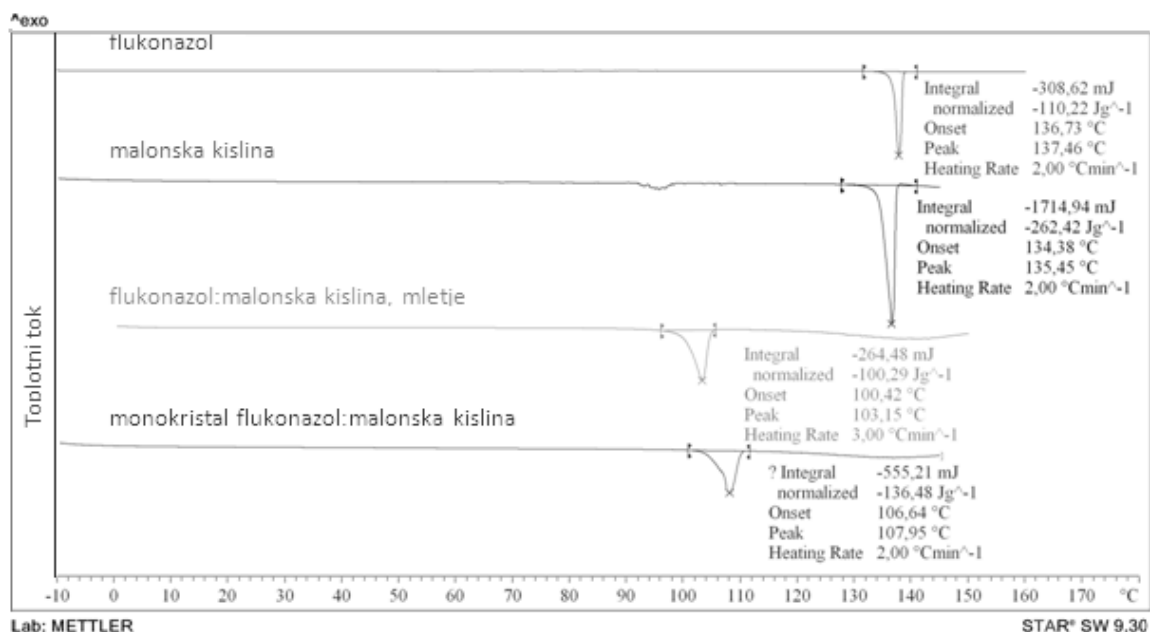
Na sliki 15 vidimo DCS krivulje flukonazola, glutarne kisline, kokristalov flukonazol:glutarna kislina pripravljenih z mletjem z dodatkom topila in iz raztopine ter fizikalne zmesi flukonazola in glutarne kisline. Na vseh krivuljah opazimo en izrazit endotermen vrh. Iz grafa je razvidno, da smo z obema metodama uspeli pridobiti kokristale, saj sta vrhova primerljiva (96°C). Temperatura se sklada tudi z literaturnimi podatki (86). Iz DSC krivulje fizikalne zmesi lahko sklepamo na tvorbo evtektika, ki se stali pri nižji temperaturi kot kokristal, delno pa nastane kokristal že med shranjevanjem fizikalne zmesi z interakcijami med površinami delcev.



Slika 16: DSC krivulje flukonazola, salicilne kisline ter kokristalov flukonazol:salicilna kislina pridobljenih z mletjem in iz raztopine.

Na sliki 16 so prikazane DSC krivulje flukonazola, salicilne kisline ter njihovih kokristalov pridobljenih z mletjem in iz raztopine. Pri teh kokristalih smo proučevali le mehanske lastnosti, zato nismo izdelali fizikalne zmesi. Na vseh krivuljah je viden en izrazit endotermen vrh. Oba kokristala imata primerljivi temperaturi tališča (107 in 110°C), ki sta nižji od temperature tališča obeh izhodnih komponent (137°C flukonazol in 158°C salicilna kislina). Rahlo nižja temperatura (107°C) pri kokristalih pridobljenih z mletjem v primerjavi z temperaturo tališča (110°C) pri kokristalih pridobljenih iz raztopine, lahko pripišemo razliki v velikosti delcev, saj je znano, da se snovi z manjšo velikostjo delcev talijo pri nekoliko nižji temperaturi. Rezultati se ujemajo z literaturnimi podatki (86).

Na sliki 17 so prikazane DSC krivulje flukonazola, malonske kisline, ter njihovih kokristalov pridobljenih z mletjem in iz raztopine. Na vseh krivuljah je viden en izrazit endotermen vrh. Oba kokristala imata primerljivi temperaturi tališča (100°C, 106°C), ki sta nižji od temperatur tališč obeh izhodnih komponent (137°C flukonazol in 134°C malonska kislina). Nekoliko nižja temperatura (100°C) pri kokristalih pridobljenih z mletjem v primerjavi z temperaturo tališča (106°C) pri kokristalih pridobljenih iz raztopine, lahko pripišemo razliki v velikosti delcev.

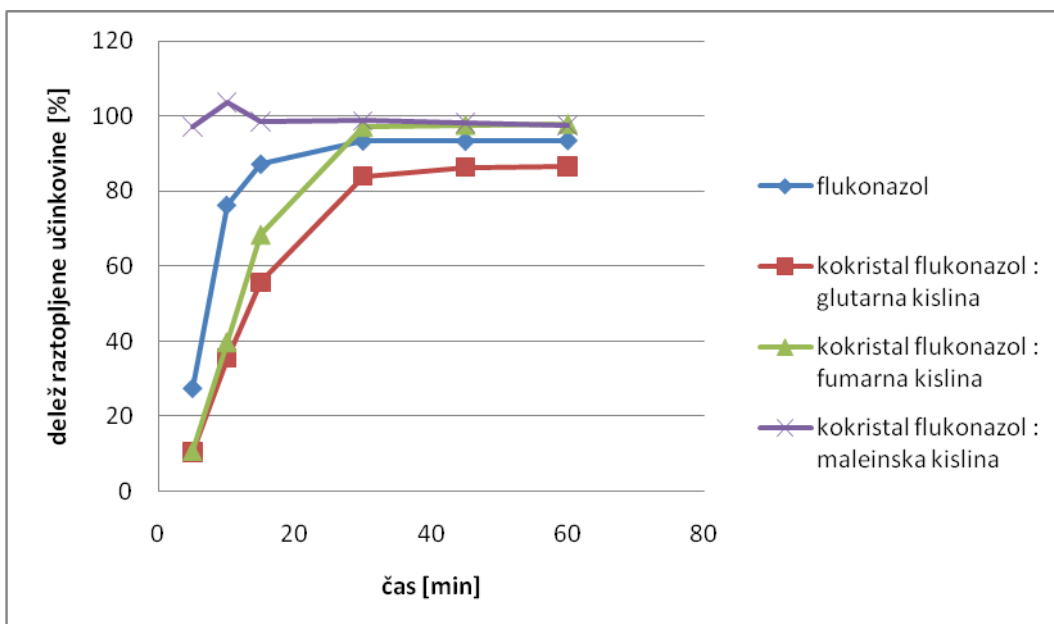


Slika17: DSC krivulje flukonazola, malonske kisline ter kokristalov flukonazol:malonska kislina pridobljenih z mletjem in iz raztopine.

