

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**VLIV ZPŮSOBU KRYSTALIZACE HETEROCYKlickÝCH LÁTEK  
NA FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI PEVNÉ FÁZE**

Diplomová práce

Autor:	Bc. Adéla Bártová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Materiálová chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Ing. Roman Gabriel, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Romana Gabriela, Ph.D. s použitím odborné literatury a dalších pramenů, které jsou uvedeny v seznamu literatury. Souhlasím s tím, že je práce prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....

Bártová Adéla

## *Poděkování*

*Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Romanu Gabrielovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a čas, který mi poskytl během zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Bláhové Prudilové a RNDr. Evě Otyepkové, Ph.D. za měření povrchové energie a Mgr. Lukáši Malinovi za změření Youngova modulu. Můj dík patří také pracovníkům společnosti Teva Czech Industries s.r.o., Regionálnímu centru pokročilých technologií a materiálů a katedře fyzikální chemie PŘF. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům, kteří mě podporovali nejen během studia, ale i mimo něj.*

## Bibliografická identifikace

<b>Autor:</b>	Bc. Bártová Adéla
<b>Název práce:</b>	Vliv způsobu krystalizace heterocyklických látek na fyzikálně chemické vlastnosti pevné fáze
<b>Typ práce:</b>	Diplomová
<b>Pracoviště:</b>	Katedra fyzikální chemie
<b>Vedoucí práce:</b>	Ing. Roman Gabriel, Ph.D.
<b>Rok obhajoby práce:</b>	2019

### Abstrakt:

V této práci byl studován vliv způsobu krystalizace aktivních farmaceutických substancí na fyzikálně chemické vlastnosti pevné fáze (distribuce velikosti částic, obsah zbytkových rozpouštědel, povrchové, mechanické a objemové vlastnosti). Studovanou látkou byl fluticason propionát, který byl krystalován z acetonu, antisolventem byla voda. Krystalizace s pouhým přidáním antisolventu ovlivňuje především distribuci velikosti částic a obsah zbytkových rozpouštědel. U očkované krystalizace bylo potvrzeno, že s přidáním většího množství očkovacího materiálu klesá parametr  $D(90)$ , stejně jako obsah zbytkových rozpouštědel. Krystalizace s různým množstvím zirkoniových templátů neměla vliv na distribuci velikosti částic. Připravené materiály měly největší specifickou plochu povrchu a vysokou drsnost. Sonokrystalizace nejvíce ovlivnila obsah zbytkových rozpouštědel a materiály měly nejmenší specifickou plochu povrchu a drsnost. Bylo potvrzeno, že se zvětšující se velikostí krystalů se zlepšují tokové vlastnosti prášku. Způsob krystalizace má také vliv na mechanické vlastnosti.

<b>Klíčová slova:</b>	API, krystalizace, antisolvent, očkování, sonokrystalizace, povrchové vlastnosti, Youngův modul
<b>Počet stran:</b>	61
<b>Počet příloh:</b>	0
<b>Jazyk:</b>	český

## Bibliographical identification

**Autor's first name and surname:** Bc. Adéla Bártová  
**Title:** The effect of the crystallization of heterocyclic compounds on the physicochemical properties of the solid phase  
**Type of thesis:** Diploma  
**Department:** Department of Physical Chemistry  
**Supervisor:** Ing. Roman Gabriel, Ph.D.  
**The year of presentation:** 2019

### Abstract:

In this diploma thesis was studied the effect of the crystallization of active pharmaceutical substance on the physicochemical properties of the solid phase (particle size distribution, the content of residual solvents, surface, mechanical and bulk properties). The studied substance was fluticasone propionate which was crystallized from acetone, water was used as antisolvent. Crystallization with antisolvent addition affected mainly particle size distribution and content of residual solvents. Seeding process confirmed that with increasing the amount of seeds, parameter D(90) of final crystals decreased similarly as in the case of residual solvents. Crystallization with different amount of zirconia templates did not affect the particle size distribution. Prepared materials had the biggest specific surface area and high roughness. Sonocrystallization mostly affected the content of residual solvents, crystals had the smallest specific surface area and roughness. We demonstrated that with increasing the particle size, the ability to flow increased. The type of crystallization affected the mechanical properties.

**Keywords:** API, crystallization, antisolvent, seeding, sonocrystallization, surface properties, Young modulus  
**Number of pages:** 61  
**Number of appendices:** 0  
**Language:** Czech

# Obsah

1. Úvod .....	8
2. Teoretická část .....	10
2.1. Aktivní farmaceutické látky .....	10
2.2. Krystalizace .....	12
2.3. Termodynamika krystalizace – přesycení .....	12
2.4. Primární nukleace .....	13
2.5. Sekundární nukleace .....	17
2.6. Růst krystalu .....	18
2.7. Typy krystalizací .....	19
2.7.1. Krystalizace chlazením .....	20
2.7.2. Krystalizace s přidáním antisolventu .....	21
2.7.3. Krystalizace s odpařením rozpouštědla .....	21
2.7.4. Reakční krystalizace .....	22
2.7.5. Speciální typy krystalizace .....	22
2.8. Vybrané metody charakterizace pevné fáze .....	24
2.8.1. Metody stanovení velikosti částic .....	24
2.8.2. Metody stanovení povrchových vlastností .....	26
2.8.3. Metody stanovení mechanických vlastností .....	28
2.8.4. Metody stanovení objemových vlastností .....	30
3. Experimentální část .....	31
3.1. Chemikálie .....	31
3.2. Přístroje a metody .....	31
3.3. Krystalizační experimenty .....	34
4. Výsledky a diskuze .....	36
4.1. Křivka rozpustnosti .....	36
4.2. Krystalizace s přidavkem antisolventu .....	37
4.3. Očkovaná krystalizace .....	39
4.4. Krystalizace s využitím templátů .....	42
4.5. Sonokrystalizace .....	44
4.6. Povrchové vlastnosti .....	47
4.7. Mechanické vlastnosti .....	50
4.8. Objemové vlastnosti .....	51
4.9. Korelace parametru D(90) .....	52

