Sferična kristalizacija

Baus, Nea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:761123

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Nea Baus

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SFERIČNA KRISTALIZACIJA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Marijana Đaković

Zagreb, 2017.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 23.svibnja 2017.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 23. / 30. lipnja 2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Marijana Đaković Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK X

§ 1. UVOD 1

1.1. Kristalizacija 1

1.2. Sferična kristalizacija 1

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME 2

2.1. Kristalizacija organskih krutina 2

2.1.1. Teorijski uvod 2

2.1.2. Metode kristalizacije organskih krutina 2

2.1.3. Nukleacija 4

2.1.4. Kristalni rast 5

2.1.5. Morfologija i habitus kristala 5

2.2. Sferična kristalizacija 6

2.2.1. Teorijski uvod 6

2.2.2. Metode sferične kristalizacije 6

2.2.3. Zone koje nastaju prilikom sferične kristalizacije 14

2.2.4. Karakterizacija sferičnih aglomerata 15

§ 3. ZAKLJUČAK 20

§ 4. LITERATURNI IZVORI XXI

§ SAŽETAK

Sferična kristalizacija je jedna od novih tehnika dizajna čestica koja svoju najveću primjenu nalazi u farmaceutskoj industriji.[1] Ova tehnika prvi se put spominje u radu koji je napisao Kawashima sa suradnicima 1982. godine, a razvijena je s ciljem poboljšanja izravne kompresibilnosti salicilne kiseline i ostalih djelatnih farmaceutskih tvari (*eng. API*).[1]

Tijekom sferične kristalizacije nastanak kristala usklađen je s njihovom aglomeracijom u sferične čestice. Ova tehnika kristalizacije jedna je od rijetkih u kojima je aglomeracija poželjna, no potrebna je kontrola brojnih parametara s ciljem nastanka čestica željenih svojstava.[3] Postoji nekoliko metoda eksperimentalne izvedbe od kojih sve uključuju upotrebu otapala u kome je aktivna tvar dobro topljiva (tzv. dobro otapalo), otapala u kome je aktivna tvar slabo topljiva ili gotovo netopljiva (tzv. protuotapala) i premošćujuće tekućine. Najčešće korištena metoda je metoda jednostavne sferične aglomeracije, a najinovativnija je metoda kristal-ko-aglomeracije kojom se i djelatne tvari niske aktivne doze u kombinaciji s pomoćnim tvarima (ekscipijensima) mogu proizvesti u direktno kompresibilnoj formi.[4]

Tehnika sferične kristalizacije iznimno je korisna i ekonomski isplativa u industriji, ali je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se proces mogao optimizirati.

§ 1. UVOD

1.1. Kristalizacija

Kristalizacija je proces pri kojem se istovremeno kombiniraju stvaranje čvrstih kristala iz otopine, taline, para ili krutina i njihovo pročišćavanje. Proces kristalizacije zahtjeva manje ulaganje energije od evaporacije. Kristal je čvrsta forma neke krutine. Ukoliko se radi o anorganskoj krutini, njena unutarnja građa je pravilna te se kristali od kojih je sastavljena mogu svrstati u jedan od sedam osnovnih kristalnih sustava. Organske krutine, uključujući i većinu djelatnih farmaceutskih tvari, imaju uređeno stanje niže simetrije te je stoga njihova karakterizacija otežana.[5] Gledano sa supramolekularnog stajališta, kristalizacija je supramolekulska reakcija, a svojstva kristala definirana su intermolekulskim interakcijama.

1.2. Sferična kristalizacija

U današnje vrijeme u farmaceutskoj industriji veliki izazov predstavljaju djelatne tvari teško topljive u vodi i vodenim otopinama te djelatne tvari i lijekovi (farmaceutski oblik s djelatnom tvari) koje nemaju odgovarajuća primarna i sekundarna svojstva. Primarna svojstva tvari su veličina i oblik čestica, kristalna forma, gustoća, poroznost; dok su sekundarna svojstva tečnost, kompresibilnost i kompaktnost.

Tehnike pomoću kojih se ta svojstva unapređuju su tehnike dizajna čestica. Jedna od takvih tehnika je i sferična kristalizacija prilikom koje se kristalizacija i aglomeracijski procesi zbivaju simultano.[7]

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Kristalizacija organskih krutina

2.1.1. Teorijski uvod

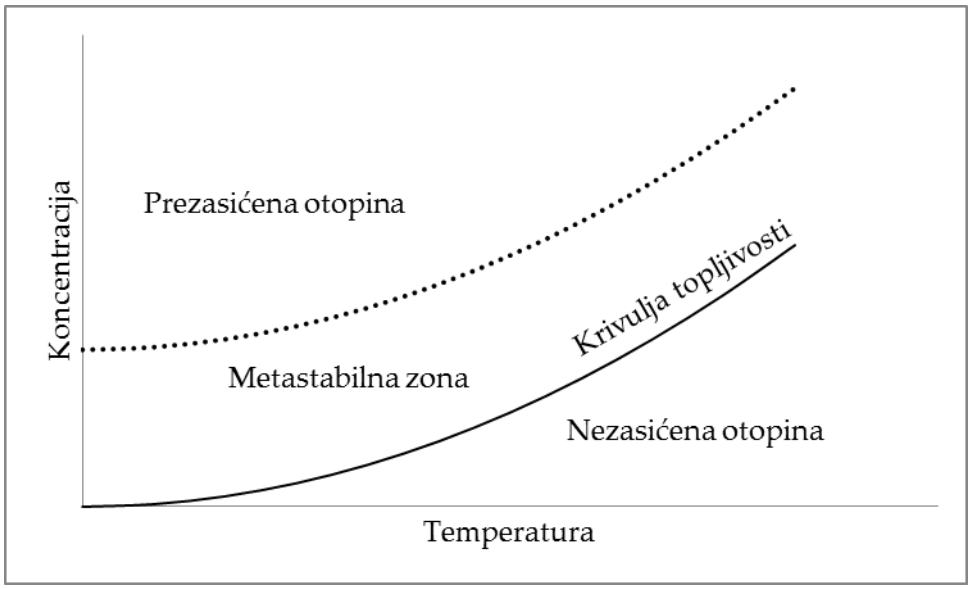
Kristalizacija je osnova mnogim prirodnim i kemijskim procesima, a važnu ulogu zauzima i u farmaceutskoj industriji gdje je bitno dobiti djelatnu farmaceutsku tvar (*eng. API*) željene kristalne forme koja je stabilna i apsorbabilna u ljudskom organizmu na željenome mjestu. Upravo kontrola procesa kristalizacije omogućuje pripravu proizvoda sa željenim i reproducibilnim svojstvima.