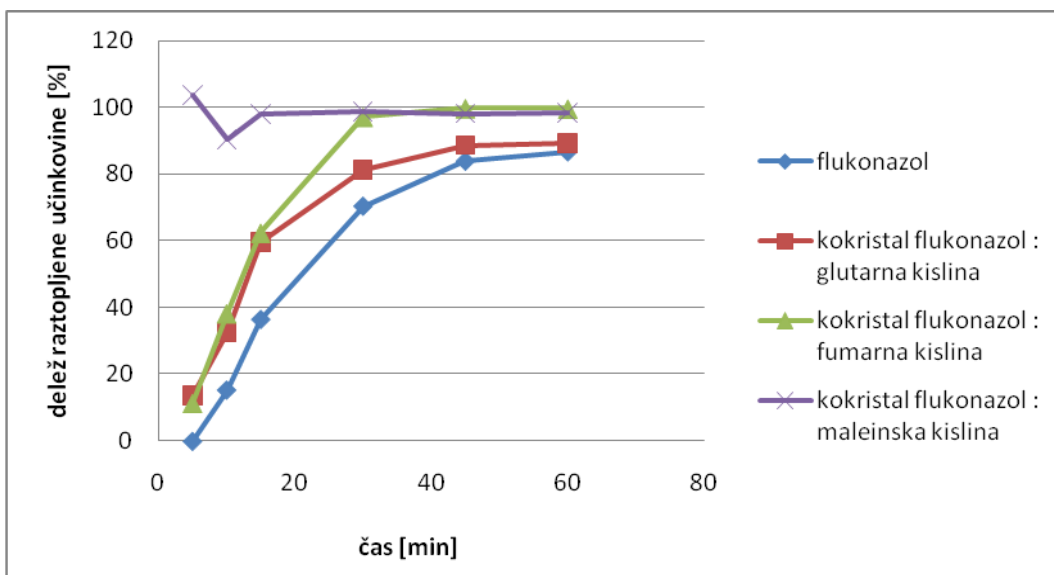
4.2 VREDNOTENJE HITROSTI RAZTAPLJANJA KOKRISTALOV IN FIZIKALNIH ZMESI

Hitrost raztapljanja smo določali kokristalom pripravljenim z mletjem. Primerjali smo hitrost raztapljanja kokristalov flukonazola z glutarno, fumarno in maleinsko kislino s hitrostjo raztapljanja fizikalnih zmesi iste sestave. Poizkus smo izvedli tako, da smo kokristale in fizikalne zmesi polnili v kapsule s ciljem izboljšanja močljivosti. Uporabili smo želatinske kapsule, katerih ovoj se v vodi hitro raztopi.

Kapsule smo raztapljali z aparaturo s košaricami (Apparatus 1) in z aparaturo z vesli (Apparatus 2) in primerjali rezultate med seboj.



Slika 18: Profil raztapljanja kokristalov flukonazola in čistega flukonazola z uporabo metode z vesli v prečiščeni vodi pri $37\pm 0,1^\circ\text{C}$.

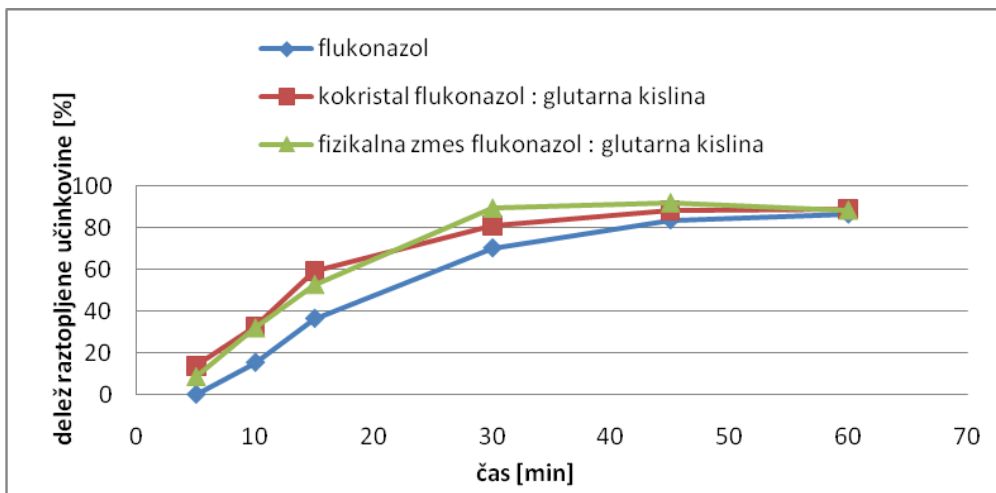


Slika 19: Profil raztapljanja kokristalov flukonazola in čistega flukonazola z uporabo metode s košaricami v prečiščeni vodi pri $37\pm 0,1^\circ\text{C}$.

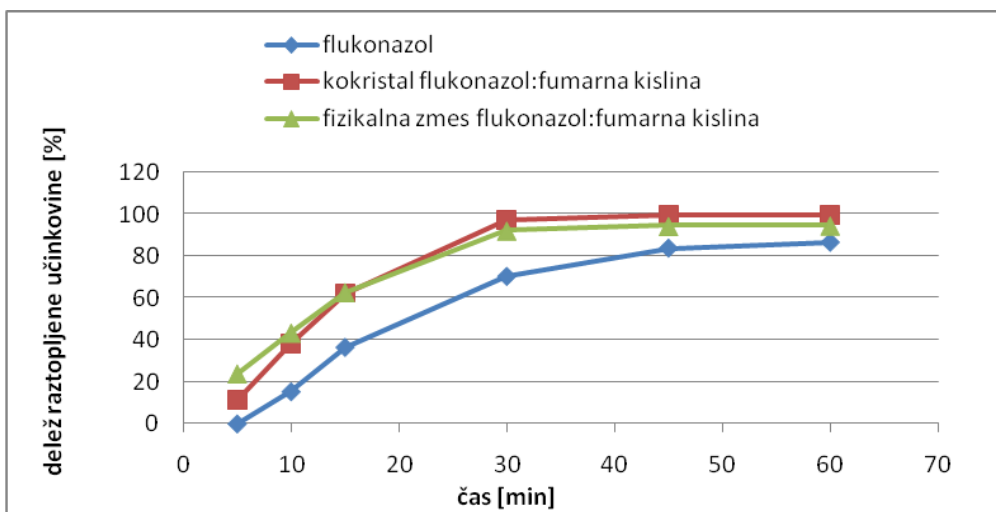
Na slikah 18 in 19 so prikazane krivulje raztapljanja čistega flukonazola in njegovih kokristalov pridobljene z metodo z vesli in košaricami. Iz rezultatov je razvidno, da se najhitreje raztapljajo kokristali z maleinsko kislino, saj že po petih minutah dosežejo vrednosti, ki so blizu 100%. Z uporabo obeh metod dobimo podobne profile raztapljanja za vse kokristale, profila raztapljanja čiste učinkovine pa se med uporabljenima metodama precej razlikujeta. Pri metodi s košaricami se flukonazol raztaplja počasneje od vseh preizkušenih kokristalov, pri metodi z vesli, pa se kokristala z glutarno in fumarno kislino

raztapljata počasneje od čiste učinkovine. Glede na to, da sta obe metodi farmakopejski je presenetljivo, da dajeta ravno za čisto učinkovino tako različne rezultate. Razlike bi lahko pripisali različnim hidrodinamskim pogojem, ki se vzpostavijo v posodi za raztapljanje pri obeh metodah in različno vplivajo na difuzijo molekul čiste učinkovine. Za nadaljnje meritve smo uporabili metodo s košaricami. Oblika košaric je namreč natančno določena, pri metodi z vesli pa smo kapsule ovili z žico («sinker»), ki je mogoče v nekaterih primerih ovirala razpad ovojnice in raztapljanje vsebine.

