

Univerza *v Ljubljani*  
Fakulteta *za farmacijo*



VIDA FUREK

RAZVOJ METODE ZA OBARJANJE ZDRAVILNE UČINKOVINE V PRETOČNEM  
MIKROREAKTORJU Z DODATKOM NETOPILA

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DRUG PRECIPITATION IN MICROFLUIDIC  
FLOW REACTOR WITH AN ANTISOLVENT ADDITION

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

Rada bi se zahvalila mentorju izr. prof. dr. Odonu Planinšku, ki je vedno bdel nad mojim delom in mi z nasveti pomagal premagati ovire, ki so nastale tekom eksperimentalnega dela in pisanja diplomske naloge. Poleg tega gre zahvala tudi ostalim sodelavcem in diplomantkam na Katedri za farmacevtsko tehnologijo, ki so mi pogosto priskočili na pomoč.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Odonu Planinška, mag. farm.

**VSEBINA**

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| VSEBINA.....                                                                                    | II |
| SEZNAM OKRAJŠAV.....                                                                            | IV |
| POVZETEK .....                                                                                  | V  |
| ABSTRACT .....                                                                                  | VI |
| 1. UVOD.....                                                                                    | 1  |
| 1.1. Kristalizacija.....                                                                        | 1  |
| 1.1.1. Prenasičenje .....                                                                       | 2  |
| 1.1.2. Nukleacija.....                                                                          | 3  |
| 1.1.3. Rast kristalov .....                                                                     | 6  |
| 1.1.4. Kristali .....                                                                           | 8  |
| 1.2. Pretočni mikroreaktorji.....                                                               | 12 |
| 1.2.1. Zgradba pretočnega mikroreaktorja.....                                                   | 12 |
| 1.2.2. Dejavniki, ki vplivajo na velikost delcev pri obarjanju v pretočnem mikroreaktorju ..... | 13 |
| 1.3. Modelni učinkovini .....                                                                   | 13 |
| 2. NAMEN DELA.....                                                                              | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNO DELO.....                                                                    | 16 |
| 3.1. Materiali .....                                                                            | 16 |
| 3.2. Aparature .....                                                                            | 17 |
| 3.3. Metode.....                                                                                | 17 |
| 3.3.1. Izbira topila in netopila za obarjanje zdravilne učinkovine.....                         | 17 |

|                             |                                                                                                      |    |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.2.                      | Določanje topnosti zdravilne učinkovine v topilu in zmesi topila in netopila                         | 19 |
| 3.3.3.                      | Obarjanje delcev karvedilola in ketoprofena v bučki.....                                             | 20 |
| 3.3.4.                      | Obarjanje delcev v pretočnem mikroreaktorju .....                                                    | 20 |
| 3.3.5.                      | Razvoj metod za preučevanje velikosti in oblike oborjenih delcev .....                               | 23 |
| REZULTATI IN RAZPRAVA ..... |                                                                                                      | 26 |
| 3.4.                        | Obarjanje delcev v bučki .....                                                                       | 26 |
| 3.4.1.                      | Merjenje velikosti delcev karvedilola oborjenih v bučki s fotonsko korelacijsko spektroskopijo ..... | 26 |
| 3.4.2.                      | Merjenje velikosti delcev ketoprofena oborjenih v bučki s fotonsko korelacijsko spektroskopijo ..... | 29 |
| 3.4.3.                      | Opazovanje delcev oborjenih v bučki z vrstičnim elektronskim mikroskopom                             | 31 |
| 3.5.                        | Obarjanje delcev karvedilola v pretočnem mikroreaktorju .....                                        | 36 |
| 3.3.                        | Možnosti izboljšave aparature obarjanja delcev v pretočnem mikroreaktorju....                        | 42 |
| 4.                          | ZAKLJUČEK .....                                                                                      | 43 |
| 5.                          | LITERATURA .....                                                                                     | 45 |

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

SEM - vrstični elektronski mikroskop (angl.: Scanning Electron Microscope)

DMSO - dimetilsulfoksid

THF - tetrahidrofuran

PDI - polidisperzni indeks

## POVZETEK

V procesu obarjanja se raztopljena snov iz raztopine izloči v trdni obliki. Kadar molekule ne tvorijo tridimenzionalno urejenih struktur, se iz raztopine obori amorfna snov. V primeru, ko se molekule povezujejo v urejeno kristalno rešetko, poteka kristalizacija in nastajajo kristali.

V diplomski nalogi smo zdravilno učinkovino iz raztopine oborili z uporabo pretočnega mikroreaktorja. V ta namen smo sestavili aparat iz dveh črpalk, cevk, čaš in pretočnega mikroreaktorja. Do obarjanja je prišlo v kapilarah pretočnega mikroreaktorja, ko sta se združila raztopina zdravilne učinkovine in netopila. Z dodatkom netopila smo zmanjšali topnost učinkovine, povzročili prenasičenje in posledično obarjanje delcev karvedilola. Pretoka topila in netopila smo v ustreznem razmerju uravnali s pomočjo črpalk tako, da je bilo obarjanje spontano in hitro. Vzoredno smo obarjanje karvedilola in ketoprofena izvajali v bučki in rezultate obeh postopkov primerjali med seboj. Delce dobljene z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju in obarjanjem v bučki smo nato analizirali z vrstično elektronsko mikroskopijo in s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Razvili smo metode za pripravo vzorcev za vrstični elektronski mikroskop. V ta namen smo koloidno disperzijo delcev učinkovine kapljali v tekoči dušik in izvedli liofilizacijo. Druga metoda je obsegala kapljanje koloidne disperzije na nučo pokrito z membranskim filtrom, ki smo ga po sušenju uporabili za analizo delcev z vrstično elektronsko mikroskopijo. Analiza vzorcev, ki smo jih pripravili z obarjanjem v bučki, je pokazala, da v začetku kristalizacije nastanejo delci učinkovine nanometrskih velikosti, ki pa s časom hitro rastejo, saj smo po 5 minutah dobili delce velike od 1 do 3  $\mu\text{m}$ . Osnovni delci dobljeni z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju so enotnih oblik in velikosti okrog 500 nm, vendar tvorijo agregate, ki dosežejo velikost nekaj mikrometrov. Tako pripravljeni delci imajo večjo specifično površino kot delci dobljeni z obarjanjem v bučki. Ugotovili smo, da fotonska korelacijska spektroskopija ni primerna metoda za analizo delcev, katerih velikost se s časom relativno hitro spreminja. Analiza vzorca namreč traja približno 5 minut, v tem času pa delci zrastejo iz nanometrskih velikosti v mikronske delce. Bolj primerna je metoda analize delcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom, saj lahko delce analiziramo takoj po njihovem nastanku in za analizo zadostuje ena kapljica vzorca. V primeru fotonske korelacijske spektroskopije pa potrebujemo najmanj 1 mL vzorca.

Predvidevamo, da je v tako razvitem pretočnem mikroreaktorju mogoče ponovljivo izdelati delce želenih velikosti, morfologije in kristalne oblike.

## ABSTRACT

In precipitation process the molecules are coming out of solution and forming a solid. If the molecules are not packed in a regular three-dimensional structure, these types of solids are termed amorphous solids. If the molecules are packed in a crystal lattice, the crystals occur.

In our thesis, we tried to implement crystallization by using a microfluidic flow reactor. Therefore, we created an apparatus consisting of two pumps, tubes, cups and a microfluidic flow reactor. The onset of precipitation in the microfluidic flow reactor's capillaries occurred when the drug solution and the antisolvent were combined. By adding antisolvent, we have reduced drug solubility, causing supersaturation and consequently particle precipitation of carvedilol. The flow of solvent and antisolvent were controlled in proportion using pumps for spontaneous and rapid precipitation. Parallel precipitation of carvedilol and ketoprofen was implemented in a flask and the results were compared with each other. Particles obtained during precipitation in the microfluidic flow reactor and precipitation in a flask were analyzed by scanning electron microscopy and by photon correlation spectroscopy. We have developed methods for sample preparation for a scanning electron microscope. The first method involved dripping a colloidal dispersion of the drug particles in liquid nitrogen and implementing lyophilization. The second method consisted of dropping a colloidal dispersion on a flask covered with a membrane filter which was dried then used for particle analysis via scanning electron microscopy. Analysis of the samples which were prepared by precipitation in the flask showed that, at the beginning of crystallization, the drug particles were nanometer-sized, but grew quickly over time. After 5 minutes, we observed particles which had grown from 1 to 3  $\mu\text{m}$ . Basic particles obtained by precipitation using the microfluidic flow reactor displayed the same shape and size up to around 500 nm, but subsequently formed aggregates the size of several micrometers. In such a way, our prepared particles had larger specific surfaces than the particles prepared by precipitation in the flask. Our conclusion is that photon correlation spectroscopy is not a suitable method for particle analysis when particle size is changing relatively quickly. The sample is analyzed for about 5 minutes, during which the particles grow from the nanometer-sized particles in the micron. A more appropriate method of particle analysis should utilize a scanning electron microscope because the particles can be analyzed immediately after creation, and one drop of sample is

sufficient for analysis, whereas photon correlation spectroscopy requires least a 1 mL sample.

We assume that, in our microfluidic flow reactor, it's possible to reproduce particles of desirable size, morphology and crystal form.

## 1. UVOD

Slaba vodotopnost zdravilnih učinkovin je pogosto povezana z nizko biološko uporabnostjo. Ker se v razvoju zdravil pojavlja vse več takšnih zdravilnih učinkovin, želimo izboljšati njihovo raztapljanje. Po evropski farmakopeji med skoraj netopne učinkovine uvrščamo tiste, kjer se 1g učinkovine raztopi v več kot 10000 mL topila (1). Vse pogostejše kot slabo topno učinkovino obravnavamo tisto, ki v gastrointestinalni tekočini potrebuje več časa za raztapljanje, kot za absorpcijo (2).

Topnost učinkovin lahko izboljšamo z več metodami. Ena izmed metod za izboljšanje topnosti je zmanjšanje velikosti delcev do nanometrskih velikosti. Z zmanjšanjem delcev povečamo specifično površino topljenca, kar izboljša topnost. Nanodelce lahko pripravimo z dvema tehnologijama, in sicer z zmanjševanjem večjih delcev (od "zgoraj-navzdol"; angl.: top-down - tehnologija) ali z obarjanjem delcev (angl.: bottom-up - tehnologija). Pri prvi delce mehansko manjšamo z mletjem in homogeniziranjem. Pri drugi metodi delce izgrajujemo iz molekul, ki jih najprej raztopimo v topilu in potem oborimo na primer z dodatkom netopila. Zaradi večje porabe časa in energije, vnašanja nečistot, elektrostatičnih učinkov pri uporabi metod zmanjševanja večjih delcev, se pojavlja vse večje zanimanje za "bottom-up" tehnologijo, oziroma obarjanje delcev zdravilnih učinkovin koloidnih velikosti (3,4).

### 1.1. Kristalizacija

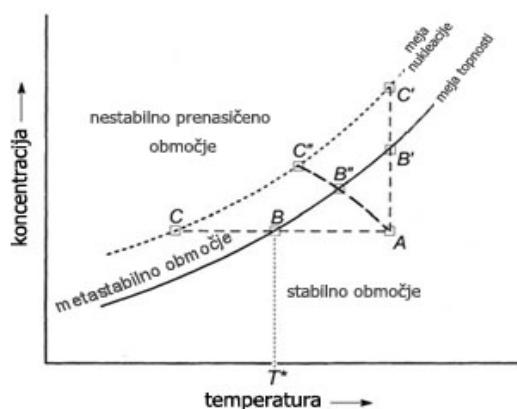
Kristali so trdne snovi, kjer so atomi urejeni v periodično ponavljajočem se vzorcu, ki se razteza v treh dimenzijah. Snovi, kjer so atomi urejeni le na kratkih razdaljah, so nekristalinične oziroma amorfne. Tvorba kristalov oziroma kristalizacija je proces, v katerem se kristali oborijo iz plinaste, tekoče ali trdne faze. Med tekočo fazo spadajo tako taline kot raztopine. Kristalizacija iz raztopine je ena izmed najpomembnejših v farmacevtski industriji, saj z njo izoliramo majhne organske zdravilne učinkovine (5,7).

Kristalizacijo izvedemo iz prenasočene raztopine. Kadar v topilu raztopimo maksimalno količino topljenca, govorimo o nasičeni raztopini. Da lahko izpadejo kristali, potrebujemo prenasočeno raztopino, kar pomeni, da je v topilu več topljenca, kot se ga lahko raztopi. Prenasičenje lahko ustvarimo namerno ali nenamerno; z odstranjevanjem topila (sušenje z zamrzovanjem, sušenje z razprševanjem, sušenje granulata), z manjšanjem topnosti (z

ohlajevanjem raztopine, z dodatkom topila, ki se meša z osnovnim topilom, vendar se topljenec v njem slabše topi in ga zato imenujemo netopilo, s spremembo pH) (5-8). Pretvorba spojine v kristalno obliko je odvisna od kinetične stabilnosti prenasičenega stanja in je regulirana z mehanizmom in kinetiko nukleacije (7).

### 1.1.1. Prenasičenje

Kristalna snov je posledica agregacije molekul v raztopini, ki vodi v nastanek jeder. Za nastanek in rast kristalov pa moramo molekule topljenca spremeniti v termodinamično nestabilno stanje. To pa dosežemo s prenasičenjem (8). Prenasičenje opisuje slika 1.



Slika 1: Topnostni diagram spojine pri različnih temperaturah (9).

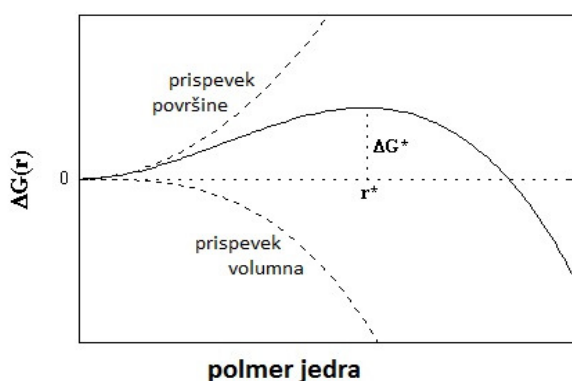
Na sliki 1 ločimo tri območja. *Stabilno območje* je pod mejo topnosti (neprekinjena krivulja), kjer ni možnosti za nukleacijo ali rast kristalov. Obstoječi kristali se raztopijo. *Prenasičeno metastabilno območje* je območje, kjer je možna rast, ni pa spontane nukleacije, ker je energijsko zahtevnejša 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 (9).

Osnovna gonilna sila kristalizacije je prenasičenje, ki jo lahko dosežemo z znižanjem topnosti topljenca ali s povečanjem koncentracije topljenca. Koncentracijo lahko povečamo z izhlapevanjem topila (daljica AC' na sliki 1). Metode, ki zmanjšajo topnost topljenca, so ohlajanje nasičene raztopine (na sliki 1 ohlajanje nasičene raztopine predstavlja daljica AC), dodatek netopila, sprememba pH, dodatek ionov, ki prispevajo k znižanju topnosti topljenca (izsoljevanje). Daljica AC'' na sliki predstavlja kombinacijo dveh metod, in sicer ohlajanje in izhlapevanje topila (5,8,9).

S povečanjem stopnje prenasíčenja se skrajša indukcijski čas. To je čas, ki je potreben, da v prenasíčeni raztopini nastane prvo jedro (7). Število molekul, ki so potrebne za nastanek učinkovitega klastra, to je klastra, ki ne razpade, je obratno sorazmerno stopnji prenasíčenja (8).

### 1.1.2. Nukleacija

Nukleacija je proces, v katerem nastanejo majhna jedra premera nekaj nanometrov in so osnova za rast kristalov. Jedra nastanejo s povezovanjem molekul ali ionov v prenasíčeni raztopini, talini ali plinu (10). Če jedro obravnavamo kot sferično telo, lahko določimo kritični polmer ( $r_c$ ), ki je potreben za njegov obstoj. Kritični polmer določimo tako, da odvajamo funkcijo spremembe Gibbsove proste energije po polmeru. Maksimum te funkcije predstavlja kritični polmer, kar je prikazano na sliki 2.  $\Delta G^*$  predstavlja aktivacijsko energijo za nastanek jedra kritične velikosti (12).