5. Závěr.....	54
6. Summary .....	56
7. Reference .....	58

## 1. Úvod

Než si v lékárně můžeme koupit lék, vede k jeho výrobě dlouhá cesta. A na této cestě existuje mnoho křižovatek, proto nemusíme vždycky dojít do stejného cíle. Jedním z klíčových kroků na této cestě je také krystalizace, která představuje finální operaci při přípravě farmaceutické substance. Jedná se o proces, kdy se nahodile orientované molekuly začínají uspořádat do krystalové mřížky. Krystalizace je jedna z nejstarších operací chemického průmyslu a první zmínky o ní můžeme najít už v egyptských a latinských textech, které popisují zisk soli z mořské vody.<sup>1</sup> I když je krystalizace lidem známá už po staletí, stále se jí nedaří plně kontrolovat. Krystalizace je proces, který je vysoce citlivý na podmínky jako je teplota,<sup>2</sup> přesycení<sup>3</sup> či čistota vstupního materiálu.<sup>4</sup> Drobná změna jen jednoho z výše zmíněných faktorů může vést k produktu s podstatně odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Až do nedávna nebyla krystalizačním procesům ve farmaceutickém průmyslu věnována větší pozornost. Vše se ale změnilo v posledních desetiletích, a to díky několika neblaze proslulým případům. V padesátých a šedesátých letech minulého století to byl Thalidomid, který musel být stažen z trhu poté, co se objevily nežádoucí účinky u tisíců pacientů.<sup>5</sup> Lék s účinnou látkou Thalidomid se podával jako sedativum hlavně těhotným ženám. Ukázalo se ale, že jeho druhý optický izomer je teratogenní a způsobuje vážné vrozené vady. Na konci dvacátého století se na trhu objevil Ritonavir.<sup>6</sup> Jeho nově objevená stabilní polymorfní forma měla ale nižší rozpustnost než původně vyráběná, což vedlo k problémům v biodostupnosti. A před 11 lety to byl Rotigotin, který musel být stažen z prodeje.<sup>7</sup> Důvodem byla, stejně jako v případě Ritonaviru, nová polymorfní forma, která se objevila během skladování. Ukázalo se, že je třeba kontrolovat proces krystalizace a cíleně jej řídit. Větší zájem o krystalizační procesy vedl také k rozvoji technologií sloužících ke kontrole krystalizace.<sup>8</sup> Díky nim jsme schopni lépe řídit vlastnosti produktu jako je např. distribuce velikosti částic<sup>2</sup> nebo polymorfní forma.<sup>9</sup>

V dnešní době je vyvíjen stále větší tlak na přesnou charakterizaci každého materiálu. Ve farmacii bývá posledním krokem při výrobě API látek krystalizace. Na základě vlastností látky, kterou chceme krystalovat, volíme optimální způsob přípravy. Typicky krystalizace s teplotní chladicí rampou, která je vhodná pro látky, jejichž rozpustnost je výrazně závislá na teplotě.<sup>10</sup> Krystalizace s přidáním antisolventu, ve kterém je látka málo rozpustná. Jeho



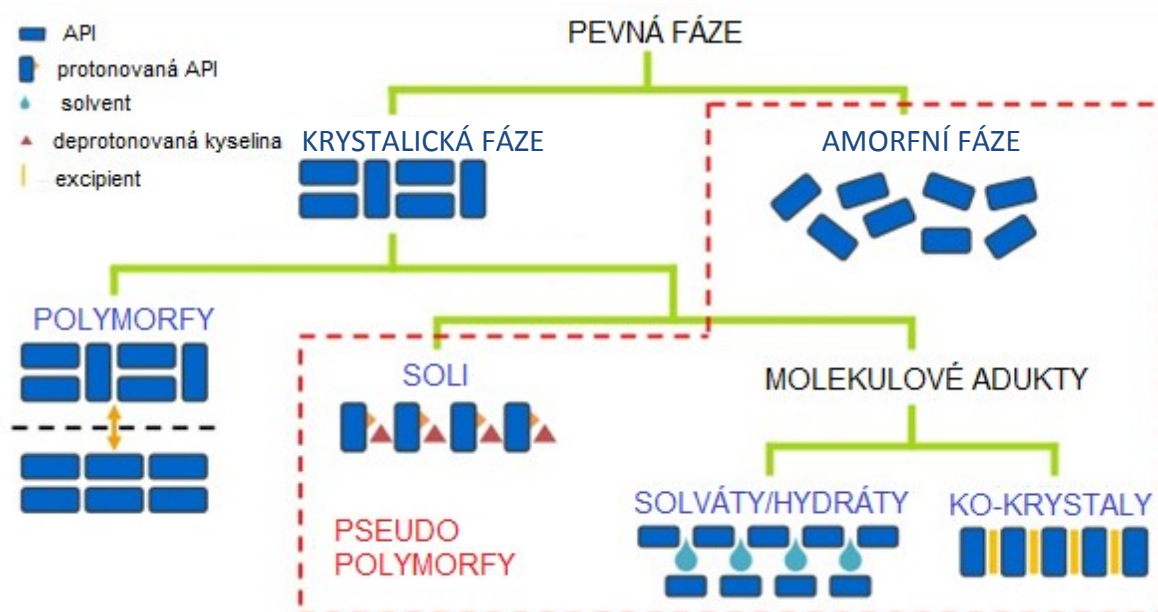
přidáním skokově zvýšíme míru přesycení.<sup>11</sup> Očkovaná krystalizace nám poskytuje kontrolu nad celým procesem<sup>12</sup> a umožňuje např. i řízení distribuce velikosti částic.<sup>3</sup> Finální velikost částic dále ovlivňuje tokové vlastnosti.<sup>13</sup> Někdy bývá materiál po krystalizaci dále upravován např. mletím, kdy se redukuje distribuce velikosti částic. Pomleté krystaly mají nepravidelný tvar a defekty, což může ovlivnit jejich povrchovou energii.<sup>14</sup> V konečném výsledku může mít materiál úplně odlišné vlastnosti. Pochopení klíčových faktorů zůstává však stále výzvou. Proto se tématem mé diplomové práce stalo studium vlivu krystalizace na fyzikálně chemické vlastnosti API látek.

## 2. Teoretická část

Účinnou látkou v každém léku je tzv. aktivní farmaceutická substance (API), která interaguje s organismem a způsobuje biologický účinek. Léčivá látka společně s dalšími pomocnými látkami (excipienty) se formuje do vhodné lékové formy. Nejčastější formou jsou pevné tablety, tobolky.

### 2.1. Aktivní farmaceutické látky

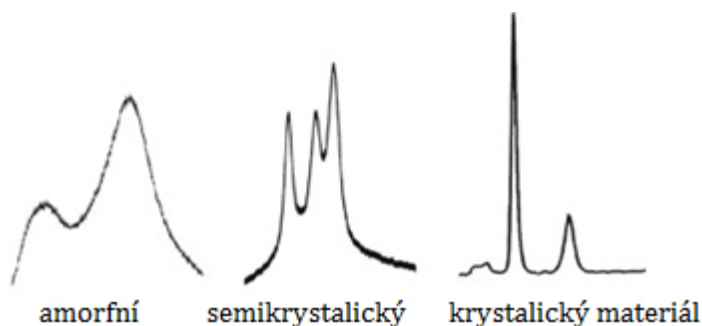
Aktivní farmaceutické látky (API) existují buď v krystalické, nebo amorfní fázi (viz obr. 1). Krystalická fáze se vyznačuje vysokým stupněm uspořádáním atomů/molekul, lepší termodynamickou stabilitou a vysokým stupněm čistoty. Naopak amorfní látky vykazují uspořádanost pouze na krátké vzdálenosti a jsou méně stabilní – tzv. metastabilní. Molekuly mají větší energii a mobilitu a můžou podléhat chemické a fyzikální transformaci.<sup>15</sup> Amorfní látky mají tendenci přecházet ve stabilnější formy. Amorfní látky lze připravit různými způsoby např. odstraněním solventu ze solvátu,<sup>15</sup> rychlým ochlazením roztoku<sup>11</sup> nebo mletím.<sup>16</sup>