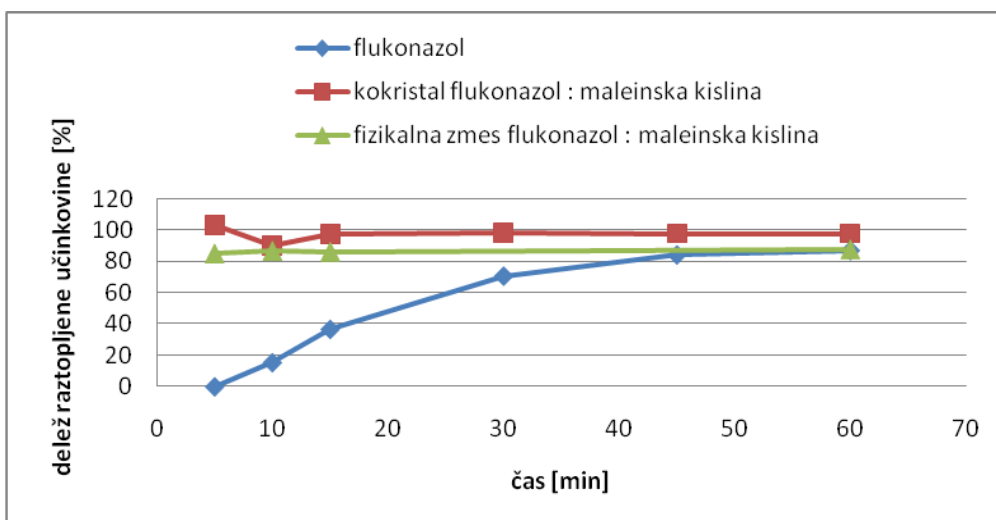
Na slikah 20-22 lahko vidimo primerjave hitrosti raztapljanja med čisto učinkovino, kokristalom in fizikalno zmesjo. Iz slik vidimo, da smo s tvorbo kokristalov v vseh treh primerih povečali hitrost raztapljanja učinkovine. Izboljšanje hitrosti raztapljanja je pogosto glavni razlog izdelave kokristalov. Hitrost raztapljanja se je povečala tudi, ko smo uporabili le fizikalno zmes, kar kaže, da prisotnost molekul dikarboksilnih kislin v raztopini poveča hitrost raztapljanja učinkovine (razlog bi lahko bila lokalna sprememba pH). Kljub temu, da smo ugotovili povečanje hitrosti raztapljanja tudi pri fizikalnih zmesih imajo kokristali lahko industrijsko uporabnost saj ponujajo možnosti za patentno zaščito (1). Pri kokristalih z glutarno in fumarno kislino ne opazimo signifikantnih razlik v hitrostih raztapljanja kokristalov in fizikalnih zmesi. Največje povečanje hitrosti raztapljanja dosežemo s pripravo kokristalov z maleinsko kislino, ker se v tem primeru tvori sol (87). Pri primerjavi profilov raztapljanja pridobljenih z našo metodo in profilov, ki jih je opisal Karlo Lovrić smo ugotovili, da s polnjenjem v kapsule ne dosežemo bistvene spremembe.



Slika 20: Profili raztapljanja čistega flukonazola, kokristala flukonazola z glutarno kislino in fizikalne zmesi flukonazola z glutarno kislino z uporabo metode s košaricami v prečiščeni vodi pri $37\pm 0,1^\circ\text{C}$.



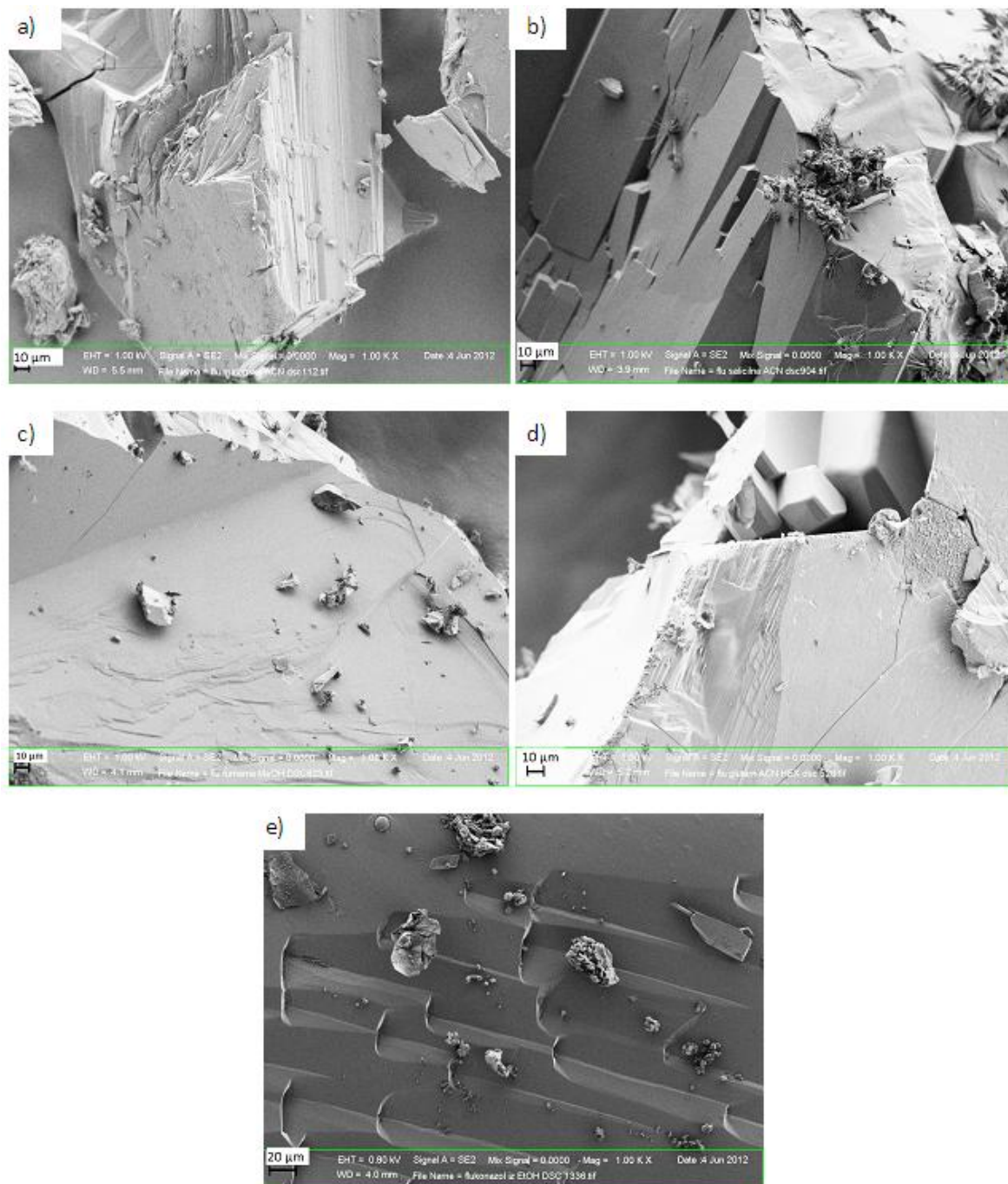
Slika 21: Profili raztapljanja čistega flukonazola, kokristala flukonazola s fumarno kislino in fizikalne zmesi flukonazola s fumarno kislino z uporabo metode s košaricami v prečiščeni vodi pri $37\pm 0,1^\circ\text{C}$.



