

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MENSUD OMEROVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



MENSUD OMEROVIĆ

**PROUČEVANJE MEHANSKIH LASTNOSTI
POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA Z
METODO INSTRUMENTALNEGA
NANOVTISKOVANJA**

**STUDY OF MECHANICAL PROPERTIES OF
POLYMORPHIC FORMS OF TOLBUTAMIDE
BY INSTRUMENTAL NANOINDENTATION
METHOD**

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za Farmaceutsko tehnologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm. Meritve na instrumentalnem nanoindenterju smo izvedli na Naravoslovnotehniški fakulteti, Oddelek za materiale in metalurgijo. Analize z X-žarkovno difraktometrijo smo opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za anorgansko kemijo.

Zahvala

Za strokovno pomoč, usmerjanje med eksperimentalnim delom, nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge se zahvaljujem mentorici doc. dr. Biljani Janković, mag. farm. Prof. dr. Stanku Srčiću, mag. farm., se zahvaljujem, da mi je omogočil izvedbo in posredovanje pri iskanju teme in mentorja magistrske naloge. Hvala prof. dr. Antonu Medenu za analizo vzorcev na rentgenskem difraktometru.

Za nesebično pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela magistrske naloge se zahvaljujem prof. dr. Odonu Planinšku, mag. farm., asist. dr. Mateji Egart, Zoranu Lavriču, Mojci Keržan in Tatjani Hrovatič.

Posebna zahvala gre mojim staršem, ki so me spodbujali med študijem, in kolegom, ki so mi nudili podporo v času celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Biljane Janković, mag. farm.

Mensud Omerović

Predsednik komisije: izr. prof. dr. iztok Grabnar, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Jožko Cesar

Mentorica: doc. dr. Biljana Janković, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	IV
1. UVOD	1
1.1. KRISTALI, NJHOVA STRUKTURA in OBLIKA.....	1
1.2. OSNOVE KRISTALIZACIJE IZ RAZTOPIN	2
1.2.1. Uvod	2
1.2.2. Teorija kristalizacije.....	2
1.3. POLIMORFIZEM.....	6
1.3.1. Uvod	6
1.3.2. Vrste polimorfizma	6
1.4. MEHANSKE LASTNOSTI SNOVI.....	7
1.5. INSTRUMENTALNO NANOVTISKOVANJE (NANOINDENTACIJA).....	9
1.5.1. Uvod	9
1.5.2. Tehnika kontinuiranega merjenja togosti	10
1.6. TOLBUTAMID	12
1.6.1. Mehanizem delovanja zdravilne učinkovine	12
1.6.2. Kristalna morfologija in polimorfizem zdravilne učinkovine	12
2. NAMEN DELA	14
3. MATERIALI in METODE	15
3.1. MATERIALI.....	15
3.2. NAPRAVE.....	15
3.3. METODE.....	16
3.3.1. Instrumentalna nanoindentacija	16
3.3.2. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	18
3.3.3. X-žarkovna difraktometrija posameznih kristalov (SCXRD).....	19

3.3.4. Laserska difrakcija (LD)	21
3.3.6. Kompatibilnost	24
3.3.7. Močljivost in določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice	25
4. EKSPERIMENTALNO DELO	27
4.1. PRIPRAVA POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA (TB).....	27
4.1.1. Priprava oblike I	27
4.1.2. Priprava oblike III.....	27
4.2. METODE VREDNOTENJA POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA (TB).....	28
4.2.1. Vrednotenje polimorfni oblik TB z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC)	28
4.2.2. Vrednotenje kristalne strukture polimorfni oblik TB z X-žarkovno difraktometrijo na posameznem kristalu (SCXRD)	29
4.2.3. Vrednotenje mehanskih lastnosti polimorfni oblik TB z metodo instrumentalnega nanovtiskovanja	29
4.2.4. Vrednotenje porazdelitve velikosti delcev polimorfni oblik TB z lasersko difrakcijo (LD).....	30
4.2.5. Določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice	31
4.2.6. Izdelava tablet tolbutamida.....	32
4.2.7. Določanje trdnosti tablet in merjenje njihovih dimenzij, kompatibilnostni diagram	33
5. REZULTATI in RAZPRAVA	34
5.1. VREDNOTENJE POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA (TB).....	34
5.1.1. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC).....	34
5.1.2. Instrumentalna nanoindentacija	35
5.1.3. Primerjava mehanskih lastnosti zdravilnih učinkovin	39
5.1.4. Laserska difrakcija	40
5.1.5. Stični kot	41
5.1.6. Direktno tabletiranje	42
6. SKLEP	46
7. LITERATURA.....	47

SLIKE

Slika 1: Osnovni parametri osnovne celice kristala: a, b, c – dimenzije osi (robov) osnovne celice; α , β , γ – koti med osmi (robovi) osnovne celice	1
Slika 2: Topnostni diagram za kristalizacijo spojine pri različnih temperaturah	3
Slika 3: Fazni diagram odvisnosti Gibbsove proste energije (G) od temperature (T) za dimorfni (a), monotropni in (b) enantiotropni sistem	7
Slika 4: Krivulja napetosti/deformacija	8
Slika 5: Shematski prikaz obremenitve v odvisnosti od globine vtisa	9
Slika 6: Vsota elastične in plastične energije pri deformaciji materiala	10
Slika 7: Prikaz modificirane CSM-metode nanoindentacije – sila v odvisnosti od globine vtisa	10
Slika 8: Strukturna formula zdravilne učinkovine TB	13
Slika 9: Shematski prikaz nanoindenterja	16
Slika 10: Geometrija konic indenterjev: (a) stožčasta oblika, (b) Berkovichev indenter (tristrana piramida), (c) Vickersov indenter (štiristrana piramida)	17
Slika 11: Geometrija Braggove enačbe (d je razdalja med plastmi, θ je kot uklona)	20
Slika 12: Shematski prikaz zgradbe monokristalnega difraktometra	20
Slika 13: Shema instrumenta LD	21
Slika 14: Stopnje stiskanja tablet na tabletirki na udarec	23
Slika 15: Kompatibilnostni diagram (I) zmesi (II – krivulja v primeru laminacije ali tvorbe kopic)	24
Slika 16: Ravnoesje sil, ki jim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino	25
Slika 17: Shematski primer spremembe stičnega kota v času	26
Slika 18: Prikaz merjenja naraščajočega (a) in pojemajočega (b) stičnega kota	26
Slika 19: Mettler Toledo DSC 1	28
Slika 20: Agilent SuperNova difraktometer	29
Slika 21: Nanoindenter Agilent G200	30
Slika 22: Mastersizer S, Malvern	31
Slika 23: Ročna hidravlična stiskalnica, Graseby Specac	31
Slika 24: Naprava za merjenje stičnega kota, Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRUSS	32
Slika 25: Hidravlična tabletirka na udarec, Killian SP 300, IMA	33
Slika 26: Naprava za določanje trdnosti tablet, Tablet hardness tester VK 200, Vanderkamp	33
Slika 27: DSC-termogram polimorfni oblik TB (oblika I in oblika III).....	34
Slika 28: Kvartilni diagram (angl. box plot) za vrednosti E in H polimorfni oblik TB	36
Slika 29: Slike površin posameznih kristalov TB oblike I (a) in oblike III (b), posnetih z nanoindenterjem, in graf krivulj sila stiskanja – globina vtisa (c)	38
Slika 30: Strukturno pakiranje molekul, značilno za obliko I (slika levo) in obliko III (slika desno)	39

Slika 31: Trend med Youngovim modulom in vtisno trdnostjo za izbrane zdravilne učinkovine	40
Slika 32: Stični kot tablet polimorfnih oblik TB v odvisnosti od časa.....	41
Slika 33: Kompatibilnostni diagram (odvisnost natezne trdnosti od tlaka stiskanja) za serijo tablet TB oblike I in oblike III	43
Slika 34: Kompatibilnostni diagram za serijo tablet T oblike I za območje tlaka stiskanja 7,958–71,62 MPa	44
Slika 35: Kompatibilnostni diagram za serijo tablet T oblike III za območje tlaka stiskanja 5,305–19,45 MPa	44

PREGLEDNICE

Preglednica 1: Eksperimentalne DSC-vrednosti in DSC-vrednosti iz literature za obe polimorfni obliki TB	35
Preglednica 2: Vrednosti E in H , odčitane iz Box plot grafov, za polimorfni obliki I in III (rezultati so predstavljeni kot mediana in interkvartilni rang – razlika med Q_3 in Q_1)	36
Preglednica 3: Vrednosti P_y in njena razmerja z mehanskimi lastnostmi materialov	37
Preglednica 4: Vrednosti P_y in njena razmerja s H in E za obe polimorfni obliki TB	37
Preglednica 5: Volumska porazdelitev delcev polimorfni oblik I in III	40
Preglednica 6: Vrednosti stičnih kotov tablet obeh polimorfni oblik	41
Preglednica 7: Sile stiskanja, tlak stiskanja in mase tablet	42
Preglednica 8: Dimenzije in natezne trdnosti tablet za obliki I in III	43
Preglednica 9: Vrednosti konstant kompatibilnostnih diagramov za seriji tablet TB oblik I in III	45

POVZETEK

Pri razvoju in proizvodnji zdravilnih učinkovin v farmacevtski industriji imajo ključno vlogo postopki, s katerimi lahko vplivamo na njihove fizikalno-kemijske kot tudi kasneje na mehanske lastnosti. Kristalizacija je postopek, ki zavzema pomembno vlogo pri pripravi kristalov zdravilnih učinkovin različne notranje strukture in zunanlega videza.

Namen magistrske naloge je bil pripraviti polimorfni obliki tolbutamida (obliki I in III) iz različnih topil in jima določiti mehanske lastnosti, in sicer: vtisno trdnost (merilo plastičnosti), Youngov modul (merilo elastičnosti) in mejni tlak (merilo plastičnosti). Proučevali smo, kako polimorfizem tolbutamida vpliva na njegovo mehansko obnašanje, in ob tem ocenili, katera polimorfna oblika ima najprimernejše lastnosti za proces stiskanja v tablete. Metoda, s katero smo določali mehanske lastnosti preiskovane zdravilne učinkovine na nanometrskem nivoju, je instrumentalno nanovtiskovanje (nanoindentacija).

Na osnovi rezultatov smo sklepali, da ima oblika I krhke in plastične lastnosti (nanometriške lastnosti), ki so razlog uporabe višje sile ob stiskanju kompakto. Zaradi krhkih lastnosti oblika I ni izkazovala tendence lepljenja za pečate. Na drugi strani pa ima oblika III žilave in elastične karakteristike. Zaradi izrazite žilavosti (nižji P_y) ima oblika III večjo kompatibilnost (večji koeficient C_p) v primerjavi z obliko I. Ob stiskanju je izkazovala tudi pojav lepljenja za pečate. Pri nanoindentaciji oblike I smo mehansko obremenili ploskev »bc«, pri kateri so molekule bolj gosto pakirane v formaciji »zig-zag« (ploskev »bc« je dominantna po svoji velikosti in najverjetneje določa mehansko obnašanje materiala ob stiskanju). Zaradi gosto premrežene strukture izkazuje oblika I krhke lastnosti. Na drugi strani smo pri nanoindentaciji oblike III stiskali ploskev »ac« (bolj razvita), pri kateri so molekule dejansko vzporedne s to ploskvijo. Na ta način smo povzročili plastičen tok v smeri delovanja sile in pokazali, da ima oblika III predvsem plastične lastnosti.

Na osnovi rezultatov močljivosti lahko obe polimorfni obliki razvrstimo v hidrofilne snovi, saj je stični kot manjši od 90° . Polimorfna oblika III ima boljšo močljivost ($32,3^\circ$) v primerjavi z obliko I ($67,7^\circ$). Rezultat je tudi v skladu z literaturnimi podatki, ki govorijo o večji topnosti oblike III v primerjavi z obliko I.

Mehanske lastnosti polimorfni oblik tolbutamida smo primerjali tudi z mehanskimi lastnostmi različnih zdravilnih učinkovin (klorpropamid, olanzapin, nifedipin, famotidin A in famotidin B), pri čemer smo ugotovili, da polimorfi tolbutamida in klorpropamida pripadajo skupini izrazito plastičnih snovi.

Na podlagi dobljenih meritev pri raziskovalnem delu smo zaključili, da polimorfizem tolbutamida vpliva na njegove mehanske lastnosti in je v povezavi z načinom ureditve molekul v kristalni strukturi.

Ključne besede: *kristalizacija, polimorfizem, tolbutamid, vtisna trdnost, Youngov modul, instrumentalno nanovtiskovanje.*

ABSTRACT

The main aims of the master thesis were to prepare the polymorphic forms of the active substance tolbutamide (form I and III) with recrystallization from different solvents as well as to determine their mechanical properties (Young's modulus, indentation hardness and yield pressure). For assessment of mechanical behaviour of investigated polymorphic forms of tolbutamide, instrumented nanoindentation was applied.

Based on results, form I has brittle and plastic properties due to which larger force was applied during compression process. Since brittleness of material generally leads to lubricating properties, form I was not demonstrated tendency to sticking on punches during tableting. On the other hand, form III expressed ductile and elastic characteristics, which resulted in extensive sticking to compression tolls. In respect to that form III has higher compactibility (higher C_p coefficient) than form I.

During nanoindentation of form I, the stress was applied on »bc« plane in which the molecules are more densely packed in a »zig-zag« formation (»bc« plane is dominant and mostly responsible for mechanical behaviour during compression). Therefore, brittle behaviour can be explained with consolidation of densely cross-linked crystal structure, which restricted plastic flow of material. On contrary, form III was deformed at »ac« plane (dominant one) in which the molecules are stretched along this lattice. Indentation force induced plastic flow (slipping) of molecules in this direction, which resulted in ductile behaviour of form III.

The mechanical properties of tolbutamide polymorphic forms were also compared with the mechanical properties of the various active pharmaceutical ingredients (chlorpropamide, olanzapine, nifedipine, famotidine A and famotidine B). Together with chlorpropamides, Tolbutamide can be classified as extensively plastic material.

With regards to wettability results, both polymorphic form can be classified as hydrophilic materials because the contact angle is less than 90°. Polymorphic form III is more hydrophilic (32,3°) when compared to form I (67,7°). The result is also in accordance with better water solubility of form III.

According to results, tolbutamide polymorphism affects its mechanical behaviour, which is in function with the crystal packing or organization of molecules at investigated crystal plains.

Key words: crystallization, polymorphism, tolbutamide, hardness, Young;s modulus, instrumental nanoindentation.

SEZNAM OKRAJŠAV

<i>C_p</i>	<i>konstanta kompatibilnostnega diagrama</i>
<i>CSM</i>	<i>kontinuirano merjenje togosti (angl. continuous stiffness measurement)</i>
<i>d</i>	<i>premer tablet</i>
<i>DCM</i>	<i>dinamično merjenje stika (angl. dynamic contact measurement)</i>
<i>DSC</i>	<i>diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. differential scanning calorimetry)</i>
<i>E</i>	<i>Youngov modul (modul elastičnosti)</i>
<i>F</i>	<i>trdnost tablet</i>
<i>H</i>	<i>vtisna trdnost</i>
<i>h</i>	<i>debelina tablet</i>
<i>LD</i>	<i>laserska difrakcija</i>
<i>P_y</i>	<i>meja plastičnosti</i>
<i>S</i>	<i>togost (angl. stiffness)</i>
<i>SCXRD</i>	<i>X-žarkovna difraktometrija posameznih kristalov (angl. Single Crystal X-Ray Diffraction)</i>
<i>SD</i>	<i>standardna deviacija</i>
<i>σ</i>	<i>natezna trdnost tablet</i>
<i>T</i>	<i>temperatura</i>
<i>TB</i>	<i>tolbutamid</i>
<i>ZU</i>	<i>zdravilna učinkovina</i>

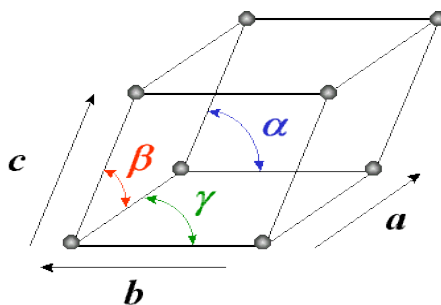
1. UVOD

1.1. KRISTALI, NJIHOVA STRUKTURA in OBLIKA

Trdna snov je definirana kot trden, homogen, fizikalno definiran in ločljiv del sistema. Trdne snovi obstajajo v kristalni ali amorfni obliki, odvisno od obsega tridimenzionalne ureditve vzorca in stopnje termodinamske stabilnosti. Kristalno stanje lahko opišemo kot ponavljajočo se ureditev molekul v tridimenzionalnem vzorcu, medtem ko amorfne snovi izkazujejo kratkosežno ureditev [1].

Kristalna snov je definirana kot trdna snov, sestavljena iz atomov, ionov ali molekul, ki jih s skupnim imenom imenujemo gradniki, urejeni v ponavljajočem se tridimenzionalnem vzorcu, za katerega je značilna simetrija, medtem ko amorfne snovi izkazujejo kratkosežno ureditev. Če gre za razporeditev molekul v prostoru, govorimo o molekulskih kristalih, ki so za področje farmacije najpomembnejši, saj večina ZU oziroma pomožnih snovi nastopa v obliki molekul [2].

Tridimenzionalno ureditev gradnikov imenujemo kristalna mreža (angl. crystal lattice). Pri opazovanju kristalov so ugotovili, da so gradniki v kristalni mreži urejeni v ponavljajoče se motive, ki jih imenujemo osnovne celice. Osnovne celice (angl. unit cell) so paralelepiped, tj. telesa, obdana s šestimi ploskvami, pri čemer sta si po dve nasprotni ploskvi med sabo vzporedni, in predstavljajo najmanjši del kristala, ki vsebuje še vse njegove značilnosti, hkrati pa so v vseh treh prostorskih smereh obkrožene z identičnimi enotami. Osnovno celico (slika 1) definirajo osnovni parametri kristalne mreže, tj. tri prostorske osi oziroma robovi osnovne celice, po navadi označeni z a , b in c , in trije koti med njimi (α , β in γ). Kot α predstavlja kot med osema b in c , β kot med osema a in c ter γ kot med osema a in b [2].