Cilj kristalizacije je dobiti kristalan produkt visoke kvalitete koja se procjenjuje na temelju kemijske čistoće, kristalografske čistoće, morfologije, veličine čestica i raspodjela čestica različite veličine. Ukoliko dobiveni produkt ne udovoljava kriterijima, mogu se javiti problemi i oštećenja prilikom miješanja, filtriranja ili sušenja produkta te može doći do stvaranja novih polimorfa.[6]

2.1.2. Metode kristalizacije organskih krutina

2.1.2.1. Kristalizacija iz otopine

Kristalizacija iz otopine odnosi se na kristalizaciju organske tvari otopljene u jednom otapalu ili smjesi više otapala. Odabrano otapalo kemijski ne reagira s organskom tvari. Preduvjet za ovu metodu kristalizacije je prezasićenje otopine kojom se potiče kristalizacija. Ono se većinom postiže evaporacijom otapala pri standardnom ili sniženom tlaku. Pomoću dijagrama topljivosti određene tvari može se povezati množinska koncentracija i temperatura sustava sa zasićenjem i topljivosti. Iznad linije zasićene otopine, nalazi se metastabilna zona čija širina ovisi o prisutnosti nečistoća i jezgara nukleacije. Metastabilna zona je stanje otopine u kojoj se primarna nukleacija (nukleacija do koje dolazi pri prezasićenju) ne zbiva spontano, ali je moguća. Nakon što kristalizacija započne, koncentracija otopine ovisi o brzini evaporacije, površini kristala, sekundarnoj nukleaciji i brzini rasta kristala. Ukoliko koncentracija otopine prekorači metastabilnu zonu, može doći do aglomeracije i nekontrolirane nukleacije.



Slika 1. Dijagram topljivosti krutine

U slučaju dobro topljivih krutina, kristalizacija iz otopine može se postići i dodatkom otapala u kojem se krutina ne otapa i s kojim kemijski ne reagira niti tvori kokristal ili solvate, tzv. protuotapala. Protuotapalo je mješljivo s otapalom. Dodatkom protuotapala, topljivost krutine se smanjuje i dolazi do kristalizacije. Ova metoda se vrlo često koristi u industriji za kristalizaciju termolabilnih tvari jer nije potrebno dodatno zagrijavati sustav.[6]

2.1.2.2. Kristalizacija iz taline

Ukoliko prilikom zagrijavanja ili taljenja organske krutine ne dolazi do njenog raspada, kristalizacija se može postići hlađenjem taline. Ova metoda koristi se ukoliko je krutina netopljiva u najčešće korištenim otapalima ili ako prilikom evaporacije tvori kokristale ili solvate s otapalima.[6]

2.1.2.3. Kristalizacija iz para krutine

Ukoliko krutina pri određenim uvjetima tlaka i temperature izravno sublimira, bez taljenja, i pritom se ne raspada, kristalizacija se može postići hlađenjem para sublimirane krutine. Ovom metodom dobiva se iznimno čisti produkt.[6]

2.1.2.4. Solvotermalna i hidrotermalna kristalizacija

Solvotermalna kristalizacija odnosi se na kristalizaciju u prisutnosti otapala pri temperaturi višoj od vrelišta otapala pri atmosferskom tlaku. Ukoliko se radi o vodi, metoda se naziva hidrotermalna kristalizacija. Povećanjem temperature (do kritične temperature), raste tlak para iznad vodene otopine te se smanjuje viskoznost i dielektrična konstanta otapala. Također, u većini slučajeva, povećanjem temperature povećava se topljivost tvari, a smanjenjem viskoznosti povećava se pokretljivost otopljene tvari u otopini. Ova metoda je vrlo pogodna za kristalizaciju koordinacijskih polimera. Ovakva kristalizacija odvija se u hidrotermalnom reaktoru (autoklavu).[6]

2.1.2.5. Kristalizacija iz krute faze

Kooperativnost u kristalu važan je čimbenik nukleacije nove vrste iz krute faze. Na transformaciju molekula u krutoj fazi i nukleaciju ponajprije utječe ono što se zbiva u njenoj neposrednoj blizini i prisutnost defekata. Kristalizacija nove krutine (faze kćeri) iz roditeljske faze (faze majke) zbiva se prilikom pothlađivanja ili pregrijavanja.

Postoje dvije tehnike koje ova metoda uključuje, a to su prijelaz jediničnog kristala u jedinični kristal i mehanokemijska priprava kristala. Prilikom prijelaza jediničnog kristala u jedinični kristal, reaktant je monokristal koji reakcijom daje drugi monokristal uz očuvanje oblika i prozirnosti. Ova tehnika kristalizacije iz krute faze primjenjuje se u proizvodnji kristalnih organskih polimera. Mehanokemijska priprava kristala je tehnika za kristalizaciju tvari bez prisutnosti ili uz minimalnu količinu otapala kojim se potiče veća brzina nukleacije, a kao produkt dobivaju se kristali manjih dimenzija. Primjenjuje se za krutine koje su slabo topljive pri normalnim uvjetima. Eksperimentalna izvedba ove tehnike uključuje upotrebu tarionika s tučkom ili kugličnog mlina.[6]

2.1.3. Nukleacija

Kristalizacija je složeni proces u kojem postoje dvije faze: nukleacija i kristalni rast. Do nukleacije dolazi u onom trenu kada se nukleacijska jezgra (skup određenih atoma, iona ili molekula) stabilizira iz sustava (otopine, taline ili para). Do agregacije otopljenih molekula dolazi prilikom koncentriranja otopine i pojave jačih neveznih interakcija među molekulama otopljene tvari. Takvom agregacijom nastaje kritična jezgra specifičnih dimenzija (kritične veličine) koja postaje ishodište daljeg kristalnog rasta. Nukleacija može biti spontana ili inducirana, no u većini slučajeva teško je definirati je li nukleacija potaknuta vanjskim čimbenicima. Stoga se nukleacija može podijeliti na primarnu (homogenu) do koje dolazi u homogenom sustavu i sekundarnu (heterogenu) do koje dolazi u blizini neke druge faze (nečistoće ili nepravilnosti).[6]

2.1.4. Kristalni rast

Kada dođe do stabilizacije nastale kritične jezgre, gradbene jedinice, tj. molekule otopljene tvari difundiraju iz okolne prezasićene otopine na površinu kritične jezgre čime dolazi do njihovog povezivanja i kristalnog rasta. Brzina rasta određena je brzinom kojom se gradbene jedinice vežu i/ili otpuštaju s površine kritične jezgre te brzina difuzije kroz otopinu i reakcijsku zonu do površine kritične jezgre, tj. brzina površinske reakcije. Kristalni rast moguće je kontrolirati dodatkom površinski aktivnih tvari ili proteina, a na njega utječu vanjski parametri poput temperature i prezasićenja te prisutstvo nečistoća.[6]

2.1.5. Morfologija i habitus kristala

Morfologija i habitus kristala pojmovi su koji se odnose na vanjski izgled kristala. Morfologija se odnosi na kristalne plohe i kuteve među tim plohama i usko je povezana sa simetrijom kristala. Habitus kristala odnosi se na njegov oblik (štapičast, igličast, prizmatski). Morfologija i habitus kristala vrlo su bitne karakteristike praškastih materijala jer o njima ovisi kompresibilnost (koliko je uzorak otporan na komprimiranje u tabletu). U farmaceutskoj industriji preferirani su ekvidimenzionalni kristali jer su obično kompaktniji, tečniji, te se lakše suše i filtriraju. Kontroliranje morfologije kristala stoga je koristan alat u industriji, a može se postići odabirom odgovarajućeg otapala ili dodatkom aditiva pripravljenih specifično za određeni sustav.[6]