Obr. 1: strukturální rozdíly mezi uspořádáním pevné fáze.<sup>17</sup>

Pokud se krystaly o stejném chemickém složení liší ve vnitřním uspořádání (struktuře), mluvíme o polymorfizmu. Typickým příkladem je uhlík, který známe ve formě diamantu, grafitu nebo fullerenů. Asi 30% API látek vytváří polymorfy.<sup>18</sup> Rozdíly ve vnitřním uspořádání způsobují odlišné fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti.<sup>19</sup> Mezi techniky,

kteřé nám umožňují identifikovat různé pevné formy látek patří RTG prášková difrakce, termická analýza, mikroskopické techniky, infračervená nebo Ramanova spektroskopie či solid-state NMR. Poměry rozpustností polymorfních forem jsou obecně menší než dva, výjimečně je poměr vyšší. Naprostou výjimku představuje premafloxacin, u kterého je poměr rozpustností více jak 20ti násobný.<sup>20</sup>



Obr. 2: rozdíl RTG difraktogramů amorfního a krystalického materiálu.<sup>21</sup>

Literatura uvádí, že asi 50% API látek je připravovaných ve formě soli,<sup>15</sup> pro které je typická iontová vazba. Krystalová struktura je zcela odlišná od mateřské API, liší se i struktury různých solí stejné API. Rozdíly jsou také v rozpustnosti a schopnosti krystalizovat. Tvorbou solí se dobře řídí rozpustnost i jiné vlastnosti. Farmaceutické soli jsou v pevné fázi obvykle poměrně stabilní.<sup>15</sup>

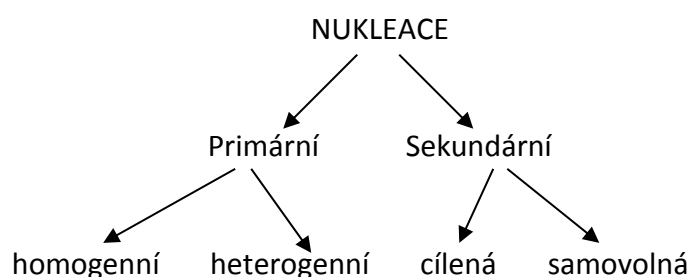
Krystaly mající ve své mřížce zabudované molekuly rozpouštědla nazýváme solváty. Pokud je rozpouštědlem voda, jedná se o hydráty. Skupiny solvátů jednoho rozpouštědla, ale s různou stechiometrií, bývají často označovány jako pseudopolymorfy. Solváty a hydráty se běžně vyskytují u velkého množství farmaceutických látek.<sup>15</sup> Častěji se setkáváme s hydráty. Je to hlavně díky vlastnostem molekuly vody (malá velikost, schopnost působit jako donor i akceptor vodíkové vazby). Nižší zastoupení solvátů vyplývá také z toxicity některých organických rozpouštědel.<sup>15</sup>

Kokrystaly jsou tvořeny dvojicí API-excipient, čímž se výrazně liší od polymorfů (pouze API) i solí (iontová vazba). Jednotlivé složky kokrystalů jsou neutrální a jsou spolu vázány neionickými vazbami. Pokud API tvoří solváty, je vysoká pravděpodobnost, že bude vytvářet i kokrystaly. Ty mohou mít lepší rozpustnost a biodostupnost v porovnání s mateřskou látkou. Dalšího zvýšení rozpustnosti kokrystalů lze dosáhnout ionizací koformeru.<sup>15</sup>

## 2.2. Krystalizace

Krystalizace je proces, při kterém dochází k vyloučení pevné látky z roztoku, taveniny nebo jiné pevné fáze.<sup>22</sup> Ve farmaceutickém průmyslu je krystalizace finálním krokem výroby aktivních farmaceutických substancí, kde slouží především jako čistící a separační proces. Krystalizace je proces, kde paralelně probíhají dva pochody, nukleace a růst.<sup>23</sup> Potlačení jednoho pochodu na úkor druhého je možné výrazně ovlivnit fyzikálně chemické vlastnosti finálního produktu.

Nukleace může probíhat spontánně (primární) nebo může být indukovaná (sekundární). Primární nukleaci dále dělíme na homogenní a heterogenní. Sekundární nukleaci můžeme rozdělit na cílenou (očkování) a samovolnou (viz obr.3).<sup>22</sup> Proces krystalizace je vysoce citlivý na experimentální podmínky jako je teplota,<sup>3</sup> stupeň přesycení,<sup>24</sup> míchání nebo kontaminace.<sup>25</sup>



Obr. 3: rozdělení nukleace.

## 2.3. Termodynamika krystalizace – přesycení

Klíčovým parametrem řídícím nukleaci a růst krystalu je přesycení. Přesycený roztok je nestabilní systém obsahující větší koncentraci rozpuštěné látky než je jeho rovnovážná (nasyčená) koncentrace – rozpustnost.<sup>22</sup> Z pohledu termodynamiky ke krystalizaci dochází, pokud je chemický potenciál krystalizované složky v rovnovážném stavu  $\mu^*$  nižší, než v přesyceném stavu  $\mu$ .<sup>26</sup>

$$\Delta\mu = \mu - \mu^* \quad (1)$$

Obecně je chemický potenciál rozpuštěné látky v roztoku dán vztahem:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a \quad (2)$$

kde  $\mu_0$  je standardní chemický potenciál rozpuštěné látky,  $R$  je univerzální plynová konstanta,  $T$  termodynamická teplota a  $a$  vyjadřuje aktivitu rozpuštěné látky.

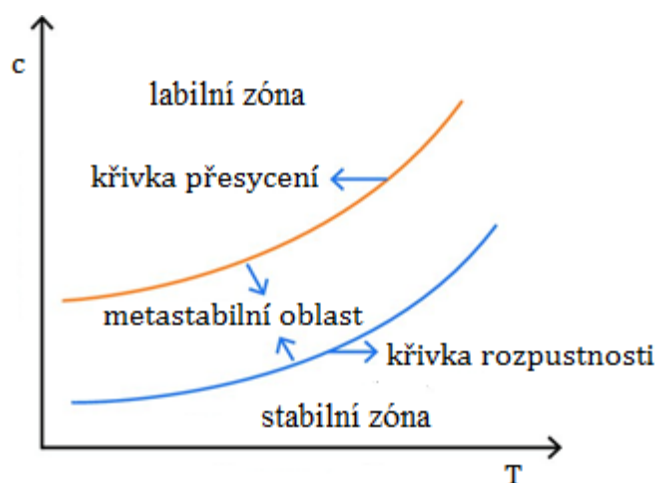
Spojením rovnic 1 a 2 získáme vztah pro přesycení  $B$ :

$$B = \exp \frac{\Delta\mu}{RT} \quad (3)$$

Praktičtější je ale vyjádření přesycení pomocí koncentrací:<sup>22</sup>

$$B_c = \frac{c}{c^*} \quad (4)$$

Na obr.4 je znázorněna závislost koncentrace rozpuštěné látky na teplotě. Oblast grafu je rozdělena dvěma křivkami, křivka rozpustnosti (modře) a křivka přesycení (oranžově), na tři oblasti. Ve stabilní, nenasycené zóně ke krystalizaci nedochází. Snižováním teploty nebo zvýšením koncentrace se dostaneme do zóny metastabilní. V této oblasti máme přesycený roztok a může zde dojít ke krystalizaci. Překročením křivky přesycení se dostáváme do třetí oblasti, nestabilní, labilní, kde dochází ke spontánnímu vyloučení druhé fáze (krystal, olej).