Slika 1: Osnovni parametri osnovne celice kristala: a , b , c – dimenzije osi (robov) osnovne celice; α , β , γ – koti med osmi (robovi) osnovne celice [3]

Ista substanca ima lahko kemijsko gledano različno prostorsko razporeditev gradnikov in s tem različne kristalne strukture. Obsežne raziskave so pokazale, da lahko vse kristalne mreže zgradimo iz sedmih različnih osnovnih celic, ki hkrati definirajo sedem kristalnih sistemov in se razlikujejo v dolžini osi in kotih med osmi [2].

Poleg osnovnih sedmih načinov razporejanja gradnikov v osnovni celici (7 osnovnih kristalnih sistemov) se lahko le-ti razporejajo še na drugačne načine. Bravais je ugotovil, da z upoštevanjem principov simetrije v osnovnih kristalnih sistemih lahko konstruira 14 kristalnih mrež, ki se po njem imenujejo Bravaisove mreže. Gradniki se lahko nahajajo še dodatno v točkah simetrije navideznih ploskev osnovnih celic in/ali telesa [2].

1.2. OSNOVE KRISTALIZACIJE IZ RAZTOPIN

1.2.1. Uvod

Do tvorbe kristalne snovi lahko pride iz taline, iz plinaste faze, iz superkričnega fluida ali iz raztopine. Večina ZU so majhne organske molekule, ki jih najpogosteje izoliramo s kristalizacijo iz raztopin, meljemo in oblikujemo v farmacevtsko obliko, kot so tablete, kapsule, aerosoli in suspenzije. Poznavanje kristalizacije je posebej pomembno v farmacevtski industriji, kjer je treba zagotoviti dober izkoristek pri izolaciji ZU s ponovljivimi lastnostmi od serije do serije. To pomeni, da lahko izdelamo delce enakih velikosti, morfologije in kristalne oblike. Na ta način se lahko izognemo formulacijskim težavam, kot sta neponovljivo tabletiranje ali biološka neekvivalenca [2].

1.2.2. Teorija kristalizacije

Kristalizacija je pomembna separacijska tehnika v mnogih proizvodnih procesih. To je proces, pri katerem iz homogene faze (plin, talina ali raztopina) nastajajo trdni delci [4]. Industrijsko najzanimivejša je kristalizacija iz raztopine. Pri kristalizaciji raztopino koncentriramo in po navadi ohlajamo, dokler ni koncentracija topljenca večja od njegove topnosti pri isti temperaturi (T). Zatem se topljenec izloči iz raztopine tako, da oblikuje kristale čistega topljenca, ker topnosti nečistot večinoma ne presežemo. Kristale, ki jih dobimo pri kristalizaciji, moramo še očistiti in obdelati [5]. Kristalizacija je nujna operacija v farmacevtski proizvodnji, saj se večina ZU proizvaja v trdni obliki. Reakcijski sistem in pogoji imajo velik vpliv na potek kristalizacije in lastnosti končnega produkta, kot so oblika kristalov, velikost in porazdelitev velikosti delcev itd. Pri kristalizaciji se v uporabljenem

mediju oblikuje nova faza kot posledica kemijske reakcije ali fizikalno-kemijske operacije, ki poteka prek dveh zaporednih faz [6]:

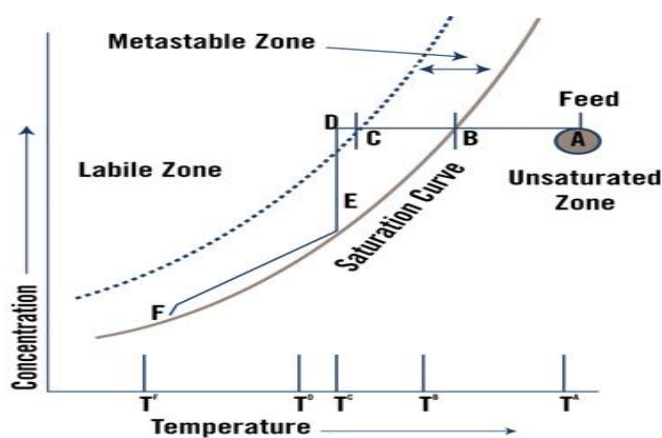
- 1) *nukleacija*,
- 2) *rast kristalov*.

1.2.2.1. Prenasičenje

Proces kristalizacije se začne z ustvarjanjem prenasičenja. Prenasičenje nam pove, za koliko v reakcijskem sistemu presegamo ravnotežno koncentracijo v idealni raztopini. Razlika v koncentracijah ravnotežne topnosti v idealni raztopini in dejanske nas privede do prenasičenja. Od prenasičenja je odvisna dinamika nukleacije in rasti kristalov. Prenasičenje lahko dosežemo na štiri načine [4]:

- z ohlajanjem raztopine,
- z izparevanjem topila,
- z dodatkom netopila in
- z reakcijo (s precipitacijo).

Pogoje, kjer se to dogaja, najbolje opišemo s faznim diagramom, ki ga predstavlja slika 2. Na sliki 2 ločimo tri območja. Stabilno območje je pod mejo topnosti (neprekinjena krivulja), kjer ni možnosti za nukleacijo ali rast kristalov. Obstoječi kristali se raztopijo. Prenasičeno metastabilno območje je območje, kjer je možna rast, ni pa spontane nukleacije, ker je energijsko zahtevnejša od rasti kristalov. To območje se nahaja med krivuljo topnosti in krivuljo, ki predstavlja mejo nukleacije. Tretje območje je nestabilno prenasičeno območje. Nukleacija v tem območju poteka spontano in hitro, prav tako tudi rast kristalov [2].



Slika 2: Topnostni diagram za kristalizacijo spojine pri različnih temperaturah [7]

Vsaka raztopina ima mejo prenasičenja, nad katero postane nestabilna. To mejo določamo z merjenjem širine metastabilnega območja predvsem na dva načina. Pri prvi metodi raztopine hitro ohladimo do določene T in merimo čas, ki je potreben za nastanek kristalov. Ko postane ta čas kratek, smo se približali meji metastabilnega območja. Pri drugi metodi raztopino ohlajamo z določeno hitrostjo in beležimo T , pri kateri začnejo nastajati prvi kristali. T , kjer se to zgodi, je odvisna od hitrosti ohlajanja. Podatki o metastabilnem območju pri določenih pogojih, kot so sestava, hitrost ohlajanja in mešanje, so pomembni, saj želimo kristalizacijo izvajati od roba metastabilnega območja. Tako je merjenje širine metastabilnega območja pri ustreznih pogojih zelo pomembno in vredno časa za njegovo določitev. Kadar kristalizacijo izvajamo pri visokem prenasičenju blizu metastabilne meje, se tvorijo majhni kristali, ki jih ne želimo, saj mašijo pore filtra med procesom izolacije kristalov [2].

Pri izolaciji ZU nas najpogosteje zanima izkoristek obarjanja (kristalizacije), tako da prenasičenje izražamo kot razliko med prenasičeno koncentracijo in ravnotežno koncentracijo. Stanje prenasičenja lahko dosežemo s povečevanjem koncentracije topljenca ali znižanjem topnosti topljenca [2].

1.2.2.2. Nukleacija

Nukleacija je proces, pri katerem se tvorijo jedra (nukleusi). Jedro je mesto ali skupek osnovnih delcev, ki so fizikalno obstojni in so od okolice ločeni s fizikalno mejo. Jedra tvorijo ioni, atomi ali molekule. Pri hitrem gibanju delcev se pogosto zgodi, da se dva združita. Začetni nukleusi so lahko nestabilni in se gradbeniki znova raztopijo v topilu. Dokler skupek sestavlja manjše število delcev, ga še ne smemo obravnavati kot zametek nove faze. Zametki imajo navadno kratko življenjsko dobo in razpadajo spet v manjše skupke ali celo v posamezne delce. Odvisno od prenasičenja raztopine pa jih nekaj le zraste in do takšne velikosti, da dosežejo termodinamsko ravnotežje z raztopino. Tak zametek imenujemo kristalno jedro. Kristalna jedra so nestabilna. Delci lahko migrirajo v raztopino ali pa se združujejo in tvorijo večji kristal. Poleg prenasičenja, ki je najpomembnejše, vplivajo na tvorbo kristalnih jeter še:

- *vnos mehanske energije,*
- *prisotnost raztopljenih nečistot,*
- *prisotnost trdnih delcev v raztopini.*

Trdni delci pospešujejo tvorbo kristalnih jeder zlasti takrat, ko imajo podobno ali celo enako kristalno mrežo kot topljenec, ki kristalizira [5, 8].

Nukleacijo kategoriziramo na primarno in sekundarno. V primeru primarne nukleacije gre za tvorbo kristalizacijskih jeder v odsotnosti trdnih delcev snovi, ki jo kristaliziramo. Sekundarna nukleacija pa zahteva prisotnost cepitvenih kristalov (t. i. semen) želene snovi. Primarno nukleacijo lahko razdelimo na homogeno in heterogeno [9, 10].

Homogena nukleacija poteka v čistih raztopinah brez vpliva kakršne koli trdne faze. Heterogena nukleacija se sproži zaradi vpliva trdnih površin v reakcijskem sistemu (pregradne stene, mešalo, prah ...) [5, 11].

1.2.2.3. Rast kristalov

Rast kristalov je proces nalaganja atomov in poteka le na zunanji ploskvi kristala. Prenos topljenca poteka iz glavne mase raztopine do kristalne ploskve, kjer se uvrsti v kristalno mrežo.

Ena od teorij, ki se ukvarja s kinetiko rasti kristalov, je model difuzijske plasti. Fazo rasti kristalov sestavljajo procesi, kot so:

- prenos snovi do difuzijske plasti okoli kristala,
- prenos snovi skozi difuzijsko plast,
- vključitev snovi v kristalno rešetko,
- odvajanje sproščene toplote s površine kristala.

Če je ob rastočem kristalu tanek mirujoč film tekočine, skozi katerega morajo molekule topljenca difundirati, je hitrost obeh procesov določena z razliko med koncentracijami na površini kristala in v raztopini [4].

1.3. POLIMORFIZEM

1.3.1. Uvod

Polimorf je opredeljen kot snov, ki lahko obstaja v vsaj dveh različnih prostorskih ureditvah v trdnem stanju, ki imata načeloma različne kemijske in fizikalne lastnosti, kot so tališče, topnost, gostota in biološka uporabnost [12].

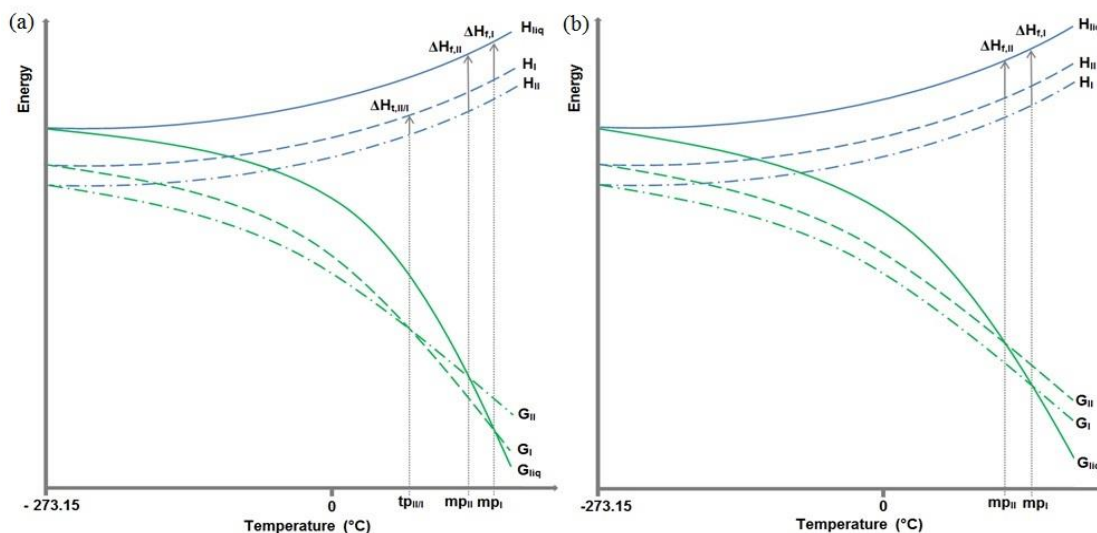
Razlike v fizikalnih lastnostih različnih trdnih snovi imajo pomemben vpliv pri proizvodnji zdravil, medtem ko imajo razlike v topnosti vpliv na absorpcijo in biološko razpoložljivost ZU [13].

Različni farmacevtski procesi med razvojem zdravil značilno vplivajo na končno kristalno obliko zdravila v farmacevtski obliki. Proces, kot sta liofilizacija in sušenje z razprševanjem, lahko vodita do nastanka amorfnе oblike ZU, ki je manj stabilna in bolj higroskopna kot kristalna oblika. Tudi procesi, kot so sušenje, mletje, mokra granulacija in kompaktiranje, lahko pospešijo različne fazne prehode pri trdnih farmacevtskih snoveh. Stopnja polimorfne konverzije je odvisna od relativne stabilnosti faz in vrste ter stopnje uporabljenih mehanskih procesov [13].

1.3.2. Vrste polimorfizma

Ugotovljeno je bilo, da so organske molekule sposobne tvoriti različne kristalne rešetke prek dveh različnih mehanizmov. Eden od teh mehanizmov je imenovan »strukturni polimorfizem« (angl. packing polymorphism) in predstavlja sisteme, v katerih se konformacijsko relativno rigidne organske molekule prek različnih intermolekularnih mehanizmov uredijo v različne kristalne ureditve. Polimorfizem je lahko tudi posledica obstoja različnih konformacij iste molekule in predstavlja konformacijski tip polimorfizma. V psevdopolimorfizmu so različni tipi kristalov posledica nastanka hidratov ali solvatov modelnih učinkovin [13].

Na podlagi razlik termodinamskih lastnosti so polimorfi klasificirani kot bodisi enantiotropi ali monotropi, odvisno od tega, ali lahko ena oblika reverzibilno prehaja v drugo. Posledično lahko polimorfni sistem razdelimo v dve kategoriji – monotropni in enantiotropni sistem. Ta razmerja so prikazana na sliki, kjer sta ponazorjena dva polimorfa (oblika I in oblika II) [13].



Slika 3: Fazni diagram odvisnosti Gibbsove proste energije (G) od temperature (T) za dimorfni (a), monotropni in (b) enantiotropni sistem [14]

V sistemu z monotrofnim prehodom je polimorfna modifikacija z višjim tališčem (A) stabilna pri vseh T , modifikacija z nižjim tališčem (B) pa je pri vseh T metastabilna. Prehod je ireverzibilen: metastabilna modifikacija prehaja v stabilno [2].

V enantiotrofnem sistemu krivulja proste energije za tekočo fazo/talino (I) seka krivulji za polimorfni modifikaciji A in B nad T prehoda (T_p) iz ene polimorfne modifikacije v drugo. Pri tem je modifikacija z nižjim tališčem (A) stabilna pod T_p , modifikacija B pa nad T_p . Prehod med polimorfni modifikacijama A in B je reverzibilen. V T_p sta topnosti obeh modifikacij enaki [2].

1.4. MEHANSKE LASTNOSTI SNOVI

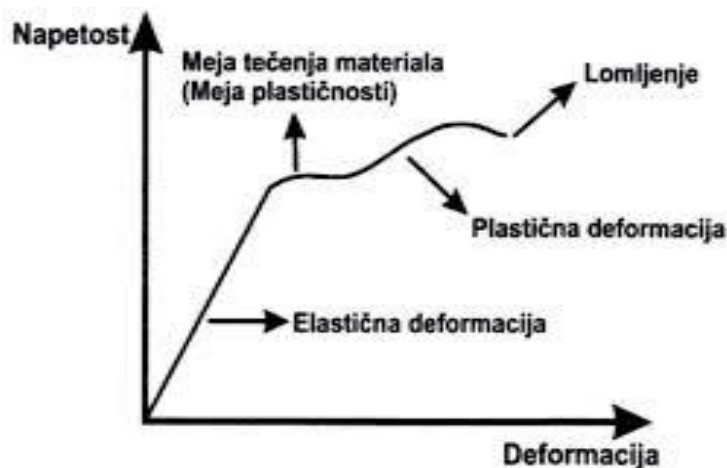
Večina organskih kristalnih spojin ima monoklinsko ali triklinsko osnovno celico in izrazito anizotropijo, zaradi česar lahko preferenčna orientacija kristalov med procesom tabletiranja značilno vpliva (negativno ali pozitivno) na stisljivost prahu. Večino organskih kristalov lahko kategoriziramo kot krhke (angl. brittle), upogibajoče se (angl. bending) in plastične (angl. plastic shearing). Elastične in plastične lastnosti kristalov so posledica prisotnosti vodikovih (elastičen karakter) in van Der Waalsovih vezi (plastičen karakter) [15].

Mehanske lastnosti snovi predstavljajo obnašanje snovi pod vplivom obremenitve. Razdelimo jih lahko v elastičnost, plastičnost in lomljenje. Na sliki 4 je z diagramom napetost – deformacija predstavljen potek mehanskih sprememb v snovi pod vplivom obremenitve. Pri nizkih obremenitvah deformacija materiala narašča premosorazmerno z napetostjo. Če v tem

območju vzorec razbremenimo, deformacija v celoti izgine oziroma se material vrne v izhodiščno stanje (npr. oblika ali lega materiala). To območje imenujemo območje elastične deformacije in zanj velja Hookov zakon [15]:

$$\frac{F}{S} = E \cdot \frac{\Delta l}{l} \quad (\text{enačba 1})$$

kjer (F/S) predstavlja obremenitev materiala (tlak), ($\Delta l/l$) deformacijo materiala (raztezek, skrčec) in E predstavlja modul elastičnosti (prožnostna konstanta) oziroma Youngov modul. Youngov modul lahko določimo iz naklona linearnega dela diagrama. Nad mejo plastičnosti (meja tečenja) se materiali začnejo plastično deformirati, kar pomeni, da se ob razbremenitvi material ne vrne več v prvotno stanje. Ob nadaljnjem povečevanju obremenitve se lahko pojavi tudi lomljenje materiala oziroma fragmentacija [15].