Slika 2. (a) Kristali iste morfologije, ali različitog habitusa
(b) Kristali sličnog habitusa (oblika), ali različite morfologije

2.2. Sferična kristalizacija

2.2.1. Teorijski uvod

Sferična kristalizacija je metoda kristalizacije prilikom koje dolazi do izmjene otapala, a nastanak kristalnih aglomerata potaknut je dodatkom treće tekućine koja se naziva premošćujuća tekućina. Prilikom većine ostalih procesa kristalizacije nastoji se izbjeći aglomeracija, no prilikom sferične kristalizacije aglomeracija je poželjna i odvija se u kontroliranim uvjetima. Procesom sferične kristalizacije kristali nastali u procesu kristalizacije pretvaraju se u sferične aglomerate veličine između 300 i 500 μm.[8] Nastali sferični aglomerati nadalje poboljšavaju tečnost i kompresibilnost lijeka (farmaceutski oblik s djelatnom tvari) čime se omogućuje direktno tabletiranje.[7]

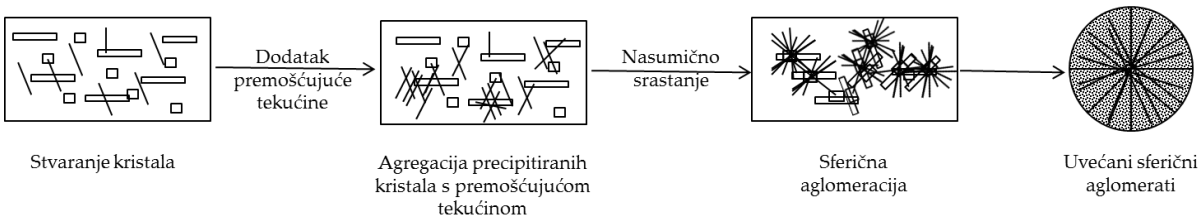
Prilikom sferične kristalizacije potrebno je pratiti i kontrolirati određene parametre kako bi se osiguralo što veće iskorištenje, odnosno nastanak što veće količine sferičnih kristala. Optimizacija sferične kristalizacije dosta je otežana jer nisu u potpunosti poznati točni mehanizam i utjecaj procesnih parametara. Nadziranjem raspodjele čestica tijekom postupka kristalizacije može se pratiti promjena njihovog ukupnog broja, dimenzija i brzine nastajanja čime se omogućava uvid u dinamiku sferične kristalizacije. Sferična kristalizacija koristi se u farmaceutskoj industriji za povećanje topljivosti i brzine otapanja slabo topljive tvari, za maskiranje gorkog okusa nekih tvari, poboljšanja tečnosti i kompresibilnosti te veće financijske isplativosti čitavog procesa proizvodnje jer se omogućuje izravno tabletiranje farmaceutskog oblika s djelatnom tvari, tj. lijeka.[7]

2.2.2. Metode sferične kristalizacije

Postoji nekoliko metoda sferične kristalizacije djelatnih tvari i lijekova, a one osnovne su jednostavna sferična aglomeracija i difuzija otapala u emulziji.

2.2.2.1. Jednostavna sferična aglomeracija (Metoda izmjene otapala)

Jednostavna sferična aglomeracija je metoda koja uključuje korištenje triju različitih otapala. U jednom od ta tri otapala djelatna farmaceutska tvar (*eng. API*) se izrazito dobro otapa (tzv. dobro otapalo), u drugom se gotovo ne otapa (protuotapalo), dok se treće koristi kao premošćujuća tekućina.. Gotovo zasićena otopina tvari u dobrom otapalu ulijeva se u protuotapalo. Zatim se u smjesu, uz konstantno miješanje, dodaje manja količina premošćujuće tekućine (agensa za močenje) koja služi za poticanje nastanka aglomerata. Kao rezultat kapilarnih sila i efekta međupovršinske napetosti, premošćujuća tekućina „lijepi“ kristale jednog za drugoga čime se formiraju sferični aglomerati.[7] Glavni parametri ove metodu su izbor otapala, količina i vrsta premošćujuće tekućine, prisustvo aditiva, početna veličina čestica, topljivost, brzina miješanja i temperatura sustava.

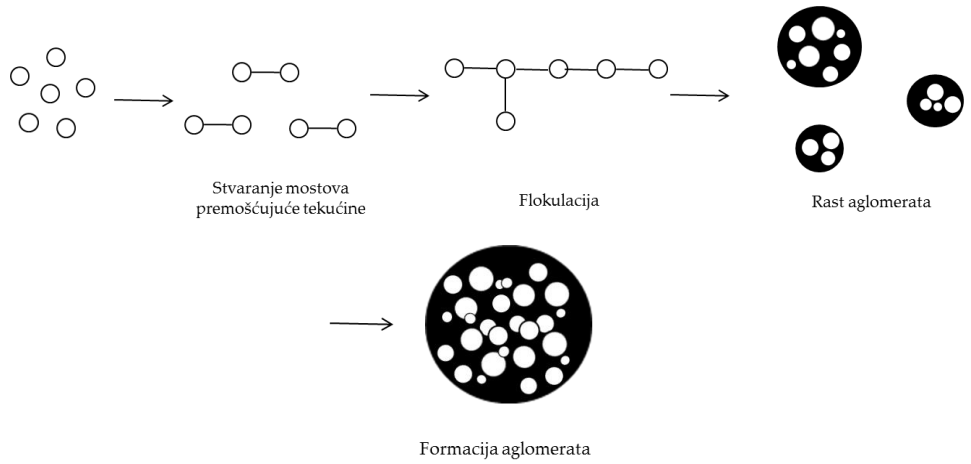


Slika 3. Shematski prikaz metode jednostavne sferične aglomeracije u kojoj se mnoštvo igličastih kristala (iglice) udruži u sferične aglomerate uz upotrebu odgovarajućeg precipitanta (štapići) i sustava otapala

Polarnost dobrog otapala i njegova interakcija s protuotapalom i premošćujućom tekućinom utječu na oblik rastućih kristala, izgled površine i zaobljenost kristalnih aglomerata. Otapalo i protuotapalo moraju biti dobro mješljivi i afinitet između dobrog i lošeg otapala mora biti jači od afiniteta između tvari i dobrog otapala čime se omogućuje trenutni nastanak kristala. Premošćujuća tekućina ne smije biti mješljiva s lošim otapalom i mora močiti precipitirane kristale. Sustav otapala u praksi se većinom određuje principom pokušaja i pogreške, ali vodeći brigu o uvjetima koje odabrana otapala moraju zadovoljavati. Chow i Leung predložili su određena pravila pomoću kojih se sustav otapala može sustavno odabrati.[13] Ukoliko je djelatna tvar topljiva u vodi, kao protuotapalo koristi se organsko otapalo mješljivo s vodom, a kao premošćujuća tekućina koristi se vodena otopina kalcijevog klorida visoke koncentracije. Ukoliko je djelatna tvar topljiva u jednom ili više organskih otapala, voda se koristi kao protuotapalo, a organsko otapalo nemješljivo s vodom kao premošćujuća tekućina. Za djelatne tvari koje se otapaju samo u organskim otapalima koja su mješljiva s vodom, zasićena vodena otopina tvari i neko organsko otapalo koriste se kao protuotapalo i premošćujuća tekućina. Ukoliko je djelatna tvar slabo topljiva u vodi ili bilo kojem organskom otapalu, kao protuotapalo koristi se organsko otapalo nemješljivo s vodom i vodena otopina kalcijevog klorida visoke koncentracije kao premošćujuća tekućina. S obzirom na nedovoljnu topljivost djelatne tvari u vodenoj otopini kalcijevog klorida, dodatak pomoćne vezujuće tvari poput polivinil pirolidona (PVP 40000) ili polietilen glikola (PEG 10000) nužan je za aglomeraciju.