Obr. 4: schéma metastabilní zóny krystalizačního procesu.<sup>27</sup>

## 2.4.Primární nukleace

Nukleace je prvním krokem krystalizace. Pokud nejsou v roztoku přítomny krystaly dané látky, hovoříme o primární nukleaci.<sup>26</sup> Proces vzniku stabilních nukleí není přesně znám. Počet molekul stabilního nuklea, vznikajícího bimolekulární adicí, se pohybuje od desítek až ke stovkám molekul.<sup>22</sup> Kritické nukleum je považováno za minimální množství nové fáze, která je schopna existence.<sup>25</sup> U homogenní nukleace nejsou v roztoku přítomny žádné cizí částice.<sup>26</sup> Jedná se o čistě náhodný proces, při kterém vznikají klastry díky Brownovu pohybu.<sup>25</sup> Koncentrace rozpuštěné látky v roztoku je konstantní za konstantní teploty a

tlaku. Ale existují místa, kde hodnoty fluktuují. V těchto místech je vysoké přesycení a molekuly agregují do klastrů, které jsou extrémně nestabilní a snadno se mohou rozpadat. Pokud ale jejich velikost dosáhne kritické velikosti, stávají se stálými.<sup>22</sup> Klasická nukleační teorie vychází z prací Gibbse,<sup>28</sup> Volmera,<sup>29</sup> Beckera a Döringa<sup>30</sup> a je považována za jednokrokový proces, kdy v přesyceném roztoku vznikají stabilní nuklea, která dále rostou.<sup>25</sup>

Pro jednoduchost uvažujme kulovitý agregát o poloměru  $r$ . Řídící silou nukleace je snížení volné Gibbsovy energie  $\Delta G$ :<sup>26</sup>

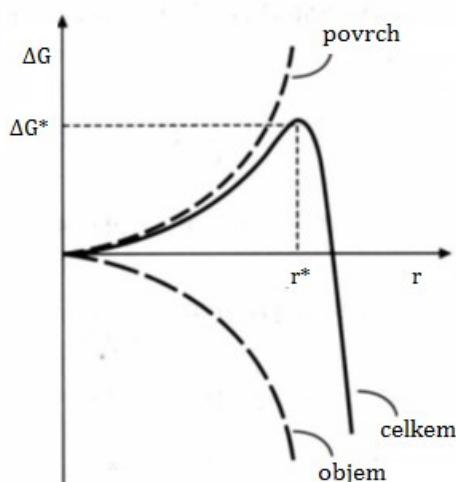
$$\Delta G = \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma \quad (5)$$

kde  $\Delta G_v$  vyjadřuje změnu Gibbsovy energie na jednotku objemu, je záporná a způsobuje tak pokles  $\Delta G$ ,  $\gamma$  je povrchové napětí, které je kladné a zvyšuje  $\Delta G$ .<sup>22</sup> Ke spontánní nukleaci dochází pouze v přesyceném roztoku, platí  $\Delta G_v < 0$ . Pokud je poloměr nuklea  $r$  roven právě kritickému poloměru  $r^*$ , je  $\Delta dG/dr = 0$ . Velikost kritického poloměru je tedy dána rovnicí:

$$r^* = \frac{-2\gamma}{\Delta G_v} \quad (6)$$

dosazením vztahu z rovnice 6 do rovnice 5 získáme hodnotu energetické bariéry  $\Delta G^*$ , kterou musí nukleační proces překonat (viz obr. 5):<sup>22,23</sup>

$$\Delta G^* = \frac{16\pi\sigma^3}{3(\Delta G_v)^2} \quad (7)$$



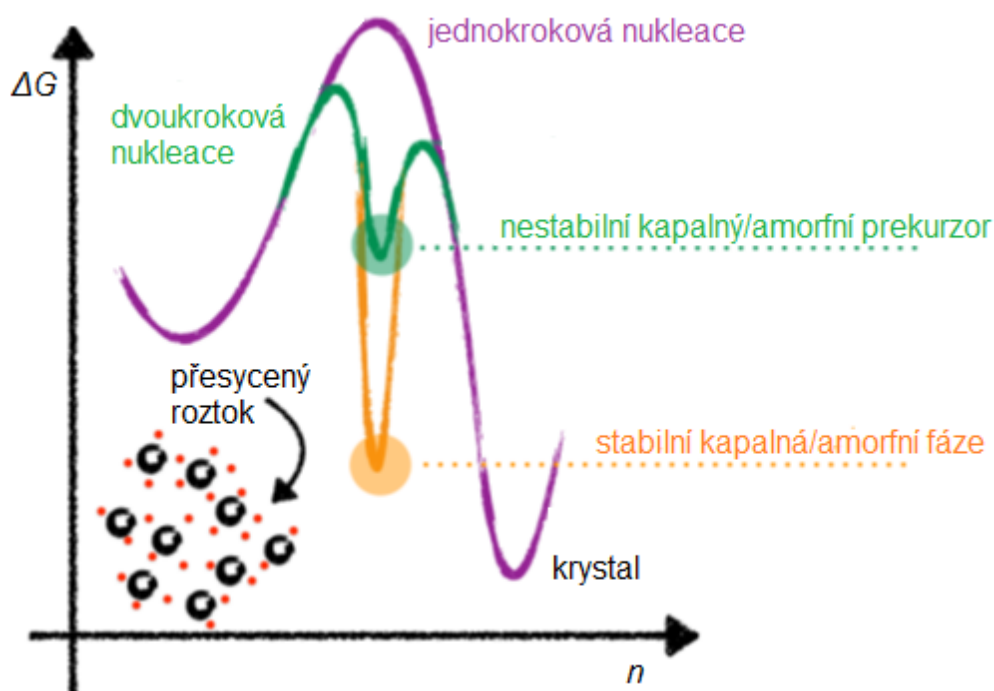
Obr. 5: graf závislosti volné Gibbsovy energie na velikosti nuklea.