Slika 2: Sprememba Gibbsove proste energije nukleacije kot funkcija velikosti jedra (11).

Nukleacijo lahko delimo na primarno, kjer so kristali spojine v raztopini odsotni in sekundarno, kjer so že prisotni kristali (5).

#### Primarna nukleacija

Primarno nukleacijo razdelimo na homogeno in heterogeno nukleacijo. O homogeni nukleaciji govorimo takrat, kadar le-ta poteče brez vplivov trdne faze katerekoli snovi. Torej v raztopini nimamo prisotnih niti kristalov, ki jih želimo obarjati, niti delcev druge tuje snovi. V primeru prisotnosti tujih delcev, kot so prah, koloidi in druge nečistote, je nukleacija pospešena in jo imenujemo heterogena nukleacija (5). Prisotni tuji delci delujejo kot katalizatorji, ki zmanjšajo energijsko oviro za nastanek jeder (8).

### Homogena nukleacija

Homogena nukleacija zelo redko poteče v večjih volumnih (večjih od 100  $\mu\text{l}$ ) (16). Med dejavnike, ki vplivajo na hitrost homogene nukleacije, uvrščamo molekulski ali ionski transport, viskoznost, prenasíčenje, topnost, temperaturo, medfazna napetost med trdno snovjo in tekočino (8,13). Kinetiko nukleacije lahko eksperimentalno določimo z merjenjem hitrosti nukleacije, indukcijskega časa in širino metastabilnega območja kot funkcijo začetnega prenasíčenja. Hitrost nukleacije narašča s povečevanjem prenasíčenja, kadar so ostali parametri konstantni. Pri konstantnem prenasíčenju pa se hitrost nukleacije poveča s povečanjem topnosti, s čimer se poveča možnost trkov med molekulami. S spremembami topila ali raztopine lahko povečamo topnost in s tem zmanjšamo medfazno energijo in povečamo afiniteto med medijem in kristali. Posledično se za spontano nukleacijo s povečanjem topnosti zniža potrebno prenasíčenje (8).

Ostwaldovo pravilo pravi, da sistem, ki zapušča nestabilno stanje, ne išče najbolj stabilnega stanja, ampak najbližje metastabilno stanje, ki ga doseže z minimalno izgubo proste energije. Nestabilna trdna oblika spojine z najvišjo topnostjo se obori pred obliko, ki je termodinamsko bolj stabilna, kar pomeni, da sta nukleacija in rast kristala termodinamsko nestabilne oblike z najvišjo topnostjo hitrejši kot pri ostalih trdnih oblikah z nižjo topnostjo. Ostwaldovo pravilo pa ni splošno, ker sta tvorba in rast trdne faze pogojeni s kinetiko nukleacije in rasti pod določenimi eksperimentalnimi pogoji (8).

Na hitrost nukleacije in rasti kristalov prav tako vplivajo interakcije med topilom in topljencem na dva načina. Molekule topljenca so v topilu povezane z molekulami topila. Te molekule topila se morajo odstraniti, da pride do interakcije in posledično do kristalizacije. Lahko so molekule topila adsorbirane na površino jedra oziroma na površino rastočega kristala. Molekule topljenca morajo izriniti adsorbirane molekule topila s površine rastočega kristala in se vgraditi v kristalno mrežo. Močnejše kot so interakcije med topljencem in topilom, počasnejša je nukleacija in rast kristalov (14).

Optimalna temperatura nukleacije v praksi je temperatura, pod katero tekočina ni preveč viskozna in nad katero molekularno gibanje ne prepreči formiranja kristala (15).

Pomemben parameter, ki vpliva na mehanizem in kinetiko nukleacije, je volumen raztopine, v katerem se pojavijo jedra kristalov. Dispergiranje, kjer večji volumen raztopine pretvorimo v drobne kapljice, je učinkovit mehanizem za doseganje velikih prenasíčenj oziroma podhladitve. Za preučevanje homogene nukleacije uporabljamo ta mehanizem, saj nam omogoča nadzor nad čistoto, velikostjo delcev in morfologijo. Zaradi

velikega prenasíčenja so tako dobljeni kristali lahko zelo majhni (nanometrskih velikosti). Zaradi nizke stopnje difuzije, ki ovira razvoj klastrov v času izvajanja poskusa, lahko izoliramo amorfnó obliko spojine (8).

### **Heterogena nukleacija**

Nukleacija v heterogenem sistemu poteče pri nižji stopnji prenasíčenja kot v homogenem sistemu. Pomožne snovi (substrati), ki jih dodamo raztopini, znižajo energijo potrebno za potek nukleacije (10,15). Volmer je leta 1939 ugotovil, da je nižanje proste energije odvisno od stíčnega kota (oziroma kota močenja) trdne faze (15).

Reaktivnost površin snovi, ki jih dodamo za sprožitèv nukleacije, vpliva na izolacijo želene kristalne modifikacije in na pretvorbe te modifikacije, ker se zniža prosta energija za tvorbo dvodimenzionalnega jedra. Številne študije so dokazale vpliv parametrov kristalne mreže, topografije substrata oziroma snovi, ki jih dodamo, kristalnih simetrij in medmolekulskih interakcij na nukleacijo povzročeno s površino substrata (8).

S heterogeno nukleacijo lahko izdelamo metastabilne kristalne oblike, ki se v vodi bolje topijo kot stabilne oblike kristalov. To pa dosežemo z dodatkom semen oziroma delcev spojine z ustrezno polimorfno obliko (16).

### **Sekundarna nukleacija**

Sekundarna nukleacija je izraz za nukleacijo, ki poteče ob prisotnosti kristalov snovi v raztopini. Kristali izvirajo iz prenasíčene raztopine in imajo katalitični učinek, kar pomeni, da kristalizacija poteče pri nižjem prenasíčenju kot spontana kristalizacija (8,10). Ta tip kristalizacije je pomemben v industriji.

V literaturi najdemo več teorij razlage sekundarne nukleacije. Razdelimo jih lahko v dve kategoriji. Prva sledi izvoru sekundarnega jedra do matíčnega kristala. V to kategorijo spadajo prašno gojenje, igličasto gojenje in gojenje s trkom. Po drugi, sekundarna jedra lahko izhajajo tudi iz topljenca v tekočem stanju. V to kategorijo spada s strigom tekočine povzročena nukleacija in nukleacija koncentracijskega gradienta nečistote (15).

Pri prašnem gojenju sekundarna jedra izvirajo iz semen kristalov. Drobni kristali, sekundarna jedra, se oblikujejo na površini med rastjo dodanih kristalov – semen ali kot posledica razdrobljenosti med shranjevanjem. Če ta jedra damo v raztopino, delujejo kot nukleacijska jedra in so večja od kritíčne velikosti jedra, zato je hitrost nukleacije neodvisna od stopnje prenasíčenja ali mešanja raztopine. Pri visoki prenasíčenosti se oblikujejo igličasti ali dendritíčni kristali. Ti kristali v raztopini fragmentirajo in služijo kot

nukleacijska jedra. Ta pojav imenujemo igličasto gojenje kristalov. Pri še večjem prenasičenju se oblikujejo nepravilni polikristalni agregati. Drobljenje polikristalov lahko vodi v nastanek nukleacijskih jeder. To imenujemo polikristalno gojenje kristalov. Pri visoki hitrosti mešanja pride do makroabrazije oziroma obrabe kristalov. Pojav delcev je posledica zaokroževanja robov kristalov. Delci, ki nastanejo pri nukleaciji z obrabo, služijo kot kristalizacijska jedra. Hitrost nukleacije je odvisna od kristalne trdote in koncentracije suspenzije. Stična nukleacija je verjetno najpomembnejši vir sekundarnih jeder v industriji. V posodi za kristalizacijo lahko pride do treh vrst stika, in sicer kristal-kristal, kristal-mešalo, kristal-stena posode za kristalizacijo. Sekundarna jedra lahko nastajajo z mikroabrazijo ali pa iz adsorbiranih plasti topljenca, ki še niso kristalizirale (15).

Teorija koncentracijskega gradienta nečistote pravi, da je raztopina bolj strukturirana v bližini kristala, kar poveča lokalno prenasičenost tekočine v bližini kristala, ki je vir kristalizacijskih jeder. Raztopljene nečistote zavirajo hitrost nukleacije. Nečistote so lahko vgrajene v kristalno površino in ustvarijo razliko v koncentracijskem gradientu, kar poveča verjetnost nukleacije. Poskus nukleacije kalijevega klorida v prisotnosti svinca kot nečistote, je to teorijo potrdil. Z mešanjem raztopine izgine koncentracijski gradient nečistot in nukleacija se upočasni. Do kristalizacijskih jeder lahko pride tudi s strigom tekočine na površini kristala. Pri visoki prenasičenosti na površini kristala rastejo dendritični kristali, ki se odlomijo zaradi strižnega toka tekočine in so vir jeder. Drugi mehanizem pa je, ko strižni tok odplavi plast adsorbiranih molekul nazaj v raztopino, kjer lahko zrastejo v nove kristale (15).

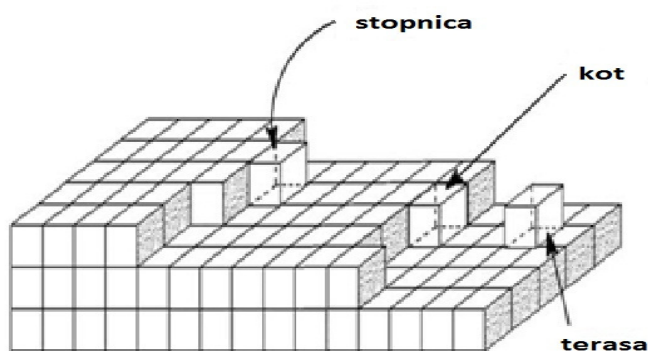
### **1.1.3. Rast kristalov**

Nastanek stabilnih jeder je pogoj za pričetek rasti makroskopskih kristalov. Rast kristalov urejajo notranji in zunanji dejavniki. Notranji dejavniki, kot so tridimenzionalna struktura kristala in kristalni defekti določajo naravo in jakost medmolekularnih povezav med površino kristala in raztopino. Zunanji dejavniki, kot so temperatura, prenasičenost, topilo, prisotnost nečistot, vplivajo na tip interakcije (8).

Hitrost rasti kristala pri linearni rasti kristala izražamo kot hitrost rasti značilnih dimenzij kristala na enoto časa. V primeru okroglega kristala je to premer, v primeru ostalih oblik je to druga največja dimenzija. Drugi način za izražanje hitrosti rasti kristala je spreminjanje mase kristala v odvisnosti od časa (15).

Kristal raste v smeri pravokotno na površino ploskve kristala. Rastoči kristal ima več površin oziroma ploskev, ki rastejo, vendar na obliko kristala vpliva ploskev, ki raste najpočasneje. Najpočasneje pa vedno raste največja ploskev (6,15,19). Obstaja več teorij rasti kristala. Molekula (enota rasti) iz raztopine se mora najprej desolvatirati in se adsorbirati na površino kristala. Potem migrira do področja, kjer obstajajo tako imenovane zanke, kamor se lahko vgradi. Enota kristala ima nato tri možnosti, kot je prikazano na sliki 3, da se vgradi v kristal.

Enota rasti se lahko pritrdi na tako imenovano teraso, kjer imata rastoči kristal in enota rasti le ena stično površino. Lahko se pritrdi na stopnico, kjer sta prisotni dve stični površini ali pa se pritrdi v kot, kjer so tri stične površine. Enota rasti, ki ima največ stičnih površin z rastočim kristalom, se najmočneje veže na površino, kar pomeni, da je slednji primer energijsko najugodnejši (9,15). Obstaja pa še ena možnost, in sicer, da se enota rasti vrne nazaj v raztopino, kar se lažje zgodi pri šibkih vezeh (12).



Slika 3: Vgraditev enote rasti kristala na površino rastočega kristala (9).

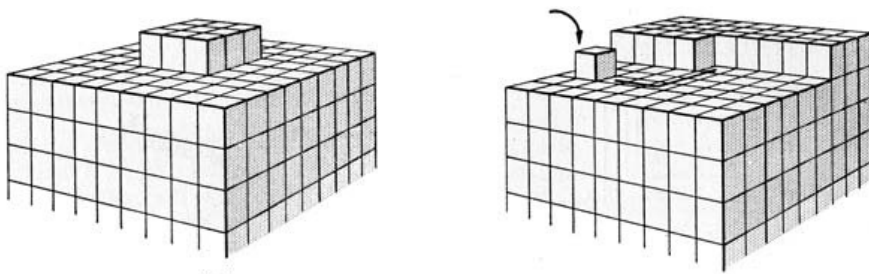
Rast kristalov iz prenasichene raztopine je možna, ker je tok molekul, ki se povežejo s površino kristala, večji kot tok molekul, ki se sprostijo s površine kristala nazaj v raztopino. Tok molekul na površini kristala je odvisen od koncentracije topljenca, zato bodo dobro topni kristali pri enaki stopnji prenasichenja rasli hitreje kot slabo topni (12).

Rast kristalov lahko opišemo z različnimi modeli rasti. Med najbolj raziskanimi mehanizmi sta dvodimenzionalna rast in s spiralna rast kristalov.

### **Dvodimenzionalna rast kristalov**

Kristali rastejo tako, da se enote rasti vgrajujejo v kristal na področju že obstoječih stopnic, vendar če nove stopnice ne nastajajo, kristal neha rasti, ko se površina terase izgradi. Možnost, da nastanejo nove stopnice, je tvorba enoslojnih otočkov na površini kristala

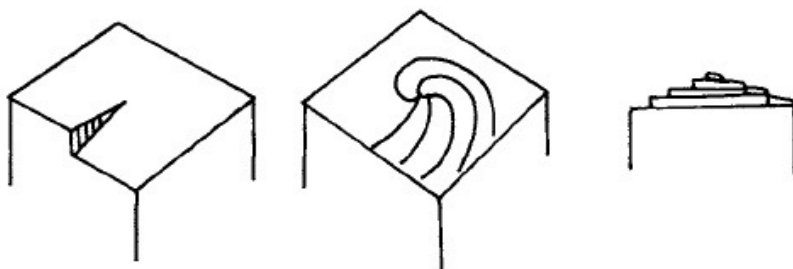
imenovanih tudi dvodimenzionalna jedra. Otočke tvorijo enote rasti, ki ne najdejo takoj področja za vgradnjo in se adsorbirajo na molekule na površini kristala. Ti otočki potem postanejo vir novih "stopnic in kotov", v katere se lahko ujamejo nove enote rasti, dokler se ne prekrije celotna površina kristala. Ta dvodimenzionalni mehanizem rasti je poznan tudi pod imenom "rojstvo in širjenje" (angl.: birth and spread). Dvodimenzionalno rast lahko pričakujemo le pri visokem prenasičenju, saj se jedro težko oblikuje na že obstoječi površini kristala (9,12).



Slika 4: Nastanek dvodimenzionalnega otočka na površini kristala (18).

### Spiralna rast

Kristali niso popolni. Nepravilnosti, ki se pojavijo v kristalu, omogočijo njegovo rast. Opišemo jih z Burton-Cabrera-Frank modelom (17,18). Prekinitev kristalne mreže v obliki vijačnih motenj so stalen vir spiralno urejenih stopnic, zato lahko rast kristala poteka tudi pri nizkem prenasičenju (12,15,18). Površina postane spiralno stopnišče, ki je lahko levo ali desno sučno, odvisno od motnje v kristalni mreži. Ko se plast izgradi, je motnja še vedno prisotna, le da je eno plast višje (15,15). Pri spiralni rasti nikoli ne nastane popolnoma gladka površina kristala, saj rast poteka v obliki spiralnega stopnišča (18).



Slika 5: Spiralna rast kristala (18).