Količina i vrsta premošćujuće tekućine najbitniji su parametri ove metode. Premošćujuća tekućina služi kao „most“ koji povezuje čestice koje stvaraju aglomerate. U većini slučajeva, povećanje količine premošćujuće tekućine dovodi do povećanja veličine sferičnih aglomerata. Primjenom ove metode na nekoliko različitih djelatnih tvari, zaključeno je da se najfiniji kristali i najveće iskorištenje dobivaju kada se koristi relativno mala količina premošćujuće tekućine. Količina premošćujuće tekućine može se odrediti iz ternarnog dijagrama ili dijagrama topljivosti premošćujuće tekućine u

danom sustavu. U području iznad krivulje koja separira faze sustav je u potpunosti mješljiv, ali je u području tik ispod separacijske krivulje prisutna mala količina premošćujuće tekućine.



Slika 4. Mehanizam stvaranja mostova premošćujuće tekućine tijekom sferične aglomeracije

Prisustvo pomoćnih tvari (ekscipijensa) poput polimernih materijala ili površinski aktivnih tvari (surfaktanata) utječe na aglomeraciju čestica u procesu kristalizacije. Dodatkom surfaktanata, smanjuje se površinska napetost i viskoznost medija čime se utječe na nukleacijski proces. Dodatkom nekih polimera poput hidroksipropil metil celuloze (HPMC), metilceluloze ili polivinil pirolidona (PVP) proces kristalizacije se inhibira. Polivinil pirolidon (PVP) je najučinkovitiji inhibitor kristalizacije. Ovi polimeri su nekompatibilni s molekulom domaćinom na površini rastućeg kristala te se njihovim inkorporiranjem na površinu mijenja način rasta. Dodatak navedenih pomoćnih tvari može i ubrzati proces kristalizacije i poboljšati biodostupnost i mikrometarska svojstva lijeka.

Veličina čestica i raspodjela čestica djelatne farmaceutske tvari i ekscipijensa različite veličine utječe na proces miješanja i na moguću segregaciju unutar materijala koji se miješa. Raspored čestica različite veličine u praškastom materijalu utječe i na tečnost i biodostupnost određenog lijeka.

Topljivost djelatne farmaceutske tvari utječe na odabir sustava otapala, a fizikalna svojstva lijeka (farmaceutskog oblika s djelatnom tvari) mogu se kontrolirati odabirom odgovarajuće količine otapala. Povećanjem koncentracije djelatne tvari poroznost se smanjuje. Količina otapala određuje se testovima topljivosti lijeka i konstruiranjem triangularnog faznog dijagrama pomoću kojeg se definira područje međusobne nemješljivosti otapala koristeći ternarni dijagram.

Sferične čestice formiraju se uslijed mehaničke sile uzrokovane miješanjem kroz dulji vremenski period. Upravo je brzina miješanja jedan od glavnih parametara koji utječu na veličinu prosječnog promjera aglomeriranih kristala. Brzina miješanja i količina premošćujuće tekućine određuju brzinu formacije aglomerata i njihovu konačnu veličinu. Potrebna je velika brzina miješanja kako bi se premošćujuća tekućina raspršila unutar sustava. Povećanjem brzine miješanja, povećava se sila

smicanja primijenjena na kapljice čime se one više disperziraju. Prilikom kristalizacije nekih lijekova potrebno je koristiti manje snage miješanja jer ponekad povećanje brzine miješanja može uzrokovati smanjeni nastanak aglomerata zbog utjecaja povećanih sila koje remete sustav. Brzina kristalizacije određuje brzinu miješanja. Ukoliko je brzina kristalizacije velika, potrebna je i velika snaga miješanja kako bi došlo do aglomeracije nastalih kristala. Ustanovljeno je da veće snage miješanja uzrokuju nastanak manje poroznih aglomerata koji su otporniji na mehanički stres. Primijećeno je i da dulje vrijeme miješanja prije dodatka premošćujuće tekućine rezultira nastankom većih i izduženijih kristala koji se postepeno udružuju u sferične aglomerate. Oblik aglomerata određen je i vrstom oštrice na miješalici koja se koristi.

Temperatura unutar sustava utječe na oblik, veličinu i teksturu aglomerata što je posljedica utjecaja temperature na topljivost lijeka. Većina tvari bolje se otapa pri višoj temperaturi te tada do kristalizacije dolazi u manjoj mjeri i sporije. Pri višim temperaturama nastaju aglomerati manje nasipne gustoće. Temperatura sustava utječe na nukleaciju i aglomeraciju kristala. Kawashima i Capes odredili su da sferična kristalizacija prati kinetiku prvog reda uz povećanje broja aglomerata u vremenu.[14]

Vrijeme zadržavanja tijekom kojeg su aglomerati suspendirani u reakcijskoj smjesi utječe na veličinu, oblik i snagu aglomerata. Ukoliko je vrijeme zadržavanja dugo, smanjuje se veličina aglomerata zbog djelomičnog otapanja uzrokovanog premošćujućom tekućinom. Potrebno je odrediti idealno vrijeme zadržavanja da ne dođe do nepotpune aglomeracije ili raspada nastalih aglomerata.

Jednostavna sferična aglomeracija je korisna metoda za pripravu mikrosfera, nanosfera, mikrobalona i nanočestica kao novih načina isporuke lijekova. Ova metoda bitna je i u procesima granulacije, tabletiranju i izradi pastila.[8]

Tablica 1. Popis otapala korištenih u sferičnoj kristalizaciji lijekova[7]

Lijek	Dobro otapalo	Protuotapalo	Premošćujuća tekućina
Celecoxib	Aceton	Voda	Kloroform
Benzojeva kiselina	Etanol	Voda	Kloroform
Mefenaminska kiselina	Dimetil formamid	Voda	Kloroform
Aciclofenac	Aceton	Voda	Diklormetan
Askorbinska kiselina	Voda	Etil acetat	Kloroform
Roxythromycin	Metanol	Kloroform	Voda
Aminophylline	Etanol	Kloroform	Voda
Nabumetone	Etanol	Voda	Cikloheksan
Acetilsalicilna kiselina	Etanol	Voda	Ugljikov tetraklorid
Salicilna kiselina	Voda	Etanol	Kloroform
Propyphenazone	Etanol	Voda	Izopropil acetat