Obměnou klasické Arrheniovy rovnice můžeme vyjádřit rychlost nukleace  $J$  (počet vzniklých nukleí za jednotku času na jednotku objemu):

$$J = A \exp \frac{-\Delta G^*}{kT} \quad (8)$$

kde  $A$  je preexponenciální faktor,  $k$  je Boltzmannova konstanta a  $T$  termodynamická teplota.<sup>22</sup> Rychlost nukleace roste exponenciálně až po dosažení kritické koncentrace.<sup>26</sup>

V roce 2010 byl publikován článek popisující dvoukrokovou nukleaci.<sup>31</sup> Ta, na rozdíl od jednokrokové nukleace, musí překonat dvě energetické bariéry, které jsou ovšem nižší než v případě jednokrokové nukleace. První bariéra představuje vytvoření neuspořádaných, hustých metastabilních klastrů o velikosti stovek nanometrů, které jsou suspendovány v roztoku.<sup>31</sup> Vzniklý prekurzor musí poté překonat druhou energetickou bariéru, která odpovídá uspořádání molekul do krystalické fáze (viz obr. 6).<sup>32,33</sup>



Obr. 6: schématické srovnání jednokrokové a dvoukrokové nukleace.<sup>32</sup>

Primární homogenní krystalizace je ve farmaceutickém průmyslu méně využívaná, protože neposkytuje kontrolu nad krystalizačním procesem a hrozí tak vznik nežádoucího produktu.<sup>23</sup>

Primární heterogenní nukleace probíhá na cizí fázi v roztoku (stěny reaktoru, míchadlo, nečistoty), která disponuje volným povrchem. Přítomnost cizích částic může indukovat nukleaci snadněji než je tomu u primární homogenní nukleace.<sup>22</sup> Změna Gibbsovy energie heterogenní nukleace  $\Delta G_{het}$  musí být menší než v případě homogenní nukleace  $\Delta G_{homo}$ :

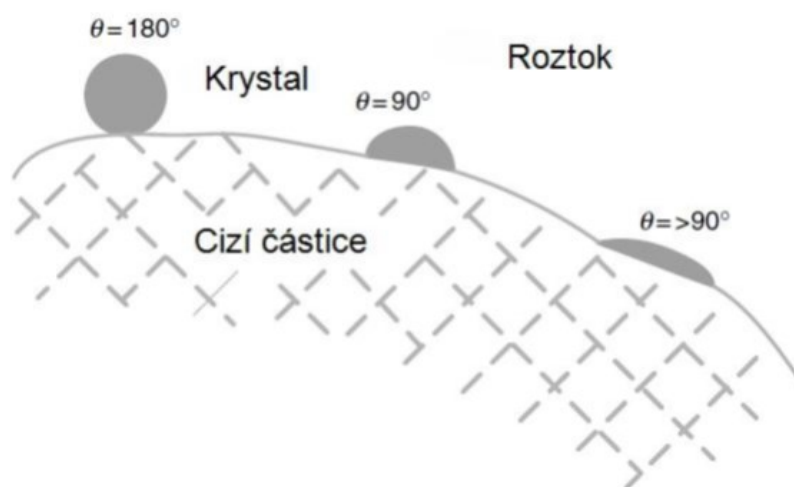
$$\Delta G_{het} = f(\theta) \cdot \Delta G_{homo} \quad (9)$$

kde  $f(\theta)$  je funkce kontaktního úhlu, který je menší než 1. Kontaktní úhel představuje úhel mezi cizí fází v roztoku s volným povrchem a nukleem. Závislost povrchového napětí  $\gamma$  mezi třemi fázemi popisuje Youngova rovnice:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{sl} - \gamma_{cs}}{\gamma_{cl}} \quad (10)$$

kde  $\gamma_{sl}$  je povrchové napětí mezi cizí pevnou fází a kapalinou,  $\gamma_{cs}$  je napětí mezi krystalickou fází a cizí pevnou látkou a  $\gamma_{cl}$  je napětí mezi krystalickou fází a kapalinou.<sup>23</sup>

Na základě interakcí mezi cizí pevnou fází a vznikajícím nukleem můžou nastat tři případy, které jsou na obr. 7. Téměř nulová afinita mezi vznikajícím krystalem a cizí fází, kontaktní úhel  $\theta = 180^\circ$ , energie potřebná k nukleaci je stejná jako pro homogenní nukleaci; pro kontaktní úhle  $\theta = 0^\circ$  je energie nukleace nulová (spontánní nukleace); pokud je kontaktní úhel mezi těmito krajními hodnotami, dochází k heterogenní nukleaci, pro kterou stačí menší energie než pro homogenní nukleaci.<sup>22</sup>



Obr. 7: heterogenní nukleace na cizí částici pro různé úhly smáčení.<sup>10</sup>



## 2.5. Sekundární nukleace

Sekundární nukleace je dominantním mechanismem při průmyslové výrobě. U sekundární nukleace je krystalizace vyvolána přítomností krystalků rozpuštěné látky. Tyto krystalky působí jako katalyzátory nukleace. Pro sekundární nukleaci je typická nižší energie potřebná ke vzniku nukleí, proto k ní dochází při nižším přesycení než v případě primární nukleace.<sup>10,34</sup>

Existuje mnoho teorií popisujících sekundární nukleaci, které můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. První popisuje původ sekundárních nukleí díky přítomnosti rodičovského krystalu. Počáteční nebo prachový původ (formování drobných krystalů na povrchu rodičovského krystalu během růstu nebo odlomením), makroabraze nebo kolize (při vysokých rychlostech míchání, zaoblení hran), jehlicovitý/polykrystalický původ (při vyšším přesycení, rozpad jehlicovitých/polykrystalických částic, které dále slouží jako nukleační centra). Nejběžnějším mechanismem je kontaktní nukleace (sekundární nuklea vznikají z poškození povrchu krystalu).<sup>11</sup>

Druhou možností je, že sekundární nuklea pocházejí přímo od rozpuštěné látky v roztoku.<sup>11</sup> Teorie gradientu koncentrace nečistot předpokládá heterogenitu disperze. V blízkosti krystalů je větší přesycení. Vyšší koncentrace klastrů v blízkosti očkovacího materiálu vede k jejich agregaci a tvorbě nukleí větších, než je kritický poloměr nuklea.<sup>34</sup> Posledním mechanismem je smyk kapaliny. Ta odnese do objemu klastry, které jsou na povrchu již vytvořených krystalů, které dále rostou.<sup>10</sup>

Rychlost sekundární nukleace je řízena třemi hlavními kroky: vznikem sekundárních nukleí, přesunem klastrů a růstem v novou pevnou fázi. Tyto procesy ovlivňuje přesycení, rychlost chlazení, míchání nebo přítomnost nečistot.<sup>3</sup> Vliv má dále drsnost kontaktních částí nebo očkovací materiál.<sup>11</sup>

Očkováná krystalizace je speciálním případem sekundární nukleace, kdy jsou do krystalizačního roztoku přidány částice krystalizované látky. Očkování je jeden z nejdůležitějších kroků při optimalizaci krystalizace,<sup>35</sup> brání nekontrolované nukleaci a zaručuje reprodukovatelnost procesu.<sup>11,23</sup> Očkovací materiál je přidáván ve formě prášku nebo jako suspenze.<sup>10</sup> Důležité je přidání očkovacího materiálu ve správnou chvíli. Pokud je oko přidáno příliš brzy, rozpustí se. Naopak, pokud je přidáno pozdě, nezabrání nadměrné nukleaci.<sup>10</sup> Optimální je přidání očk v  $\frac{1}{4}$  až  $\frac{1}{2}$  šířky metastabilní zóny. Další otázku

představuje množství očkovacího materiálu.<sup>23</sup> Čím větší množství očkovacího materiálu je přidáno, tím je rychlost nukleace menší.<sup>11</sup> Množství očkovacího materiálu je důležité mimo jiné i pro řízení krystalizace polymorfních forem<sup>4</sup> a různí se od žádného až po masivní:<sup>10</sup>