Slika 4: Krivulja napetosti/deformacija [15]

Dodatno pa lahko plastičnost materiala ovrednotimo s trdnostjo. Plastičnost snovi je lahko posledica ireverzibilnega drsenja, dvojčenja ali lezenja molekularnih plasti. Različni načini kristalne ureditve vodikovih vezi določajo način drsenja plasti (angl. slipping) pod vplivom sile. V primeru plastovite strukture kristalov lahko drsenje nastane med mrežami vodikovih vezi, s katerimi so ravnine medsebojno povezane. Kljub 2D-plastoviti strukturi imajo lahko kristali različne stopnje plastičnosti. Tenki 2D-plastoviti kristali imajo močne vodikove vezi znotraj plasti in šibke ter nespecifične interakcije med plastmi, ki pospešijo plastično deformacijo. Na drugi strani imajo debeli 2D-plastoviti kristali šibke in specifične interakcije med plastmi in močnejše vezi znotraj kristalnih ravnin, kar se kaže v nižji plastičnosti (značilna ureditev za upogibajoče se kristale). Premrežene strukture v vseh smereh so značilne

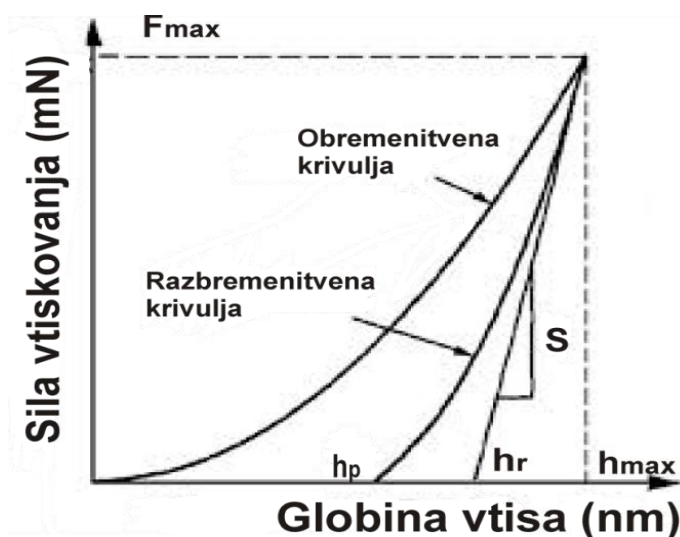
za krhke kristale. Zaradi kristalnega pakiranja »zig-zag« je drsenje plasti omejeno in se kristali običajno lomijo z visoko stopnjo elastične relaksacije [16].

1.5. INSTRUMENTALNO NANOVTISKOVANJE (NANOINDENTACIJA)

1.5.1. Uvod

Princip merjenja temelji na kontroliranem (območje μN – mN) vtiskovanju konice v preiskovani material. Osnovni rezultat, ki ga dobimo, predstavlja graf obremenitve (sile) v odvisnosti od globine vtisa (slika 5). Obremenitvena krivulja izraža elastično in plastično deformacijo, medtem ko pri razbremenjevanju nastane elastična relaksacija vtisa [17].

Cikel nanovtiskovanja se začne s približevanjem konice, dokler ta ne zazna površine vzorca na osnovi nastavljene vrednosti togosti stika. Nato se prične kontrolirano vtiskovanje konice v vzorec, ki se ustavi ob doseženi maksimalni sili ali globini deformacije (različna načina merjenja). Pri maksimalni obremenitvi konica zastane nekaj sekund v materialu (običajno 10 sekund) zaradi izključitve časovno odvisne plastične deformacije v razbremenitveni fazi. V tej fazi je možno določiti stopnjo lezenja materiala (plastičnega toka ob konstantni sili). Nato nastopi kontrolirana dekompresija vzorca in konica se vrne v začetni položaj [18].

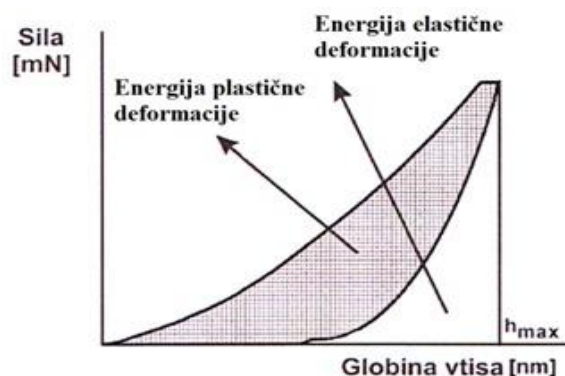


Slika 5: Shematski prikaz obremenitve v odvisnosti od globine vtisa [18]

Na podlagi analize *krivulje obremenitev/globina vtisa* in z upoštevanjem geometrije konice (največkrat se uporablja tristrana diamantna prizma po *Berkovichu*) lahko pridobimo naslednje fizikalne količine: *vtisno trdnost* (H), *Youngov modul* (E) in *elastično ter plastično energijo*. *Togost* (S) pri klasičnem postopku vtiskovanja določimo iz naklona razbremenitvene

krivulje. Najpogostejši model, ki se uporablja za izračun E , predstavlja Oliver-Pharrova teorija [18].

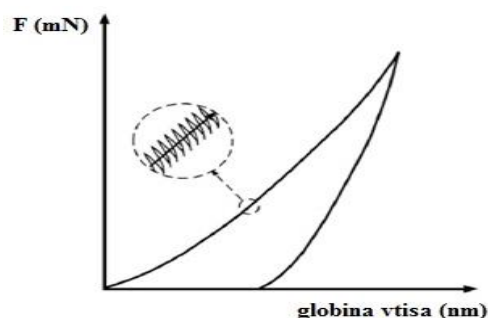
Integrirana površina med obremenitveno in razbremenitveno krivuljo na grafu *obremenitev/globina vtisa* (slika 6) nam predstavlja energijo plastične deformacije, površina pod razbremenitveno krivuljo pa energijo elastične deformacije [18].



Slika 6: Vsota elastične in plastične energije pri deformaciji materiala [19]

1.5.2. Tehnika kontinuiranega merjenja togosti

Nanoindenter G200 (Agilent Technologies, ZDA) nam omogoča tudi uporabo tehnike kontinuiranega merjenja togosti (angl. continuous stiffness measurement – CSM). CSM je izboljšava klasičnega postopka nanoindentacije, saj nam omogoča kontinuirano merjenje odvisnosti E in H od globine vtisa tekom procesa obremenjevanja materiala. To dosežemo z dinamičnim nihanjem sile v obremenitvenem ciklu. Pri vsaki določeni globini vtisa merimo fazni zamik (slika 7). Pri naših poskusih smo uporabili konico DCM (angl. dynamic contact mechanics), ki zagotavlja boljšo ločljivost pri višji frekvenci osciliranja (75 Hz) in je minimalno občutljiva na vpliv vibracij iz okolja. DCM-igla ima maso 150 mg in se uporablja za natančno določanje mehanskih lastnosti na nanometrskem nivoju [20].



Slika 7: Prikaz modificirane CSM-metode nanoindentacije – sila v odvisnosti od globine vtisa

[20]

Vrednosti mehanskih parametrov E in H pridobimo s pomočjo spodnjih izračunov:

$$K = (S^{-1} + K_f^{-1}) + K_s \quad (\text{enačba 2})$$

K – togost stika konice s površino vzorca

K_f – togost ogrodja nanoindenterja

K_s – togost blažilnih vzmeti

Togost vzorca (S) in dušenje ob kontaktu ($D_s \cdot \omega$) sta podana z enačbama 3 in 4:

$$S = \left(\frac{1}{\frac{P_0}{z_0} \cos \Theta - (K_s - m\omega^2)} - \frac{1}{K_f} \right)^{-1} \quad (\text{enačba 3})$$

$$D_s \cdot \omega = \frac{F_0}{z_0} \sin \Theta - D_i \cdot \omega \quad (\text{enačba 4})$$

Pred meritvijo nastavimo vrednost vzbujevalne frekvence (ω). Med meritvijo izmerimo amplitudo vzbujanja (F_0), premik amplitude (z_0) in spremembo faznega osciliranja (Θ). Faktorji dušenja D_i , K_s , K_f in m pa so parametri aparature, ki jih določi proizvajalec [20].

E (elastični modul) vzorca izračunamo iz enačbe 5:

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

E_i – elastični modul indenterja (za diamantni tip: $E_i = 1141$ GPa)

ν_i – Poissonovo razmerje indenterja (za diamantni tip: $\nu_i = 0,07$)

Reducirajoči elastični modul (E_r) je podan z enačbo 6.

$$E_r = \frac{\sqrt{\pi}}{2\beta} \cdot \frac{S}{\sqrt{A_c}} \quad (\text{enačba 6})$$

A_c je projicirana kontaktna površina, β je konstanta, ki je odvisna od geometrije indenterja. A_c je določena s pomočjo enačbe 8 [19].

$$A = f(h_c) \quad (\text{enačba 7})$$

$$h_c = h_{\max} - \varepsilon \left(\frac{P_{\max}}{S} \right) \quad (\text{enačba 8})$$

Iz razmerja sile (P) in projicirane kontaktne površine (A_c) izračunamo vtisno trdnost (H) [19].

$$H = \frac{P}{A_c} \quad (\text{enačba 9})$$

1.6. TOLBUTAMID

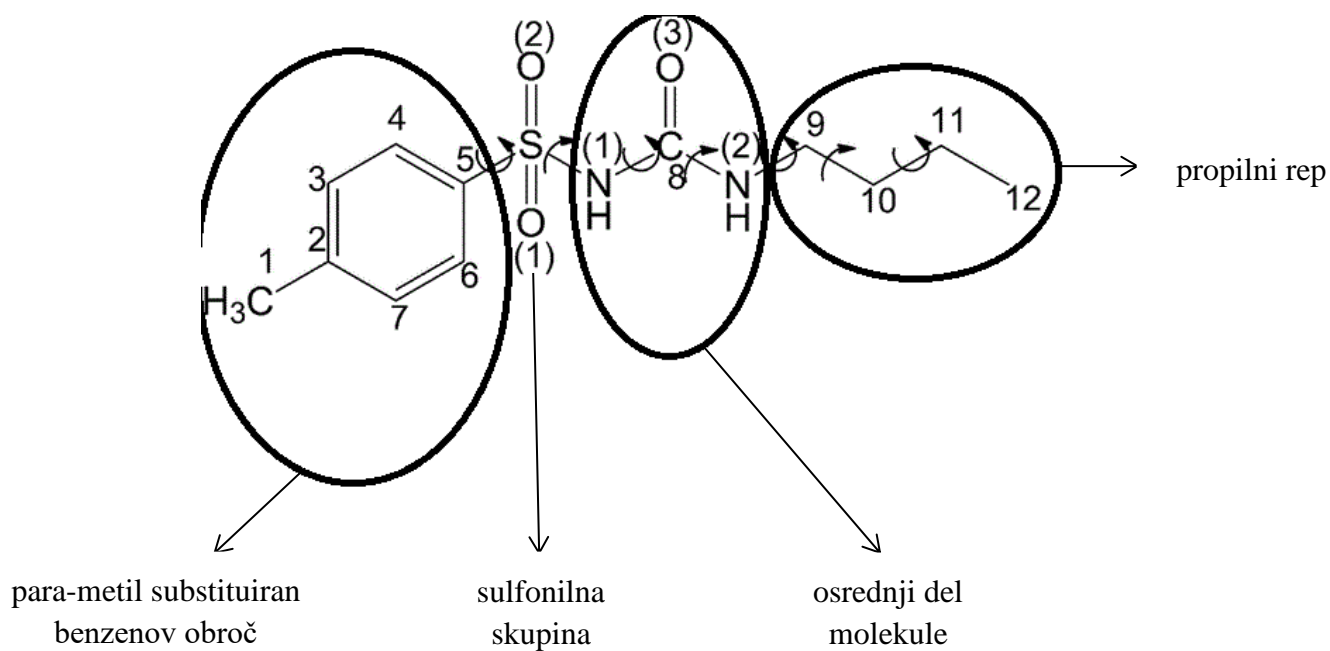
1.6.1. Mehanizem delovanja zdravilne učinkovine

Tolbutamid (1-butyl-3-(4-methylphenylsulphonyl) urea, TB) je sulfonilsečninski peroralni antidiabetik 1. generacije, ki se uporablja za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. TB stimulira izločanje inzulina iz pankreasa (trebušna slinavka). Je strukturno podoben acetoheksamidu, klorpropamidu in tolazamidu. Zdravila v tem razredu se med seboj razlikujejo po odmerku, hitrosti absorpcije, trajanju delovanja, mestu izločanja in vezavnem mestu na njihovem tarčnem receptorju β celic trebušne slinavke. Sulfonilsečninski antidiabetiki tudi zvišujejo raven glukoze, zmanjšujejo jetrno glukoneogenezo in lahko povečajo število in občutljivost inzulinskih receptorjev. Zaradi svojega mehanizma delovanja, sulfonilsečnine lahko povzročijo hipoglikemijo, kar lahko zahteva dosleden vnos hrane za zmanjšanje tega tveganja. Tveganje za hipoglikemijo je večje pri starostnikih, pri oslabelih in podhranjenih posameznikih. TB se metabolizira v jetrih. TB in njegovi presnovki se izločajo z urinom (75–85 %) in z blatom [21].

TB se v obliki tablete trži pod blagovno znamko Orinase® [21].

1.6.2. Kristalna morfologija in polimorfizem zdravilne učinkovine

Kemijska struktura TB je prikazana na sliki 8. TB obstaja v 4 polimorfnih oblikah, ki imajo T tališča pri 127, 117, 106 in 88 °C. Polimorfne oblike TB se medsebojno razlikujejo po svojih fizikalno-kemijskih lastnostih (morfologija kristalov, topnost, stabilnosti). Za TB je značilen konformacijski polimorfizem kot posledica različne prostorske ureditve benzilne skupine in propilnega repa glede na ravnino S-N1-C8-N2-C9. Vrstni red stabilnosti polimorfnih oblik je sledeč: oblika I > oblika III > oblika II > oblika IV, pri čemer je oblika I najbolj stabilna oblika pri sobnih pogojih. Vendar pa obstaja nekaj pomislekov glede stabilnosti polimorfov pri sobnih pogojih. Poleg tega strukturni izvor polimorfizma pri TB ni znan, kar je dosledno za pojasnitev notranje ureditve molekule TB v kristalnih strukturah različnih polimorfov [22].



kemijska formula: $C_{12} H_{18} N_2 O_3 S$

Slika 8: Strukturna formula zdravilne učinkovine TB [22]

Polimorfne oblike I–III lahko pridobimo s postopkom kristalizacije iz raztopine, medtem ko obliko IV s sušenjem in razprševanjem (angl. spray drying) [22].

2. NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo ovrednotili vpliv konformacijskega polimorfizma izbrane ZU tolbutamida na mehanske lastnosti orientiranih in posameznih kristalov oblik I in III. Obnašanje pripravljenih polimorfni oblik pod vplivom sile bomo ovrednotili z metodo instrumentalnega nanovtiskovanja. Deformacijske lastnosti bomo določili s pomočjo Youngovega modula (E , merilo elastičnosti), vtisne trdnosti (H , merilo plastičnosti) in meje plastičnosti (P_y).

Praktično uporabnost nanoindentacijskih rezultatov bomo ocenili na osnovi kompatibilnosti TB-praškov oblik I in III. Za to bomo pripravili dvokomponentne zmesi ZU in drsila (magnezijev stearat) ter jih stisnili na tabletirki pri naraščajočih tlakih stiskanja. Na osnovi rezultatov (kompatibilnostni indeks) bomo ugotovili, katera polimorfna oblika ima najustreznejše lastnosti za proces tabletiranja. Namen bo prikazati odvisnost med parametri procesa tabletiranja, mehanskimi lastnostmi tablet na eni strani in nanometrskimi, lokalnimi deformacijskimi lastnostmi konformacijskih polimorfov tolbutamida.

V prvem delu magistrske naloge bomo pripravili polimorfne oblike TB s pomočjo kristalizacije iz raztopine ob uporabi različnih topil oziroma z obarjanjem kristalov z dodatkom netopila.

Za identifikacijo polimorfni oblik TB bomo uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in X-žarkovno kristalografijo na posameznem kristalu.