2.2.2.2. Metoda difuzije otapala u emulziji (eng. ESD) ili Kvazi-ESD metoda

U metodi difuzije otapala u emulziji (*eng. ESD*) sferični aglomerati pripravljaju se upotrebom miješanog sustava otapala koji se sastoji od dva ili tri djelomično mješljiva otapala, poput sustava premošćujuće tekućine i protuotapala ili dobrog otapala, protuotapala i premošćujuće tekućine. U ESD metodi afinitet između djelatne tvari i dobrog otapala jači je nego onaj između djelatne tvari i protuotapala. Djelatna tvar se otapa u dobrom otapalu i dispergira u protuotapalo pri čemu nastaju emulzijske (kvazi) kapljice, iako su otapalo i protuotapalo dobro miješljivi. Dobro otapalo postepeno difundira iz emulzijskih kapljica u okolno protuotapalo, dok protuotapalo difundira u kapljice pri čemu lijek kristalizira unutar kapljica. Do kristalizacije dolazi prilikom obrnute difuzije dobrog i lošeg otapala. Dobro otapalo koje zaostane unutar kapljica ponaša se poput premošćujuće tekućine te pomaže aglomeraciji nastalih kristala. Za stabilizaciju emulzije nužno je koristiti odgovarajući polimer koji je potreban za pravilnu kristalizaciju. Djelatna tvar i polimer se koprecipitiraju kako bi se formirali kristali djelatne tvari koji odgovaraju svojstvima polimera. Ova metoda je jednostavnija od metode jednostavne sferične aglomeracije, ali je odabir odgovarajućih otapala izrazito zahtjevan zbog činjenice da ona trebaju biti odabrana tako da sustav bude u obliku emulzije te je teško postići ujednačenu difuziju protuotapala.[3]

Metoda difuzije otapala u emulziji (*eng. ESD*) korištena je za pripravu sferičnih kristala Glibenclamida. Za dobivanje sferičnih kristala uz prisutstvo polimera kao dobro otapalo korišten je metanol, kloroform kao premošćujuće otapalo i voda kao protuotapalo. Dobiveni su sferični kristali

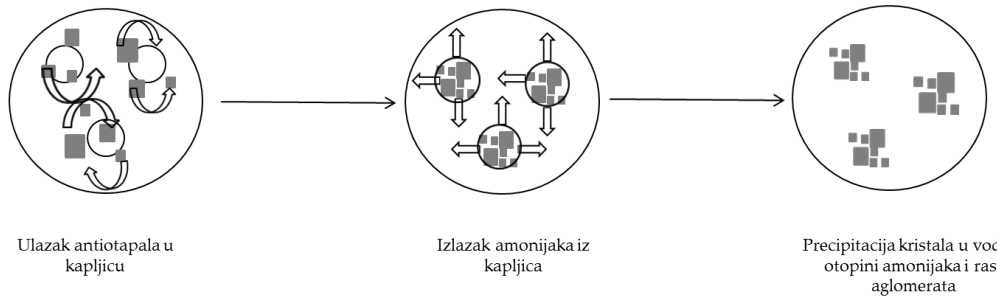
bolje tečnosti, kompaktnosti i gušćeg pakiranja koji su pogodniji za izravno tabletiranje u usporedbi s nesferičnim kristalima. Ovim načinom kristalizaije poboljšana je topljivost i brzina otapanja lijeka. Pretpostavlja se da su svojstva poboljšana zbog povećanih dimenzija i sferičnog oblika čestica te bolje fragmentacije tijekom kompaktnog slaganja pri čemu se povećavaju sile napetosti, a smanjuje elastičnost sustava.[9]

Tablica 2. Popis otapala korištenih u metodi difuzije otapala u emulziji[7]

Djelatna tvar	Otapala
Ibuprofen	Etanol, vodena otopina saharoze, ester više masne kiseline
Acebutalol hydrochloride	Voda, etanol, izopropil acetat

2.2.2.3. Metoda difuzije amonijaka (eng. ADM)

U ovoj metodi kao kristalizacijski sustav koristi se smjesa triju otapala (aceton, vodena otopina amonijaka, diklormetan) koja su djelomično nemješljiva. Ovakva metoda korištena je za sferičnu kristalizaciju djelatne tvari Enoxacin-a. Vodena otopina amonijaka djeluje kao premošćujuća tekućina i kao dobro otapalo za Enoxacin. Aceton se miješa s vodom, ali je loše otapalo te se stoga Enoxacin precipitira izmjenom otapala bez nastanka amonijevih soli. Otapala koja nisu mješljiva s vodom, poput halogeniranih ugljikovodika potiču oslobođenje amonijaka. Aceton iz smjese otapala ulazi u kapljice vodene otopine amonijaka koje su oslobođene iz sustava aceton-vodena otopina amonijaka-diklormetan i posljedično Enoxacin koji je otopljen u vodenoj otopini amonijaka precipitira se tijekom nakupljanja kristala u kapljici. Istovremeno, amonijak iz aglomerata difundira u vanjsko organsko otapalo te njegova sposobnost kao premošćujuće tekućine opada i nastaju aglomerati. Ova metoda korisna je za aglomeraciju djelatnih tvari koje su topljive samo u kiselim ili bazičnim otapalima.[7,8,10]



Slika 5. Metoda difuzije amonijaka za pripravu sferičnih kristala

2.2.2.4. *Metoda neutralizacije*

Metoda neutralizacije uključuje nastanak finih kristala i njihovu aglomeraciju. U ovoj metodi, djelatna tvar otopi se u dobrom otapalu i postavi u cilindričnu posudu (reaktor) uz neprestano miješanje. Tijekom miješanja, u otopinu dodaje se vodena otopina polimera zajedno s neutralnom otopinom čime se neutralizira dobro otapalo i potakne kristalizacija djelatne tvari te se istovremeno dodaje premošćujuća tekućina konstantnom brzinom čime se potiče aglomeracija nastalih kristala. Ova metoda korištena je za pripremu antidijabetika Tolbutamida. Tolbutamid se otopi u natrijevoj lužini, te se doda vodena otopina hidroksipropil metilceluloze (HPMC) i klorovodične kiseline kako bi se otopina neutralizirala. Prilikom neutralizacije dolazi do kristalizacije Tolbutamida. Premošćujuća tekućina dokapava se u sustav brzinom od 10 mL / min pri čemu dolazi do aglomeracije kristala Tolbutamida. Tako pripravljeni aglomerati Tolbutamida imaju veću specifičnu površinu, veću brzinu otapanja i bolju močljivost u usporedbi s aglomeratima pripremljenima metodom difuzije otapala u emulziji i metodom jednostavne sferične aglomeracije. Bolja močljivost posljedica je činjenice da se prilikom aglomeracije hidrofilni polimer hidroksipropil metilceluloza (HPMC) čvrsto zalijepio za aglomerirane kristale.[3,7,11]

2.2.2.5. Metoda kristal-ko-aglomeracije (eng. CCA)

Inkorporacija ekscipijensa u formirane aglomerate korištenjem organske premošćujuće tekućine otežana je zbog hidrofobne prirode većine ekscipijensa. Ukoliko ne može doći do njihove inkorporacije, metoda sferične kristalizacije ne može se koristiti za djelatne tvari niske aktivne doze ili pak onih djelatnih tvari koje pokazuju loša kompresijska svojstva. Metoda kristal-ko-aglomeracije je nova tehnika dizajna čestica pomoću koje se gore navedena ograničenja sferične kristalizacije mogu prevladati.