#### 1.1.4. Kristali

Kristali, produkt procesa kristalizacije, so trdne snovi, v katerih so atomi, ioni ali molekule urejeni v pravilne tridimenzionalne strukture. Pri kristalih je ta ureditev pravilna na daljše

razdalje. Običajno so kristali zgrajeni iz ravnih ploskev, ki ležijo pod različnimi koti ena na drugo (6,20).

Čeprav so kristalne rešetke urejene na daljše razdalje, pa lahko imajo kristali, ki so zgrajeni iz enake kemijske entitete, različen ponavljajoči se 3D vzorec, kar imenujemo polimorfizem. Lahko pa imajo enak vzorec, vendar tvorijo delce različnih oblik (morfologija kristalov). Z gradniki kristalov se lahko v kristalne mreže ujame tudi topilo in govorimo o solvatih oziroma v primeru vode o hidratih (6). Tako imajo kristali, ki so enake kemijske sestave, različne lastnosti.

### **Polimorfizem**

Polimorfizem je pojav, da spojina obstaja v več kot eni kristalni obliki. Če se pogoji, pri katerih izvajamo kristalizacijo, spremenijo, bodo lahko molekule tvorile kristal z drugačnim ponavljajočim se vzorcem, kot pri osnovnih pogojih. Tako na polimorfizem vpliva zamenjava topila, spremembe mešanja, prisotnost drugih nečistot ter spremembe v temperaturi in tlaku (6,21).

Vsaka polimorfna oblika spojine ima drugačne fizikalno-kemijske lastnosti. Različna je temperatura taljenja, temperatura sublimacije, toplotna kapaciteta, toplotna prevodnost, gostota, trdnost, oblika, barva, lomni količnik, topnost, hitrost raztapljanja, stabilnost in reaktivnost trdne oblike. Zato ima polimorfizem tudi vpliv na učinkovitost in delovanje zdravilnih učinkovin (22). Tako imajo študije polimorfizma pomembno vlogo v razvoju zdravila (23).

Spojine lahko tvorijo več polimorfni oblik, ki pa niso enako stabilne. Metastabilne polimorfne oblike se sčasoma pretvorijo v bolj stabilno obliko. Nekatere se pretvorijo takoj, pri nekaterih pa je čas polimorfne transformacije daljši (6). Najstabilnejša oblika ima najnižjo prosto energijo pri dani temperaturi (18). Metastabilne oblike so običajno bolj topne in se hitreje raztapljajo kot stabilna oblika. Za učinkovine z nizko vodotopnostjo je pomembno, da je polimorfizem dobro nadzorovan, saj s tem zagotovimo, da je ves čas uporabnosti zdravila biološka uporabnost enaka. Kadar je pri vseh temperaturah stabilna le ena oblika, govorimo o monotropnem sistemu. V nasprotnem primeru pa o enantiotropnem sistemu, kar pomeni, da so pri različnih temperaturah stabilne različne polimorfne oblike (6).

Spojine lahko kristalizirajo v dve kristalni obliki, ki sta si zrcalni slike. Taki obliki imenujemo enantiomera oziroma optična izomera. Molekule obeh oblik so zgrajene iz

enakih atomov in funkcionalnih skupin, le da so prostorsko različno razporejene (10). Obe obliki imata enako topnost, temperaturo taljenja ter se ne moreta transformirati iz ene oblike v drugo, zato ti dve obliki nista prava polimorfa (18). Značilnost enantiomerov je različna optična aktivnost. Enantiomera različno sučeta ravnino polarizirane svetlobe. En jo suče v desno (desnosučni enantiomer), drugi pa v levo (levosučni enantiomer). Kadar optično aktivne molekule kristalizirajo v obe kristalni obliki, govorimo o racemni zmesi. Pri nekaterih zdravilnih učinkovinah je učinkovita le ena enantiomerna oblika, v določenih primerih je lahko ena izmed oblik celo strupena (primer talidomida). V takšnih primerih je pomembno, da izoliramo le učinkovito in neškodljivo obliko.

### **Morfologija kristalov**

Oblika kristalov je odvisna od hitrosti rasti različnih površin kristala. Nekatere površine kristala rastejo zelo hitro in imajo zelo majhen, oziroma nimajo vpliva na obliko rastočega kristala. Največji vpliv na njegovo obliko imajo počasi rastoče površine (18). Ponavljajočo se osnovno enoto kristala lahko opišemo s tremi vektorji ( $a$ ,  $b$  in  $c$ , ki so običajno izraženi v dolžini) in koti med njimi ( $\alpha, \beta, \gamma$ ). Obstaja 6 različnih kristalnih sistemov: kubični, tetragonalni, ortorombski, monoklini, triklini in heksagonalni. Ti sistemi se razlikujejo po notranji zgradbi in prostorski ureditvi. Čeprav se ne spremeni notranja ureditev, lahko imajo kristali različno zunanjo ureditev, ki se izraža v obliki oziroma morfologiji kristala (6,21).

### **Solvati in hidrati**

Snov lahko kristalizira tudi tako, da v rešetko ujame molekule topila. Če je topilo voda, nastajajo hidrati. Solvati pa je bolj splošno ime in se uporablja za vsa ostala topila (6).

Solvati in hidrati niso polimorfne oblike, ker se njihova kemijska sestava razlikuje od matične spojine. Imajo pa nekatere podobne značilnosti kot polimorfi, in sicer se lahko pretvorijo v bolj stabilno obliko (18). Hidrati oziroma solvati imajo drugačne lastnosti kot brezvodne oblike oziroma oblike brez prisotnosti topila v kristalni mreži. Govorimo o psevdopolimorfizmu. Zaradi toksičnosti organskih topil se v zdravilih pojavljajo predvsem hidrati učinkovin. Glede na število molekul vode, ki se skupaj z molekulo gradbene enote kristala ujamejo v kristalno mrežo, ločimo: monohidrate (ena molekula vode), dihidrate (dve molekuli vode), trihidrate (tri molekule vode), hemihidrate (ena molekula vode z dvema molekulama gradbene enote), lahko pa vsebujejo tudi večje število molekul vode. Molekula vode lahko tvori vodikovo vez med dvema gradbenima molekulama, kar učvrsti

kristalno rešetko. Tako je raztapljanje hidrata praviloma počasnejše od brezvodne oblike. V nekaterih primerih pa se lahko hidratna oblika raztaplja hitreje kot brezvodna. Molekule vode v teh primerih preprečijo optimalne interakcije med gradniki, kar oslabi kristalno mrežo (primer je eritromicin) (6).

### **Proučevanje kristalizacije**

V farmacevtski industriji je poznavanje velikosti delcev, polimorfnih oblik in morfologije ključnega pomena za zagotavljanje konstantne kakovosti zdravila. Tehnik, ki nam omogočajo proučevanje kristalizacije in kristalov, je veliko.

Velikost delcev lahko določimo z mehanskimi, fizikalnimi in optičnimi metodami. Med mehanske metode prištevamo *metodo sejanja*, ki je enostavna metoda in se pogosto uporablja. Slabost te metode je, da ni primerna za delce manjše od 5 $\mu$ m in je dolgotrajna. Druga metoda je *analiza posedanja delcev*. Delci se v tekočini posedajo na dno s konstantno hitrostjo. Velikost delcev izračunamo iz izmerjene hitrosti posedanja. Vendar ima tudi ta metoda veliko omejitev. Fizikalne metode za merjenje velikosti delcev pa so metode, *kjer merimo dinamično sipanje svetlobe*. Optične metode omogočajo meritev široke porazdelitve velikosti delcev. Analiza vzorca pa poteče hitro. Optične instrumente razdelimo v dve skupini, in sicer instrumenti, ki merijo *sipanje svetlobe* in optične sisteme, ki so sposobni zajemati tako majhen volumen, da lahko zaznajo vsak delec posebej in mu izmerijo velikost. Ti sistemi v določenem volumnu delce preštejejo in jih porazdelijo na območja velikosti ter določijo koncentracijo delcev v suspenziji (24). Glavne omejitve optičnih metod pa so nesferičnost delcev in nestabilnost vzorcev med meritvijo.

Za proučevanje polimorfnih oblik uporabljamo naslednje metode: *mikroskop z ogrevano mizico*, s katerim lahko opazujemo spreminjanje polimorfnih oblik med segrevanjem; *termično analizo* in *X-žarkovno kristalografijo*. Med termičnimi analizami je najuporabnejša diferenčna dinamična kalorimetrija (angl.: differential scanning calorimetry, DSC), s pomočjo katere proučujemo stabilnost polimorfnih oblik, določamo entalpijo taljenja, temperaturo tališča in toplotno kapaciteto, identificiramo solvate oziroma hidrate. *X-žarkovna kristalografija* omogoča proučevanje urejenosti atomov v kristalni strukturi. Uporabni sta tudi *infrardeča spektroskopija* in *jedrska magnetna resonanca* (angl.: nuclear magnetic resonance, NMR), ki omogočata spremljanje strukture polimorfnih oblik in solvatov. Polimorfne oblike lahko ločimo tudi na osnovi helijeve gostote in z nekaterimi drugimi tehnikami (25).

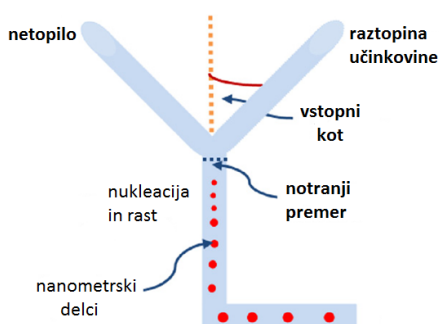
Za opis oblike kristalov se najpogosteje uporabljata *optični in elektronski mikroskop* (25). Z optičnim mikroskopom lahko opazujemo rast kristalov, vendar se problemi pojavijo pri delcih nano velikosti, ki jih s tem mikroskopom ne moremo opazovati. Vrstični elektronski mikroskop (angl.: Scanning Electron Microscope, SEM) za opazovanje površine uporablja curek elektronov in nam omogoča velike povečave ter vizualizacijo nanodelcev.

## 1.2. Pretočni mikroreaktorji

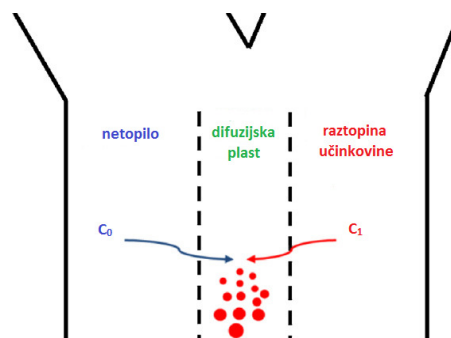
Pretočni mikroreaktorji so naprave, ki jih uporabljamo na različnih področjih, kot sta kemijska sinteza ali obarjanje delcev. Z njimi lahko izdelujemo delce velikosti od nekaj deset nanometrov do 1000  $\mu\text{m}$ . Širina velikostnega intervala je ozka. Pretočni mikroreaktorji omogočajo tudi nadzor nad obliko delcev. Možna pa je tudi transformacija v industrijsko uporabo. Takšne naprave so se prvič pojavile v 90-ih letih 20. stoletja (4, 26).

### 1.2.1. Zgradba pretočnega mikroreaktorja

Pretočni mikroreaktor je običajno narejen iz stekla. Zgrajen je iz dveh (lahko tudi več) vhodnih tankih kapilar in ene izhodne kot je prikazano na sliki 6. Vhodni kapilari se lahko združita v izhodno v obliki črke Y ali T. V takšnem pretočnem mikroreaktorju lahko zdravilno učinkovino obarjamo tako, da skozi vhodni kapilari uvajamo dve tekočini, ki se mešata. Skozi eno uvajamo raztopino učinkovine, skozi drugo pa tekočino, v kateri učinkovina ni topna (netopilo). Prenasičenje dosežemo, ko se kapilari združita in pride do mešanja teh dveh tekočin. Med obema tekočinama nastane tako imenovana difuzijska plast, kjer se tekočini mešata in je prikazana na sliki 7.



Slika 6: Zgradba pretočnega mikroreaktorja (4).



Slika 7: Izvodilna kapilara (3).

Ker je pretok v pretočnem mikroreaktorju laminaren in ne turbulenten, je mešanje posledica prehoda molekul v difuzijsko plast. Da se v pretočnem mikroreaktorju Y oblike

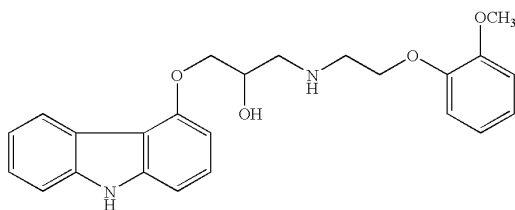
tvorijo delci enotne velikosti, mora biti indukcijski čas kristalizacije daljši kot čas mešanja. Vzdolž skupne kapilare pride do nukleacije in rasti kristala. Na obarjanje v pretočnem mikroreaktorju vplivata predvsem razmerje pretokov topila in netopila ter vstopni kot, to je kot med vhodnima kapilarama. Notranji premer kapilare ima manjši vpliv (3,4).

### **1.2.2. Dejavniki, ki vplivajo na velikost delcev pri obarjanju v pretočnem mikroreaktorju**

*Pretok topila in netopila* ima največji vpliv na velikost delcev. Velikost delcev pada z večanjem pretoka netopila, ker s tem povečamo njegov volumen. Večji volumen netopila poveča stopnjo prenasíčenja in zmanjša koncentracijo topljenca na površini rastočega kristala. Prevladuje nukleacija. Večji pretok raztopine pa ima ravno obraten vpliv na velikost delcev, kar pomeni, da prevladuje rast kristalov in nastanejo večji delci. Vpliv *vhodnega kota* na velikost delcev je manjši. Ostrejši vhodni kot omogoča, da tekočini tečeta vzdolž kapilare ne da bi vplivali druga na drugo. Pri večjih vhodnih kotih se pojavljajo večja mirujoča področja, kjer je pretok zelo počasen ali pa ga ni. Povzroči nastanek večjih delcev (4). Pri opazovanju velikosti delcev hidrokortizona, ki nastane v mikroreaktorju pri vhodnem kotu  $50^\circ$ , so ugotovili, da se nekoliko razširi porazdelitev velikosti delcev (3). Vpliv *notranjega premera kapilare pretočnega mikroreaktorja* je kompleksen. Splošno pa velja, da z zmanjšanjem premera malo zmanjšamo velikost delcev. *Krajši čas zadrževanja* delca v pretočnem mikroreaktorju zmanjša možnost rasti. *Večja koncentracija raztopine* se izraža v višji stopnji prenasíčenja. Ker nukleacija prevladuje nad rastjo kristalov, nastajajo manjši delci (3,4).

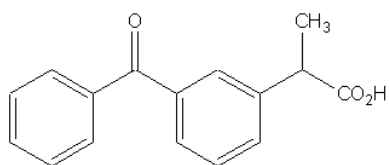
### **1.3. Modelni učinkovini**

Modelna učinkovina karvedilol (slika 8) spada v farmakoterapevtsko skupino zaviralcev adrenergičnih receptorjev alfa in beta. Uporablja se za zdravljenje esencialne hipertenzije, angine pectoris, kroničnega srčnega popuščanja ter oslabelega delovanja srčne mišice po srčnem infarktu. Največji dovoljeni odmerek karvedilola je 25 mg 2-krat na dan (27). Po evropski farmakopeji ga uvrščamo med učinkovine, ki so v vodi skoraj netopne. Spada v razred II po biofarmacevtskem sistemu klasifikacije, to je med učinkovine s slabo topnostjo in visoko permeabilnostjo.



Slika 8: Strukturna formula karvedilola.

Druga modelna učinkovina ketoprofen (slika 9) spada v farmakoterapevtsko skupino nesteroidnih protivnetnih zdravil in je derivat propionske kisline. Deluje protivnetno in lajša bolečino ter znižuje povišano telesno temperaturo. Največji dovoljeni dnevni odmerek ketoprofena je 200 mg (28). Tako kot karvedilol, tudi ketoprofen uvrščamo med v vodi skoraj netopne učinkovine in v skupino II po biofarmacevtskem sistemu klasifikacije.



Slika 9: Strukturna formula ketoprofena.