3. MATERIALI in METODE

3.1. MATERIALI

❖ **Uporabljena zdravilna učinkovina:**

- *tolbutamid, ≥ 99 %, Sigma – Aldrich, Nemčija.*

❖ **Uporabljena topila:**

- *acetonitril, ≥ 99,9 %, J. T. Baker, ZDA,*
- *etanol, Ph. Eur. 5th, (96 %), Kefolab, Slovenija,*
- *diklormetan, ≥ 99,8 %, EMSURE[®], Merck, ZDA.*

❖ **Ostale uporabljene snovi:**

- *medij za dispergiranje: prečiščena voda,*
- *površinsko aktivna snov: Tween[®] 20, Sigma – Aldrich, Nemčija,*
- *antiadheziv: magnezijev stearat, Mg(C₁₈H₃₅O₂)₂, Lex, d. o. o., Slovenija.*

3.2. NAPRAVE

❖ **Uporabljene naprave:**

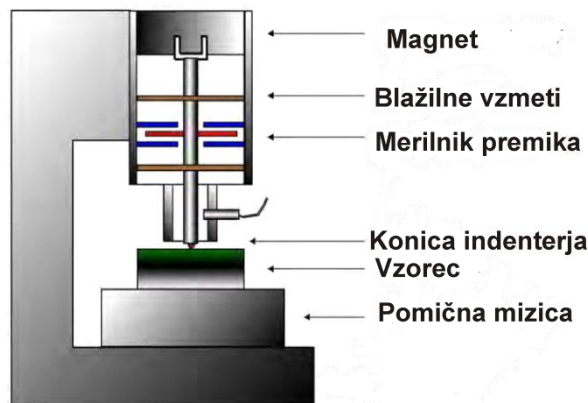
- *laboratorijska steklovina (čase, merilni valji, buče, hladilnik za kondenzacijo par, petrijevke),*
- *filter papir, Sartorius stedim, grade: 388,*
- *tehtnica, Sartorius BP1200, Nemčija,*
- *analitska tehtnica, Sartorius AX224, Nemčija,*
- *magnetno mešalo, IKA, Nemčija,*
- *laboratorijski sušilnik SP - 45, Kambič laboratorijska oprema, Slovenija,*
- *analitska tehtnica Mettler Toledo A6245, Švica,*
- *diferenčni dinamični kalorimeter Mettler Toledo DSC 1 Star[®], Švica,*
- *laserski difraktometer, Mastersizer S, Malvern, Velika Britanija,*
- *nanoindenter, Agilent G2000, ZDA,*
- *ročna hidravlična stiskalnica, Graseby Specac, Velika Britanija,*
- *naprava za merjenje stičnega kota, Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRUSS, Nemčija,*
- *hidravlična tabletirka na udarec, Killian SP 3000, IMA, Nemčija,*
- *naprava za določanje trdnosti tablet, Tablet hardness tester VK 200, Vanderkamp, ZDA,*
- *kljunasto merilo z okroglim prikazovalnikom, Horex, Nemčija.*

3.3. METODE

3.3.1. Instrumentalna nanoindentacija

Mehanske lastnosti (E in H) polimorfnih oblik TB smo vrednotili z instrumentalno nanoindentacijo, pri čemer smo uporabili tehniko kontinuiranega merjenja togosti (angl. continuous stiffness measurement, CSM) [19].

Kot osrednji instrument, ki omogoča nanoindentacijske meritve, je nanoindenter. Bistveni sestavni deli nanoindenterja so visokoločljivostni generator sile, ki omogoča kontrolirano približevanje oziroma vtiskovanje konice indenterja v material, konica indenterja in visokoločljivostni senzor, ki meri globino vtisa v materialu (slika 9). Obstaja več konic, ki se med seboj razlikujejo po obliki in namenu uporabe. Največkrat se uporablja Berkovicheva konica, ki je tristrana diamantna prizma.



Slika 9: Shematski prikaz nanoindenterja [23]

Tipičen rezultat meritve je predstavljen z grafom odvisnosti sile od globine vtisa (slika 5).

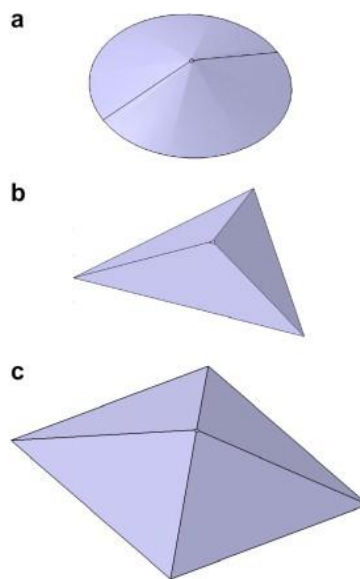
Princip delovanja nanoindenterja temelji na kontrolirani elektromagnetni obremenitvi konice, ki jo dovajamo proti preiskovanemu vzorcu s pomočjo magneta in navitja nad nanoindenterjem. Naprava nam omogoča natančen nadzor obremenitve in merjenje sile. Merilno območje sile je od 10 nN (10^{-9} Newtonov) do 10 N [24].

Osnovni princip merjenja vključuje naslednje korake [25]:

- 1) konica indenterja se približa k površini vzorca, dokler ne pride do kontakta (konica indenterja zaznava površino z vnaprej določeno togostjo stika);

- 2) kontrolirana kompresija vzorca do predvidene maksimalne sile ali globine deformacije;
- 3) določitev lezenja materiala pri maksimalni sili (konica indenterja stoji v materialu 10 s);
- 4) kontrolirana dekompresija vzorca (cikel razbremenjevanja).

Najpogostejši tip konice, ki se uporablja pri merjenju, je Berkovichev. Konice so običajno izdelane iz diamanta, saj je to material z visoko trdnostjo, toplotno prevodnostjo in kemično inertnostjo. Različni tipi konic so predstavljeni na sliki 10 [25].



Slika 10: Geometrija konic indenterjev: (a) stožčasta oblika, (b) Berkovichev indenter (tristrana piramida), (c) Vickersov indenter (štiristrana piramida) [26]

Pri naših meritvah smo uporabili DCM-CSM-tehniko nanoindentacije.

Dinamično merjenje stika (angl. *dynamic contact measurement, DCM*) omogoča karakterizacijo mehanskih lastnosti pri ultranizkih obremenitvah (maksimalna obremenitev: 10 mN). Ta možnost je izboljšala ločljivost pri določitvi dejansko dosežene sile (ločljivost obremenitve: 1 nN) in globine vtisa (ločljivost globine vtisa: 0,0002 nm) [25].

Kontinuirano merjenje togosti (CSM) je ena izmed izboljšav klasičnega postopka nanovtiskovanja. Pri tej tehniki kontinuirano merimo globino, medtem ko vzorec obremenjujemo z manjšim dinamičnim nihanjem signala sile in merimo fazni zamik pri vsaki določeni globini vtisa (najpogosteje na vsaka 2 nm). Tako lahko s pomočjo CSM-tehnik

določamo E in H iz obremenitvene krivulje in kot funkcijo globine vtisa. Opisana tehnika nam ponuja 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 obremenitvene krivulje, 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 nanovtiskovanjem [19].

Enačbe izračuna E in H so predstavljene v uvodnem poglavju 1.5.2. (enačbi 5 in 9).

Deformacijske lastnosti kristalov smo ovrednotili s pomočjo parametra meje plastičnosti (angl. yield pressure, P_y) in tudi njegovega razmerja s H in E . Vrednosti P_y dobimo z uporabo enačbe 10 [27]:

$$\frac{H}{P_y} = 0,07 + 0,6 \ln \frac{E}{P_y} \quad (\text{enačba 10})$$

Meja plastičnosti materiala označuje najnižji tlak, pri katerem se material začne plastično deformirati. S pomočjo P_y lahko materiale razdelimo na žilave (nizek P_y : izrazita površina pod obremenitveno krivuljo) in krhke (visok P_y : minimalna površina pod obremenitveno krivuljo, ki jo spremlja lom oziroma fragmentacija materiala) [27].

3.3.2. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. differential scanning calorimetry, DSC) je eksperimentalna analizna tehnika za merjenje količine energije (toplote), ki jo vzorec porabi ali sprosti, medtem ko ga segrevamo, ohlajamo ali vzdržujemo pri nadzorovanem temperaturnem režimu. Meritve temeljijo na ohranjanju temperaturnega razmerja med lončkom z vzorcem in referenčnim lončkom brez vzorca. Do spremembe v toplotnem toku pride zaradi termičnih efektov, pri katerih se toplota sprošča (eksotermna reakcija, npr. gorenje, rekristalizacija) ali porablja (endotermna reakcija, npr. taljenje kristalov ZU). Integracija površine pod krivuljo je energija, ki se v procesu sprosti ali porabi in jo izrazimo kot spremembo entalpije (ΔH). Rezultat termične analize je diagram toplotnega toka v odvisnosti od temperature, ki ga imenujemo termogram. Na podlagi zaznanih termičnih efektov in sprememb entalpij je mogoče okarakterizirati obnašanje vzorca med segrevanjem in ohlajanjem [28].

V farmacevtski industriji DSC največkrat uporabljamo za študij polimorfizma ZU, identifikacijo polimorfov in spremljanje faznih prehodov ter za detekcijo amorfnega stanja v snovi (določanje T steklastega prehoda) [28].

3.3.3. X-žarkovna difraktometrija posameznih kristalov (SCXRD)

X-žarkovna difraktometrija posameznih kristalov (angl. Single Crystal X-Ray Diffraction, SCXRD) je metoda za orientacijo in identifikacijo kristalne celice različnih kristalnih struktur. Temelji na periodični urejenosti kristalov ter sipanju in interferenci rentgenskih žarkov na teh periodičnih strukturah [29].

Pri rentgenski difrakciji uporabljamo rentgenske žarke, ki so elektromagnetno valovanje z valovno dolžino običajno med 0,5 in 2,5 Å. Fotoni teh žarkov padejo na kristal, na različne načine interagirajo z elektroni in se med drugim tudi sipajo na njih. Zaradi periodičnosti kristala med sipanjem pride do interferenc. V določenih smereh pride do ojačitve, v drugih smereh pa do oslabitve elastičnih sipanih žarkov.

Pri dani valovni dolžini λ dobimo iz ene družine kristalnih ravnin natanko en uklon pri kotu 2θ , ta kot pa je enolično določen z valovno dolžino in d_{hkl} . Kristal mora biti orientiran tako, da primarni žarek pada na družino kristalnih ravnin pod kotom θ (le-ta je določen z d_{hkl} te družine ravnin). To je Braggov pogoj (grafična predstavitev je na sliki 11) [29, 30].

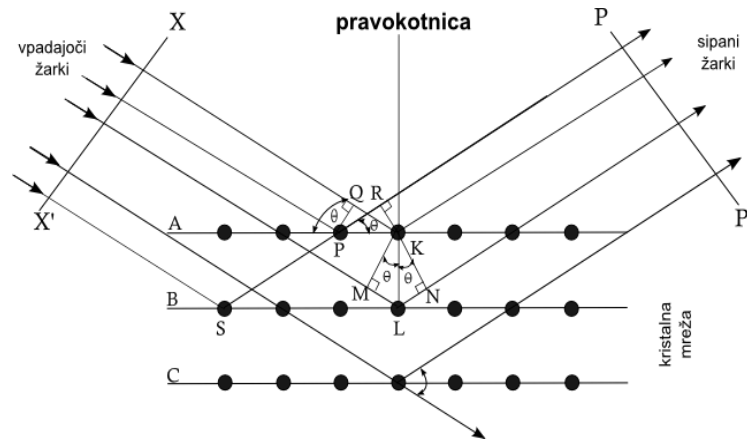
$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin \Theta \quad (\text{enačba 11})$$

kjer je:

λ – valovna dolžina rentgenskih žarkov,

n – celo število in

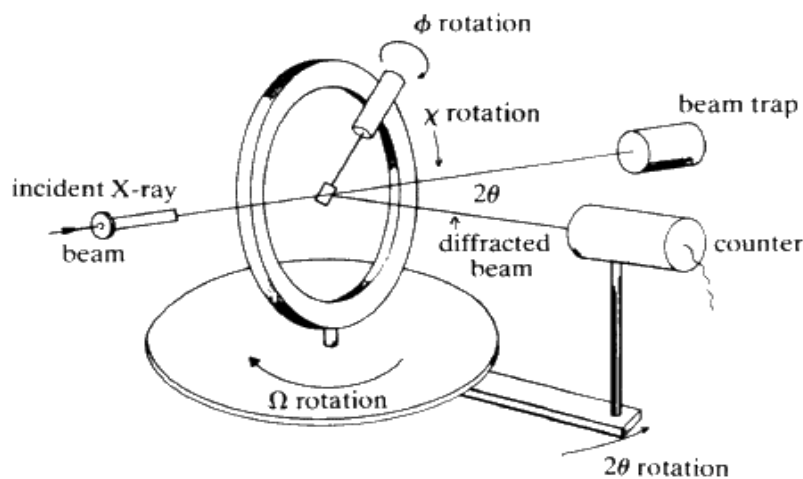
d – razdalja med ravninami v kristalni mreži.



Slika 11: Geometrija Braggove enačbe (d je razdalja med plastmi, θ je kot uklona) [32]

Monokristalni difraktometer je tako kot difraktometer za rentgensko praškovno difrakcijo sestavljen iz rentgenske cevi, nosilca vzorca in detektorja. Za monokristalno rentgensko difrakcijo uporabljamo monokromatske rentgenske žarke, pridobljene ob izbujanju elektronov iz K-lupine ($K_{\alpha 1}$ in $K_{\alpha 2}$). Valovna dolžina rentgenskih žarkov je odvisna le od anodnega materiala, ki je pri SCXRD najbolj pogosto Mo z valovno dolžino $K_{\alpha} = 0,7107 \text{ \AA}$, redkeje pa tudi Cu z valovno dolžino $K_{\alpha} = 1,5419 \text{ \AA}$. Na sliki 12 je shematsko prikazan monokristalni difraktometer s štirimi gniometriskimi glavami. Te štiri glave predstavljajo štiri kote (2Θ , χ , Φ , Ω), ki definirajo razmerje med kristalno mrežo, primarnim žarkom in detektorjem [33].

Za SCXRD so primerni le nepoškodovani, optično čisti kristali dimenzij 150–250 μm . Za analizo lahko uporabimo tudi lomljene delce večjega monokristala [33].

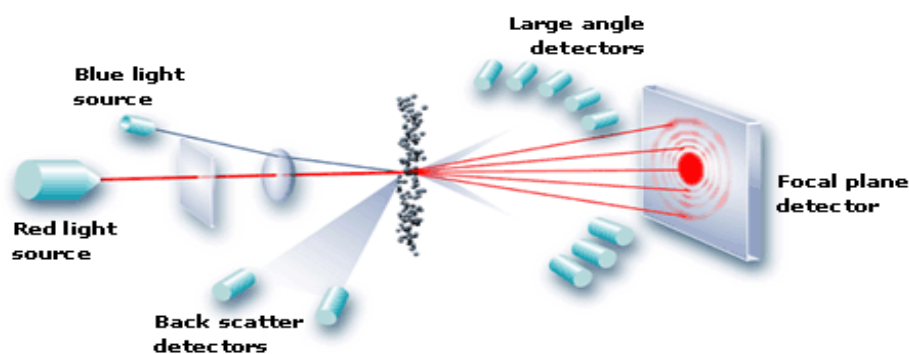


Slika 12: Shematski prikaz zgradbe monokristalnega difraktometra [33]

3.3.4. Laserska difrakcija (LD)

Laserska difrakcija (LD) je danes široko uporabljena metoda za določevanje velikosti delcev in omogoča merjenje velikosti delcev v različnih farmacevtskih oblikah (praški, pršila, suspenzije, emulzije) odvisno od uporabljene opreme. Primerna je za merjenje širokega razpona velikosti delcev (0,02–3500 μm) in majhnih količin vzorca (nekaj mg do nekaj g). Instrumenti omogočajo merjenje samih praškastih substanc v toku zraka (metoda »dry«) ali substanc, dispergiranih v vodnih ali nevodnih medijih, oziroma topil (metoda »wet«). Sistem klasičnega instrumenta sestavlja (slika 13) [34]:

- laser kot izvor monokromatske svetlobe (rdeča He – Ne svetloba z $\lambda = 638 \text{ nm}$ za delce, večje od 1 μm , in modra svetloba z $\lambda = 466 \text{ nm}$ za delce, manjše od 1 μm);
- pretočna celica (enota za pripravo vzorca), kjer skozi vzorec potuje laserski žarek;
- sistem optike in detektor – ploščica iz svetlobno občutljivega silicija, na kateri je več manjših detektorjev (optimalno od 16 do 32), ki pretvorijo svetlobni signal v električnega;
- osrednji (centralni) detektor, ki na podlagi razlike med izmerjeno največjo intenziteto laserskega žarka in intenziteto svetlobe, ki so jo sipali delci, izračuna optično koncentracijo delcev (angl. obscuration).



Slika 13: Shema instrumenta LD [35]

Osnovni princip merjenja velikosti delcev z LD temelji na predpostavki, da so delci sfere. Pri LD se vpadni žarek valovne dolžine 638 nm (rdeča svetloba) oziroma 466 nm (modra svetloba) na površini delca razprši pod različnimi koti. Pri večjih delcih je kot sipanja manjši, medtem ko je pri manjših laserska svetloba bolj razpršena (večji koti, manjša intenziteta svetlobe) [34]. Sipanje svetlobe pri nižji valovni dolžini je bolj intenzivno kot pri višji, saj je intenziteta sipane svetlobe premo sorazmerna s šesto potenco velikosti delca in obratno sorazmerna s četrto potenco valovne dolžine [36]. Razpršeni vzorci svetlobe, ki jih zaznajo

detektorji, se nato prek optično-matematičnega modela pretvorijo v volumsko porazdelitev [36].

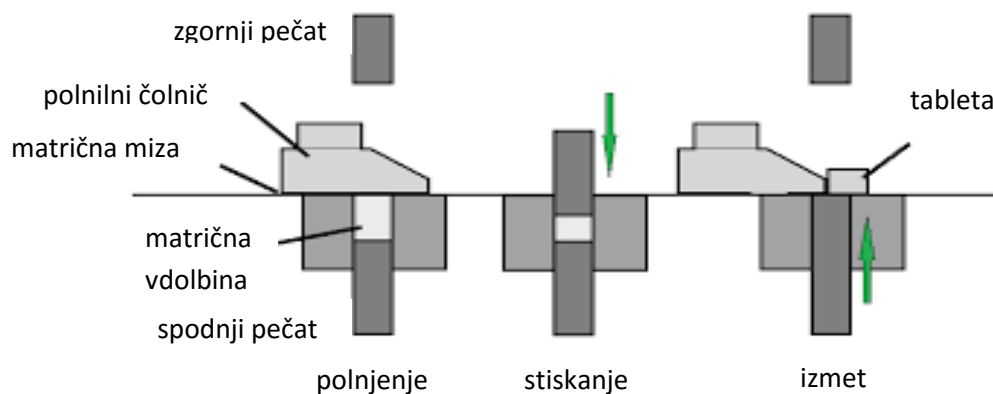
Kot vsaka druga analizna tehnika pa ima tudi LD svoje omejitve. Pri analizi velikosti in porazdelitvi velikosti delcev je za zagotovitev kakovostnih rezultatov zelo pomembno, da je vzorčenje vzorca za analizo reprezentativno, kar je opazno predvsem pri vzorcih, ki vsebujejo delce, večje od 70 μm . Večji delci namreč zavzamejo večji volumen v primerjavi z manjšimi (en 100 μm delec zavzame enak volumen kot milijon 1 μm delcev in tako poda enak odziv na detektorju), kar ima lahko za posledico velika odstopanja v rezultatih [36].