Slika 22: Profili raztapljanja čistega flukonazola, kokristala flukonazola z maleinsko kislino in fizikalne zmesi flukonazola z maleinsko kislino z uporabo metode s košaricami v prečiščeni vodi pri $37\pm 0,1^\circ\text{C}$.

Poleg izboljšanja hitrosti raztapljanja je lahko pomembna prednost kokristalov izboljšanje stabilnosti učinkovine in/ali mehanskih lastnosti. V nadaljevanju smo naše raziskave usmerili v proučevanje mehanskih lastnosti, ki so pomembne za obnašanje spojin pri tehnoloških procesih.

4.3 ELEKTRONSKO MIKROSKOPSKE SLIKE (SEM)



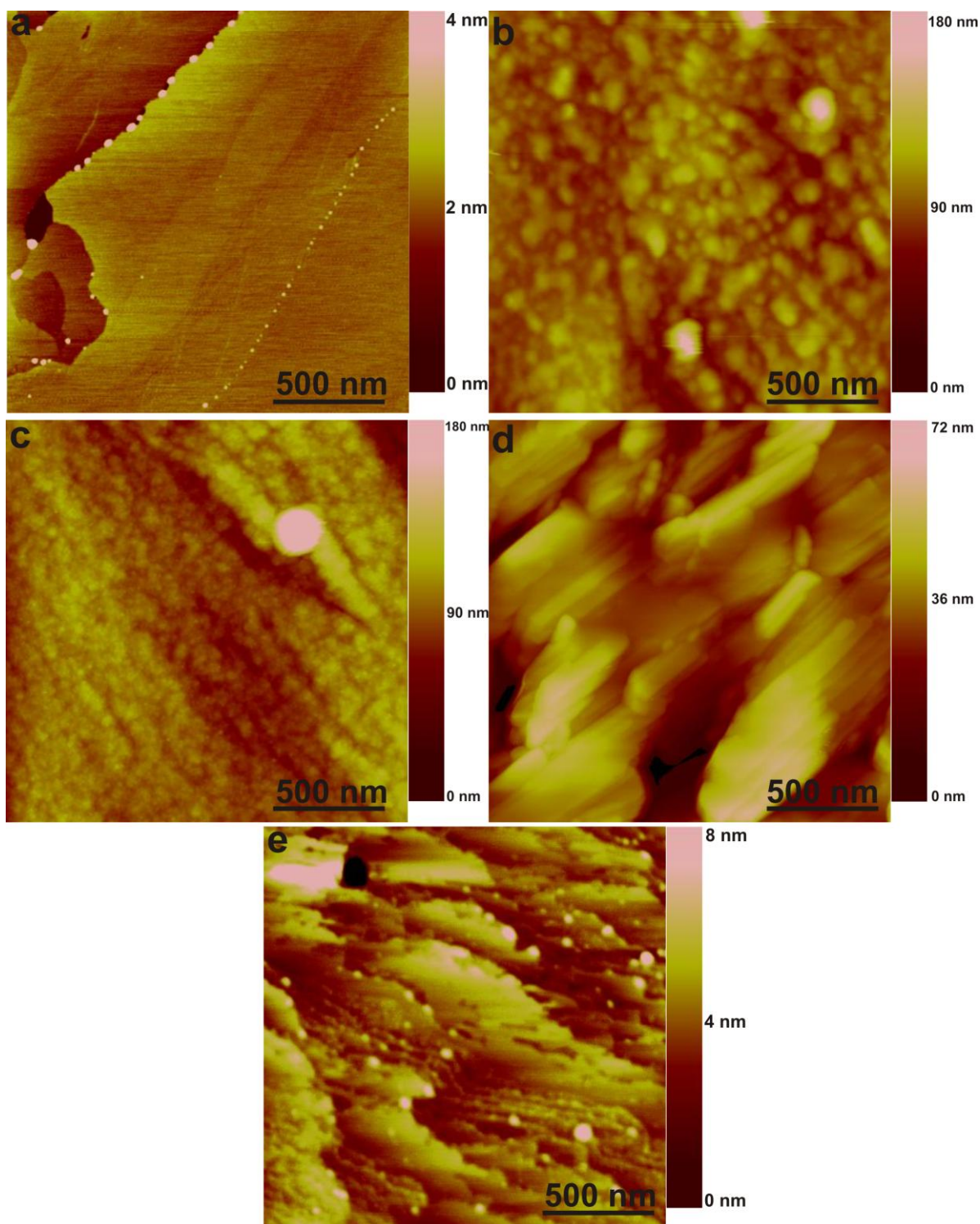
Slika 23: Slike monokristalov posnete z SEM mikroskopom: a) flukonazol:malonsko kislina, b) flukonazol:salicilna kislina, c) flukonazol:fumarna kislina, d) flukonazol:glutarna kislina, e) flukonazol polimorfna oblika III.

S pomočjo elektronskega mikroskopa smo posneli morfolologijo monokristalov. Na sliki 23 lahko vidimo površine pripravljenih monokristalov posnete pri različnih povečavah. Na kokristalu flukonazola s fumarno kislino (c) opazamo stopničasto morfolologijo, ki je značilna za 2D nukleacijsko rast kristalov. Na površini kokristalov s salicilno kislino (b) so prisotni kristali v obliki iglic, ki so značilne za kristale flukonazola v vodnih medijih, vendar kristalizacijo čistega flukonazola na površini kokristala lahko izključimo, saj v DSC krivuljah ne opazimo dodatnega tališča. Predvsem pri kokristalu z malonsko kislino (a) opazimo tudi plastno strukturo.

4.4 MIKROSKOPIJA NA ATOMSKO SILO (AFM)

Morfolologijo monokristalov smo ovrednotili tudi z AFM (slika 24). Na površinah smo ugotovili tipično stopničasto morfolologijo rasti kristalov. Površini monokristalov flukonazola s salicilno (b) in fumarno (c) kislino sta bili onečiščeni, kar se kaže z zrnatostjo površine in je lahko posledica prisotnosti različnih nečistoč v topilih.

Opazili smo tudi, da je površina monokristalov flukonazola z glutarno kislino (d) značilno bolj hrapava v primerjavi s čistim flukonazolom (e) in monokristalom z malonsko kislino (a).



Slika 24: Slike monokristalov posnete z AFM mikroskopom: a) flukonazol:malonsko kislina, b) flukonazol:salicilna kislina, c) flukonazol:fumarna kislina, d) flukonazol:glutarna kislina, e) flukonazol polimorfna oblika III

4.5 NANOINDENTACIJA

Mehanske lastnosti monokristalov smo testirali s pomočjo nanoindenterja. Za vrednotenje smo izbrali monokristale, ki so imeli primerno gladke površine. Za testiranje smo uporabili CSM tehniko, ki omogoča kontinuirano spremljanje mehanskih lastnosti kokristalov glede na globino vtiskovanja. Pri statistični obdelavi pridobljenih podatkov nismo upoštevali rezultatov tistih meritev, pri katerih je prišlo do loma monokristalov. Lom namreč povzroči značilno zmanjšanje Young-ovega modula in vtisne trdnosti saj ne opisuje realnega obnašanja snovi pri obremenitvi. Poleg monokristalov smo testirali tudi izhodne spojine, ki smo jih predhodno stisnili v diske in nato testirali na enak način kot monokristale. Rezultate prikazuje preglednica III.