Ova metoda uključuje neprestano miješanje djelatne tvari i ekscipijensa u tekućem mediju. Neprestano miješanje potrebno je kako bi se u aglomeratima nalazila ujednačena količina djelatne tvari.

U proširenom konceptu ove metode, kristal-ko-aglomeracija uključuje istovremenu kristalizaciju i aglomeraciju djelatne tvari uz ili bez prisustva ekscipijensa iz dobrog otapala i/ili premošćujuće tekućine dodatkom protuotapala. Dobiveni kristali malih su dimenzija i stoga se upotrebom ove metode poboljšava brzina otapanja i biodostupnost. Ponekad premošćujuća tekućina služi i kao dobro otapalo. Da bi se izbjegao gubitak zbog topljivosti djelatne tvari, dobro otapalo trebalo bi biti hlapljivo i nemješljivo s protuotapalom. Premošćujuća tekućina može utjecati na brzinu aglomeracije i na snagu aglomerata. Manja količina premošćujuće tekućine uzrokuje nastanak finih čestica koje u određenoj količini stvaraju velike grube čestice. Ukoliko se poveća brzina miješanja,

smanjuje se aglomeracija zbog povećanih sila koje remete sustav. Povećanjem koncentracije krutine, smanjuje se poroznost čestica.

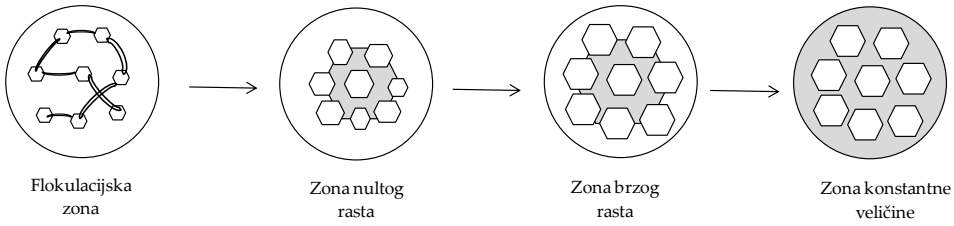
Metoda kristal-ko-aglomeracije može se izvoditi na dva načina: metodom izmjene otapala ili metodom alternacije. U metodi izmjene otapala kristal-ko-aglomerati dobivaju se u jednakoj mjeri kristalizacijom i aglomeracijom. Jedna ili više djelatnih tvari istovremeno kristaliziraju i aglomeriraju iz sustava koji sadrži dobro otapalo i premošćujuću tekućinu. Do aglomeracije dolazi uz prisustvo inertne pomoćne tvari za poboljšanje topljivosti ili dodatkom protuotapala. Odabrana pomoćna tvar za poboljšanje topljivosti treba biti netopljiva u vodi kako bi se izbjegao gubitak djelatne tvari.

Na proces kristal-ko-aglomeracije utječe odabir sustava otapala, pomoćne tvari za poboljšanje topljivosti, unutarnje faze i tipa korištenog ekscipijensa ili polimera. Ekscipijensi i polimeri od ključne su važnosti prilikom priprave kristal-ko-aglomerata za dobivanje čestica koje se izravno mogu komprimirati. Za poboljšanje kompresibilnosti, mikrometarskih svojstava i svojstava otpuštanja lijeka koriste se polimeri poput hidroksipropil metilceluloze, polietilen glikola, etil celuloze i polivinil pirolidona. Ukoliko se pripremaju izravno kompresibilni aglomerati, ekscipijensi moraju imati dobar afinitet prema premošćujućoj tekućini. Talk je hidrofoban ekscipijens koji je močljiv premošćujućom tekućinom te je stoga pogodan za kristal-ko-aglomeraciju. Upotrebljen je za sferičnu aglomeraciju Limzerwala, Bromheksin hidroklorida i Ibuprofena. Sustav otapala u ovoj metodi bira se na osnovi razlika u fizikalno-kemijskim svojstvima ekscipijensa/polimera i djelatne tvari.

Aglomerati pripravljeni metodom kristal-ko-aglomeracije imaju brojne prednosti u odnosu na one pripravljene ostalim metodama sferične kristalizacije. Oni posjeduju izvrsna svojstva tečnosti i veliku specifičnu površinu. Zahvaljujući velikoj specifičnoj površini, kristal-ko-aglomerati jednoliko se distribuiraju unutar probavnog trakta čime se poboljšava apsorpcija i biodostupnost lijeka, a toksičnost se smanjuje. Kristal-ko-aglomeracija koristi se za poboljšanje brojnih svojstava lijeka, neovisno jesu li male ili velike aktivne doze djelatne tvari te jesu li u kombinaciji s dodatnim aktivnim tvarima ili pomoćnim tvarima za poboljšanje topljivosti. Metoda kristal-ko-aglomeracije iznimno je ekonomski isplativa jer je jednostavna za izvedbu, za nastanak aglomerata potreban je samo jedan korak. Ova metoda nalazi primjenu i u pripravi placebo lijekova proizvodeći aglomerate čistog ekscipijensa (aglomerati talka).[3,7,8,10]

2.2.3. Zone koje nastaju prilikom sferične kristalizacije

Četiri koraka uključena su u zonu rasta kristala i aglomeraciju: flokulacijska zona, zona nultog rasta, zona brzog rasta i zona konstantne veličine.



Slika 6. Zone prilikom sferične kristalizacije

2.2.3.1. Flokulacijska zona

U ovoj zoni premošćujuća tekućina zamjenjuje tekućinu s površine kristala koji se približavaju jedan drugome uslijed miješanja. Adsorbirana premoćujuća tekućina povezuje čestice tvoreći mostove između njih čime se formiraju slabo povezane flokule. Međusobna privlačnost čestica ovisi o površinskoj napetosti premošćujuće tekućine i nastalim mostovima.[7,12]

2.2.3.2. Zona nultog rasta

U ovoj zoni slabo povezane flokule pretvaraju se u stješnjene aglomerate, prilikom čega dolazi do istiskivanja tekućine. Premošćujuća tekućina na taj način dolazi na površinu malih flokula. Ovo uzrokuje nedostatak mjesta unutar nastalih sfera koje su ispunjene tekućinom. Do navedenog prijelaza zarobljene tekućine dolazi zbog sila uzrokovanih miješanjem koje potiču međusobne sudare sfernih čestica te sfernih čestica i mehaničke miješalice. Brzina pretvorbe početnih flokula u male aglomerate praćena istiskivanjem premošćujuće tekućine iz pora je korak koji određuje ukupnu brzinu procesa aglomeracije nalazi se u ovoj zoni.[7,12]