- Špetka – zabrání nekontrolované nukleaci
- Malé množství (<1%) – snaha dosáhnout růstu, převažuje nukleace
- Velké množství (5–10%) – vyšší pravděpodobnost růstu
- Masivní (>10%) – maximální možnost růstu

Během každé krystalizace si mezi sebou konkurují procesy nukleace a růstu. Množství očkovacího materiálu upřednostní buďto nukleaci nebo naopak nukleaci potlačí a uplatňuje se růst krystalů. Čím větší množství očkovacího materiálu je přidáno do systému, tím více se prosazuje růst. Důvodem je větší specifická plocha povrchu krystalů, které mohou růst. Obdobné je to i v případě různé distribuce velikosti částic (PSD) očkovacího materiálu při konstantní hmotnosti. Očkování v menším množství dochází k sekundární nukleaci a finální produkt vykazuje bimodální distribuci velikosti částic.<sup>3</sup> Na finální krystaly má velký vliv také kvalita očkovacího materiálu. Očkování mletým okem může vést k bimodální distribuci finálního produktu, protože mletý vzorek obsahuje velké množství drobných krystalů, které můžou aglomerovat. To následně snižuje účinnost dalších procesů (filtrace, sušení) a může ovlivnit i biodostupnost API. Pokud se očkuje mletým materiálem, měl by se před samotným očkováním promýt, aby byly odstraněny jemné částice.<sup>12</sup> Pokud chceme udržet konstantní distribuci velikosti částic u každé šarže, je třeba očkovat materiálem s konstantním PSD.<sup>3</sup>

Očkovaná krystalizace s cyklickým teplotním profilem urychluje růst a zužuje velikostní distribuci produktu ve srovnání s lineárním chladícím profilem, protože podporuje Ostwaldovo zrání. Navíc může umožňovat růst pouze určité polymorfní formy v závislosti na zvoleném rozpouštědle.<sup>2</sup>

## 2.6. Růst krystalu

V předchozí části byla popsána první fáze krystalizačního procesu – nukleace. Nyní se zaměříme na druhou fázi, kterou je růst krystalu. Jedná se o komplexní jev, který vyžaduje jak difuzi molekul v roztoku, tak jejich úspěšné zabudování do krystalové mřížky. Nukleace a růst se „přetahují“ o volné molekuly rozpuštěné látky. Poměr rychlostí ovlivňuje distribuci

velikosti částic.<sup>25</sup> Podmínky a rychlost růstu mají značný vliv na finální čistotu a tvar krystalu.<sup>11</sup>

Volné molekuly rozpuštěné látky v roztoku se vážou, k již existujícím krystalům, třemi různými způsoby. Nejpravděpodobnější a energeticky nejvýhodnější je navázání molekuly do místa, kde je přichycena třemi plochami krystalu (kink site). Méně výhodné je místo, kde molekula sousedí se dvěma plochami krystalu. Úspěšné zabudování molekuly, kdy je přichycena pouze jednou plochou, je nejméně výhodné. Obecně platí, že molekuly se nejčastěji vážou tam, kde mají nejvíce sousedů.<sup>10</sup>

Nejmenší krystaly se v nasyceném systému rozpouští a přidávají se k větším krystalům, které tím dále rostou. Mění se tak velikostní distribuce, zvětšuje se průměrná velikost krystalů. Soustava minimalizuje Gibbsovu energii. Tento proces se označuje jako Ostwaldovo zrání.<sup>11</sup> Jev hraje důležitou roli u rychlých krystalizací a tam, kde vznikají drobné krystaly. V takovýchto případech nesmíme zapomínat na to, že Ostwaldovo zrání mění soustavu v čase.

Rychlosti růstu krystalů jednotlivých farmaceutických substancí se mohou lišit až o pět řádů. Srovnání fyzikálně-chemických vlastností ukázalo, že rychleji rostou sloučeniny s menší molekulovou hmotností a s vyšší rozpouštěcí teplotou.<sup>36</sup> Rovněž polymery mohou ovlivnit rychlost růstu krystalů a tím pádem i jeho morfologii.<sup>37</sup> Přítomnost surfaktantů upřednostňuje vznik amorfni fáze před krystalickou.<sup>38</sup>

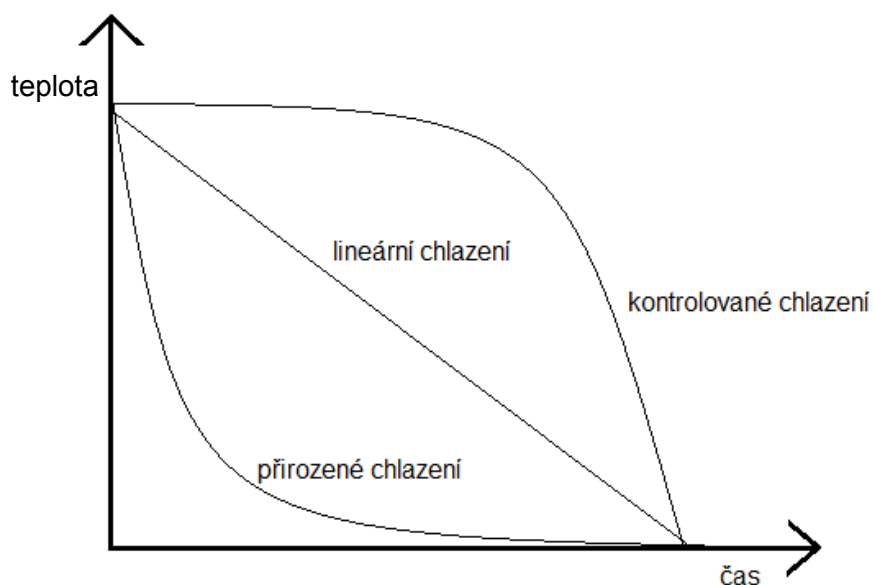
## 2.7. Typy krystalizací

Krystalizace je jednou z nejstarších chemických operací. Dnes je známo mnoho způsobů, jak krystalizaci efektivně indukovat a řídit. Důležitým parametrem procesu je již výše zmíněné přesycení.<sup>11</sup> Ve farmacii se nejčastěji využívá krystalizace chlazením,<sup>9</sup> přidáním antisolventu,<sup>16</sup> odpařením rozpouštědla<sup>39</sup> nebo reakční krystalizace.<sup>40</sup> Dobrou kontrolu nad procesem poskytuje tzv. očkování.<sup>12</sup> Mezi speciální způsoby krystalizace můžeme zařadit např. sonokrystalizaci,<sup>41</sup> využití templátů<sup>42</sup> či difuzi rozpouštědla nebo páry.<sup>11</sup> Každý z výše zmíněných způsobů má své výhody i nevýhody, a proto je třeba volit určitý způsob na základě znalostí vlastností dané látky, kterou chceme krystalizovat, a to také s ohledem na její požadované fyzikálně-chemické vlastnosti. U některých API látek se mohou během krystalizace objevovat problémy jako je vznik oleje nebo gelace.<sup>43</sup>