## 2. NAMEN DELA

Namen dela je postavitve aparata s pretočnim mikroreaktorjem, izdelava delcev modelne zdravilne učinkovine z obarjanjem v tem mikroreaktorju in razvoj metod za analizo oborjenih delcev. Aparaturo bomo sestavili iz dveh črpalk, pretočnega mikroreaktorja, različnih cevk in dveh čaš. Zdravilno učinkovino bomo raztopili v topilu in jo oborili z dodatkom netopila, ki se s topilom meša. Obarjanje oziroma kristalizacijo bomo izvajali v pretočnem mikroreaktorju in za primerjavo vzporedno tudi v bučki. Za naše delo bomo izbrali topila, v katerih se učinkovina dobro raztaplja in topila, ki se s prvimi mešajo hkrati pa učinkovine ne topijo. Modelni učinkovini, ki ju bomo uporabljali pri našem delu sta kravedilol in ketoprofen. Kot topilo, kjer se karvedilol dobro raztaplja, bomo uporabili dioksan kot netopilo pa cikloheksan. Pri ketopropenu pa bomo kot topilo uporabili dimetilsulfoksid in prečiščeno vodo kot netopilo. V topilu bomo raztopili toliko učinkovine, da bomo ob dodatku netopila dosegli 10-kratno oziroma 20-kratno prenasajenje. Razvili bomo metode za sušenje delcev, ki bodo omogočale njihovo analizo z vrstičnim elektronskim mikroskopom. V ta namen bomo uporabili filtriranje koloidnih disperzij delcev z uporabo membranskih filtrov s premerom por 0,2  $\mu\text{m}$  in liofilizacijo. Z elektronskim mikroskopom bomo proučevali velikost in obliko delcev učinkovine, ki jih bomo dobili z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju in dobljene rezultate primerjali z rezultati, ki jih dobimo z obarjanjem v bučki.

### 3. EKSPERIMENTALNO DELO

#### 3.1. Materiali

##### **Učinkovina**

Uporabili smo zdravilni učinkovini karvedilol in ketoprofen.

##### **Topila**

Kot topilo smo v primeru karvedilola uporabili dioksan (Merck, Nemčija; kakovost  $\geq 99,5\%$ ).

V primeru ketoprofena pa dimetilsulfoksid (Merck, Nemčija; kakovost  $\geq 99,9\%$ ).

##### **Netopila**

Za netopilo v primeru karvedilola smo uporabili cikloheksan (Merck, Nemčija; kakovost  $\geq 99,5\%$ ).

Za ketoprofen pa prečiščeno vodo.

##### **Filtri**

- Minisart® SRP 25 0,2  $\mu\text{m}$  (politetrafluoroetilen (PTFE), hidrofoben);
- Millipore™: Isopore™ membranski filter 0,2  $\mu\text{m}$  (polikarbonat, hidrofilen);
- Millipore™: Omnipore™ membranski filter 0,2  $\mu\text{m}$  (politetrafluoroetilen, hidrofilen);

##### **Cevke**

- Silikonske cevke (Ismatec, Nemčija);
- Tygon HC F-4040-A (Ismatec, Nemčija);

##### **Ostali materiali:**

- Brizga BD Plastipak 2,5 mL (Becton, Dickinson and Company, Španija);
- Dvostranski prevodni ogljikov trak 12 mm (Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija).

### 3.2. Aparature

Za izvajanje eksperimentalnega dela smo uporabljali naslednje aparature:

- Vrstični elektronski mikroskop (SEM): FE-SEM, Supra 35 VP, Carl Zeiss, Nemčija;
- Naprava za določanje velikosti delcev z lasersko difrakcijo: Zetasizer Nano ZS, Malvern, Velika Britanija;
- Magnetno mešalo MM-531, Železniki, Slovenija;
- Spektrofotometer: Hewlett Packard, HP 8453, UV-Visible spectroscopy system, Nemčija;
- Črpalka z brizgo Syringe Pump Control Unit Inotech, Švica;
- Peristaltična črpalka IKA WERKE, Nemčija;
- Analizna tehtnica AG 245, Metler Toledo, Švica;
- Analizna tehtnica A-150-sx, Cobos, Španija;
- Pretočni mikroreaktor, Dolomite, Velika Britanija;
- Sušilnik na vroči zrak Silencio 1200, Braun, Irska;
- Liofilizator Heto PowerDry LL1500 Freeze Dryer, Thermo Electron, Nemčija.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Izbira topila in netopila za obarjanje zdravilne učinkovine

##### Izbira topila in netopila za obarjanje karvedilola

Najprej smo proučili, v katerih topilih se karvedilol raztaplja in v katerih ni topen. Poskuse smo izvedli pri sobni temperaturi. V majhno čašo smo dali mililiter topila in za konico spatule karvedilola, kar je približno 50 mg karvedilola. Rezultati poskusov topnosti so zbrani v preglednici I. Glede na to, ali se je v topilu raztopila količina ene spatule učinkovine oziroma več (več kot 50 mg), smo označili, da se učinkovina topi zelo dobro. Če se je raztopila količina učinkovine na konici spatule, smo označili, da se učinkovina

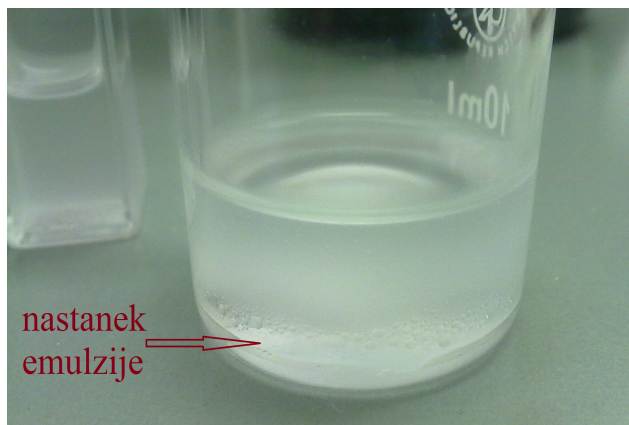
topi dobro. Če smo morali ob mešanju čašo še stresati, smo označili, da se učinkovina slabo topi. V primeru, ko se učinkovina v danem topilu sploh ni raztapljala, smo topilo označili kot netopilo.

Preglednica I: Topnost karvedilola v različnih topilih.

| TOPILO           | se topi zelo dobro | se topi dobro | se topi slabo | se ne topi |
|------------------|--------------------|---------------|---------------|------------|
| n-propanol       |                    |               | +             |            |
| aceton           |                    | +             |               |            |
| etilacetat       |                    | +             |               |            |
| kloroform        |                    | +             |               |            |
| nonan            |                    |               |               | +          |
| dimetilsulfoksid |                    | +             |               |            |
| n-heksan         |                    |               |               | +          |
| 1-propanol       |                    | +             |               |            |
| acetonitril      |                    | +             |               |            |
| metanol          | +                  |               |               |            |
| etanol           |                    |               | +             |            |
| 1,2-prpandiol    |                    |               | +             |            |
| 1-butanol        |                    | +             |               |            |
| tetrahidrofuran  | +                  |               |               |            |
| 2-propanol       |                    |               | +             |            |
| absolutni etanol |                    | +             |               |            |
| dioksan          | +                  |               |               |            |
| cikloheksan      |                    |               |               | +          |

Nato smo preverjali, katera topila in netopila se mešajo. Na podlagi teh poskusov smo najprej izbrali kot topilo butanol in kot netopilo heksan. Pri izbiri topil smo upoštevali tudi, da je topilo lahko hlapno in čim manj nevarno. Ugotovili smo, da izbrana kombinacija topil ni ustrezna, saj ob dodatku heksana k raztopini učinkovine v butanolu niso izpadli kristali. To pomeni, da z uporabo teh topil nismo dosegli dovolj velikega prenasičenja. Kot naslednje topilo smo izbrali tetrahidrofuran (THF), saj je v njem karvedilol zelo dobro topen in tako lahko dosežemo večja prenasičenja kot v primeru uporabe butanola. Tudi s THF so se pojavile težave. THF je namreč raztapljal cevke naše aparature. Cevke, ki so inertne na THF pa z ekonomskega stališča niso bile dostopne. Spet smo zamenjali topilo in izbrali dioksan. V primeru dioksana so se problemi pojavili, ko smo zmešali v dioksanu raztopljeno učinkovino in heksan. Na dnu čaše so se pojavile drobne kapljice, ki so motile meritve. V času mešanja raztopine in netopila je najverjetneje prišlo do tvorbe emulzije,

kar je vidno na sliki 10. Tako smo na koncu za nadaljnje delo izbrali topilo dioksan in kot netopilo cikloheksan.



Slika 10: Nastanek emulzije po dodatku heksana k raztopini karvedilola v dioksanu.

### **Izbira topila in netopila za obarjanje ketoprofena**

Na enak način kot pri karvedilolu smo izbrali topilo in netopilo tudi za ketoprofen. Najprej smo ocenili, v katerih topilih se ketoprofen dobro topi in v katerih ni topen. Ugotovili smo, da se ketoprofen dobro topi v dioksanu, acetonu in DMSO. Netopen pa je v heksanu, cikloheksanu in prečiščeni vodi. Nato smo preverili, katera topila in netopila se med seboj mešajo. Kot topilo smo izbrali dimetilsulfoksid (DMSO), kot netopilo pa prečiščeno vodo. Glede na to, da ketoprofena nismo obarjali v pretočnem mikroreaktorju, tudi pri izbiri topil nismo bili tako omejeni.

### **3.3.2. Določanje topnosti zdravilne učinkovine v topilu in zmesi topila in netopila**

#### **Določanje topnosti karvedilola v topilu in zmesi topila in netopila**

Topnost karvedilola v topilu in zmesi topila in netopila smo določili s pomočjo UV spektrofotometra pri valovni dolžini 332 nm. Najprej smo pripravili standardne raztopine karvedilola v topilu in zmesi topil (dioksan : cikloheksan = 1:3) ter izdelali umeritvene krivulje. Nato smo pripravili nasičeni raztopini karvedilola v samem topilu in v zmesi topila in netopila v razmerju 1:3. Raztopini smo mešali na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi in jih po 3 dneh filtrirali skozi filter SRP 25 0,2  $\mu\text{m}$  iz politetrafluoroetilenskih vlaken, ustrezno redčili in izmerili njihovo absorbanco pri valovni dolžini 332 nm in tako določili topnost. Topnost karvedilola v dioksanu je 230,5 g/L. Topnost karvedilola v zmesi topil dioksana in cikloheksana v razmerju 1:3 je 1,4 g/L.

### **Določanje topnosti ketoprofena v topilu in zmesi topila in netopila**

Z UV spektrofotometrom smo najprej posneli spekter ketoprofena in izbrali valovno dolžino 262 nm, pri kateri smo izvajali meritve topnosti. Izmerili smo topnost ketoprofena v topilu in zmesi topila in netopila v razmerju 1:3. Najprej smo pripravili standardne raztopine ketoprofena v topilu in zmesi topil (DMSO : prečiščena voda = 1:3) ter izdelali umeritvene krivulje. Pripravili smo nasičeni raztopini ketoprofena v samem topilu in v zmesi topila in netopila v razmerju 1:3. Raztopini smo mešali na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi in jih po 24 urah filtrirali skozi filter SRP 25 0,2  $\mu\text{m}$ , ustrezno redčili in izmerili njihovo absorbanco pri valovni dolžini 262 nm. Topnost ketoprofena v DMSO je 542 g/L. Topnost ketoprofena v zmesi topil DMSO in prečiščene vode v razmerju 1:3 je 1,2 g/L.

#### **3.3.3. Obarjanje delcev karvedilola in ketoprofena v bučki**

Pripravili smo raztopino zdravilne učinkovine v topilu in ji nato dodali trikratno količino netopila. Raztopini karvedilola v dioksanu smo dodali trikratno količino cikloheksana, v primeru ketoprofena pa smo raztopini ketoprofena v DMSO dodali trikratno količino prečiščene vode. Na tak način smo ugotavljali, ali do obarjanja sploh pride, kako veliki delci pri tem nastanejo ter kako se s časom njihova velikost spreminja. Obarjanje učinkovine v bučki smo videli kot pomotnitev disperzije. Te disperzije so služile razvoju analiznih metod za sušenje delcev in njihovo opazovanje pod vrstičnim elektronskim mikroskopom ter za merjenje povprečne velikost delcev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo.

#### **3.3.4. Obarjanje delcev v pretočnem mikroreaktorju**

##### **Določanje pretokov**

Določanje pretokov je bil pomemben del za izvedbo eksperimentalnega dela. Z natančnim merjenjem pretokov smo želeli doseči razmerje topila in netopila v zmesi, ki zagotavlja želeno prenasajenje. Pretok topila z raztopljeno učinkovino je moral biti 3-krat nižji od pretoka netopila. Pretoke smo določili tako, da smo najprej izmerili pretok netopila na peristaltični črpalki z uporabo različnih hitrosti vrtenja. Nato pa smo izmerili pretoke še za potisno črpalko tako, da smo spreminjali hitrost potiskanja bata v brizgi. Pretok smo določili z merjenjem časa, ki je potreben, da iz izvodilne cevke na pretočnem

mikroreaktorju v merilno bučko nakaplja 10 mL topila oziroma netopila. Pretoka smo izračunali po enačbi 1:

$$\Phi = 10 \text{ mL}/t \quad (1)$$

kjer je:  $\Phi$ .....pretok topila oz netopila (mL/min)

t.....čas, potreben za pretok 10 mL topila oziroma netopila (min)

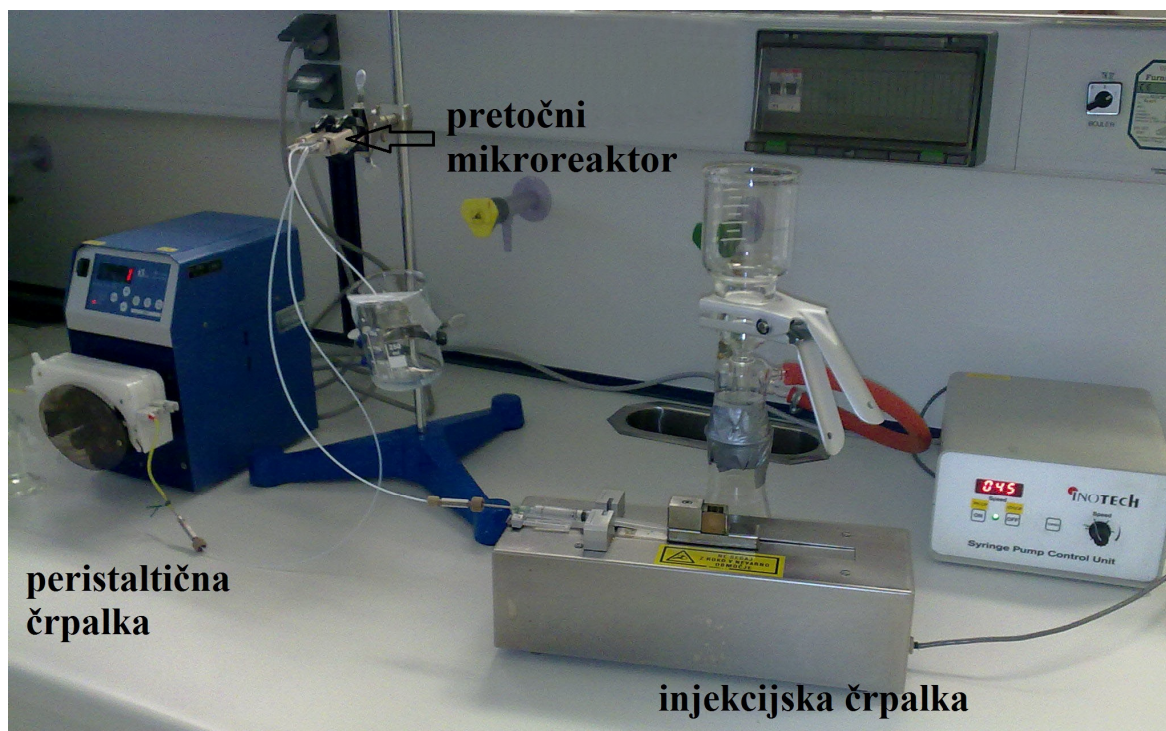
### Sestava aparata s pretočnim mikroreaktorjem

Glavni namen diplomske naloge je bil sestaviti aparaturu za obarjanje delcev. Pri sestavljanju smo naleteli na kar nekaj težav. Najprej so se problemi pojavili s silikonskimi cevkami na majhni peristaltični črpalki (slika 11), saj jih je topilo THF raztapljalo.