Preglednica III: Pregled rezultatov izračuna Young-ovega modula in vtisne trdnosti za preiskovane monokristale in izhodne spojine.

Vzorec	Young-ov modul [GPa] E	Vtisna trdnost [MPa] H
Flukonazol	14 ± 2,7	773 ± 187
Flukonazol: fumarna kislina	14,2 ± 6,1	574 ± 98
Flukonazol: glutarna kislina	11 ± 3,3	321 ± 133
Flukonazol: malonska kislina	4,4 ± 1,8	200 ± 138
Flukonazol: salicilna kislina	10,5 ± 4,7	430 ± 153
Fumarna kislina	9,5 ± 1,9	481 ± 103
Glutarna kislina	10,3 ± 1,4	256 ± 70
Malonska kislina	17,5 ± 4,6	511 ± 186
Salicilna kislina	11,6 ± 2,2	453 ± 143

Iz rezultatov vidimo, da ima najmanjši E monokristal z malonsko kislino, sledijo monokristali s salicilno in glutarno kislino, najvišji E pa ima monokristal s fumarno kislino, ki je primerljiv z E flukonazola. Iz rezultatov lahko sklepamo, da dodatek tvorca kokristala vpliva na elastične lastnosti kokristalov, kar je posebej izrazito v primeru monokristala z malonsko kislino. To lahko razložimo s pomočjo notranje zgradbe kokristalov. Kokristali flukonazola z glutarno, fumarno in salicilno kislino ter flukonazol imajo namreč serpentinasto ureditev kristalnih ploskev, kar otežuje drsenje med kristalnimi ravninami. To se odraža v večjem E. Na drugi strani ima kokristal z malonsko kislino plastno ureditev, ki olajšuje zdrs med kristalnimi ravninami (najmanjša energetska bariera) in se posledično izraža z zmanjšanjem E. Na osnovi rezultatov lahko sklepamo, da imajo kokristali flukonazola nižje vrednosti E od osnovnih komponent. Kokristalizacija z dikarboksilnimi kisljinami vpliva tudi na izboljšanje plastičnosti kokristalov, kar se kaže v

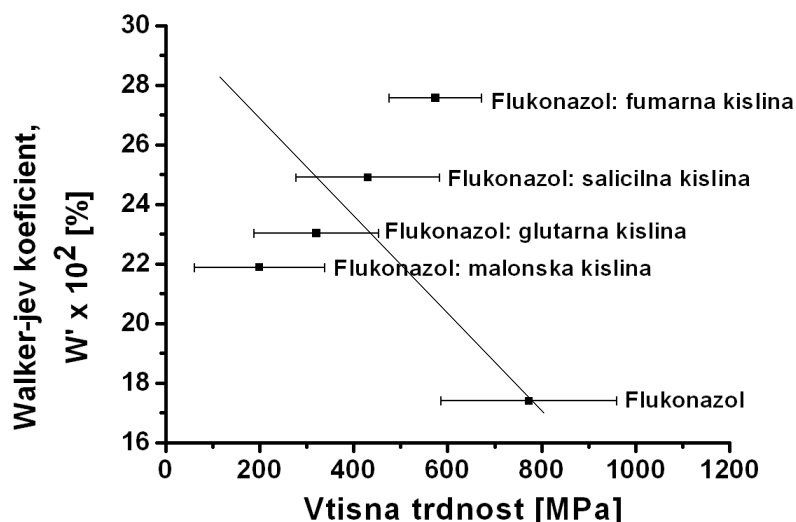
zmanjšanju H. Najbolj značilno zmanjšanje H smo ugotovili pri monokristalu flukonazola z malonsko kislino, kar je znova posledica notranje plastne ureditve. Značilno sipanje podatkov za E in H je lahko posledica anizotropije kristalov oziroma heterogenosti materialov na nm nivoju ter različnih defektov na površini, kot so razpoke (88).

4.6 KORELACIJA MED MEHANSKIMI LASTNOSTMI NA NIVOJU POSAMEZNEGA KOKRISTALA IN NA RAZSEŽNOSTNEM NIVOJU (»BULK«)

Za tabletiranje smo z mletjem pripravili večje količine kokristalov. Osredotočili smo se na tiste, ki smo jih uspeli pripraviti tudi v obliki monokristalov. Naš namen je bil ovrednotiti povezavo med mehanskimi lastnostmi na nivoju delca, ki smo jih določili z nanoindentacijo in obnašanjem kokristalov na razsežnostnem (bulk) nivoju pri stiskanju prahov. Rezultate smo vrednotili z Walkerjevim koeficientom. Za izračun Walkerjevega koeficienta smo potrebovali podatke o pravih gostotah kokristalov in flukonazola. Rezultati so prikazani v preglednici IV. Kokristal z glutarno kislino ima večjo pravo gostoto od obeh izhodnih komponent, vsi ostali testirani kokristali pa imajo pravo gostoto med obema tvorcema kokristala. Med kokristali ima najmanjšo pravo gostoto kokristal s salicilno kislino, sledita kokristala z glutarno in fumarno kislino, največjo pravo gostoto pa ima kokristal z malonsko kislino.

Preglednica IV: Prave gostote kokristalov pripravljenih z mletjem in čistega flukonazola.

Vzorec	Prava gostota [g/cm³]
Flukonazol	1,338
Flukonazol : fumarna kislina	1,474
Flukonazol : glutarna kislina	1,46
Flukonazol : malonska kislina	1,518
Flukonazol : salicilna kislina	1,447
Fumana kislina	1,623
Glutarna kislina	1,393
Malonska kislina	1,594
Salicilna kislina	1,425



Slika 25: Korelacija med vtisno trdnostjo in Walker-jevim koeficientom.

Na sliki 25 je grafični prikaz odnosa med vtisno trdnostjo, ki je merilo plastičnosti posameznega kokristala (monokristala) in Walkerjevim koeficientom, ki je merilo plastičnosti snovi na razsežnostnem nivoju. Iz grafa vidimo, da imajo vsi kokristali večjo plastičnost (večji Walkerjev koeficient) kot čisti flukonazol. Med posameznimi kokristali pa nismo ugotovili značilne razlike v stisljivosti. To lahko pripišemo vplivu elastične deformacije materialov, ki zaostane oziroma se ne sprosti pri "in-die" Walker-jevi metodi. To pomeni, da je izračunan Walkerjev koeficient seštevek elastičnih in plastičnih lastnosti materialov. Trend, ki smo ga opazili pri vseh kokristalih, kaže na izboljšanje kompresibilnosti flukonazola s tvorbo kokristalov z različnimi dikarboksilnimi kisljinami. To so nam nakazovali tudi podatki pridobljeni z nanoindentacijo, saj smo pri vseh monokristalih opazili manjšo vtisno trdnost (večjo plastičnost) v primerjavi s čistim flukonazolom.