Ve farmacii se většina krystalizací provádí v tzv. šaržích. Kvůli variabilitě produktu od šarže k šarži, se začíná věnovat větší pozornost kontinuální krystalizaci, protože při kontinuálním procesu můžeme lépe kontrolovat distribuci velikosti částic. Další výhodou je její ekonomický potenciál.<sup>44</sup> Všechny operační parametry (teplota, koncentrace atd.) jsou u kontinuální krystalizace konstantní, proto je kontrola procesu jednodušší. Kontinuálním procesem se již podařilo připravit i metastabilní polymorfní formy paracetamolu.<sup>45</sup> Pro výrobu chirálních molekul zůstává výhodnější krystalizace v šaržích, protože u kontinuální krystalizace je problém nízké výtěžnosti.<sup>44</sup>

### 2.7.1. Krystalizace chlazením

V případě, kdy je rozpustnost látky výrazně závislá na teplotě, využíváme krystalizaci chlazením.<sup>10,23</sup> Jedná se o jednu z nejběžnějších a velice jednoduchých metod. Ochlazováním nasyceného roztoku vzniká roztok přesycený, který dalším snížením teploty krystalizuje. Rozlišujeme tři základní chladicí profily, a to přirozené chlazení (nekontrolované), lineární a kontrolované chlazení (viz obr. 8).<sup>11</sup>



Obr. 8: porovnání průběhů různých chladících profilů.

Rychlost chlazení ovlivňuje úroveň přesycení a tím pádem i vlastnosti pevné fáze.<sup>10</sup> Přirozeným chlazením získáme materiál s širokou distribucí velikosti částic (tzv. bimodální rozložení), aplikací lineárního chladicího profilu se velikostní distribuce zužuje.<sup>11</sup> Výhodou krystalizace chlazením je, že se vyhneme přidavku jiných látek jako jsou další rozpouštědla nebo očkovací materiál, které by mohly negativně působit na čistotu produktu.<sup>46</sup> Pokud

látku existuje ve více polymorfních formách, je důležité kontrolovat nejen rychlost chlazení, ale také její počáteční koncentraci.<sup>9</sup> Změnou rychlosti chlazení ovlivňujeme míru přesycení a tím pádem můžeme dosáhnout požadovaných vlastností produktu. V některých případech ale může docházet k nadměrné nukleaci, pokud je krystalizace řízena pouze chlazením. Kombinace s antisolventem umožňuje lepší řízení celého procesu a částečnou kontrolu nad PSD.<sup>46</sup>

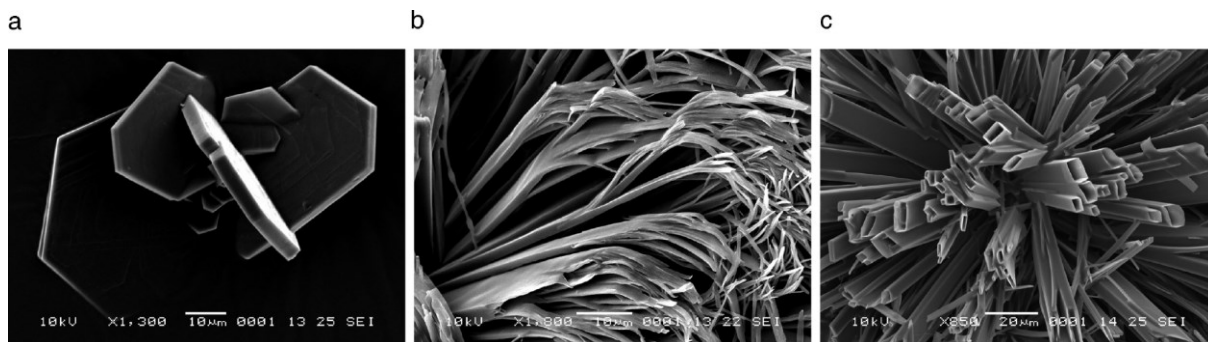
### **2.7.2. Krystalizace s přidáním antisolventu**

U tohoto typu krystalizace dochází ke snížení rozpustnosti API díky přidavku antisolventu neboli rozpouštědla, ve kterém je daná API nerozpustná. Kontrolovaná rychlost přidavku antisolventu poskytuje jednoduchý a velice účinný způsob, jak kontrolovat výslednou distribuci velikosti částic.<sup>10</sup> Antisolvent může být do roztoku přidáván za laboratorní teploty, čehož se využívá u krystalizace teplotně labilních látek. Buď je antisolvent přidáván do roztoku produktu nebo roztok produktu přidáváme k antisolventu (reverzní přídavek).<sup>10</sup> Rychlost přidavku a teplota, při které je antisolvent přidáván, rozhodují o vlastnostech pevné fáze. Někdy může docházet k extrémně velkému přesycení i v případě pomalého přidávání antisolventu. V takových případech je možné antisolvent naředit rozpouštědlem.<sup>11</sup> U reverzního přídavku dokonce i pomalá rychlost přidávání může způsobit vysoké přesycení, čímž vzniká materiál s malou distribucí velikosti částic. Dostatečně vysoká rychlost přidavku eliminuje fázi růstu a vznikají jemné částice.<sup>10</sup> Výběr dvojice solvent – antisolvent hraje velmi důležitou roli nejen u morfologie, ale také v mechanických vlastnostech API látek. Mezi jinými významně ovlivňuje i Youngův modul.<sup>47,48</sup> Fluticason propionát (FP) tvoří agregáty, pokud je krystalizován z běžně používaných organických rozpouštědel jako je methanol nebo aceton, antisolventem je voda. Krystaly připravené z polyethylenglykolu neaglomerují a proto mají užší PSD.<sup>49</sup>

### **2.7.3. Krystalizace s odpařením rozpouštědla**

Odpaření rozpouštědla, jako proces pro dosažení přesycení, se využívá u látek, jejichž rozpustnost je jen nepatrně závislá na teplotě. Typickým případem je chlorid sodný.<sup>11</sup> Běžně je roztok míchán po celou dobu krystalizace, aby byly zachovány rovnovážné podmínky v celém systému. Pokud ovšem necháme krystalizaci probíhat jen samovolným odpařením rozpouštědla, můžeme získat krystaly, u kterých rychlost růstu jedné z krystalových ploch několikanásobně převyšuje rychlost růstu ostatních. Jako např. v případě aspirinu, který

ve vodě krystalizuje ve formě hexagonálních destiček, v ethanolu tvoří lačkovité krystaly přecházející v dendrity a v chloroformu vytváří tubulární krystaly s obdélníkovým průřezem (viz obr. 9).<sup>39</sup> Krystalizace s odpařením rozpouštědla se může kombinovat s jinými operacemi, jako je např. přidavek antisolventu.<sup>10</sup>