Slika 11: Miniaturna peristaltična črpalka.

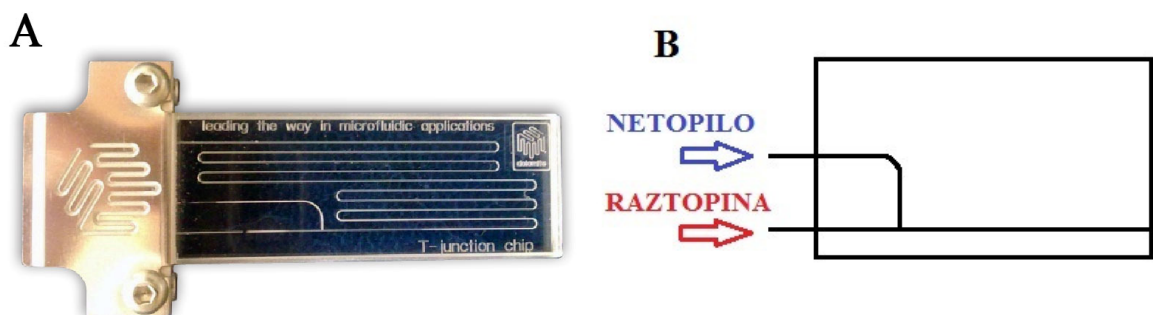
Ob zamenjavi topila cevke vseeno niso bile primerne, ker so se pojavili mehurčki zraka pri kateremkoli topilu, kjer se je karvedilol dobro raztapljal. In ker na teh majhnih črpalkah nismo mogli zamenjati cevk, smo izbrali peristaltični črpalki Ika. Tukaj se je najprej pojavil problem z uravnavanjem pretokov. Tako smo peristaltično črpalko, ki je v pretočni mikroreaktor potiskala ratopino učinkovine v dioksanu, zamenjali za Inotechovo potisno črpalko z brizgo (injekcijsko črpalko), s katero smo lahko dokaj natančno uravnavali pretok. V naslednjem koraku smo morali poiskati ustrezne cevke za peristaltično črpalko. Izbrati smo morali takšne, ki so primerne za uporabljeno netopilo. Izbrali smo cevke Tygon. Cevke smo nato vpeli v mikrofuidni reaktor. Končna aparatura je bila sestavljena tako, kot kaže slika 12.



Slika 12: Sestava aparature z mikrofluidnim reaktorjem za obarjanje delcev z uporabo dveh črpalk.

Osnovni del aparature predstavlja pretočni mikroreaktor s stičiščem kapilar v obliki črke T kot je prikazano na slikah 13A in 13B. Najprej smo določili pretok topila in netopila. Pomembno je bilo, da sta v razmerju 1:3, saj smo le tako lahko dosegli želeno prenasajenje učinkovine. Pretok cikloheksana je bil 3-krat večji od pretoka dioksana. Problemi, ki so se pojavili tukaj, so bili povezani z mešanjem raztopine in netopila. Pri začetnih nekoliko višjih pretokih 0,38 mL/min za netopilo in 0,13 mL/min za topilo ni prišlo do mešanja in s tem do obarjanja. Iz izvodilne cevke so namreč kapljale prozorne kapljice. Ugotovili smo, da pri večjih pretokih raztopina zavira oziroma potiska netopilo v nasprotni smeri od želene. Najprej smo poskusili zamenjati cevke vhodnih mikrokapilar. Tako je raztopina pritekla pravokotno na netopilo in smer nadaljnjega toka. Vendar ta sprememba ni ugodno vplivala na pretoke, v tem primeru je namreč netopilo potisnilo raztopino nazaj proti potisni črpalki, ki je začela preskakovati. Zato smo zopet zamenjali cevke (tako kot je prikazano na sliki 13B) in je netopilo teklo pravokotno na smer skupnega toka, saj je peristaltična črpalka manj občutljiva na spremembe tlaka, do katerih prihaja v pretočnem mikroreaktorju. Problem z mešanjem in obarjanjem smo skušali rešiti z znižanjem pretokov. Omejitveni faktor je bil pretok netopila. Peristaltično črpalko smo nastavili na najnižji možni pretok, ki smo ga lahko z njo dosegli, to je bilo 0,11 mL/min. Potisno

črpalko pa smo nastavili na trikrat nižji pretok. Na ta način smo dosegli, da se je učinkovina začela obarjati v pretočnem mikroreaktorju. Vendar obarjanje vseeno ni potekalo idealno, saj se je učinkovina obarjala le nekaj sekund po združitvi raztopine in netopila. Potem pa je raztopina začela zavirati pretok netopila.



Slika 13: Pretočni mikroreaktor (A: pretočni mikroreaktor, ki smo ga uporabljali za obarjanje; B: skica pretočnega mikroreaktorja).

### 3.3.5. Razvoj metod za preučevanje velikosti in oblike oborjenih delcev

#### Fotonska korelacijska spektroskopija

Z metodo imenovano dinamično sipanje svetlobe ali fotonska korelacijska spektroskopija merimo delce v območju 1-1000 nm. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo merimo Brownovo gibanje delcev, ki je naključno gibanje in nastane zaradi obstreljevanja z molekulami medija, ki obdajajo delce. Večji kot so delci, počasnejše je gibanje. Z laserskim žarkom svetimo na vzorec skozi leče. Vzorec je koloidna raztopina preiskovanih delcev dispergiranih v vodi ali kakem drugem topilu v stekleni ali plastični kiveti. Svetloba na vzorcu močno sipa, kar opazimo kot svetlo črto, ki se razteza od enega do drugega roba kivate. Sipano svetlobo detektiramo s fotopomnoževalko in nato signal prenesemo na računalnik z vgrajenim korelatorjem. Korelator kot vmesnik v računalniku prevede intenziteto signala sipane svetlobe v digitalni signal, ki ga s programsko opremo analiziramo in dobimo podatke o povprečni velikosti delcev, polidisperznosti vzorca, prisotnosti sedimentov oziroma agregatov, itd. (29).

Povprečno velikost delcev, ki smo jih dobili z mešanjem raztopine in netopila v bučki, smo izmerili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo ob različnih časih. Prvo meritev smo izvedli takoj, ko smo zmešali raztopino z netopilom, drugo po 6 minutah, tretjo po 12 minutah in četrto po 20 minutah po dodatku netopila. Na tak način smo opazovali, kako se delci večajo oziroma rastejo s časom. Za eno meritev smo v povprečju potrebovali 5 minut.

Najbolj pa nas je zanimala velikost delcev takoj po dodatku netopila, saj je bil čas zadrževanja v mikrokapilari pretočnega mikroreaktorja le nekaj sekund.

### **Vrstični elektronski mikroskop**

Pri vrstičnem elektronskem mikroskopu uporabljamo zelo tanek curek elektronov, ki potuje po površini vzorca. Elektronski snop se premika po vzorcu v obliki zaporednih vrstic. Pri tem elektroni reagirajo s površjem vzorca. SEM analizira elektrone odbite od vzorca in na ta način določa topologijo površine. SEM običajno vsebuje tri konveksne magnetne leče, ki služijo zbiranju in zoženju elektronskega snopa. Ob interakciji elektronskega snopa z vzorcem pride do različnih reakcij (ionizacija vzorca, zavorno sevanje, katodoluminescenca, emitiranje Augerjevih elektronov). Vse te procese lahko merimo in iz njih dobimo podatke o površini. Emitirane ali odbite elektrone in fotone, ki so posledica interakcije elektronskega snopa s površino, največkrat detektiramo s scintilacijskimi detektorji. Izmerjene energije in količina detektiranih delcev nam opisujejo obliko površine vzorca in njegovo kemijsko sestavo (30).

Ob ustrezni pripravi vzorca smo lahko velikost in morfologijo delcev opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) takoj po dodatku netopila. Vzorce smo pripravili na dva različna načina, in sicer z nučanjem ali z liofilizacijo, saj direktni nanos na dvostranski ogljikov trak s sledečim sušenjem ni bil uporaben zaradi topil, ki so ga raztapljala.

### **Filtriranje delcev iz organskih topil**

Z metodo filtriranja oborjenih delcev iz organskih topil smo pripravili vzorce za vrstični elektronski mikroskop. Za izvajanje te metode smo potrebovali nučo in membranske filtre ter vodno črpalko. Na membranski filter smo kapljali disperzijo delcev. Podtlak, ki ga je ustvarjala tekoča voda, je odtegnil topilo skozi pore filtra, delci pa so se ujeli na filter. Dele filtra, kjer so bili ujeti delci, smo nato prenesli na nosilce za vrstični elektronski mikroskop in jih analizirali.

Nekaj kapljic vzorca pripravljenega v bučki smo nanесли na filter in odnučali topilo. Vzorec smo nanесли ob času 0, 5, 10 in 15 minut po dodatku netopila k 10-krat prenasičeni raztopini karvedilola oziroma ketoprofena. Filter smo nanесли na nosilce in ga analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

Na enak način kot delce pridobljene z obarjanjem v bučki, smo pridobili tudi delce oborjene v pretočnem mikroreaktorju.

**Liofilizacija iz organskih topil**

Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem je metoda, s katero najpogosteje odstranimo topilo iz termolabilnih materialov. Temelji na zamrznitvi topila, kateri sledi zniževanje tlaka in dodajanje dovolj velike količine toplote, da zamrznjeno topilo v materialu sublimira. Za zamrzovanje lahko uporabimo suhi led in metanol (ledeno-alkoholna kopel) ali tekoči dušik. Material moramo ohladiti pod njegovo trojno točko. Le tako lahko zagotovimo sublimacijo topila in se izognemo taljenju. Med fazo primarnega sušenja znižamo tlak in dovedemo dovolj toplote, da topilo sublimira. Pri sekundarnem sušenju pa lahko dvignemo temperaturo tudi do  $0^{\circ}\text{C}$  ali celo več. Tako odstranimo še nezamrznjene molekule topila (31).

Vzorci karvedilola pridobljenega z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju smo tudi liofilizirali z liofilizatorjem ter v bučki, s pomočjo vodne črpalke. V obeh primerih smo za zamrzovanje raztopine uporabili tekoči dušik. Liofilizat smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

## REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.4. Obarjanje delcev v bučki

#### 3.4.1. Merjenje velikosti delcev karvedilola oborjenih v bučki s fotonsko korelacijsko spektroskopijo

Velikosti delcev, ki so nastali pri obarjanju v bučki, smo merili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Bela oborina je nastala, ko smo raztopini dodali netopilo. Merili smo povprečno velikost delcev pri 10-kratnem prenasičenju in pri 20-kratnem prenasičenju karvedilola. Stopnjo prenasičenja smo izračunali po naslednji enačbi:

$$S = c/c_0 \quad (2)$$

Kjer je: S.....stopnja prenasičenja

c.....trenutna koncentracija (g/L)

c<sub>0</sub>....ravnotežna koncentracija (g/L)

Povprečno velikost delcev smo izmerili po 5, 11, 17 in 25 minutah po dodatku netopila k 10-krat oziroma 20-krat prenasičeni raztopini karvedilola v dioksanu. Rezultati so podani v preglednici II in III.

Preglednica II: Meritve povprečne velikosti delcev oborjenih v bučki pri 10-kratnem prenasičenju karvedilola v zmesi topil (dioksan: cikloheksan = 1:3) v različnih časovnih intervalih od pričetka obarjanja.

| časovni interval od pričetka obarjanja [min] | povprečna velikost [μm] | sipanje [kcps] | PDI  |
|----------------------------------------------|-------------------------|----------------|------|
| MERITEV 1                                    |                         |                |      |
| 0-5                                          | 1,95                    | 194            | 0,04 |
| 6-11                                         | 2,68                    | 138            | 1    |
| 12-17                                        | 3,54                    | 128            | 0,44 |
| 20-25                                        | 4,13                    | 232            | 0,24 |
| MERITEV 2                                    |                         |                |      |
| 0-5                                          | 2,48                    | 205            | 0,56 |
| 6-11                                         | 2,99                    | 202            | 0,58 |
| 12-17                                        | 3,54                    | 145            | 0,24 |
| 20-25                                        | 3,95                    | 198            | 0,16 |

\*kcps: angl.: "kilo counts per second"

\*PDI polidisperzni indeks

Preglednica III: Meritve povprečne velikosti delcev oborjenih v bučki pri 20-kratnem prenasičenju karvedilola v zmesi topil (dioksan: cikloheksan = 1:3) v različnih časovnih intervalih od pričetka obarjanja.

| časovni interval od<br>pričetka obarjanja<br>[min] | povprečna<br>velikost<br>[μm] | sipanje<br>[kcps] | PDI  |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------|------|
| MERITEV 1                                          |                               |                   |      |
| 0-5                                                | 3,66                          | 154               | 1    |
| 6-11                                               | 5,30                          | 146               | 0,05 |
| 12-17                                              | 10,17                         | 170               | 0,43 |
| 20-25                                              | 83,22                         | 250               | 1    |
| MERITEV 2                                          |                               |                   |      |
| 0-5                                                | 2,91                          | 67                | 1    |
| 6-11                                               | 2,52                          | 280               | 0,02 |
| 12-17                                              | 3,10                          | 73                | 1    |
| 20-25                                              | 22,13                         | 403               | 0,48 |

Iz dobljenih meritev zbranih v preglednici II in III ter diagramu 1 opazimo, da nismo dobili takšnih rezultatov, kot smo pričakovali. Pri večjem prenasičenju smo namreč dobili večje delce namesto manjših. Vzrok je najverjetneje povezovanje kristalov v večje aglomerate, saj smo pri višjem prenasičenju po 12. minuti opazili, da so se delci tako povečali, da so presegli merilno območje. Rezultat je posledica relativno dolgega merjenja, ki ga zahteva metoda in hitre rasti in s tem spreminjanja velikosti delcev. Pri večjem prenasičenju je bila kristalizacija manj nadzorovana. Glede na polidisperzni indeks (PDI) lahko sklepamo, da so delci dobljeni z obarjanjem v bučki zelo različnih velikosti. Padanje sipanja kaže na pojav sedimentacije delcev v vzorcu ali raztapljanje delcev. Naraščanje pa je lahko povezano z agregacijo, flokulacijo ali prisotnost mehurčkov zraka v vzorcu. Pri naših vzorcih je lahko prisotno oboje. Najprej vzorec sedimentira, potem pa začnejo nastajati agregati.

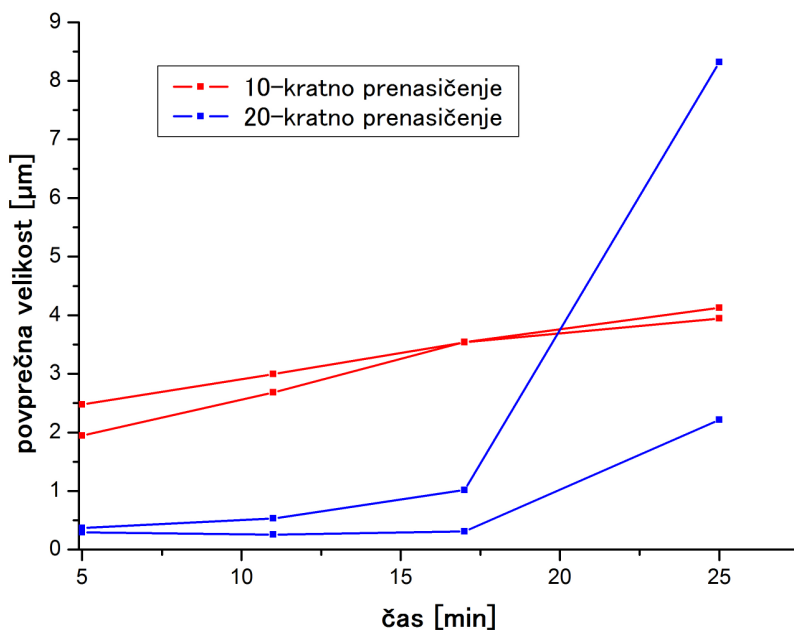


Diagram 1: Povprečna velikost delcev oborjenih v bučki v odvisnosti od časa pri 10-kratnem in 20-kratnem prenasíčenju karvedilola.