5 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo z metodo mletja z dodatkom majhne količine topila izdelali kokristale flukonazola:

- flukonazol : maleinska kislina 1:3
- flukonazol : fumarna kislina 2:1
- flukonazol : glutarna kislina 1:1
- flukonazol : malonska kislina 1:1

Nastanek teh kokristalov smo potrdili z DSC. V preizkusih raztapljanja smo uporabili kokristale flukonazola z maleinsko, fumarno in glutarno kislino. Dokazali smo, da s tvorbo teh kokristalov dosežemo povečanje hitrosti raztapljanja učinkovine, kar je glavni namen tvorbe kokristalov. Največje povečanje hitrosti raztapljanja smo opazili pri kokristalih z maleinsko kislino. Hitrosti sproščanja učinkovine iz želatinskih kapsul so primerljive s hitrostmi raztapljanja samih prahov kokristalov. Tako smo ovrgli predpostavko, da slabo močenje delcev vpliva na hitrost raztapljanja učinkovine. V primerjalnih preizkusih med kokristali in fizikalnimi zmesmi nismo opazili značilno večje hitrosti raztapljanja kokristalov od fizikalnih zmesi. Razlog je lahko lokalna sprememba pH medija za raztapljanje oz. solubilizacijski učinek pomožne snovi. V nadaljnjih preiskavah bi lahko preprečili bližino flukonazola in pomožne snovi v fizikalnih zmesih z dodatkom nevtralnega polnila (npr. laktoze) v kapsule. Če je naša predpostavka pravilna, bi pričakovali znižanje hitrosti raztapljanja fizikalnih zmesi, pri kokristalih pa sprememba profila ni pričakovana.

V drugem delu smo se osredotočili na proučevanje mehanskih lastnosti monokristalov in kokristalov. Z metodo z odparevanjem topila nam je uspelo pripraviti naslednje monokristale, katerih nastanek smo prav tako potrdili z DSC:

- monokristal čistega flukonazola polimorfna oblika III (kristaliziran iz etanola)
- monokristal flukonazol:fumarna kislina = 2:1 (kristaliziran iz metanola)
- monokristal flukonazol:glutarna kislina = 1:1 (kristaliziran iz mešanice topil acetonitril : n-heksan 1:2)
- monokristal flukonazol:malonska kislina = 1:1 (kristaliziran iz topila acetonitril)
- monokristal flukonazol:salicilna kislina = 1:1 (kristaliziran iz topila acetonitril)

Monokristalov z maleinsko, jabolčno in vinsko kislino nam ni uspelo pripraviti.

Površino pripravljenih monokristalov smo nato opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), mikroskopom na atomsko silo (AFM), elastične in plastične lastnosti pa smo določili z instrumentalno nanoindentacijo. Pri kokristalih fumarne in salicilne kisline je površina onečiščena, kar je lahko posledica nečistot v topilu ali v okolici, pri monokristalu z malonsko kislino, pa je opazna značilna plastovita struktura kokristala. Z nanoindentacijo smo proučevali elastične in plastične lastnosti pripravljenih monokristalov. Opazili smo da s tvorbo kokristalov dosežemo spremembo Youngovega modula (E), ki opisuje elastične lastnosti materiala. Največje zmanjšanje E smo opazili pri monokristalu flukonazola z malonsko kislino, kar se sklada z ugotovitvijo, da ima kokristal flukonazola z malonsko kislino za razliko od ostalih monokristalov plastno ureditev kristalnih ravnin. E ostalih monokristalov je le rahlo nižji od E monokristala flukonazola. Pri vseh kokristalih smo opazili tudi izboljšanje plastičnosti materiala, kar se kaže v zmanjšanju vtisne trdnosti. Najbolj plastičen material predstavlja kokristal flukonazola z malonsko kislino.

V zadnjem delu smo želeli opazovati povezavo med lastnostmi opaženimi z nanoindentacijo na monokristalih in obnašanjem kokristalov pri tabletiranju. V ta namen smo z metodo z mletjem z dodatkom topila izdelali večje količine kokristalov. Vtisno trdnost monokristalov smo primerjali z Walkerjevim koeficientom, ki nam da podatke o plastičnosti na razsežnostnem nivoju. Prav tako kot na nivoju kristala, so tudi na nivoju prahov, vsi kokristali izkazovali večjo plastičnost kot čista učinkovina. Dokazali smo, da z uporabo nanoindentacije lahko napovemo plastične lastnosti kokristalov, ki so zaželeni pri procesu stiskanja. To nam ponuja možnosti, da pri novoodkritih kokristalih poleg osnovnih fizikalno kemijskih lastnosti proučimo še možne prednosti na področju mehanskih lastnosti, ki so pomembne pri nadaljnji obdelavi kokristalov in oblikovanju želene trdne farmacevtske oblike. Dodatno, z nanoindentacijo namreč lahko osnovne mehanske lastnosti, kot so plastičnost in elastičnost, proučimo na manjši količini vzorca v relativno kratkem času.

LITERATURNI VIRI

- 1 Aitipamula S, Banerjee R, Bansal A.K, Biradha K, Cheney M.L., Choudhury A.R, Desiraju G.R, Dikundwar A.G, Dubey R, Duggirala N, Ghogale P.P, Ghosh S, Goswami P.K, Rajesh Goud N, Jetti R, Karpinski P, Kaushik P, Kumar D, Kumar V, Moulton B, Mukherjee A, Mukherjee G, Myerson A.S, Puri V, Ramanan A, Rajamannar T, Malla Reddy C, Rodriguez-Hornedo N, Rogers R.D, Row T.N.G, Sanphui P, Shan N, Shete G, Singh A, Sun C.C, Swift J.A, Thaimattam R, Thakur T.S, Thaper R.K, Thomas S.P, Tothadi S, Vangala V.R, Variankaval N, Vishweshwar P, Weyna D.R, Zaworotko M.J: Polymorphs, Salts and Cocrystals: What's in a name? *Cryst. Growth Des.* 2012; 12: 2147–2152
- 2 Huang LF, Tong WQ: Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2004; 56: 321-334.
- 3 Blagden N, de Matas M, Gavan P.T, York P: Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2007; 59: 617–630.
- 4 Rodriguez-Hornedo N, Nehm SJ, Jayasankar A: Cocrystals: Design, Properties and Formation Mechanisms. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3rd Edition*, Informa Healthcare, New York 2007: 615-636.
- 5 Lu J, Rohani S: Preparation and characterization of theophylline– nicotinamide cocrystal. *Org. Process Res. Dev.* 2009; 13: 1269–1275.
- 6 Guidance for Industry Regulatory Classification of Pharmaceutical Co-Crystals
- 7 Kovačič B, Planinšek O, Vrečer F: Kokristali zdravilnih učinkovin. *Farm. vestn* 2010; 61: 30-36.
- 8 Vishweshwar P, McMahon JA, Bis JA, Zaworotko MJ: Pharmaceutical co-crystals. *J. Pharm. Sci.* 2006; 95:499-516.
- 9 Aakeroy C.B, Salmon D.J: Building co-crystals with molecular sense and supramolecular sensibility. *Cryst. Eng.* 2005; 7; 439–448.
- 10 Jones W, Motherwell W.D.S, Trask A.V: Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Physical Property Enhancement. *MRS Bull* 2006; 341: 875-879.
- 11 Shan N, Zaworotko M.J: The role of cocrystals in pharmaceutical science. *Drug Discovery Today* 2008; 13: 440–446.