Na natančnost rezultatov pa odločilno vpliva ustrezna izbira disperznega medija in koncentracija vzorca oziroma merjenih trdnih delcev v disperznem mediju. Pri t. i. »mokrih« metodah je ključna izbira optimalnega medija/topila, v katerem delci dispergirane substance ne smejo med analizo raztapljati oziroma obarjati. Pomembna je tudi koncentracija vzorca, ki ne sme biti previsoka, da med meritvijo ne pride do večkratnega razprševanja svetlobe (angl. multiple scattering), kar ima za posledico lažen pomik rezultatov k nižjim vrednostim [37].

3.3.5. *Direktno tabletiranje*

Tablete pripravimo tako, da osnovne delce praška s stiskanjem prisilimo v takšno bližino, da med njimi pride do povezave v porozno, trdno obliko z definirano geometrijo. Proces stiskanja tablet na tabletirki na udarec lahko razdelimo na tri stopnje [38]:

- 1) polnjenje matrične vdolbine: v tej fazi je spodnji pečat v najnižjem položaju in s tem določa volumen zmesi v matrični vdolbini, kar posledično določi maso tablete. Polnjenje matrične vdolbine je volumetrično, kar pomeni, da za zagotavljanje enakomerne mase tablet potrebujemo dobro pretočno zmes za tabletiranje;
- 2) stiskanje tablet: v tej fazi se zgornji pečat spusti in vstopi v matrično vdolbino, kjer stiska prašek, dokler ne nastane tableta. Med fazo stiskanja lahko spodnji pečat miruje ali pa se pomika navzgor. Ko dosežemo nastavljeno silo stiskanja, ki smo jo določili z hodom zgornjega pečata, se zgornji pečat začne odmikati in sledi dekompresijska faza;
- 3) izmet tablete: do izmeta tablete pride zaradi pomikanja spodnjega pečata, ki se pomakne do zgornjega nivoja matrične vdolbine. Tableto nato odstranimo z matrične mizice tabletirke s pomočjo posnemala, s čimer je proces tabletiranja zaključen.



Slika 14: Stopnje stiskanja tablet na tabletirki na udarec [39]

Na izbiro načina priprave zmesi za tabletiranje vplivajo lastnosti ZU in način sproščanja, ki ga želimo doseči. Glede na izbran postopek prilagodimo izbiro pomožnih snovi. Zmes za tabletiranje lahko pripravimo na tri različne načine, in sicer [40]:

1. *direktno tabletiranje,*
2. *tabletiranje z vlažnim granuliranjem,*
3. *tabletiranje s suhim granuliranjem.*

Na splošno metoda direktnega tabletiranja vključuje neposredno stiskanje tabletirne zmesi brez koraka granulacije pod pogojem, da mora imeti zmes za tabletiranje ustrezne pretočne lastnosti in stisljivost [41].

Prednosti direktnega tabletiranja so [42]:

- manjše število operacij od izhodnega do končnega izdelka (nižji stroški),
- manjše težave s stabilnostjo (v primeru termolabilnih in na vlago občutljivih ZU).

Slabosti direktnega tabletiranja so [41]:

- razslojevanje oz. segregacija,
- nizek dilucijski potencial (najvišja količina ZU, ki jo še lahko stisnemo v tableto),
- majhna nasipna gostota (tablete so lahko po stiskanju pretanke),
- enakomernost vsebnosti je v večini primerov kritičen parameter (slabe pretočne lastnosti).

3.3.6. Kompatibilnost

Kompatibilnost praškastih materialov pomeni njihovo sposobnost, da tvorijo koherentne, močne kompakte (tablete) [42].

Kompatibilnost zmesi za tabletiranje vrednotimo s kompatibilnostnim profilom (slika 15). Gre za odvisnost natezne trdnosti tablet od tlaka stiskanja tablet (enačba 12). Iz tega diagrama je možno izračunati naklon premice (C_p), ki predstavlja merilo kompatibilnosti zmesi za tabletiranje. Večja kot je vrednost naklona, bolj kompatibilna je zmes za tabletiranje (43).

$$\sigma = C_p \times P + b \quad (\text{enačba 12})$$

σ natezna trdnost [MPa ali N/mm²]

C_p konstanta kompatibilnostnega diagrama

P tlak stiskanja tablete [MPa]

b konstanta, dobljena iz presečišča ekstrapoliranega dela premice z ordinato



Slika 15: Kompatibilnostni diagram (I) zmesi (II – krivulja v primeru laminacije ali tvorbe kopic) [44]

Za izračun natezne trdnosti okroglih tablet z ravnimi ploskvami uporabljamo sledečo enačbo [45]:

$$\sigma = \frac{2 \cdot F}{\pi \cdot d \cdot h} \quad (17)$$

σ natezna trdnost tablet [N/mm² ali MPa]

F sila, potrebna za lom tablete (trdnost tablete) [N]

d premer tablete [mm]

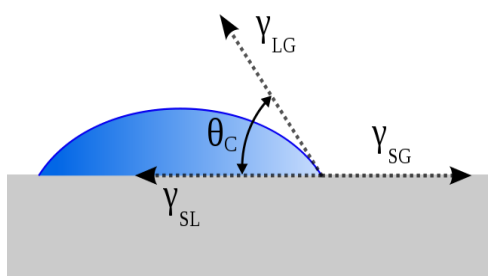
h debelina tablete [mm]

3.3.7. Močljivost in določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice

Močljivost je definirana kot sposobnost tekočine, da se razprostira po površini trdne ali tekoče snovi, ki v njej ni topna oziroma se z njo ne meša [46].

Merilo za močljivost trdnih snovi je stični kot oziroma kot močenja (θ), ki ga geometrijsko opišemo s tangento na površino kapljevine ob stiku s trdno snovjo. Stični kot lahko zavzame vrednosti med 0° in 180° . Pri 0° kapljevina popolnoma moči trdno snov, pri 180° pa pride do popolnega nemočenja [46].

Na sliki 16 so predstavljene sile, ki delujejo na kapljico tekočine na površini trdne snovi. Površinska energija trdne snovi (γ_{SG}) povzroča razprostiranje kapljice, temu procesu pa nasprotujeta medfazna energija med trdno snovjo in tekočino (γ_{SL}) ter komponenta površinske napetosti tekočine ($\gamma_{LG} \cdot \cos\theta$) [46].



Slika 16: Ravnovesje sil, ki jim je izpostavljena kapljica tekočine po nanosu na trdno površino [47]

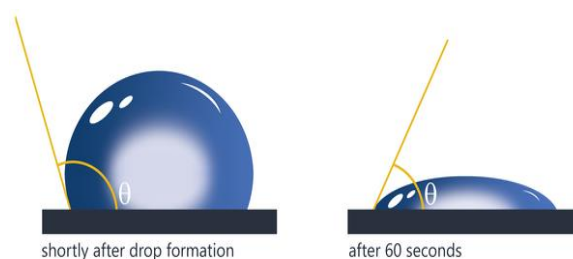
Odvisnost stičnega kota od medfaznih napetosti med trdno, tekočo in plinasto fazo opisuje Young-Duprejeva enačba [46]:

$$\gamma_{SG} - \gamma_{SL} = \gamma_{LG} \cdot \cos\Theta \quad (\text{enačba 18})$$

Θ	stični kot ali kot močenja [$^\circ$]
γ_{SG}	površinska energija trdne snovi
γ_{SL}	medfazna napetost med tekočino in trdno snovjo
γ_{LV}	površinska napetost tekočine

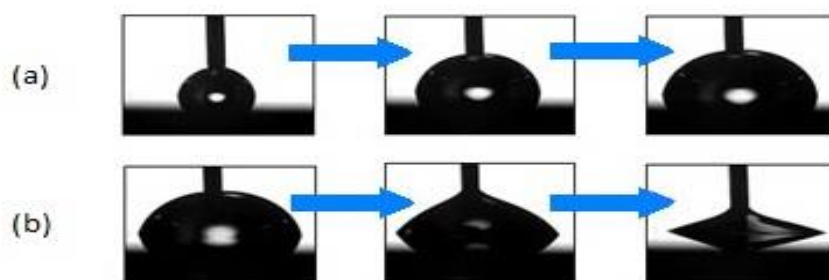
Stični kot kapljice na površini trdne snovi lahko določimo s pomočjo metode sedeče kapljice, in sicer na dva načina:

- 1) *Statična metoda sedeče kapljice:* na horizontalno površino trdne snovi kanemo kapljico kapljevine, znane površinske napetosti. Kapljica na površini mora imeti premer 2–6 mm, saj v tem območju statični stični kot ni odvisen od premera kapljice, ampak od časa. Zato je statični stični kot bolj primeren za opisovanje časovno odvisne spremembe na površini [48].



Slika 17: Shematski primer spremembe stičnega kota v času [49]

- 2) *Dinamična metoda sedeče kapljice:* merimo naraščajoči ali pojemajoči stični kot. Za merjenje naraščajočega stičnega kota na trdno površino nanese kapljico premera 1–2 mm s pomočjo injekcijske igle, ki med meritvijo ostane v kapljici. Z nadaljnjim dovajanjem kapljevine skozi iglo se volumen kapljice na površini povečuje in s tem se širi stična površina med trdno fazo in kapljevino. Meritev stičnega kota se izvede v času, ko se stična površina povečuje (slika 17). Za merjenje pojemajočega stičnega kota kanemo relativno veliko kapljico (približno 6 mm) kapljevine na trdno površino. Igla ostane v kapljici in nato začnemo vleči kapljevino nazaj, da se kapljici manjša volumen in posledično se manjša tudi stična površina kapljice s trdno fazo. Meritev stičnega kota ponovno izvedemo takrat, ko se spreminja površina med kapljevino in trdno fazo (slika 18) [48].



Slika 18: Prikaz merjenja naraščajočega (a) in pojemajočega (b) stičnega kota [50]

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. PRIPRAVA POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA (TB)

Polimorfni obliki TB (oblika I in oblika III) smo pripravili s postopkom kristalizacije iz raztopin ob uporabi čistih topil. Kot izhodni ZU za pripravo polimorfni oblik je bil uporabljen TB ($\geq 99\%$, Sigma – Aldrich, Nemčija), ki je bel kristaliničen prašek. TB je topen v organskih topilih, kot sta aceton in metanol, vendar je netopen v vodi. TB je občutljiv na svetlobo in ima tališče med 128 in 131 °C.

4.1.1. Priprava oblike I

V bučo smo natehtali izhodno ZU (2,50 g) in ji pri sobni temperaturi s pipeto dodali čisti acetonitril (10 mL) ($\geq 99,9\%$, J. T. Baker). Zmes v buči smo nato segrevali do refluxa ($T = 82\text{ °C}$) oz. do trenutka, ko se je ves TB raztopil v topilu. Po končanem postopku smo bučo z vročo raztopino pokrili s parafilmom in jo pustili ohlajati pri sobni temperaturi do nastanka kristalov (čas nastanka kristalov je 4 dni). Ohlajeno raztopino smo prefiltrirali skozi lij z gubanim filter papirjem (Sartorius stedim, grade: 388) in nastale kristale posušili v vakuumskem sušilniku ($T_{\text{sušenja}} = 40\text{ °C}$, čas sušenja = 2 uri) z namenom odstranitve rezidualnega topila. Kristali oblike I imajo kristalno morfologijo v obliki prizme (kristal z veliko ploskvami).

4.1.2. Priprava oblike III

V bučo smo natehtali izhodno ZU (2,50 g) in ji pri sobni temperaturi dodali mešanico topil (25 mL) iz etanola (96 %, Kefolab, Slovenija) in diklormetana ($\geq 99,8\%$, EMSURE[®], Merck) v razmerju 1,2 : 1. Raztopino v buči smo nato segrevali ob refluxu ($T = 72\text{ °C}$) oz. do trenutka, ko se je ves TB raztopil v topilu. Po končanem postopku smo bučo z vzorcem pokrili s parafilmom in jo pustili ohlajati pri sobni temperaturi do nastanka kristalov (čas nastanka kristalov je 7 dni). Ohlajeno raztopino smo prefiltrirali skozi lij z gubanim filter papirjem (Sartorius stedim, grade: 388) in nastale kristale posušili v vakuumskem sušilniku ($T_{\text{sušenja}} = 40\text{ °C}$, čas sušenja = 2 uri) z namenom odstranitve rezidualnega topila. Kristali oblike III imajo kristalno morfologijo v obliki ploščic.

4.2. METODE VREDNOTENJA POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA (TB)

4.2.1. Vrednotenje polimorfni oblik TB z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC)

Začetno identifikacijo polimorfni oblik TB smo ovrednotili z DSC-instrumentom (Mettler Toledo DSC 1, Švica), prikazanem na sliki 19. DSC-krivulje oz. termograme smo analizirali s programsko opremo STAR[®] Software v9.30, kjer smo določevali temperaturo taljenja vzorcev in talilne entalpije termogramskih vrhov.

Vzorci za DSC-analizo smo pripravili tako, da smo natehtali ~ 4 mg posamezne polimorfne oblike TB v aluminijaste lončke. Vsi lončki so bili zaprti in preluknjani pred izvedbo analize. Pogoji, pri katerih smo izvajali DSC-analize polimorfni oblik TB, so bili sledeči:

- temperaturno območje: $T = 25\text{--}200\text{ }^{\circ}\text{C}$,
- hitrost segrevanja: $v = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$,
- pretok N_2 : $\Phi = 30\text{ mL}/\text{min.}$



Slika 19: Mettler Toledo DSC 1 [51]

4.2.2. Vrednotenje kristalne strukture polimorfnih oblik TB z X-žarkovno difraktometrijo na posameznem kristalu (SCXRD)

Kristali polimorfnih oblik I in III so pozorno opazovani pod stereomikroskopom, da bi ugotovili pravilnost razvitih ploskev za orientacijo. Difrakcijski podatki pripravljene polimorfne oblike so pridobljeni na vsakem orientiranem kristalu na Agilent SuperNova difraktometru pri sobni temperaturi. Indeksiranje vsakega kristala smo opravili pred izvedbo nanoindentacijskih meritev s pomočjo programske opreme CrysAlis PRO software (CrysAlis PRO. Agilent Technologies UK Ltd., Yarnton, UK).



Slika 20: Agilent SuperNova difraktometer [52]

4.2.3. Vrednotenje mehanskih lastnosti polimorfnih oblik TB z metodo instrumentalnega nanovtiskovanja

Mehanske lastnosti polimorfnih oblik TB (oblika I in oblika III) smo ovrednotili s pomočjo nanoindenterja Agilent G200 (Agilent, ZDA, slika 21), pri čemer smo uporabljali tehniko kontinuiranega merjenja togosti (CSM). Meritve z nanoindenterjem smo opravili na Naravoslovnotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelek za metalurgijo in materiale. Orientirane kristale obeh polimorfnih oblik smo s pomočjo dvokomponentne cianoakrilatne smole (UHU plus sofortfest, Baden, Nemčija) pritrdili na krovna stekelca.

Za določevanje mehanskih lastnosti smo uporabili Berkovichev indenter, ki ima obliko tristrane piramide. Vsi preizkusi so bili izvedeni v CSM-načinu, pri čemer smo kontinuirano spremljali odvisnost E in H od globine vtiskovanja konice v preiskovani vzorec.

Pogoji, pri katerih smo izvajali meritve na kristalih TB, so bili sledeči:

- amplituda nihanja: 1 nm,
- frekvenca nihanja: 75 Hz,
- maksimalna globina vtisa: 800 nm,
- Poissonovo razmerje: 0,3,
- E in H smo izračunali kot povprečne vrednosti pri globini vtisa med 200 in 750 nm.

Za vsako polimorfno obliko TB smo opravili meritve na vsaj 2 kristalih. Na vsakem vzorcu kristalov TB smo opravili po najmanj 15 poizkusov. Za obdelavo podatkov je bila uporabljena Oliver-Pharrova teorija.



Slika 21: Nanoindenter Agilent G200 [53]

4.2.4. Vrednotenje porazdelitve velikosti delcev polimorfnih oblik TB z lasersko difrakcijo (LD)

Porazdelitev velikosti delcev obema polimorfnima oblikama TB smo izmerili s pomočjo laserskega difraktometra (Mastersizer S, Malvern, Velika Britanija), prikazanega na sliki 22. Kot rezultat meritev smo podali vrednosti D_{10} , D_{50} in D_{90} . Gre za volumsko porazdelitev velikosti delcev, kjer D_{10} , D_{50} in D_{90} pomenijo:

- D_{10} : 10 % delcev, manjših od določene vrednosti,
- D_{50} : 50 % populacije pod določeno vrednostjo,
- D_{90} : 90 % delcev, manjših od določene vrednosti.

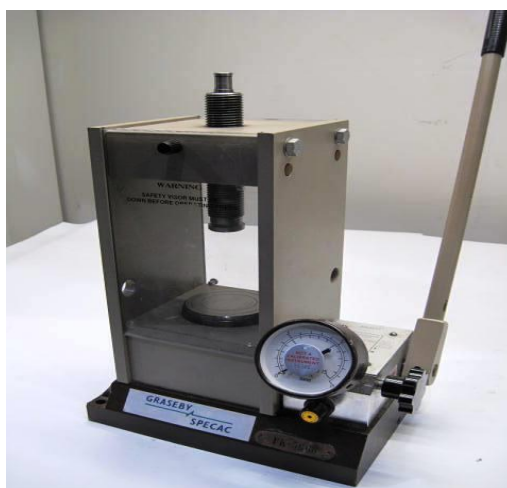
Za določitev porazdelitve velikosti delcev polimorfnih oblik TB je bilo treba najprej pripraviti disperzijo. Obliko I smo dispergirali v prečiščeni vodi z dodatkom 2 kapljic 0,1-odstotne raztopine površinsko aktivne snovi, Tween® 20 (polioksietilensorbitan monolaurat, $C_{58}H_{114}O_{26}$). Suspenzijo smo izpostavili ultrazvoku za 2 minuti, da bi se izognili morebitnemu nastanku aglomeratov. Pri pripravi disperzije za obliko III pa uporaba Tween® 20 ni bila potrebna zaradi boljše močljivosti. Vse poskuse smo izvedli v treh ponovitvah.