Povprečna velikost delcev je s časom rasla, zato smo vzorce želeli stabilizirati. Poskusno smo dodali pomožne snovi, in sicer Lutrol F 127 in Kollidon 12 PF, vendar stabilizatorja skupaj z učinkovino nista bila učinkovita (diagram 2). Merili smo povprečno velikost delcev dobljenih z obarjanjem v bučki. 10-krat prenasíčenemu karvedilolu smo dodali Kollidon 12 PF in izmerili povprečno velikost. Potem smo 10-krat prenasíčenemu karvedilolu dodali Lutrol F 127. Pri tretjem vzorcu pa smo dodali oba stabilizatorja skupaj. Iz diagrama 2 lahko razberemo, da bi bil najučinkovitejši Lutrol F 127, kjer se velikost delcev najmanj spreminja, vendar ni idealen, saj pri enem vzorcu velikost raste, pri drugem pa najprej delci nekoliko zrastejo, potem pa se manjšajo. Lahko, da dodatek pomožne snovi povzroči raztapljanje učinkovine.

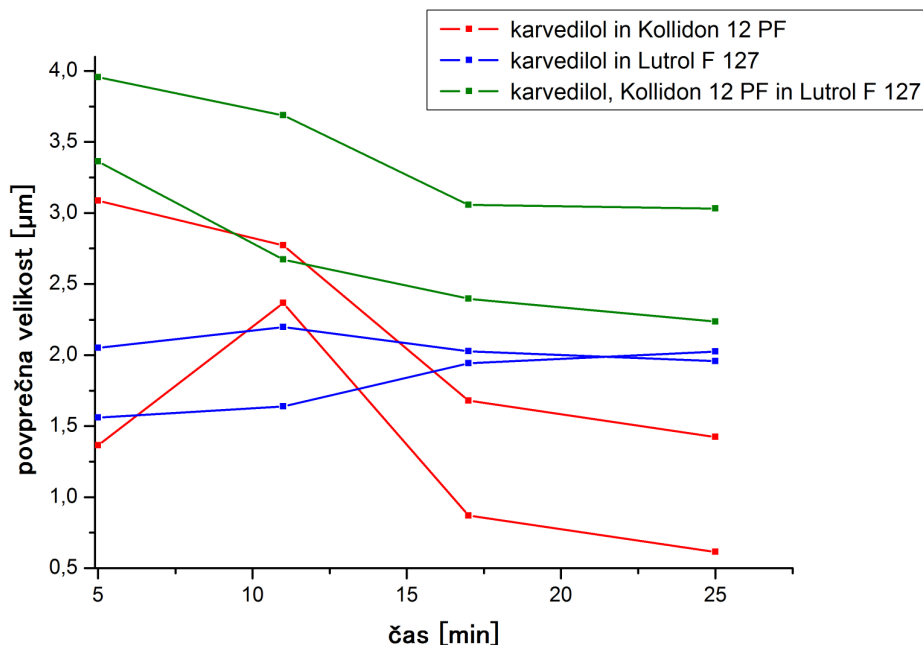


Diagram 2: Povprečna velikost delcev v odvisnosti od časa pri 10-kratnem prenasajenju karvedilola ob dodatku pomožnih snovi.

#### 3.4.2. Merjenje velikosti delcev ketoprofena oborjenih v bučki s fotonsko korelacijsko spektroskopijo

Velikosti delcev ketoprofena, ki so nastali pri obarjanju v bučki, smo merili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Pripravili smo 10-krat in 20-krat prenasajeno raztopino ketoprofena v zmesi topil DMSO in prečiščena voda v razmerju 1:3. Povprečno velikost delcev smo izmerili 5, 11, 17 in 25 minut po dodatku netopila. Rezultati so zbrani v preglednici IV in V.

Preglednica IV: Meritve povprečne velikosti delcev 10-krat prenasičene raztopine ketoprofena oborjenega v bučki v zmesi topil (DMSO : prečiščena voda = 1:3) v različnih časovnih intervalih od pričetka obarjanja.

| časovni interval od pričetka obarjanja [min] | povprečna velikost [μm] | count rate [kcps] | PDI  |
|----------------------------------------------|-------------------------|-------------------|------|
| MERITEV 1                                    |                         |                   |      |
| 0-5                                          | 1,50                    | 357               | 0,20 |
| 6-11                                         | 1,81                    | 268               | 0,26 |
| 12-17                                        | 1,89                    | 214               | 0,24 |
| 20-25                                        | 2,25                    | 297               | 0,18 |
| MERITEV 2                                    |                         |                   |      |
| 0-5                                          | 1,34                    | 267               | 0,14 |
| 6-11                                         | 1,82                    | 325               | 0,15 |
| 12-17                                        | 2,00                    | 274               | 0,14 |
| 20-25                                        | 2,30                    | 267               | 0,12 |

Preglednica V: Meritve povprečne velikosti delcev 20-krat prenasičene raztopine ketoprofena oborjenega v bučki v zmesi topil (DMSO : prečiščena voda = 1:3) v različnih časovnih intervalih od pričetka obarjanja.

| časovni interval od pričetka obarjanja [min] | povprečna velikost [μm] | count rate [kcps] | PDI  |
|----------------------------------------------|-------------------------|-------------------|------|
| MERITEV 1                                    |                         |                   |      |
| 0-5                                          | 1,40                    | 439               | 0,27 |
| 6-11                                         | 1,59                    | 397               | 0,27 |
| 12-17                                        | 1,95                    | 403               | 0,23 |
| 20-25                                        | 1,96                    | 326               | 0,26 |
| MERITEV 2                                    |                         |                   |      |
| 0-5                                          | 1,49                    | 209               | 0,27 |
| 6-11                                         | 1,89                    | 186               | 0,27 |
| 12-17                                        | 2,01                    | 173               | 0,26 |
| 20-25                                        | 2,35                    | 171               | 0,23 |

Glede na dobljene rezultate lahko opazimo, da so delci bolj enotnih velikosti kot pri karvedilolu, saj polidisperzni indeks (PDI) ne presega vrednosti 0,27. Na diagramu 3 vidimo, da so delci 10-krat in 20-krat prenasičene raztopine ketoprofena približno enakih velikosti, kar tudi ni v skladu s teorijo, kjer bi morali biti delci oborjeni iz raztopine z 20-kratnim prenasičenjem ketoprofena manjši od delcev oborjenih iz raztopine z 10-kratnim prenasičenjem.

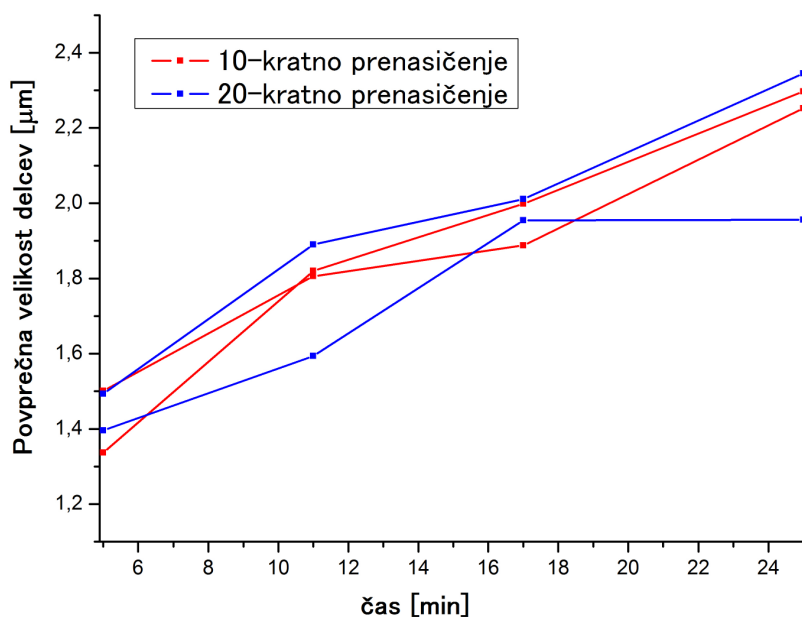


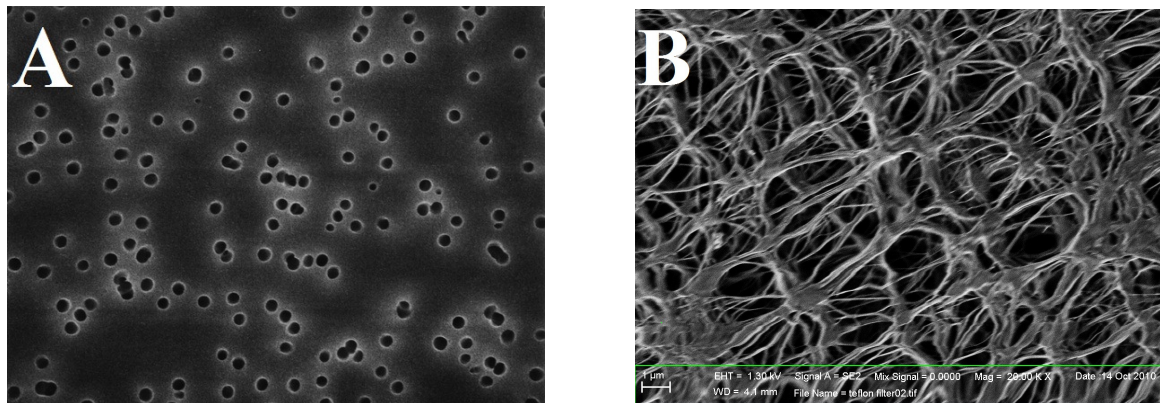
Diagram 3: Povprečna velikost delcev oborjenih v bučki v odvisnosti od časa pri 10-krat in 20-krat prenasíčenem ketoprofenu v topilu (DMSO : prečiščena voda = 1:3).

Rezultati, pridobljeni s fotonsko korelacijsko spektroskopijo, kažejo, da delci v prvih petih minutah zrastejo do velikosti okrog 2  $\mu\text{m}$  v primeru karvedilola in 1,5  $\mu\text{m}$  v primeru ketoprofena. Poleg tega smo ugotovili, da se delci s časom spreminjajo pri vseh vzorcih ter da ponovljivost med vzorci ni najboljša. Ker se delci s časom hitro spreminjajo in ker je meritev relativno dolga, nam ne poda vrednosti povprečne velikosti delcev takoj po njihovem nastanku. Zaradi teh razlogov izbrana metoda ni primerna za analizo velikosti delcev oborjenih v pretočnem mikroreaktorju.

### 3.4.3. Opazovanje delcev oborjenih v bučki z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Zaradi uporabe različnih zmesi topil smo pri pripravi vzorcev s filtriranjem preverili kompatibilnost topil s filtri. Uporabili smo dva različna filtra. Preverili smo kompatibilnost polikarbonatnega filtra Isopore (slika 14A) in teflonskega filtra Omnipore (slika 14B) z dioksanom, cikloheksanom, dimetilsulfoksidom in prečiščeno vodo. Ugotovili smo, da topilo dioksan raztaplja polikarbonatni filter, zato za filtriranje disperzije karvedilola ta filter ni bil primeren. Ustrezal pa je v primeru disperzije ketoprofena. Za filtriranje delcev karvedilola smo uporabili teflonski filter čigar sestava je kompatibilna z dioksanom in cikloheksanom. Polikarbonatni filter je hidrofilen, ni higroskopen, kar omogoča hitrejše sušenje filtra in je predvsem zaradi gladke površine primeren za opazovanje z optičnim in

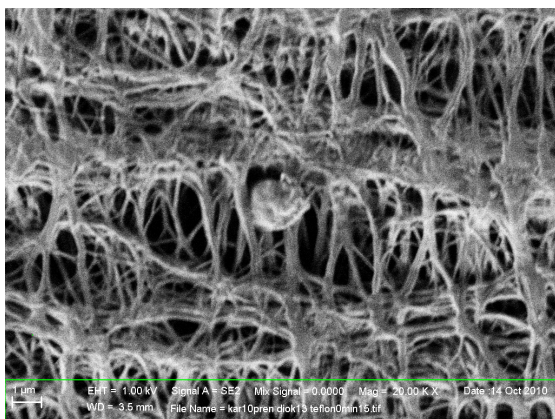
elektronskim mikroskopom. Premer por je  $0.2\ \mu\text{m}$ . Teflonski filter ima precej hrapavo površino in je manj primeren za opazovanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Filter je narejen iz politetrafluoroetilena, ki je kemijsko kompatibilen z mnogimi topili. Velikost por je enaka kot pri polikarbonatnem filtru.



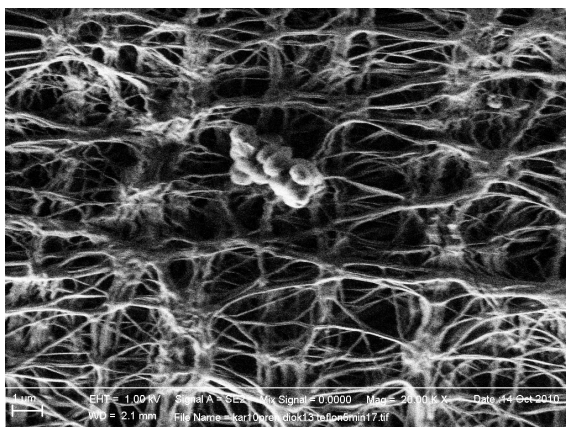
Slika 14: Elektronsko mikroskopska slika A: polikarbonatnega filtra (32) in B: teflonskega filtra (povečava 20000x).

#### **Opazovanje delcev karvedilola oborjenega v bučki z vrstičnim elektronskim mikroskopom**

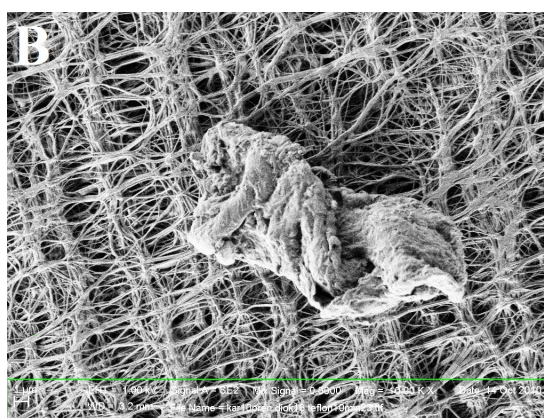
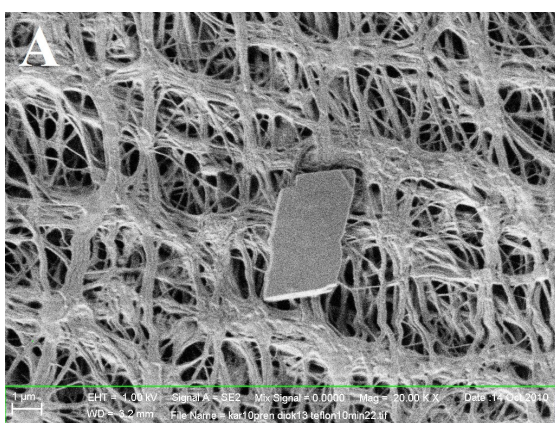
Pri vzorcih nas je zanimala predvsem velikost, oblika delcev in njihovo spreminjanje s časom. Delce, ki smo jih dobili z obarjanjem v bučki, smo na teflonski filter nanesli ob času 0, 5, 10 in 15 minut po dodatku netopila k 10-krat prenasičeni raztopini karvedilola. Na sliki 15 vidimo, kako se mreža filtra nekoliko deformira takoj ob stiku z oborjenimi delci v zmesi topil. Najverjetneje jo je obdal karvedilol. Slike 15-18 dokazujejo, da s časom delci rastejo. V začetku so bolj okroglih oblik, nato pa dobijo izgled kristalov. Rezultati velikosti delcev dobljenih z vrstičnim elektronskim mikroskopom se ujemajo z rezultati določanja velikosti delcev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo.