2.2.3.3. Zona brzog rasta

Kako dolazi do istiskivanja premošćujuće tekućine iz malih aglomerata, tako nastupa rast tih aglomerata. Proces stvaranja velikih čestica koje prati nasumična kolizija dobro formiranihh jezgara naziva se srastanje. Uspješna kolizija nastupa samo ako jezgre imaju mali višak vlažnosti koji im daje plastičnost na površini. Ovaj rast aglomerata također nastupa zbog sukcesivne adicije materijala na nastalim jezgrama.[7,8,12]

2.2.3.4. Zona konstantne veličine

U ovoj zoni prestaje aglomeracijski rast. Ponekad dolazi i do smanjenja aglomerata uzrokovanog trenjem, okrhnućem ili lomljenjem. U ovoj zoni učestalost kolizije uravnotežena je učestalosti oštećenja aglomerata.[7,8,12]

2.2.4. Karakterizacija sferičnih aglomerata

2.2.4.1. Tankoslojna kromatografija (eng. TLC)

Kromatografijom na tankom sloju određena je *Rf* vrijednost za lijek sa sferičnim i nesferičnim kristalima te su vrijednosti uspoređene. Ovom kromatografskom metodom određuje se i interakcija između djelatne tvari i polimera te se utvrđuje stabilnost lijeka u različitim otapalima.[1]

2.2.4.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (eng. FT- IR)

Primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom određuje se struktura i proučava se kompatibilnost te interakcija djelatne tvari i polimera. Ovom metodom određuje se je li djelatna tvar u formi solvata ili u anhidro formi. Također, pomoću ove metode moguće je identificirati nove polimorfe na osnovi različitih valnih brojeva apsorpcijskih maksimuma.[1,3]

2.2.4.3. Razlikovno pretražna kalorimetrija (eng. DSC)

Pomoću razlikovno pretražne kalorimetrije proučavaju se razlike u entalpiji taljenja lijeka koji je sferično kristaliziran metodom kristal-ko-aglomeracije s nekim ekscipijensom ili polimerom i nesferično kristalizirane djelatne tvari. Pomoću ove metode određuju se i termički raspad, čistoća, solvatacija, dehidratacija i fazni prijelazi.[1]

2.2.4.4. Optička mikroskopija

Oblik, veličina i dimenzije sferičnih kristala proučavaju se korištenjem optičkog mikroskopa. Opažanja se bilježe za različita uvećanja. Optičkim mikroskopom promatra se oko 300 sferičnih čestica različitih veličina. Sustav bilježi najmanji (D_{min}) i najveći promjer (D_{maks}) svake čestice. Iz njihovog omjera formira se parametar *R* koji ukazuje na okruglost (zaobljenost) čestice. Što je parametar *R* bliži broju 1, to su najveći i najmanji promjer čestice bližih veličina i čestica je okruglija.[1]

2.2.4.5. Skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. SEM)

Topografija površine, tip kristala (polimorfija i habitus kristala), oblik i veličina sferičnih kristala analizira se korištenjem skenirajuće elektronske mikroskopije.[3]

Tablica 3. Utjecaj prirode čestice na tečnost djelatne tvari[3]

Priroda čestice	Utjecaj na tečnost
Glatka površina	Povećanje tečnosti
Gruba površina	Slaba tečnost uzrokovana većim trenjem
Ravne i izdužene čestice visoke poroznosti	Slaba tečnost
Visoka gustoća i niska poroznost	Dobra tečnost

2.2.4.6. Difrakcija rentgenskog zračenja u polikristalnom uzorku (eng. PXRD)

Metoda difrakcije rentgenskog zračenja u polikristalnom uzorku koristi se za kvalitativnu i kvantitativnu faznu analizu, određivanje molekulske i kristalne strukture, naprezanja, deformacije, prosječne veličine i distribucije veličine kristalita te za određivanje orijentacije kristalita. Upravo pomoću ove metode moguće je razlikovati polimorfne forme djelatne tvari. Amorfna forma ne proizvodi pravilni uzorak. Rentgenske zrake na kristalnom praškastom uzorku difraktiraju (raspršuju se i interferiraju) na specifičan način dajući reproducibilni i karakteristični raspored maksimuma na određenim 2θ kutevima. Metoda difrakcije rentgenskog zračenja u polikristalnom uzorku je jedna od najbitnijih metoda za određivanje polimorfa u farmaceutskoj industriji.[1,3]

2.2.4.7. Gustoća

Različite vrste gustoće poput prave, granulirane, nasipne te nasipne nakon protresanja mogu se odrediti za sferične kristale. Prava gustoća definirana je kao masa po jedinici volumena. Granulirana gustoća odnosi se na gustoću jednog aglomerata i ona je jednaka masi aglomerata podijeljenoj s njegovim volumenom. Nasipna gustoća definira se kao masa praškastog uzorka podijeljena s nasipnim volumenom (nasipna gustoća $= m_{\text{uzorak}}/V_{\text{b}}$). Nasipni volumeni određuje se pomoću aparature za određivanje gustoće. Praškasti uzorak klasificiran na temelju nasipne gustoće može biti lagan ili težak. Kada su čestice rijetko pakirane, mnoštvo šupljina između čestica povećava nasipni volumen čime praškasti uzorak postaje lakši. Što je veći nasipni volumen to je i veličina kapsule u koju se uzorak pakira veća. Nasipna gustoća nakon protresanja definira se kao masa praškastog uzorka podijeljena s volumenom nakon potresanja menzure s uzorkom tijekom određenog vremenskog perioda.[1,3]

2.2.4.8. Kut mirovanja

Kut mirovanja je kut između horizontale i strmine stošca koji uzorak stvara prilikom ispuštanja s određene visine. Vrijednosti kuta mirovanja manje ili jednake 30˚ obično ukazuju na tečan materijal, dok kutevi veći ili jednaki 40˚ ukazuju na materijal loše tečnosti.[3]

$\phi = \frac{\tan^{-1} h}{r}$ kut mirovanja; h - visina stošca; r - promjer stošca

Tablica 4. Utjecaj kuta mirovanja na tečnost djelatne tvari[3]

Kut mirovanja/ ˚	Tečnost
< 25	Izvrsna
25-30	Dobra
30-40	Prolazna
> 40	Vrlo loša

2.2.4.9. Disperzibilnost

Disperzibilnost je sposobnost materijala da teče ili se lako sipa na površine, a definira se kao masa praškastog uzorka u satnom staklu podijeljena s početnom masom uzorka pomnožena sa 100 %. Eksperimentalno se određuje ispuštanjem praškastog uzorka kroz šuplji cilindar s visine od 61 cm iznad satnog stakla.[3]

2.2.4.10. Carrov indeks (Kompresijski indeks)

Indeks koji kazuje s kojom lakoćom materijal može biti potaknut da teče. Definira se kao postotak kompresibilnosti određen dijeljenjem razlike nasipne gustoće nakon protresanja i naspine gustoće s nasipnom gustoćom nakon protresanja.[1,3]

Tablica 5. Ovisnost tečnosti aktivne tvari o Carrovom indeksu (kompresijskom indeksu)[3]

Carrov indeks/ %	Tečnost
5-11	Izvrsna
12-16	Dobra
16-21	Prolazna
21-25	Loša
25-38	Vrlo loša
> 38	Ekstremno loša