Slika 22: Mastersizer S, Malvern [54]

4.2.5. Določanje stičnega kota z metodo sedeče kapljice

Stični kot tabletkam, ki smo jih izdelali s pomočjo ročne hidravlične stiskalnice (Graseby Specac, slika 23), smo določili z napravo Contact Angle Meter KRUSS (slika 24), ki je opremljena z računalniškim programom Drop Shape Analysis System DSA 100. Metoda, s katero smo določali stični kot, je bila metoda sedeče kapljice.



Slika 23: Ročna hidravlična stiskalnica, Graseby Specac [55]

Tablete za določanje stičnega kota smo pripravili tako, da smo natehtali približno 200 mg praška (oblika I in oblika III) in ga stiskali 10 sekund s silo 5 ton. Na tableto smo z

injekcijskim delom naprave kapnili po 1 μ L prečiščene vode (testna raztopina). Kapljico na površini tablete smo slikali z vgrajeno kamero, pri čemer smo poskrbeli, da je bila kapljica na sliki ustrezno osvetljena in izostrena. S pomočjo računalniškega programa smo z metodo sedeče kapljice določili stični kot (metoda Young-Laplaceovega prileganja).



Slika 24: Naprava za merjenje stičnega kota, Drop Shape Analysis System DSA 100 Contact Angle Meter KRÜSS [56]

4.2.6. Izdelava tablet tolbutamida

Tabletirali smo z metodo direktnega tabletiranja na tabletirki na udarec (Kilian SP 300, IMA) s t. i. koračnim načinom tabletiranja, s čimer smo rešili problem omejene količine zmesi, zagotovili enakomernost mase izdelanih tablet in stiskali tablete strojno, tj. s kontrolirano hitrostjo. Zmes za tabletiranje je predstavljala mešanica TB (oblika I/III) in 1,5 % magnezijevega stearata. Masa tablete je bila 500 mg. Hitrost tabletiranja smo vedno nastavili na 35 tbl/min. Uporabljali smo okrogle, ravne pečate premera 12 mm. Sile, pri katerih smo stiskali tablete, so navedene preglednici IV v poglavju 5.1.6 (preglednica 8).



Slika 25: Hidravlična tabletirka na udarec, Killian SP 300, IMA [57]

4.2.7. Določanje trdnosti tablet in merjenje njihovih dimenzij, kompatibilnostni diagram

S pomočjo kljunastega merila z okroglim prikazovalnikom (Horex) smo vsaki tableti iz obeh serij izmerili dimenzije (*debelina* in *premer*) na 0,005 mm natančno.

Trdnost tablet smo vrednotili z izračunom natezne trdnosti tablet. Izračun poleg sile, ki je potrebna za lom tablete pri diametralni obremenitvi, upošteva tudi dimenzije tablete po izmetu (enačba 12). Vrednosti nateznih trdnosti smo uporabili pri konstrukciji kompatibilnostnega diagrama ali ločeno pri vrednotenju tablet, stisnjenih z enakim tlakom. Polimorfne oblike TB smo stiskali pri silah med 1 in 32 kN. Pri izbranih točkah smo izdelali vsaj 3 tablete, katerim smo ovrednotili dimenzije in diametralno trdnost (Tablet hardness tester VK 200, Vanderkamp).



Slika 26: Naprava za določanje trdnosti tablet, Tablet hardness tester VK 200, Vanderkamp

[57]

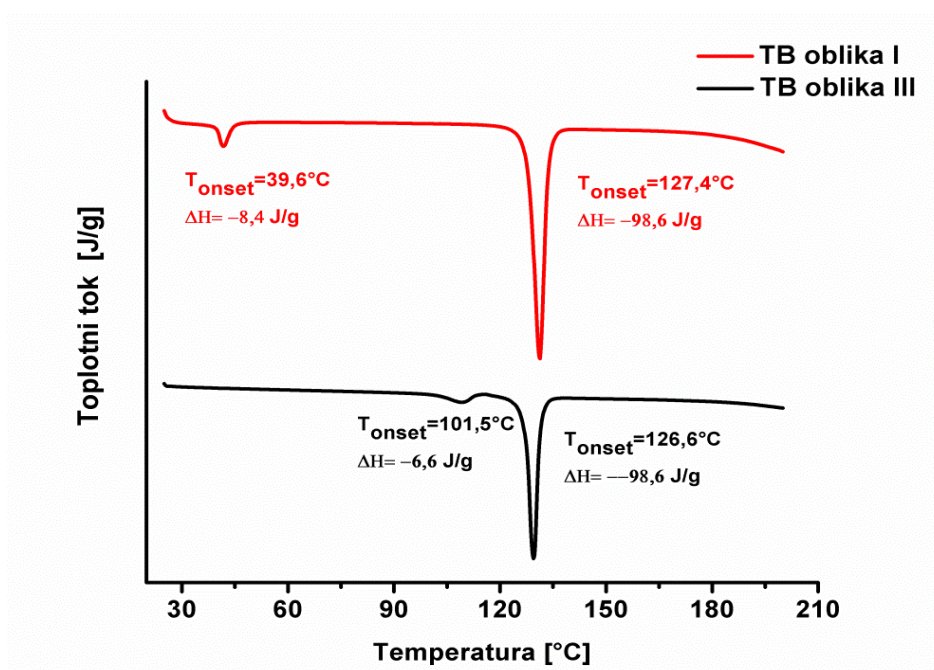
5. REZULTATI in RAZPRAVA

5.1. VREDNOTENJE POLIMORFNIH OBLIK TOLBUTAMIDA (TB)

5.1.1. Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Z DSC smo določili polimorfni obliki TB (oblika I in oblika III), pripravljene s postopki kristalizacije iz raztopin v različnih topilih.

Primerne termogramov TB I in III sta prikazana na DSC-termogramu (slika 27). Istovetnost pripravljenih polimorfni oblik (oblika I in oblika III) smo primerjali s termogrami iz literaturnih podatkov [22].



Slika 27: DSC-termogram polimorfni oblik TB (oblika I in oblika III)

Na termogramu za TB obliko I opazimo dva vrhova: endotermni vrh pri $T = 39,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{prehoda}) in endotermni vrh pri $T = 127,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{taljšča}}$). Prvi vrh je pripisan kinetičnemu reverzibilnemu polimorfni preходу oblike I_L v obliko I_H , drugi vrh pa označuje taljenje oblike I_H . Izmerjene vrednosti $T_{\text{taljšča}}$ oblike I se ujemajo z rezultati iz literature ($T_{\text{taljšča}} = 128 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Na termogramu za TB obliko III detektiramo endotermni vrh pri $T = 101,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{prehoda}) in taljenje oblike I_H pri $T = 126,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{taljšča}}$).

Z uporabo Hessejevega toplotnega zakona (enačba 20) skupno entalpijo procesa ($\Delta H_{\text{procesa}}$) izračunamo s seštevanjem entalpije prehoda ($\Delta H_{\text{prehoda}}$) in talilne entalpije ($\Delta H_{\text{taljenja}}$):

$$\Delta H_{\text{procesa}} = \Delta H_{\text{prehoda}} + \Delta H_{\text{taljenja}} \quad (20)$$

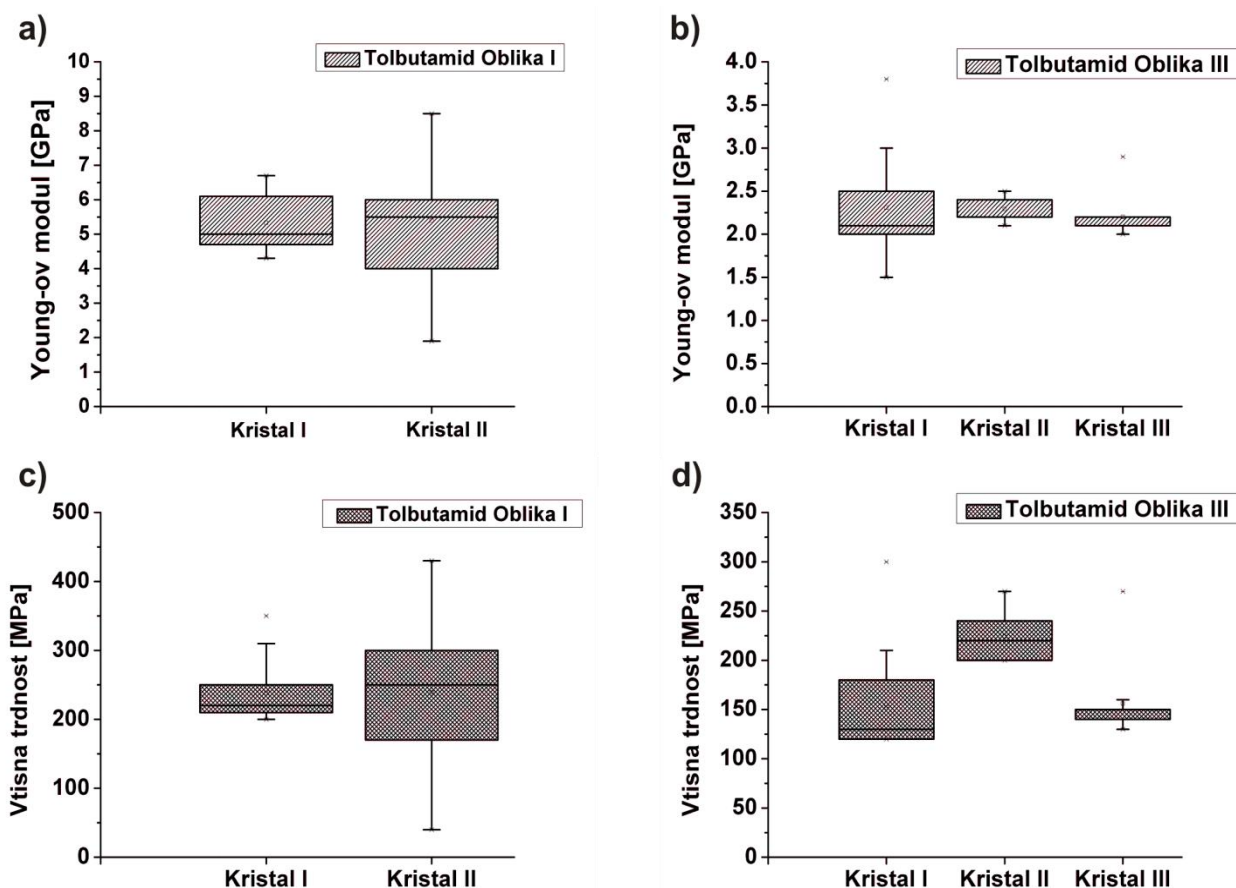
Preglednica 1: Eksperimentalne DSC-vrednosti in DSC-vrednosti iz literature za obe polimorfni obliki TB

<i>Polimorfi TB</i>	T_{prehoda} [°C]	$T_{\text{tališča}}$ [°C]	$\Delta H_{\text{prehoda}}$ [J/g]	$\Delta H_{\text{tališča}}$ [J/g]	$\Delta H_{\text{procesa}}$ [J/g]
<i>oblika I (eksperimentalne vrednosti)</i>	39,6	127,4	-8,4	-98,6	107,0
<i>oblika I (vrednosti iz literature)</i>	40	128	8,1	95,1	103,2
<i>oblika III (eksperimentalne vrednosti)</i>	101,5	126,6	-6,6	-98,6	105,2
<i>oblika III (vrednosti iz literature)</i>	106	128	6,4	94,7	101,1

Eksperimentalni podatki za T faznih prehodov in taljenja ter njihove entalpije se ujemajo z literaturnimi podatki. Prehod oblike III v obliko I govori, da je najbolj stabilen polimorf oblike I.

5.1.2. Instrumentalna nanoindentacija

Mehanske lastnosti (E in H) pripravljenim polimorfnim oblikam TB smo določili s pomočjo inštrumenta za zaznavanje globine vtisa oziroma nanoindenterja. Vse meritve smo opravili na orientiranih posameznih kristalih ustrezne kakovosti. Mehanske parametre smo določili kontinuirano v odvisnosti od globine vtisa (od 200 do 700 nm) s pomočjo tehnike DCM-CSM. Deformacijski mehanizem kristalov TB smo ovrednotili na osnovi E (merilo elastičnosti), H (merilo plastičnosti) in meje plastičnosti materiala (P_y , merilo plastičnosti).



Slika 28: Kvartilni diagram (angl. box plot) za vrednosti E in H polimorfni oblik TB

Na Box plot grafih so prikazane vrednosti E in H za polimorfni obliki TB (oblika I in oblika III). Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da ima oblika I večjo togost (višji E) in trdnost (H) v primerjavi z obliko III. Sipljanje rezultatov na posameznih kristalih je povezano s kakovostjo površine (prisotnost por oziroma površinskih lomov) in defektov v kristalni strukturi. Vpliv defektov je posebej izražen pri meritvah H materiala.

Preglednica 2: Vrednosti E in H , odčitane iz Box plot grafov, za polimorfni obliki I in III (rezultati so predstavljeni kot mediana in interkvartilni rang – razlika med Q_3 in Q_1)

<i>Parameter</i>	<i>TB oblika I</i>	<i>TB oblika III</i>
E [GPa]	$5,3 \pm 1,4$	$2,2 \pm 0,3$
H [GPa]	230 ± 90	155 ± 90

Predlog interpretacije deformacijskega mehanizma materialov sta poročala Roberts in Rowe na osnovi vrednosti P_y in razmerij E/P_y in H/P_y [27].

Preglednica 3: Vrednosti P_y in njena razmerja z mehanskimi lastnostmi materialov

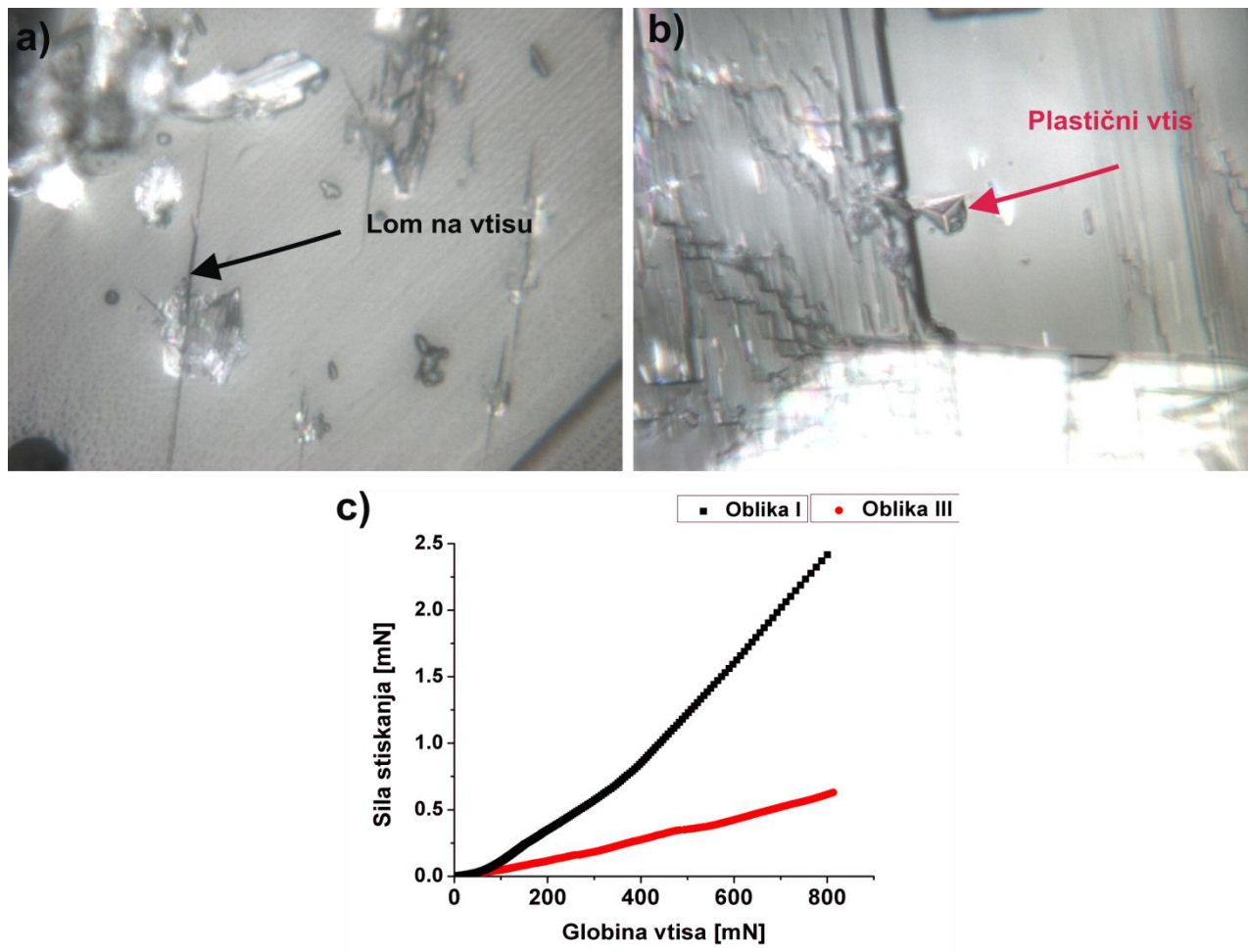
P_y [MPa]	H [MPa]	E [GPa]	H/P_y	Mehanske lastnosti	Deformacijski mehanizem
> 400	>1000	> 15	2,2	trd, krhek	fragmentacija
150–400	500– 1500	> 70	3,5	trd, žilav	plastična deformacija, določen % plastične deformacije na stičnih točkah
60–200	160–600	5–15	2,4	zmerno trd, krhek	fragmentacija, določen % plastične deformacije na stičnih točkah
60–200	160–600	5–15	2,4–2,8	zmerno trd, krhek, žilav	nižja stopnja fragmentacije, plastična deformacija na stičnih točkah
60–200	160–600	5–15	3,0	zmerno trd, žilav	plastična deformacija
40–80	160–600	5–15	3,5	mehek, žilav	plastična deformacija
40–80	50–150	2–5	2,5–3,0	mehek, žilav, elastičen	plastična, elastična deformacija
< 40	< 50	< 2	1,5–2,0	viskoelastičen	plastična deformacija

Kadar je razmerje E/P_y med 10 in 25, je za materiale značilna elastična deformacija. Razmerje E/P_y med 25 in 30 je značilno za krhke materiale. Kadar je razmerje E/P_y nad 30, je za materiale značilna plastična deformacija [27].