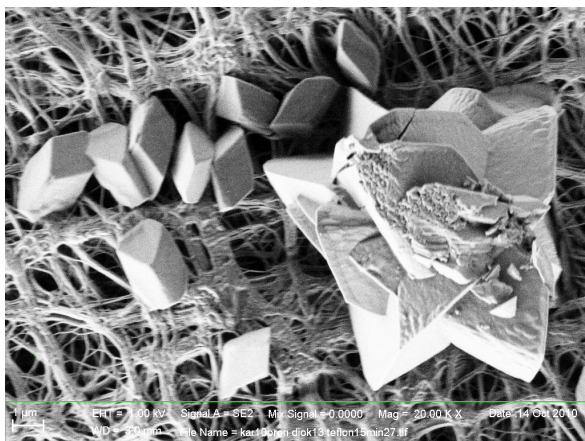
Slika 15: Elektronsko mikroskopska slika delca karvedilola na teflonskem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (dioksan : cikloheksan = 1:3) ob času 0 minut (povečava 20000x).



Slika 16: Elektronsko mikroskopska slika delcev karvedilola na teflonskem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (dioksan : cikloheksan = 1:3) ob času 5 minut (povečava 20000x).



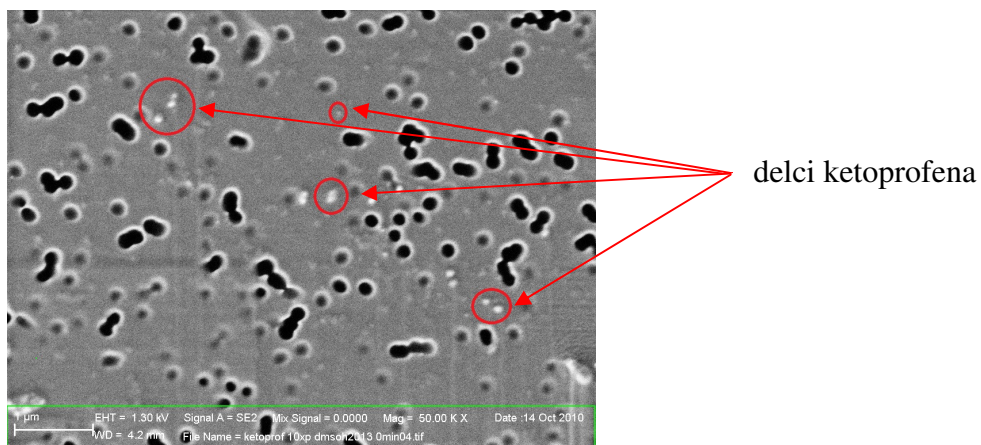
Slika 17: Elektronsko mikroskopska slika delcev karvedilola na teflonskem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (dioksan : cikloheksan = 1:3) ob času 10 minut pri 20000x (A) in 10000x povečavi (B).



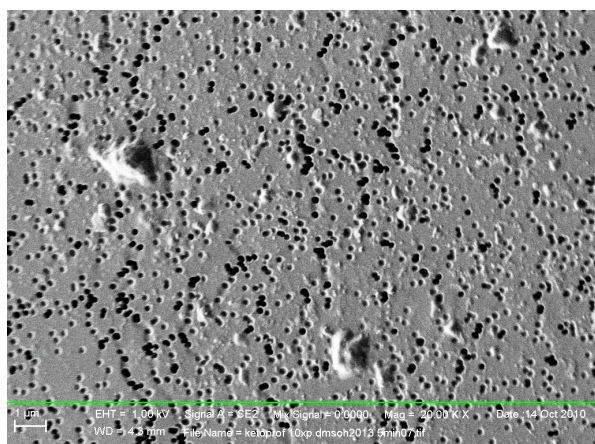
Slika 18: Elektronsko mikroskopska slika delcev karvedilola na teflonskem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (dioksan : cikloheksan = 1:3) ob času 15 minut (povečava 20000x).

#### **Opazovanje delcev ketoprofena oborjenega v bučki z vrstičnim elektronskim mikroskopom**

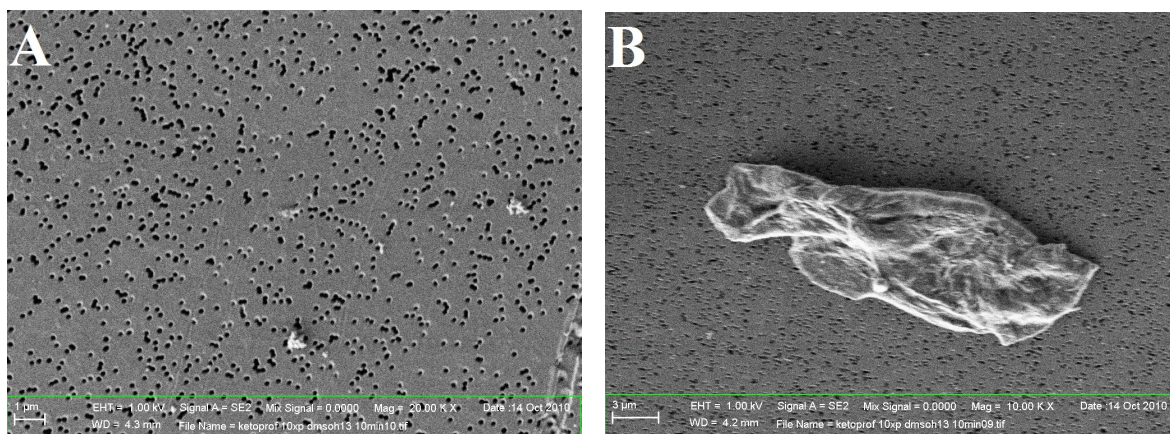
Ketoprofen, ki smo ga obarjali v bučki, smo podobno kot karvedilol pripravili za opazovanje z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Pripravili smo 10-krat prenasršeno raztopino ketoprofena v DMSO in dodali prečiščeno vodo. Vzorec smo kapljali na polikarbonatni filter takoj po dodatku prečiščene vode in po 5 ter 10 minutah. Topilo smo odnučali. Nato smo posušeni filter nanegli na nosilce in ga analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Slika 14A prikazuje površino filtra s porami velikosti 0,2  $\mu\text{m}$ . Na sliki 19 so opazni nanodelci ketoprofena, ki so se ujeli na filter. Delci so se po 5 minutah povečali do velikosti 2 mikrometrov (slika 20). Po 10 minutah pa lahko opazimo, da smo imeli prisotne velike in majhne delce (slika 21). Če primerjamo te rezultate z rezultati, ki smo jih dobili s fotonsko korelacijsko spektroskopijo, ugotovimo, da so podobni. Pri prvi meritvi s fotonsko korelacijsko spektroskopijo smo dobili povprečno velikost delcev okrog 1,5  $\mu\text{m}$ . Na sliki 20 so rezultati temu zelo podobni, saj lahko vidimo delce velikosti od 1 do 2  $\mu\text{m}$ .



Slika 19: Elektronsko mikroskopska slika delcev ketoprofena na polikarbonatnem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (DMSO : prečiščena voda = 1:3) ob času 0 minut (povečava 50000x).



Slika 20: Elektronsko mikroskopska slika delcev ketoprofena na polikarbonatnem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (DMSO : prečiščena voda = 1:3) ob času 5 minut (povečava 20000x)



Slika 21: Elektronsko mikroskopski sliki majhnih in velikih delcev ketoprofena na polikarbonatnem filtru oborjenih v bučki iz zmesi topil (DMSO : prečiščena voda = 1:3) ob času 10 minut (A: majhni delci pri 20000x; B: veliki delec pri 10000x povečavi).

### 3.5. Obarvanje delcev karvedilola v pretočnem mikroreaktorju

Pretok topila je znašal 0,039 mL/min, pretok netopila pa 0,11 mL/min. Ugotovili smo, da pretokov zaradi omejitev črpalk ne moremo najbolj natančno uravnati. Pri peristaltični črpalki smo opazili pulziranje. Pri potisni črpalki pa smo opazili, da je bila raztopina karvedilola v dioksanu precej lepljiva in je nekoliko deformirala gumijasti bat na brizgi, zato črpalka ni ves čas enakomerno potiskala raztopine. Pulziranje je najverjetneje ustvaril visok tlak v reaktorju in ta je potisnil tok raztopine nazaj proti brizgi in potisna črpalka ni mogla premagati te ovire. Tak pulz se je pojavljal v povprečju na 30 sekund.

Vzorci izdelane v pretočnem mikroreaktorju ni bilo mogoče analizirati s fotonsko korelacijsko spektroskopijo, saj naša aparatura ni delovala pravilno dovolj časa, da bi lahko zbrali 1 mL vzorca, ki je potreben za analizo. Drug razlog je zamudnost zbiranja in samega merjenja velikosti delcev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo. Predvidevamo, da bi bili rezultati podobni tistim, ki smo jih dobili z merjenjem velikosti delcev oborjenih v bučki. Tako smo velikost delcev ocenjevali le z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Želeli smo ugotoviti velikost delcev takoj po izhodu iz mikrofluidnega reaktorja, zato smo uporabili druge ustrezne metode.

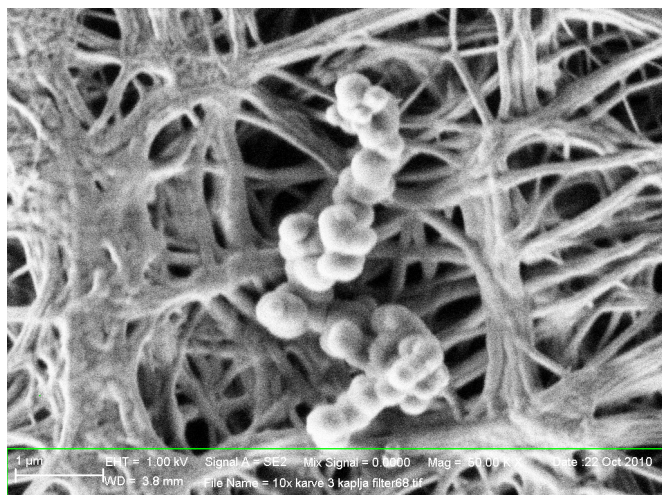
Karvedilol smo v pretočnem mikroreaktorju obarjali pri 10-kratnem prenasičenju. Najprej smo nastavili pretoke tako, da je bilo razmerje topila in netopila približno 1:3, potem pa smo začeli z obarvanjem. Kapljice oborjenega karvedilola so bile bele barve. Takšne kapljice smo najprej lovili na teflonski filter, ki smo ga položili na nučo. Da je topilo čim

prej izhlapelo, smo zraven nuče uporabili še sušilnik s toplim zrakom kot je prikazano na sliki 22.



Slika 22: Priprava vzorca za vrstični elektronski mikroskop s kapljanjem disperzije delcev na filter.

Delci, ki smo jih dobili z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju so bili v primerjavi z delci oborjenimi v bučki bolj enotnih velikosti in oblike. Opazili smo skupke okroglih nanodelceve kot je vidno na sliki 23. Osnovni delci so manjši od 500 nm in tvorijo agregate. Da bi preprečili njihovo nastajanje, bi verjetno morali dodati pomožne snovi. Ko oborjena tekočina priteče v izvodilno cevko, delci že pričnejo rasti in se lepijo med seboj, saj je ta cevka širša od mikrokapilare pretočnega mikroreaktorja. Ker obarjanje poteka s stalno hitrostjo predvidevamo, da lahko na ta način ponovljivo izdelujemo delce enakih velikosti in oblik.



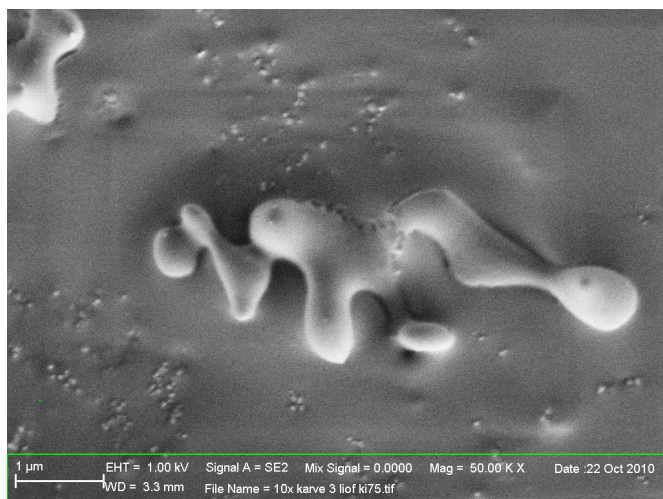
Slika 23: Elektronsko mikroskopska slika delcev karvedilola na teflonskem filtru oborjenega v pretočnem mikroreaktorju iz zmesi topil dioksan : cikloheksan = 1:3 (povečava 50000x).

Vzorci za vrstični elektronski mikroskop smo pripravili še z liofilizacijo. Kapljice oborjenega karvedilola, ki so kapljale iz izvodilne cevke smo lovili v erlenmajerico s tekočim dušikom (slika 24A). Erlenmajerice smo nato položili v transportno posodo s tekočim dušikom in jih odnesli na Kemijski inštitut. Nekatere vzorce pa smo liofilizirali v našem laboratoriju z uporabo vodne črpalke in bučke (slika 24B).

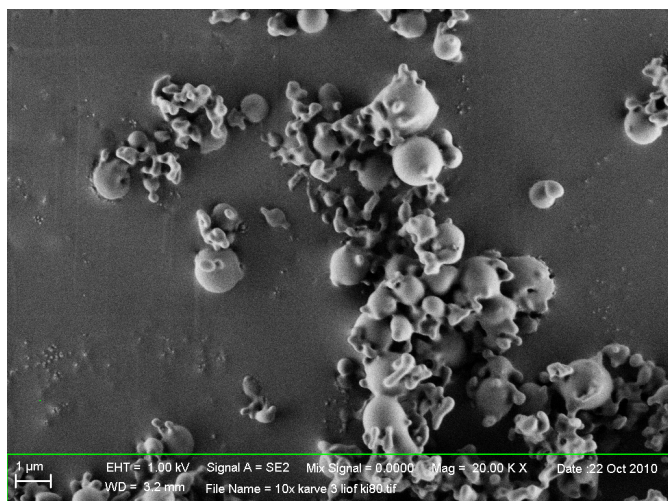


Slika 24: Postopek liofilizacije: slika A prikazuje lovljenje vzorca v tekoči dušik (zamrzovanje), slika B pa odstranjevanje topila z liofilizacijo s pomočjo vodne črpalke.

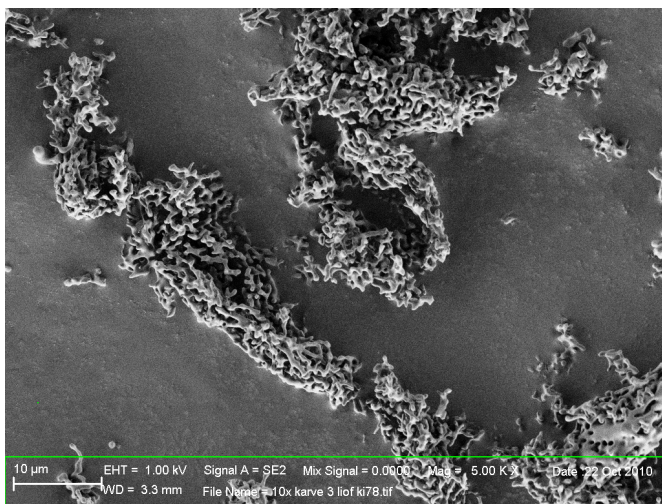
Slike 25-27 prikazujejo delce dobljene z uporabo liofilizatorja. Opazili smo, da delci agregirajo. Posamezni delci so manjši od 1  $\mu\text{m}$ , agregati pa so bili različnih velikosti. Na sliki 27 lahko opazimo takšne agregirane delce, za katere predvidevamo, da imajo veliko specifično površino. Na podlagi tega lahko pričakujemo, da se učinkovina v taki obliki tudi hitreje raztaplja.