-
- 12 Schultheiss N, Newman A: Pharmaceutical cocrystals and their physicochemical properties. *Cryst. Growth Des.* 2009; 9: 2950–2967.
- 13 Weyna D.R, Cheney M.L, Shan N, Mazen H, Zaworotko M.J, Sava V, Song S, Sanchez-Ramos J.R: Improving Solubility and Pharmacokinetics of Meloxicam via Multiple-Component Crystal Formation. *Mol. Pharmaceutics* 2012; mp 300169c.
- 14 Blagden N, Berry D.J, Parkin A, Javed H, Ibrahim A, Gavan P.T, De Matos L.L, Seaton C.C: Current directions in co-crystal growth. *New J. Chem.* 2008; 32: 1659–1672.
- 15 Bak A, Gore A, Yanez E, Stanton M, Tufekcic S, Syed R, Akrami A, Rose M, Surapaneni S, Bostick T, King A, Neervannan S, Ostovic D, Koparkar A: The co-crystal approach to improve the exposure of a water-insoluble compound: AMG 517 sorbic acid co-crystal characterization and pharmacokinetics. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97: 3942–3956.
- 16 Aakeroy C.B, Forbes S, Desper J: Using cocrystals to systematically modulate aqueous solubility and melting behavior of an anticancer drug. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131: 17048–17049.
- 17 Fleischman S.G, Kuduva S.S, McMahon J.A, Moulton B, Bailey Walsh R.D, Rodriguez-Hornedo N, Zaworotko M.J: Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases: multiple-component crystalline solids involving carbamazepine. *Cryst. Growth Des.* 2003; 3: 909–919.
- 18 Planinšek O: Nekaterne metode za povečanje topnosti in hitrosti raztapljanja v vodi težko topnih učinkovin-1.del. *Farm. Vestnik* 2011; 52: 221-230.
- 19 Bethune SJ, Huang N, Jayasankar A, Rodriguez-Hornedo N: Understanding and Predicting the Effect of Cocrystal Components and pH on Cocrystal Solubility. *Cryst. Growth Des.* 2009; 9: 3976-3988
- 20 Barzegar-Jalali M, Valizadeh H, Shadbad MRS, Adibkia K et al: Cogrounding as an approach to enhance dissolution rate of poorly water-soluble drug (gliclazide). *Powder Technol.* 2010; 197: 150-158.
- 21 McNamara D.P, Childs S.L, Giordano J, Iariccio A, Cassidy J, Shet M.S, Mannion R, O'Donnell E, Park A: Use of Glutaric Acid Cocrystal to improve Oral Bioavailability of a Low Solubility API. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1888-1897.
- 22 Reutzel-Edens S.M, Newman A.W: Physical characterization of hygroscopicity in pharmaceutical solids. In: Hilfiker, R. (Ed.), *Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, 235–258.

-
23. Surface measurements systems 3rd international DVS user group meeting, Imperial College, London, GB, 9th June, 1999 / 4th international DVS user group meeting, Colmar, France, 3-6. September 2003.
- 24 Qiao N, Li M, Schlindwein W, Malek N, Davies A, Trappit G: Pharmaceutical cocrystals: An overview. *Int. J. Pharm.* 2011; 419:1-11.
- 25 Tiwary AK: Modification of crystal habit and its role in dosage form performance. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2001; 27: 699–709.
- 26 Yang G, Kubota N, Sha Z et al: Crystal Shape Control by Manipulating Supersaturation in Batch Cooling Crystallization. *Cryst. Growth Des.* 2006; 6: 2799-2803.
- 27 Sun, C.C, Hou H: Improving mechanical properties of caffeine and methyl gallate crystals by cocrystallization. *Cryst. Growth Des.* 2008; 8(5): 1575-1579.
- 28 Karki S, Frišćić T, Fabian L, Laity P.R, Day G.M, Jones W: Improving mechanical properties of crystalline solids by cocrystal formation: new compressible forms of paracetamol. *Adv. Mater.* 2009; 21(38-39): 3905-3909.
- 29 Chatteraj S, Shi L, Sun C.C: Understanding the relationship between crystal structure, plasticity and compaction behaviour of theophylline, methyl gallate, and their 1: 1 co-crystal. *Cryst. Eng. Comm.* 2010; 12(8): 2466-2472.
- 30 Trask A.V: An overview of Pharmaceutical Cocrystals as Intellectual Property. *Mol. Pharmaceutics* 2007; 4: 301-309.
- 31 Jayasankar A, Somwangthanaroj A, Shao Z.J, Rodriguez-Hornedo N: Co-crystal formation during cogrinding and storage is mediated by amorphous phase. *Pharm. Res.* 2006; 23: 2381-2392.
- 32 Good, D.J: Pharmaceutical cocrystal eutectic analysis: Study of thermodynamic stability, solubility, and phase behavior. University of Michigan, Ann Arbor, 2010.
- 33 Padrela L, Rodrigues M.A, Velaga S.P, Fernandes A.C, Matos H.A, de Azevedo E.G: Screening for pharmaceutical cocrystals using the supercritical fluid enhanced atomization process. *J. Supercrit. Fluids* 2010; 53: 156–164.
- 34 Dhumal R.S, Biradar S.V, Paradkar A.R, York P: Ultrasound assisted engineering of lactose crystals. *Pharm. Res.* 2008; 25: 2835–2844.
- 35 Aher S, Dhumal R, Mahadik K, Paradkar A, York P: Ultrasound assisted cocrystallization from solution (USSC) containing a non-congruently soluble cocrystal component pair: caffeine/maleic acid. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2010; 41: 597–602.

-
- 36 Alhalaweh A, Velaga S.P: Formation of Cocrystals from Stoichiometric Solutions of Incongruently Saturating Systems by Spray Drying. *Cryst. Growth Des.* 2010; 10: 3302–3305.
- 37 Chieng N, Rades T, Aaltonen J: An overview of recent studies on the analysis of pharmaceutical polymorphs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011; 55: 618-644.
- 38 Maheshwari C, Jayasankar A, Khan N.A, Amidon G.E, Rodriguez-Hornedo N: Factors that influence the spontaneous formation of pharmaceutical cocrystals by simply mixing solid reactants. *Cryst. Eng. Comm.* 2009; 11: 493–500.
- 39 Ervasti T, Ketolainen J, Aaltonen J: Spontaneous Formation of Theophylline-Nicotinamide Cocrystals. *Sci. Pharm.* 2010; 78: 622.
- 40 Florence A.T, Attwood D: *Physicochemical Principles of Pharmacy* fifth Ed. 11-12
- 41 Stahly GP: Diversity in Single- and Multiple-Component Crystals. The Search for and Prevalence of Polymorphs and Cocrystals. *Cryst. Growth Des.* 2007; 7: 1007-1026.
- 42 Aakelröy C.B: *Crystal engineering: strategies and architectures.* *Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci.* 1997; 53: 569-586.
- 43 McNamara D.P, Childs S.L, Giordano J, Iarriccio A, Cassidy J, Shet M.S, Mannion R, O'Donnell E, Park A: Use of a glutaric acid cocrystal to improve oral bioavailability of a low solubility API. *Pharm. Res.* 2006; 23: 1888–1897.
- 44 Braga D, Grepioni F: Reactions Between or Within Molecular Crystals. *Angew Chem. Int. Ed.* 2004; 43: 4002-4011.
- 45 Braga D, Grepioni F, Maini L, Polito M: Crystal Polymorphism and Multiple Crystal Forms. *Struct. Bond.* 2009; 132: 25-50.
- 46 Vishweshwar P, McMahon J.A, Zaworotko M.J: *Crystal Engineering of Pharmaceutical Co-crystals.* *Frontiers in Crystal Engineering,* John Wiley & Sons 2006; 25-49.
- 47 Neal C.H: *Engineering cocrystal solubility and stability via ionization and micellar solubilization.* University of Michigan 2011.
- 48 Shan N, Toda F, Jones W: Mechanochemistry and co-crystal formation: effect of solvent on reaction kinetics. *Chem. Commun.* 2002; 2372-2373.
- 49 Trask A.V, Motherwell W.D.S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystalization. *Chem. Commun.* 2004; 890-891.
- 50 Frišćić T, Jones W: Recent Advances in Understanding the Mechanism of Cocrystal Formation via Grinding. *Cryst. Growth Des.* 2009; 9: 1621-1637.