Preglednica 4: Vrednosti P_y in njena razmerja s H in E za obe polimorfni obliki TB

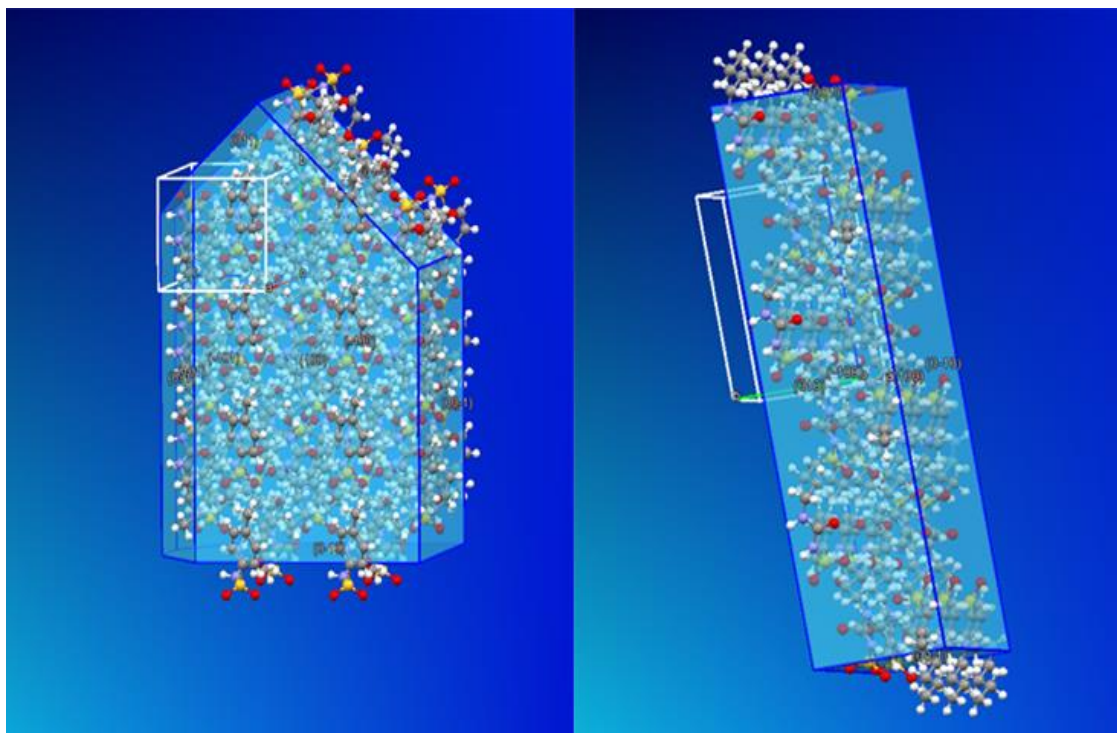
Parameter	TB oblika I	TB oblika III
P_y [MPa]	91,89	73,48
E/P_y	57,68	29,94
H/P_y	2,5	2,45
Mehanske lastnosti	Krhek/plastičen	Žilav/elastičen

Na osnovi vrednosti P_y in razmerij E/P_y in H/P_y za obe polimorfni obliki TB smo ugotovili, da ima oblika I krhke/plastične lastnosti v primerjavi z obliko III, ki je žilav in elastičen material.



Slika 29: Slike površin posameznih kristalov TB oblike I (a) in oblike III (b), posnetih z nanoindeterjem, in graf krivulj sila stiskanja – globina vtisa (c)

Na sliki 29 sta prikazani površini kristalov TB I in III po nanoindentaciji. Krhke lastnosti oblike I smo potrdili tudi na osnovi nastanka razpoke v vtisu, ki kaže na lomljenje kot način deformacije materiala. Na drugi strani smo detektirali jasen piramidalni vtis ob deformaciji oblike III, ki potrjuje njene plastične lastnosti.



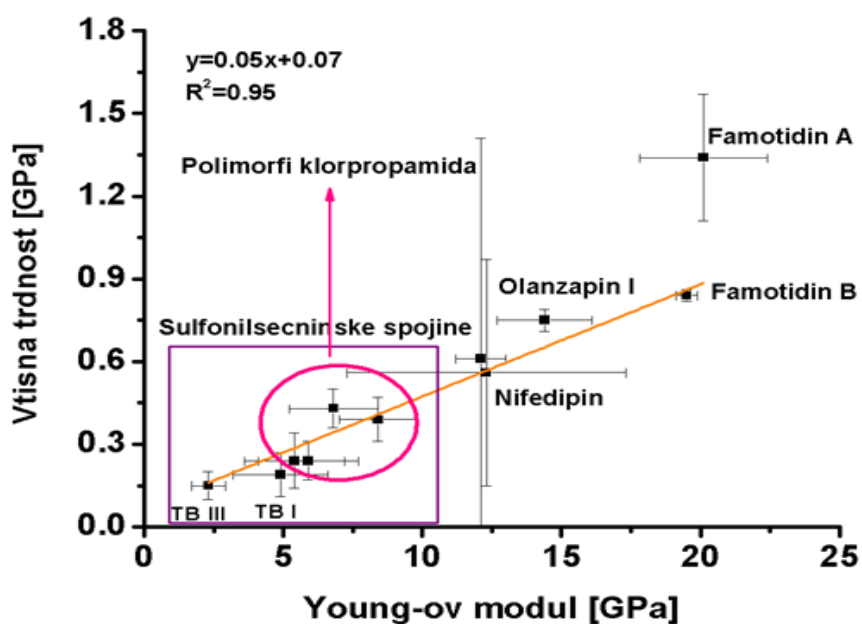
Slika 30: Strukturno pakiranje molekul, značilno za obliko I (slika levo) in obliko III (slika desno)

Na osnovi podatkov iz SCXRD ima oblika I (slika 30 levo) ortorombsko kristalno celico s prostorsko skupino Pna21 in parametri $a = 20$; $b = 7,9$ in $c = 9$ Å. Za obliko III (slika 30 desno) je značilna monoklinska osnovna celica s parametri $a = 11,8$, $b = 9,1$ in $c = 14,0$ ter $\beta = 104,6$ in prostorsko skupino P21/n.

Pri nanoindentaciji oblike I smo mehansko obremenili ploskev »bc«, pri kateri so molekule bolj gosto pakirane v formaciji »zig-zag«. Iz tega razloga oblika I izkazuje krhke lastnosti. Na drugi strani smo pri nanoindentaciji oblike III stiskali ploskev »ac« (bolj razvita), pri kateri so molekule dejansko vzporedne s to ploskvijo. Na ta način smo povzročili plastičen tok v smeri delovanja sile in pokazali, da ima oblika III predvsem plastične lastnosti.

5.1.3. Primerjava mehanskih lastnosti zdravilnih učinkovin

Cilj raziskave mehanskih lastnosti kristalnih zdravilnih učinkovin je nastanek baze podatkov, ki bi služila kot osnova za izbor ustreznega načina formulacije oziroma procesiranja aktivnih spojin. V trenutno bazo podatkov so vključene meritve, izvedene z instrumentalno nanoindentacijo na orientiranih kristalih in pri enakem % deformacije (do 700 nm globine vtisa). Kot je razvidno na osnovi slike 31, je razviden pozitiven trend med E in H .



Slika 31: Trend med Youngovim modulom in vtisno trdnostjo za izbrane zdravilne učinkovine

Na osnovi slike 31 lahko razlikujemo 2 skupini kristalnih zdravilnih učinkovin: krhke materiale, kot so famotidin A in B, olanzapin I, nifedipin in piroksikam, ter plastične materiale, značilne za sulfonilsečnijske spojine (klorpropamid in tolbutamid).

5.1.4. Laserska difrakcija

Za potrebe določitve kompatibilnosti polimorfni oblik smo pripravljene kristale zmleli v terilnici in jim določili velikost delcev. Za ta namen smo uporabili metodo laserske difrakcije. Osnovni cilj mletja je bil zagotoviti približno enako velikost delcev oziroma izničiti razlike v velikosti delcev, ki naj ne bi vplivale na kompatibilnostni profil.

Kot rezultate meritev smo podali vrednosti D_{10} , D_{50} in D_{90} (volumska porazdelitev), ki so prikazane v preglednici 5. Za posamezno obliko smo opravili po 3 meritve in kot rezultat podali povprečno vrednost in standardno deviacijo (SD).

Preglednica 5: Volumska porazdelitev delcev polimorfni oblik I in III

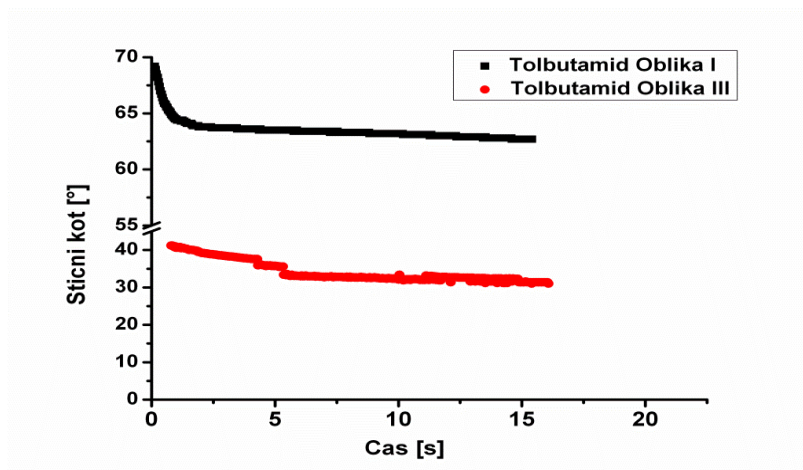
porazdelitev velikosti delcev	D_{10} [μm]	SD	D_{50} [μm]	SD	D_{90} [μm]	SD
oblika I	2,29	0,74	15,97	2,01	61,60	12,63
oblika III	2,10	0,27	14,02	1,83	40,76	8,86

Pri določitvi velikosti delcev oblike I smo v medij za dispergiranje dodali natrijev lavril sulfat, da bi izboljšali močenje in preprečili aglomeracijo delcev. Glede na slabšo močljivost oblike I v vodi je bila tvorba aglomeratov bolj izražena, kar je rezultiralo v večji variabilnosti rezultatov (D_{90}). Obe polimorfni obliki imata primerljive velikosti delcev po mletju.

5.1.5. Stični kot

Preglednica 6: Vrednosti stičnih kotov tablet obeh polimorfni oblik

<i>tableta TB</i>	<i>Stični kot [°]</i>
<i>oblika I</i>	67,7
<i>oblika III</i>	32,3



Slika 32: Stični kot tablet polimorfni oblik TB v odvisnosti od časa

Na osnovi rezultatov (preglednica 6 in slika 32) lahko obe polimorfni obliki razvrstimo v hidrofilne snovi, saj je stični kot manjši od 90° . Polimorfna oblika III ima boljšo močljivost ($32,3^\circ$) v primerjavi z obliko I ($67,7^\circ$). Rezultat je tudi v skladu z literaturnimi podatki, ki govorijo tudi o večji topnosti oblike III v primerjavi z obliko I [59].

5.1.6. Direktno tabletiranje

Tablete TB smo izdelali z metodo direktnega tabletiranja s pomočjo hidravlične tabletirke na udarec. Za posamezno serijo smo pripravili po dvanajst 500-miligramskih tablet (serija I in serija III). Tabletirna zmes je bila pripravljena iz stisnjenega praška polimorfne oblike (98,50 ut./ut. %) in magnezijevega stearata kot antiadheziva (1,50 ut./ut. %).

Preglednica 7: Sile stiskanja, tlak stiskanja in mase tablet

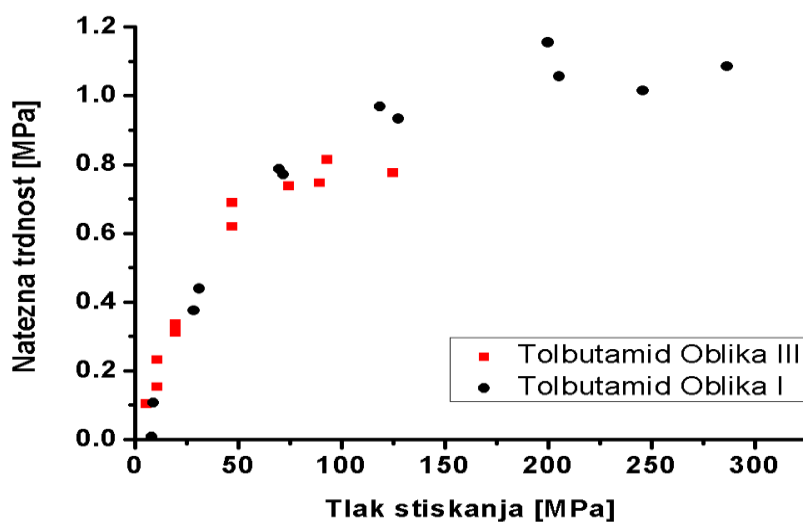
$n_{tableta}$ (oblika I)	$F_{stiskanja}$ [kN]	$P_{stiskanja}$ [MPa]	F [N]	$m_{tablete}$ [mg]	$n_{tableta}$ (oblika III)	$F_{stiskanja}$ [kN]	$P_{stiskanja}$ [MPa]	F [N]	$m_{tablete}$ [mg]
1	0,9	7,958	7,2	498,6	1	0,6	5,305	9,1	487,7
2	1,0	8,842	9,0	491,3	2	0,7	6,19	9,3	496,2
3	3,2	28,29	28,4	497,0	3	1,2	10,61	12,9	499,6
4	3,5	30,95	33,4	501,7	4	1,2	10,61	19,2	496,9
5	7,9	69,85	57,0	496,5	5	2,2	19,45	24,8	496,3
6	8,1	71,62	54,4	495,2	6	2,2	19,45	26,9	497,6
7	13,4	118,5	68,5	495,1	7	5,3	46,86	51,1	498,6
8	14,4	127,3	65,1	490,6	8	5,3	46,86	46,0	495,1
9	22,6	199,8	80,4	493,2	9	8,4	74,27	52,3	487,0
10	23,2	205,1	75,4	495,1	10	10,1	89,3	53,9	500,5
11	27,8	245,8	67,8	475,9	11	10,5	92,84	59,4	484,6
12	32,4	286,5	76,5	493,3	12	14,1	124,7	55,4	495,9

Trdnost izdelanih tablet smo ovrednotili z izračunom natezne trdnosti tablet (enačba 12). Vrednosti natezних trdnosti smo uporabili pri konstrukciji kompatibilnostnega diagrama (natezna trdnost v odvisnosti od tlaka stiskanja).

V preglednici 8 so prikazane izmerjene dimenzije (*debelina* in *premer*) v mm in trdnosti v N ter izračunane vrednosti natezne trdnosti v MPa.