Slika 25: Elektronsko mikroskopska slika delcev pridobljenih v pretočnem mikroreaktorju pri 10-kratnem prenasajenju karvedilola (razmerje pretokov raztopine karvedilola v dioksanu in cikloheksana je 1:3) posušenih v liofilizatorju (povečava 50000x).

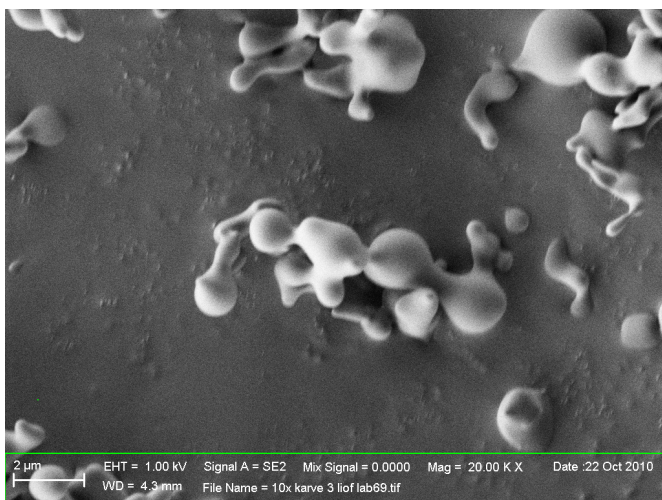


Slika 26: Elektronsko mikroskopska slika delcev pridobljenih v pretočnem mikroreaktorju pri 10-kratnem prenasajenju karvedilola (razmerje pretokov raztopine karvedilola v dioksanu in cikloheksana je 1:3) posušenih v liofilizatorju (povečava 20000x).

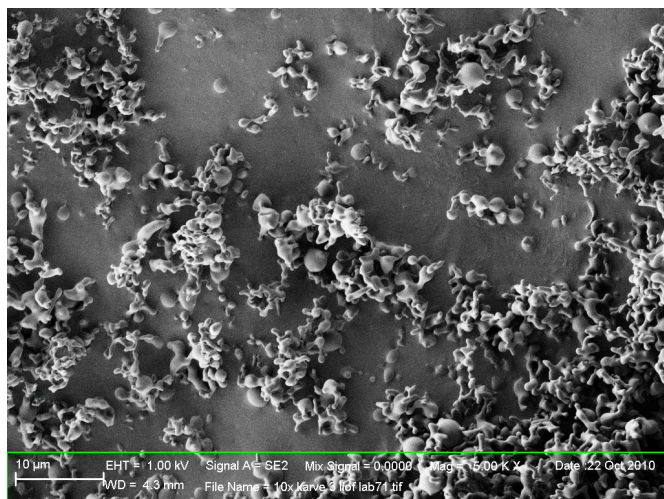


Slika 27: Elektronsko mikroskopska slika delcev pridobljenih v pretočnem mikroreaktorju pri 10-kratnem prenasičenju karvedilola (razmerje pretokov raztopine karvedilola v dioksanu in cikloheksana je 1:3) posušenih v liofilizatorju (povečava 5000x).

Rezultati liofilizacije v bučki so podobni rezultatom sušenja v liofilizatorju. Prav tako smo opazili agregacijo delcev (slika 28). Delci so podobnih velikosti in oblik. Tudi ta vzorec ima veliko specifično površino.



Slika 28: Elektronsko mikroskopska slika delcev pridobljenih v pretočnem mikroreaktorju pri 10-kratnem prenasičenju karvedilola (razmerje pretokov raztopine karvedilola v dioksanu in cikloheksana je 1:3) liofiliziranega v bučki (povečava 20000x).



Slika 29: Elektronsko mikroskopska slika delcev pridobljenih v pretočnem mikoreaktorju pri 10-kratnem prenasičenju karvedilola (razmerje pretokov raztopine karvedilola v dioksanu in cikloheksana je 1:3) liofiliziranega v bučki (povečava 5000x).

Rezultati analize vzorcev pridobljenih z liofilizacijo in s filtriranjem so podobni. Delci so večinoma manjši od  $1\mu\text{m}$  in agregirajo. Po obliki niso vsi enaki. Na slika 29 lahko opazimo sfere, sfere z izrastki in delce nepravilnih oblik. Specifična površina liofiliziranega vzorca je velika.

Z uporabljenimi metodami za pripravo vzorcev lahko dobro preučujemo velikost, obliko in morfologijo delcev. Prednost teh metod v primerjavi s fotonsko korelacijsko spektroskopijo je, da lahko delce opazujemo ob času njihovega nastanka. Rezultati vzorcev karvedilola pripravljenih z obarjanjem v bučki, ki smo jih analizirali s fotonsko korelacijsko spektroskopijo ob času 0 in z vrstičnim elektronskim mikroskopom po 5 minutah so podobni. Analiza s fotonsko korelacijsko spektroskopijo poteka približno 5 minut. Po tem času smo dobili povprečno velikost delcev okoli  $2\mu\text{m}$  (preglednica II). Če ta rezultat primerjamo s tistim, ki smo ga dobili z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri 5 minutah (slika 15), vidimo, da je zelo podoben.

V pretočnem mikoreaktorju lahko ponovljivo izdelujemo delce in jih analiziramo že nekaj sekund po nastanku. Tako lahko na izhodu zbiramo koloidno disperzijo delcev in jih takoj sušimo, kar je pri obarjanju v bučki mnogo težje.

### **3.3. Možnosti izboljšave aparature obarjanja delcev v pretočnem mikroreaktorju**

Med izvajanjem eksperimentalnega dela diplomske naloge smo opazili kar nekaj težav, ki so bile povezane s sestavo pretočnega mikroreaktorja za obarjanje delcev. Manjše težave smo poskusili odpraviti tekom izvajanja eksperimentalnega dela. To so bile težave povezane s cevkami, z njihovimi spoji in delno tudi s črpalkami. Nekaterih pa v tako kratkem času nismo mogli odpraviti, saj je potrebno naročiti določene dele, ki predstavljajo osrednji del aparature. Najprej bi bilo potrebno zamenjati peristaltično črpalko s potisno, s čimer bi odpravili pulziranje in izboljšali natančnost nastavitvev pretokov. Z zamenjavo pretočnega mikroreaktorja v obliki črke T za mikroreaktor v obliki črke Y, bi omogočili boljše mešanje in enake možnosti pretoka obeh tekočin, tako netopila kot raztopine učinkovine, saj se pretočni mikroreaktor s spojem mikrokapilar v obliki črke T najpogosteje uporablja za pripravo mikroemulzij iz dveh ne-mešajočih se tekočin (33).

#### 4. ZAKLJUČEK

V okviru diplomske naloge smo sestavili aparat s pretočnim mikroreaktorjem za obarjanje delcev. Delce smo za primerjavo obarjali še v bučki, kjer je obarjanje manj nadzorovano kot v primeru uporabe mikroreaktorja. Razvili smo tudi metodi za proučevanje velikosti in morfologije delcev ter metodi za pripravo vzorcev za vrstični elektronski mikroskop.

Karvedilol in ketoprofen, obe v vodi težko topni učinkovini, smo obarjali v bučki. Dobili smo delce nepravilnih oblik in velikosti od nekaj 100 nm do 1  $\mu\text{m}$ , ki so s časom hitro rasli. S tehniko obarjanja karvedilola v pretočnem mikroreaktorju so nastali delci manjši od 500 nm, vendar so tvorili agregate. Delci, ki smo jih pripravili z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju, so bili v primerjavi z delci, ki smo jih oborili v bučki bolj enotnih oblik in velikosti. Tudi delci oborjeni v bučki agregirajo, vendar predvidevamo, da je njihova specifična površina mnogo manjša kot v primeru obarjanja delcev v pretočnem mikroreaktorju. Pričakujemo, da se bodo delci pridobljeni z obarjanjem v pretočnem mikroreaktorju bolje raztapljali.

Za preučevanje velikosti delcev smo uporabili fotonsko korelacijsko spektroskopijo in vrstični elektronski mikroskop. Z obema metodama dobljeni rezultati obarjanja delcev v bučki 5 minut po dodatku netopila so med seboj primerljivi. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo ne moremo dobiti podatkov o velikosti delcev takoj po njihovem nastanku. V primeru obarjanja delcev v pretočnem mikroreaktorju ta metoda za analizo velikosti delcev ni bila uporabna zaradi dveh razlogov. Prvi razlog je, da bi za zbiranje vzorca potrebovali 7 minut, za analizo pa še dodatnih 5 minut. V tem času bi delci rasli in agregirali. Drug razlog pa je, da izvedba naše aparature s pretočnim mikroreaktorjem ni dovoljevala, da bi zbrali 1 mL vzorca za analizo. Ugotovili smo, da fotonska korelacijska spektroskopija ni primerna metoda za analizo delcev, katerih velikost se s časom relativno hitro spreminja.

Razvili smo dve metodi za pripravo vzorcev za vrstični elektronski mikroskop, in sicer liofilizacijo ter filtriranje delcev iz organskih topil. Ugotovili smo, da obe metodi za pripravo vzorcev za analizo z vrstičnim elektronskim mikroskopom dajeta podobne rezultate in sta primerni za analizo delcev. Razlika je le v tem, da je liofilizacija v primerjavi s filtracijo dolgotrajnejša in dražja. Vzorec smo morali najprej zamrzniti v tekočem dušiku, potem pa odstraniti topilo, kar je energijsko potraten proces. Pri filtriranju se problemi pojavijo pri izbiri filtrov, saj vsi zaradi nekompatibilnosti z različnimi topili,

niso enako primerni za pripravo vzorcev. Obe metodi sta dali dobre in podobne rezultate. Vrstična elektronska mikroskopija je primernejša metoda proučevanja velikosti delcev kot fotonska korelacijska spektroskopija. Slabost te metode je subjektivnost. Ne poda točne vrednosti velikosti delcev, ampak velikost lahko le ocenimo. Analizirati moramo več vzorcev in jih primerjati med seboj. Prednost te metode pred fotonsko korelacijsko spektroskopijo je možnost, da delce proučujemo takoj po njihovem nastanku in da nam omogoča proučevanje morfologije delcev ob enostavnem spreminjanju pogojev za njihov nastanek.

S preoblikovanjem aparata s pretočnim mikroreaktorjem za obarjanje delcev bo mogoče v prihodnjih raziskavah proučevati vpliv pogojev izdelave na velikost in morfologijo delcev ter možnosti njihove stabilizacije z uporabo različnih pomožnih snovi.

## 5. LITERATURA

1. European Pharmacopoeia 7<sup>th</sup> Edition. Strasbourg. Council of Europa 2010.
2. Dannenfelser R., He H., Joshi Y., Bateman S., Serajuddin A.: Development of Clinical Dosage Forms for Poorly Water Soluble Drug I: Application of polyethylene glycol-polysorbate 80 solid dispersion carrier system. J. Pharm. Sci. 2004; 93: 1165-1175.
3. Ali H.S.M., York P., Blagden N.: Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors, Int.J Pharm. 2009; 375: 107-113.
4. Ali H.S.M., Blagden N., York P., Amani A., Brook T.: Artificial neural networks modelling the prednisolone nanoprecipitation in microfluidic reactors, Int.J Pharm. 2009; 37: 514-522.
5. Mayers D.: Surfaces, Interfaces, and Colloids. Principles and Applications. Wiley-VCH, New York, 1999: 132-138.
6. Aulton M.E.: Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2002: 133-151, 239.
7. Planinšek O.: Osnove kristalizacije iz raztopin. Izbrana poglavja iz načrtovanja lastnosti delcev. 2011 (v tisku).
8. Rodriguez-Hornedo N., Murphy D.: Significance of controlling crystallization mechanism and kinetics in pharmaceutical systems. Int. J Pharm. 1999; 88(7): 651-660.
9. Dalmolen J.: Synthesis and application of new chiral amines in Dutch Resolution: family behaviour in nucleation inhibition. Rijksuniversiteit Groningen, 2005: 38-45.
10. Jones A. G.: Crystallization Process Systems. Butterworth-Heinemann, Oxford, 2002: 124-25.
11. <http://www.k.hosei.ac.jp/~kataoka/yamada/Chapter1.html>, dostopano: januar, 2011.
12. [https://secure.hosting.vt.edu/www.geochem.geos.vt.edu/bgep/pubs/Chapter\\_3\\_DeYoreo\\_Vekilov.pdf](https://secure.hosting.vt.edu/www.geochem.geos.vt.edu/bgep/pubs/Chapter_3_DeYoreo_Vekilov.pdf), dostopano: januar, 2011.
13. <http://www.scribd.com/doc/13239606/solvent-systems-and-their-selection-in-pharmaceutics-and-biopharmaceutics>, dostopano: december, 2010.

14. Gu C., Young V., Grant D.: Polymorph Screening: Influence of Solvents on the Rate of Solvent-Mediated Polymorphic Transformation. *J. Pharm. Sci.* 2001; 90 (11): 1878–1890.
15. Myerson A. S.: *Handbook of Industrial Crystallisation*. Butterworth-Heinemann, Boston, 2001: 48-58.
16. Rodriguez-Spong B., Price C.P., Jayasankar A., Matzger A.J., Rodriguez-Hornedo N.: General principles of pharmaceutical solid polymorphism: a supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004; 56: 241–274.
17. Smereka P.: Spiral Crystal Growth. *Physica D* 2000; 138: 282-301.
18. Mullin J.W.: *Crystallization*. Elsevier Butterworth-Heinemann. Oxford, 2004: 216-221, 280-284.
19. Garside J., Mersmann A., Nyvlt J.: Measurement of crystal growth and nucleation rates. *ICHEME*. 2002: 14-16.
20. Atkins P., Jones L.: *Chemical principles. The quest for insight*. W. H. Freeman and Company, New York, 2008: 188.
21. Boerrigter S. X. M.: Modeling of crystal morphology. PhD Thesis, University of Nijmegen, Nizozemska, 2003: 10-15.
22. Cogen J. M., Hilmer A. J.: Crystal polymorphism in antioxidant-metal deactivator 1,2-bis(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyhydrocinnamoyl)hydrazine. *Polymer Degradation and Stability* 2008; 93: 2193–98.
23. Deij M.: Modeling Crystal Growth of Organic Materials. Nucleation, Steps and Morphology. PhD Thesis, University of Nijmegen, Nizozemska, 2008: 1-2.
24. Garside J., Mersmann A., Nyvlt J. Measurement of crystal growth and nucleation rates. *ICHEME* 2002: 40-45.
25. Bernstein J. *Polymorphism in molecular crystals*. Oxford University Press, 2007: 94-139.
26. Xu S., Nie Z., Seo M., Lewis P., Kumacheva E., Stone H.A., Garstecki P., Weibel D.B., Gitlin I., Whitesides G.M.: Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: control over Size, Shape and Composition. *Angew.Chem. Int.Ed.* 2005; 44: 724-728.
27. <http://www.zdravila.net/> (SmPC zdravila Coryol 12,5 mg tablete), dostopano: februar, 2011.

28. <http://www.zdravila.net/> (SmPC zdravila Ketonal 100 mg filmsko obložene tablete), dostopano: februar, 2011.
29. <http://www.malvern.com/common/downloads/campaign/MRK656-01.pdf>, dostopano: februar, 2011.
30. <http://www.fmfrevija.com/?p=757>, dostopano: februar, 2011.
31. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Liofilizacija>, dostopano: februar, 2011.
32. <http://www.millipore.com/catalogue/module/C153#>, dostopano: februar, 2011.
33. Chia Hsein Y., Qiaole Z., Sheng Ji L., Yu Cheng L.: Using a T-junction microfluidic chip for monodisperse calcium alginate microparticles and encapsulation of nanoparticles. *Sensors and Actuators A* 2009; 151: 231–236.