2.2.4.11. Hausnerov omjer

Hausnerov omjer definira se kao omjer nasipne gustoće nakon protresanja i nasipne gustoće. Hausnerov omjer manji od 1,25 (ekvivalentan Carrovom indeksu od 20%) ukazuje na dobru tečnost. Omjer veći od 1,50 (ekvivalentan Carrovom indeksu od 33%) ukazuje na vrlo lošu tečnost. Ukoliko je Hausnerov omjer između 1,25 i 1,50 dodatkom kliznog sredstva poboljšava se tečnost.[1,3]

2.2.4.12. Poroznost

Stanje pakiranja praškastog uzorka opisano je njegovom poroznosti. Poroznost se definira kao omjer praznog volumena i nasipnog volumena.

$$poroznost = \frac{prazni\ volumen}{nasipni\ volumen} = \frac{nasipni\ volumen - nasipni\ volumen\ nakon\ potresanja}{nasipni\ volumen}$$

Poroznost se često iskazuje u postocima.[1,3]

2.2.4.13. Kompresijska svojstva

Ova svojstva vrlo su bitna prilikom priprave tableta, a proces se naziva komprimacija. Prilikom komprimacije mijenja se i poroznost praškastog uzorka. Na temelju ponašanja prilikom kompresije, uzorke se može podijeliti na one koji imaju plastično ponašanje i one koji imaju dilatantno ponašanje. Uzorci koji pokazuju plastično ponašanje deformiraju se prilikom kompresije, a oni koji pokazuju dilatantno ponašanje prilikom kompresije neočekivano se ekspandiraju te se kod nekih uzoraka povećava poroznost.[3]

2.2.4.14. Analiza snage

Mehanička snaga jednog aglomerata određuje se pomoću uređaja za testiranje kompresije u materijalima. Aglomerat se smjesti u uređaj te se na njega primjenjuje postepeno sve veći pritisak pomoću pomičnog klipa ravnog dna. Klip se pomiče prema površini na kojoj je smješten aglomerat konstantnom brzinom od 0,5 mm/min.[3]

$$F = \frac{\pi d^2 \sigma}{4}$$

F- izmjerena sila

d- promjer aglomerata

σ - pritisak

2.2.4.15. Močljivost

Močljivost je kut između površine komprimata i brida kapljice vode nanesene na njega. Ukoliko je taj kut 0˚ komprimat djelatne farmaceutske tvari u potpunosti je močljiv. Za kuteve u iznosu od približno 15˚ komprimat je dobro močljiv, a za kut u iznosu 95˚ ili više komprimat djelatne tvari je loše močljiv. Poželjno svojstvo komprimata je dobra močljivost jer se onda on lakše otapa prilikom ulaska u probavni sustav čovjeka.[1]

2.2.4.16. Higroskopnost

Higroskopnost je definirana povećanjem mase praškastog uzorka uzrokovanog navlačenjem vlage u komorama pri određenoj temperaturi i sadržaju vlage tijekom određenog vremenskog razdoblja.[1]

§ 3. ZAKLJUČAK

Prilikom priprave lijekova nailazi se na brojne zapreke. Mnoge djelatne tvari imaju lošu biodostupnost ili njihova fizička svojstva poput tečnosti, kompresibilnosti i gustoće otežavaju proizvodnju. Da bi se svojstva takvih djelatnih tvari poboljšala i proizvodnja lijekova olakšala, koriste se različite tehnike dizajna čestica.

Sferična kristalizacija je nova tehnika dizajna čestica kojom se dobivaju sferične čestice djelatne tvari veće nasipne gustoće, bolje tečnosti i kompresibilnosti. Ova tehnika također pomaže i u poboljšanju brzine otapanja. Sferična kristalizacija je proces koji ima mnoštvo prednosti pa se tako njome unapređuju fizikalna i mehanička svojstva djelatne farmaceutske tvari što ima veliku korist za farmaceutske procese poput mljevenja, miješanja i tabletiranja. Sferičnom kristalizacijom moguće je pripraviti nove polimorfne forme djelatne tvari koje mogu imati bolju biodostupnost. Pomoću ove tehnike omogućuje se učinkovitija naknadna separacija, filtracija i sušenje te se mogu pripraviti mikrosfere, nanosfere, mikrobaloni i mikro peleti kao novi način isporuke lijeka u tijelu. Sferična kristalizacija lijekova koristi se i za maskiranje njihova gorka okusa. Nažalost, postoje i neki mane ovoga procesa. Odabir odgovarajućih otapala i optimizacija parametara poput temperature i miješanja otežani su zbog brojnih mogućih kombinacija. Optimizirani proces sferične kristalizacije kojim se dobivaju reproducibilni sferični aglomerati može se primijeniti i kao pristup za izravno tabletiranje čime se povećava ekonomska isplativost proizvodnje. Tableta dobivena na ovaj način poboljšane je snage, tvrdoće, manje trošnosti i brzine raspada, a veće brzine otapanja. Za optimizaciju procesa sferične kristalizacije potrebno je uložiti dosta vremena (ili imati sreće) te se stoga u današnje vrijeme pokušavaju pronaći načini modeliranja čitavog procesa i dizajna eksperimenta zbog njegove velike primjenjivosti i brojnih prednosti.

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. E. Hari Krishna, V. Rama Mohan Gupta, N. Soubia Samreen i S. Jyothi, *Der Pharmacia Sinica* **4** (2013) 77-87.
2. Y. Kawashima, M. Okumura i H. Takenaka, *Science* **216** (1982) 1127-1128.
3. E. Hari Krishna, V. Rama Mohan Gupta i S. Jyothi, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **5** (2012) 114-117.
4. A. Ribardiere, P. Tchoreloff, G. Courraze i F. Puisieux, *International Journal of Pharmaceutics* **144** (1996) 195-207.
5. Z. K. Nagy, *Analysis and Conceptual Design of Crystallization Processes*
6. G. Desiraju, 75-95.
7. S. Tiwari i P. Verma, *International Journal of Pharmacy and Life Sciences* **2** (2011) 1065-1068.
8. Y. Javadzadeh, Z. Vazidehasl, S. M. Dizaj i M. Mokhtarpour, *Advanced Topics in Crystallization*, InTech, 2015, str. 85-104.
9. S. Patil i S. Sahoo, *Digest Journal of nanomaterials and biostructures* **6** (2011)
10. B. Kovačić, F. Vrečer i O. Planinšek, *Acta Pharm.* **62** (2012) 1-14.
11. A. Sano, T. Kuriki, Y. Kawashima, H. Takeuchi, T. Hino i T. Niwa, *Chem. Pharm. Bull.* **40** (1992) 3030-3035
12. G. R. Ghenge, S. D. Pande, T. B. Birari, L. S. Jejurkar i A. Ahmad, *International Journal of Applied Pharmaceutics* **3** (2011) 1-6
13. A. H. L. Chow i M. W. M. Leung, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **22** (1996) 357-371
14. Y. Kawashima i C. E. Capes, *Powder Technol.* **10** (1974) 85-92