-
- 51 Rastogi R. P, Bassi P. S, Chadha L. S: Mechanism of the Reaction Between Hydrocarbons and Picric Acid in the Solid State. *J. Phys. Chem.* 1963; 67: 2569–2573.
- 52 Karki S, Frišćić T, Motherwell W.D.S, Jones W: Screening for Pharmaceutical Cocrystal Hydrates via Neat and Liquid-Assisted Grinding. *Mol. Pharmaceutics* 2007; 4: 347–354.
- 53 Chadwick K, Davey R.J, Cross W: How does grinding produce co-crystals? Insights from the case of benzophenone and diphenylamine. *Cryst. Eng. Comm.* 2007; 9: 732–734.
- 54 Chadwick K, Davey R.J, Cross W: How does grinding produce co-crystals? Insights from the case of benzophenone and diphenylamine. *Cryst. Eng. Comm.* 2007; 9: 732-734.
- 55 Willart J.F, Descamps M: Solid State Amorphization of Pharmaceuticals. *Mol. Pharmaceutics* 2008; 5: 905–920.
- 56 Jayasankar A, Somwangthanaroj A, Shao Z.J et al: Cocrystal Formation during Cogrinding and Storage is Mediated by Amorphous Phase. *Pharm. Res.* 2006; 23: 2381-2392.
- 57 Rager T, Hilfiker R: Cocrystal Formation from Solvent Mixtures. *Cryst. Growth Des.* 2010; 10: 3237-3241.
- 58 Frišćić T, Childs S.L, Rizvi S.A, Jones W: The role of solvent in mechanochemical and sonochemical cocrystal formation: a solubility-based approach for predicting cocrystallisation outcome. *Cryst. Eng. Comm.* 2009; 11: 418-426.
- 59 Trask A.V, Motherwell S, Jones W: Solvent-drop grinding: green polymorph control of cocrystallisation. *Chem. Commun.* 2004; 890-891.
- 60 European Pharmacopoea 6th Ed., 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms; 5811-5817.
- 61 Ando S, Kikuchi J, Fujimura Y, Ida Y, Higashi K, MOribe K, Yamamoto K: Physicochemical Characterization and Structural Evaluation of a Specific 2:1 Cocrystal of Naproxen–Nicotinamide. *Wiley Online Library* 2012; DOI 10.1002/jps.23158.
- 62 Allen S. M, Thomas E. L: *The Structure of Materials*. John Willey & Sons, Inc, 1999.
- 63 Landau L. D, Lifshitz E. M, Markovich Kosevich A, Petrovich Pitaevskiĭ L.: *Theory of elasticity*, 3rd edition, Oxford, 1986.
- 64 Govedarica B, Ilić I, Šibanc R, Dreu R, Srčić S: The use of single particle mechanical properties for predicting the compression behaviour of pharmaceutical materials. *Powder technol.* 2012; 225: 43-51.

-
- 65 http://www.nanoindentation.cornell.edu/Model/elastic_model.htm. dostopano 8.10.2012
- 66 Lucca D. A, Herrmann K, Klopstein M. J: Nanoindentation: measuring methods and applications. *Manuf. Technol.* 2010; 59: 803-819
- 67 Pharr G.M: Measurement of mechanical properties by ultra-low load indentation. *Mat. Sci. Eng., A* 1998; 253: 151-159.
- 68 Oliver W.C, Pharr G.M: An improved technique for determining hardness and elastic-modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J. Mater. Res.* 1992; 7: 1564-1583.
- 69 Sneddon I.N: The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.* 1965; 3: 47–57.
- 70 Oliver W.C, Pharr G.M: Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *J. Mater. Res.* 2004; 19: 3-20.
- 71 Lucas B.N, Oliver W.C, Swindeman J.E: Fundamentals of Nanoindentation and Nanotribology. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1998; 3: 522.
- 72 Wilson R.A, Bullen A.H, Bullen A.W: Introduction to scanning probe microscopy, Basic Theory Atomic Force Microscopy; Northern Kentucky University, Highland Heights, KY 41099.
- 73 Train, D: An investigation into the compaction of powders. *J. Pharm. Pharmacol.* 1956; 8: 745–761.
- 74 Roberts R.J, Rowe R.C: Mechanical properties of powders. In: Ganderton, G., Jones, T.M., McGinity, J.W. (Eds.), *Advances in Pharmaceutical Sciences*, vol. 7. Academic Press, London 1995, pp. 1–62.
- 75 Heckel, R.W: An analysis of powder compaction phenomena. *Trans. Metall. Soc.* 1961; 221: 1001–1008.
- 76 Walker E.E: The properties of powders VI: the compressibility of powders. *Trans. Faraday Soc.* 1923; 19: 73–82
- 77 Kawakita K, Lüdde K.H: Some considerations on powder compression equations. *Powder Technol.* 1970; 4: 61–68.
- 78 Celik M: Overview of compaction data analysis techniques. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1992; 18: 767–810.

-
- 79 Rang H. P, Dale M. M, Ritter J. M, Flower R.J: Rang and Dale's Pharmacology 6th edition. Elsevier 2007: 692-695.
- 80 American society of health-system pharmacists; Drug information 2008; 8: 500
- 81 Sweetman SC: Martindale: The complete drug reference, 35th edition, Pharmaceutical Press, London 2007: 479-481.
- 82 Alkharmis K.A, Obaidat A.A, Nuseirat A.F: Solid-state characterization of fluconazole. Pharm. Dev. Technol. 2002;7(4): 491-503
- 83 Fekete P, Virgula J, Furdyga E, Leventiszne H.M, Klebovich I, Baloghne N.K: Fluconazole capsules with improved release WIPO Patent, WO 2005/002553 A2, 2005.
- 84 Papageorgiou G.Z, Bikiaris D, Kanaze F.I, Stergiou A, Georgarakis E: Tailoring the Release Rates of Fluconazole. Using Solid Dispersions in Polymer Blends. Drug Dev. Ind. Pharm. 2008; 34(3): 336-346.
- 85 Vandercam B, Gibbs D, Valtonen M, JSger H, Armignacco O: Fluconazole orally dispersible tablets for the treatment of patients with oropharyngeal candidiasis. J. Int. Med. Res. 1998; 26(4): 209-218
- 86 Lovrić K: Vrednotenje kokristalov flukonazola pripravljenih z mletjem, Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010.
- 87 Kastelic J, Hodnik Ž, Šket P, Plavec J, Lah N, Leban I, Pajk M, Planinšek O, Kikelj D: Fluconazole Cocrystals with Dicarboxylic Acids. Cryst. Growth Des. 2010; 10: 4943-4953.
- 88 K.L. Johnson: Contact mechanics, Cambridge University Press, 1987