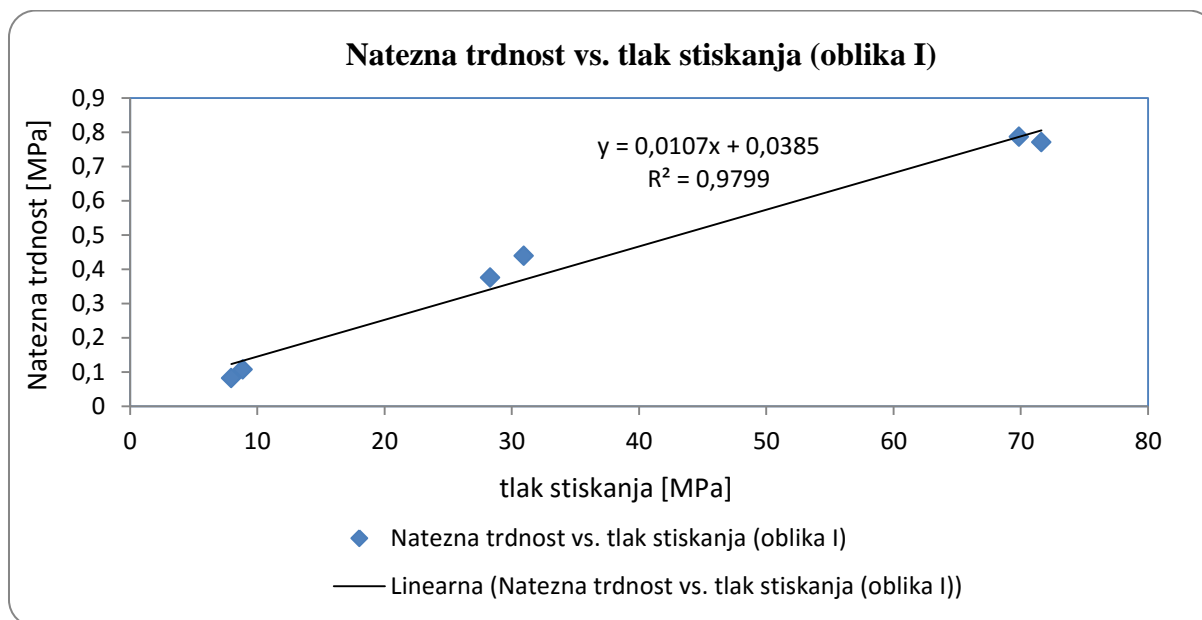
Preglednica 8: Dimenzije in natezne trdnosti tablet za oblike I in III

n_{tablet} (oblika I)	d [mm]	h [mm]	$F_{stiskanja}$ [kN]	F [N]	σ [MPa]	n_{tablet} (oblika III)	d [mm]	h [mm]	$F_{stiskanja}$ [kN]	F [N]	σ [MPa]
1	12,05	4,62	0,9	7,2	0,00823	1	11,96	4,66	0,6	9,1	0,104
2	12,00	4,45	1,0	9,0	0,107	2	12,02	4,70	0,7	9,3	0,105
3	12,06	3,99	3,2	28,4	0,376	3	12,00	4,46	1,2	12,9	0,153
4	12,07	4,015	3,5	33,4	0,439	4	11,95	4,41	1,2	19,2	0,232
5	12,06	3,825	7,9	57,0	0,787	5	12,04	4,20	2,2	24,8	0,312
6	12,045	3,73	8,1	54,4	0,771	6	12,07	4,21	2,2	26,9	0,337
7	12,10	3,72	13,4	68,5	0,969	7	12,08	3,91	5,3	51,1	0,689
8	12,07	3,68	14,4	65,1	0,933	8	12,06	3,92	5,3	46,0	0,619
9	12,06	3,675	22,6	80,4	1,155	9	12,055	3,75	8,4	52,3	0,737
10	12,06	3,77	23,2	75,4	1,056	10	12,05	3,81	10,1	53,9	0,747
11	12,05	3,53	27,8	67,8	1,015	11	12,07	3,85	10,5	59,4	0,814
12	12,06	3,72	32,4	76,5	1,086	12	12,05	3,77	14,1	55,4	0,776
SD				26,00266	0,395074					19,74202	0,285578

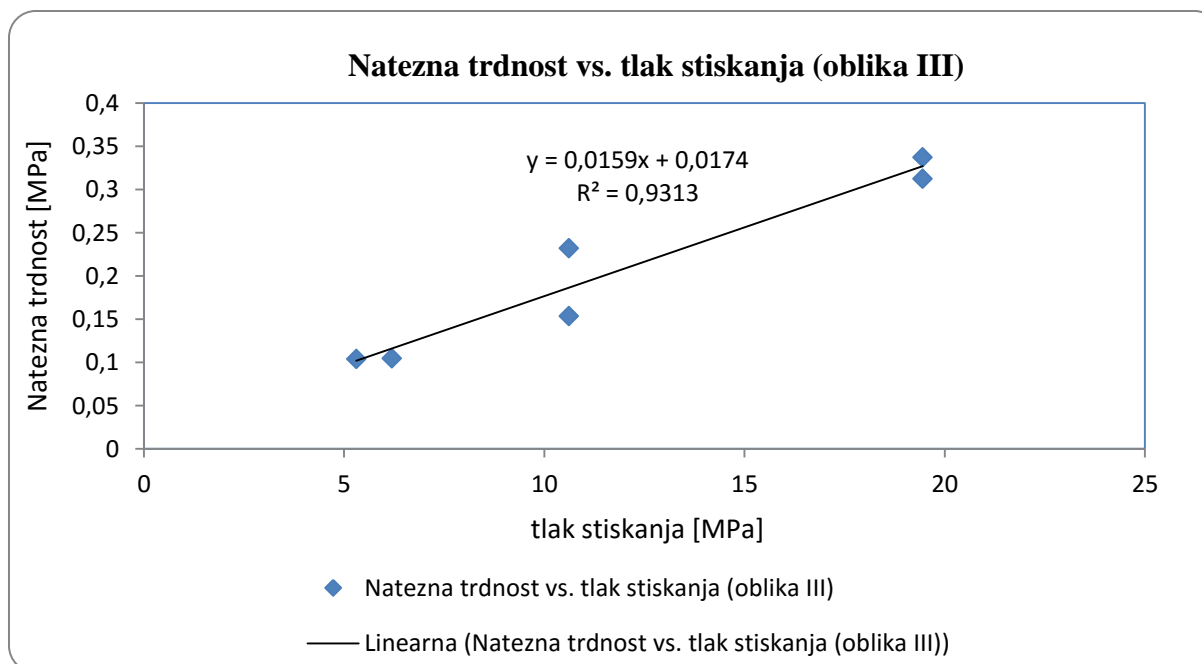


Slika 33: Kompabilitnostni diagram (odvisnost natezne trdnosti od tlaka stiskanja) za serijo tablet TB oblike I in oblike III

Na sliki 33 je prikazan kompatibilnostni profil obeh polimorfnih oblik. Krivulja ima območje linearne odvisnosti natezne trdnosti od tlaka stiskanja in plato, v kateri je dosežena maksimalna plastična deformacija materiala. Indeks kompatibilnosti materiala (C_p) smo določili kot naklon začetnega linearnega dela krivulje.



Slika 34: Kompatibilnostni diagram za serijo tablet T oblike I za območje tlaka stiskanja 7,958–71,62 MPa



Slika 35: Kompatibilnostni diagram za serijo tablet T oblike III za območje tlaka stiskanja 5,305–19,45 MPa

Preglednica 9: Vrednosti konstant kompatibilnostnih diagramov za seriji tablet TB oblik I in III

<i>tableta TB</i>	<i>območje P [MPa]</i>	<i>C_p x 10⁻³</i>	<i>R²</i>
<i>oblika I</i>	7,958–71,62	10,7	0,9799
<i>oblika III</i>	5,305–19,45	15,9	0,9313

Na osnovi C_p indeksa lahko sklepamo, da ima oblika III večjo stisljivost v primerjavi z obliko I. Rezultat je v skladu z večjo plastičnostjo materiala (nižji P_y) za TB III, ki smo jo določili z instrumentalno nanoindentacijo. Oblika III se je pri tabletiranju izrazito lepila za pečate in je površina tablete imela sintrani videz. To lahko povežemo s plastičnimi lastnostmi učinkovine. Na drugi strani oblika I ni izkazovala tendence k lepljenju zaradi njenih drsilnih lastnosti, kot posledica krhkosti materiala.

6. SKLEP

V magistrski nalogi smo proučevali vpliv konformacijskega polimorfizma na mehanske lastnosti zdravilne učinkovine TB, določene z metodo instrumentalnega nanovtiskovanja (nanoindentacija). Mehansko obnašanje smo izmerili dvema polimorfnima oblikama preiskovane zdravilne učinkovine, in sicer: TB obliki I in III. Na podlagi izmerjenih parametrov mehanskih lastnosti TB smo ocenili, katera polimorfna oblika ima primernejše lastnosti za proces stiskanja.

Polimorfni obliki TB I in III smo uspešno pripravili s postopkom kristalizacije iz topil, kot so acetonitril in mešanica etanola in diklorometana. Polimorfni obliki smo identificirali s pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije in X-žarkovne difraktometrije na posameznem kristalu. Za nanoindentacijo smo uporabili orientirane posamezne kristale ustrezne kakovosti.

Na osnovi eksperimentalno določenih mehanskih parametrov, kot sta E in H , smo izračunali mejo plastičnosti materiala (P_y). Oblika I ima krhke in plastične lastnosti (nanometrsko lastnosti), ki so razlog uporabe višje sile ob stiskanju kompaktovanosti TB oblike I. Zaradi krhkih lastnosti oblika I ni izkazovala tendence lepljenja za pečate. Na drugi strani pa ima oblika I žilave in elastične karakteristike. Zaradi izrazite stopnje plastičnosti (nižji P_y) ima oblika III večjo kompatibilnost (večji koeficient C_p) v primerjavi z obliko I. Ob stiskanju je izkazovala izrazit pojav lepljenja za pečate. Pri nanoindentaciji oblike I smo mehansko obremenili ploskev »bc«, pri kateri so molekule bolj gosto pakirane v formaciji »zig-zag«. Ploskev »bc« je dominantna po svoji velikosti in najverjetneje določa mehansko obnašanje materiala ob stiskanju. Zaradi gosto premrežene strukture izkazuje oblika I krhke lastnosti. Na drugi strani smo pri nanoindentaciji oblike III stiskali ploskev »ac« (bolj razvita), pri kateri so molekule dejansko vzporedne s to ploskvijo. Na ta način smo povzročili plastičen tok v smeri delovanja sile in pokazali, da ima oblika III predvsem plastične lastnosti.

Na osnovi rezultatov močljivosti lahko obe polimorfni obliki razvrstimo v hidrofilne snovi, saj je stični kot manjši od 90° . Polimorfna oblika III ima boljšo močljivost ($32,3^\circ$) v primerjavi z obliko I ($67,7^\circ$). Rezultat je tudi v skladu z literaturnimi podatki, ki govorijo o večji topnosti oblike III v primerjavi z obliko I.

7. LITERATURA

- [1] Gibson M: Pharmaceutical Preformulation and Formulation, A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form, Informa Healthcare, New York, 2001: 34 - 61.
- [2] Vrečer F, Planinšek O: Izbrana poglavja iz načrtovanja lastnosti delcev, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2011: 17 - 65.
- [3] <http://www.mikeblaber.org/oldwine/chm1045/notes/Forces/Solids/Forces07.htm> (dostop: 20.07.2015).
- [4] Ivić U: Optimizacija procesnih pogojev kristalizacije farmacevtske učinkovine, Diplomaska naloga, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2011.
- [5] Željko K, Škerget M: Termodifuzijski procesi separacijski procesi, zbrano gradivo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 1999.
- [6] Tung HH, Edward LP, Midler M, McCauley AJ: Crystallization of Organic Compounds, An industrial perspective, JohnWiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009: 1 - 3.
- [7] <https://www.chemicalprocessing.com/articles/2003/381/> (dostop: 20.08.2015).
- [8] Sohner O, Garside J: Precipitation, Butterworth – Heinemann, Oxford, 1992: 1 - 217.
- [9] Kočever J: Vloga kristalizacije pri oblikovanju zdravilnih pripravkov. Farm Vestn 1993; 44: 55 - 74.
- [10] Myers D: Surfaces, interfaces and colloids, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1993: 22 - 49.
- [11] Myerson SA: Handbook of Industrial Crystallization, Butterworth – Heinemann, USA, 2002: 33 - 63.
- [12] https://www.wpi.edu/Pubs/ETD/Available/etd-020606-165721/unrestricted/Kasim_Biyikli_MS_Thesis.pdf (dostop: 15.12.2015)

- [13] Vippagunta S, Brittain H, Grant JWD: Crystalline solids. Adv Drug Deliv Rev 2001; 48: 3 - 26.
- [14] [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Energy-Temperature diagrams of a system exhibiting two polymorphic forms with enantiotropic behaviour %28left%29 and monotropic behaviour %28right%29..jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Energy-Temperature_diagrams_of_a_system_exhibiting_two_polymorphic_forms_with_enantiotropic_behaviour_%28left%29_and_monotropic_behaviour_%28right%29..jpg) (dostop: 16.11.2015).
- [15] Srpčič S: Mehanika trdnih teles, Fakulteta za gradbeništvo in geodezijo, Ljubljana, 2003.
- [16] Reddy C.M, Basavoju S, Desiraju R.A: Sorting of polymorphs based on mechanical properties. Trimorphs of 6-chloro-2,4-dinitroaniline. Chem Commun 2005: 2439 - 2441.
- [17] Govedarica B, Ilić I, Šibanc R, Dreu R, Srčič S: The use of single particle mechanical properties for predicting the compressibility of pharmaceutical materials. Powder technol 2012; 225: 43 - 51.
- [18] Oliver WC, Pharr GM: Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation. Advances in understanding and refinements to methodology. J Mater Res 2011; 19: 3 - 20.
- [19] Varughese S, Kiran M. S. R. N., Ramamurty U, Desiraju GR: Nanoindentation in Crystal Engineering: Quantifying Mechanical Properties of Molecular Crystals, Angew Chem Int Edit 2013; 52: 2701 - 2712.
- [20] Xiaodong L, Bharat B: A review of nanoindentation continuous stiffness measurement technique and its applications. Mater Charact 2002; 11 - 36.
- [21] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01124> (dostop: 09.04.2015).
- [22] Thirunahari S, Aitipamula S, Chow P.S, B. H. Tan R: Conformational Polymorphism of Tolbutamide: A Structural, Spectroscopic and Thermodynamic Characterization of Burger's Forms I-IV. J Pharm Sci 2010; 99: 2975 - 2989.
- [23] http://nanomechanics.uwaterloo.ca/index_files/Page6640.htm (dostop: 27.07.2015).

- [24] Lah M: Vpliv ionske moči raztopin na mehanske lastnosti ksantanskih verig in na nabrekanje tablet, Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
- [25] Egart M: Vrednotenje strukturno – mehanskih lastnosti zdravilnih učinkovin z instrumentalno nanoindentacijo ter njihov pomen pri izdelavi tablet, Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2014.
- [26] Sakharova N.A, Fernandes J.V, Antunes J.M, Oliveira M.C: Comparison between Berkovich, Vickers and conical indentation tests: A three-dimensional numerical simulation study. *Int J Solids and Struct* 2009; 46: 1095 - 1104.
- [27] Roberts RJ, Rowe RC: The compaction of pharmaceutical and other model materials – a pragmatic approach. *Chem Eng Sci* 1987; 42: 903 - 911.
- [28] Cooper A, Nutley M.A, Wadood A: Differential scanning microcalorimetry, Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry, Oxford University Press, Oxford New York, 2000: 287 - 318.
- [29] Meden A.: Rentgenski praškovni difraktogram – prstni odtis trdne snovi, *Kemija v šoli*, 15 (2003): 2 - 10.
- [30] Birsa Čelič T: Določevanje kristalne strukture na monokristalih, Seminar, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010.
- [31] Bitenc M: Uporaba rentgenske praškovne difrakcije za karakterizacijo nanodelcev, Seminar pri predmetu Aplikativna kristalografija. Ljubljana, 2006.
- [32] http://www.ki.si/fileadmin/user_upload/datoteke-L09/nzl/Kristalografija-NZL-POGL4.pdf (dostop: 05.08.2015).
- [33] http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SXD.html (dostop: 10.11.2015).
- [34] Malvern Instruments Ltd, Mastersizer 2000, user manual, MRK0864 – 01, 2007.
- [35] <http://www.colgate.edu/academics/departments-and-programs/geology/facilities> (dostop: 20.07.2015).
- [36] <http://www.malvern.com/en/products/technology/laser-diffraction/default.aspx> (dostop: 20.07.2015).

- [37] https://sl.wikipedia.org/wiki/Rayleighovo_sipanje#Aproksimacija_velikosti_delca_in_intezitete_sipanja (dostop: 20.07.2014).
- [38] Alderborn G: Tablets and Compaction. In: Aulton M. E Pharmaceuticals: The Science of Dosage Form Design, Churchill Livingstone, 2002: 397 - 440.
- [39] http://www.ffa.unilj.si/fileadmin/datoteke/Knjiznica/magistrske/2014/Zaloznik_Ziva_mag_nal_2014.pdf (dostop: 20.07.2015).
- [40] Vidovič S: Proučevanje vpliva vrste škroba in laktoze na lastnosti tablet izdelanih z direktnim tabletiranjem, Diplomaska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013.
- [41] Kumar Dokala G, Pallavi Ch.: Direct Compression - An Overview. IJRPBS 2013; 4: 155 - 158.
- [42] Joksimović T, Baumgartner S: Tabletiranje snovi, občutljivih na povišan tlak. Farm Vestn 2008; 59: 194 - 195.
- [43] Swarbrick J, Boylan JC: Encyclopedia of Pharmaceutical technology, Informa Healthcare USA, New York, 2007: 3653 - 3672.
- [44] Junc A: Vpliv premera matrice na proces stiskanja in lastnosti tablet, Magistrska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2014.
- [45] Rodriguez Valadez J.A, Villafuerte Robles L: Compactibility assessment of direct compression excipients: Prosoolv easytab. IJPPS 2014; 6: 258 - 264.
- [46] Planinšek O, Srčič S: Navodila za vaje pri predmetu Fizikalna farmacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2001: 1 - 42.
- [47] https://en.wikipedia.org/wiki/Contact_angle#/media/File:Contact_angle.svg (dostop: 20.07.2015).
- [48] Hadela A: Študij adsorpcije galaktoglukomanana na polietilentereftalat, Diplomsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za strojništvo, 2014.
- [49] <http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/static-contact-angle/> (dostop: 20.07.2015).

- [50] http://www.face-kyowa.co.jp/english/en_science/en_theory/en_what_contact_angle/ (dostop: 20.07.2015).
- [51] <http://ww1.prweb.com/prfiles/2009/04/21/166431/DSC1.gif> (dostop: 28.07.2015).
- [52] http://www.aimil.com/product-SuperNova_dual_wavelength_diffractionmeter-1096.aspx (dostop: 10.11.2015).
- [53] http://uwm.edu/engineering-advancedanalysisfacility/wp-content/uploads/sites/253/2015/02/20150217_DSR_CEAS_D5D5648image.jpg (dostop: 27.07.2015).
- [54] <http://www.thm.de/ibva/ags/agbiophysik/ausstattung> (dostop: 28.07.2015).
- [55] <https://www.abbott-ir.com/custom/auctionArchiveDetail.cfm?aID=6156> (dostop: 28.07.2015).
- [56] <http://www.kruss.de/products/contact-angle/dsa100/drop-shape-analyzer-dsa100/> (dostop: 28.07.2015).
- [57] http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FT/Oprema/IMA_Killian_SP300.pdf (dostop: 28.07.2015).
- [58] <http://www.ebay.com/itm/VARIAN-AGILENT-VK200-Tablet-Hardness-Tester-/121462240539> (dostop: 28.07.2015).
- [59] Hasegawaa G, Komasaakaa T, Bandoa R, Yoshihashia Y, Yonemochia E, Fujii K, Uekusab H, Teradaa K: Reevaluation of solubility of tolbutamide and polymorphic transformation from Form I to unknown crystal form. *Int J Pharm* 2009; 369: 12 - 18.