Obr. 9: SEM snímky aspirinu krystalizujícího z různých rozpouštědel – a) z vody, b) z ethanolu a c) z chloroformu.<sup>39</sup>

#### 2.7.4. Reakční krystalizace

U reakční krystalizace nebo také precipitace je dosaženo přesycení chemickou reakcí. Reakce může probíhat mezi organickými sloučeninami nebo jde o neutralizaci za vzniku soli. Reakce jsou velmi rychlé ve srovnání s rychlostí růstu krystalu, proto dochází k velkému lokálnímu přesycení a špatně kontrolované nukleaci za vzniku malých krystalků. S drobnými částicemi může být problém v dalších krocích zpracování (filtrace, mytí a sušení).<sup>10</sup> Vysoká rychlost celého procesu krystalizace může vést k nižší čistotě produktu nebo také k okluzi rozpouštědel. Reakční krystalizace se využívá především u API s nízkou rozpustností ve vodě. Ty jsou chemickou reakcí převedeny na soli, které mají obecně lepší rozpustnost ve vodě.<sup>10</sup> Krystalický materiál s vysokou kvalitou (stabilita, užší PSD a lepší krystalinita) byl připraven reakční krystalizací za použití „impinging jet mixer“ v kombinaci s kontinuálně míchaným tankovým reaktorem. Nejprve dochází k vynikajícímu promíchání reagentů, a tedy k nukleaci. Vzniklé malé částice jsou okamžitě dispergovány do tankového reaktoru a nemůže proto docházet k aglomeraci.<sup>40</sup>

#### 2.7.5. Speciální typy krystalizace

##### *Sonokrystalizace*

Krystalizaci lze řídit a kontrolovat také za použití ultrazvuku.<sup>50</sup> Během jeho působení vznikají v roztoku bubliny, které rostou a nakonec praskají. Tento proces je označován jako kavitace.<sup>10</sup> V oblasti kolapsu bublin jsou vysoké teploty (5 000 K) a tlaky (2 000 atm). Kavitace

efektivně indukuje nukleaci, takže se výrazně zlepší reprodukovatelnost procesu (běžně se pro lepší reprodukovatelnost používá očkovaná krystalizace).<sup>51,52</sup> Ultrazvuk indukuje primární nukleaci při mnohem nižším přesycení roztoku, což se odrazí ve snížení indukčního času.<sup>53</sup> Během sonokrystalizace vzniká mnohem více nukleí v porovnání s očkovanou krystalizací, proto finální produkt tvoří malé krystaly s úzkou distribucí velikosti částic.<sup>52</sup> Ultrazvuk podporuje i sekundární nukleaci mechanickým rozrušením krystalů nebo slabě vázaných aglomerátů.<sup>51</sup> Jeho aplikace také efektivně zabraňuje aglomeraci.<sup>53,54</sup> Pokud látka krystalizuje ve více polymorfních formách, vhodně použitou sonokrystalizací vzniká termodynamicky nejstabilnější polymorfní forma. Ultrazvuk může také nahradit míchání během procesu. Díky kavitaci a akustickým vlnám je např. antisolvent dobře promícháván s krystalizační suspenzí, proto dochází k rychlé a rovnoměrné nukleaci. Čím vyšší je amplituda ultrazvuku, tím se tvoří menší krystaly a zužuje se velikostní distribuce. Podobný je i účinek doby sonikace.<sup>50</sup> Pozitivní je také vliv sonokrystalizace na výtěžek reakce.<sup>41</sup> Ultrazvuk výrazně působí na tvar a povrch krystalů, což v dalších fázích výroby ovlivní manipulační vlastnosti.<sup>55</sup>

#### *Krystalizace s využitím templátů*

Během výroby API látek je vyžadována krystalizace požadovaného produktu o určitých vlastnostech a reprodukovatelnost celého procesu.<sup>51,52</sup> Často se uplatňuje očkovaná krystalizace, která rovněž zkracuje čas procesu.<sup>11,23</sup> Je ale důležité hlídat vlastnosti očkovacího materiálu, aby všechny šarže měly stejnou kvalitu.<sup>12</sup> Dobrou reprodukovatelnost a selektivitu finálního materiálu nabízí krystalizace s templáty.<sup>42</sup>

Jako templáty se často využívají kovy.<sup>56</sup> Typ solventu, míra přesycení a velikost templátů ovlivňuje selektivitu.<sup>57</sup> V dnešní době je věnována velká pozornost nanočásticím. Jejich vlastnosti a chování nejenže můžou urychlit krystalizaci, ale ovlivňují i velikost a tvar krystalů. Nanočástice oxidů křemíku, titanu nebo zirkonia s vrstvou kyseliny skořicové, která je buď adsorbována, nebo kovalentně vázána, podporují její krystalizaci.<sup>58</sup> TiO<sub>2</sub> krystalizuje ve více formách. Bylo prokázáno, že anatas více podporuje nukleaci a brání růstu krystalů v porovnání s rutillem.<sup>42</sup>

Další možností je funkcionalizace,<sup>59</sup> např. silanizace vialek.<sup>24</sup> Funkční skupiny efektivně indukují specifickou krystalizaci např. u carbamazepinu ve středně a nízko polárních rozpouštědlech. U hodně polárních rozpouštědel templáty výrazně neovlivňují

krystalizaci, protože silné interakce mezi templátem, rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou maskují efekt templátů pro heterogenní nukleaci.<sup>24</sup>

Využití templátů u krystalizace otevírá daleko více možností. Třeba přípravu krystalických látek o neobvyklých tvarech. Např. Songwen *a kol.* použili ke krystalizaci monohydrátu  $\alpha$ -laktózy jako templát kyselinu citronovou. Výsledkem byly květinové krystaly s velkou plochou povrchu a velkým objemem pórů.<sup>60</sup> McKellar *a kol.* jako první publikovali článek o použití polymerů jako templátů bez přítomnosti rozpouštědla.<sup>59</sup>

## 2.8. Vybrané metody charakterizace pevné fáze

API látky jsou zpracovávány v pevné fázi, tudíž je vysoce důležitá jejich prášková a částicová analýza. U API látek jsou nejčastěji zjišťovány tyto vlastnosti: distribuce velikosti částic, tvar, specifická plocha povrchu, drsnost a porozita. Z objemových vlastností nás zajímá hustota, kompresibilita, flowabilita a elektrické vlastnosti.<sup>15</sup>

### 2.8.1. Metody stanovení velikosti částic

Techniky měřící distribuci velikosti částic zkoumaného souboru často pracují s aproximací sférických částic. V takovém případě je rozměr popsán poloměrem koule. Tento přístup ale není možné aplikovat na všechny systémy. API látky krystalizují v nejrůznějších tvarech od nepravidelných destiček, přes jehličky až po sférické krystaly. Někdy navíc dochází k agregaci, což dále komplikuje analýzu.<sup>15</sup> Mikroskopické techniky definují morfologii a jsou komplementární k výsledkům distribuce velikosti částic zkoumaného souboru. U větších krystalů v řádech desítek mikrometrů stačí optický mikroskop, několika násobně většího zvětšení dosahují elektronové mikroskopy (transmisní, skenovací).

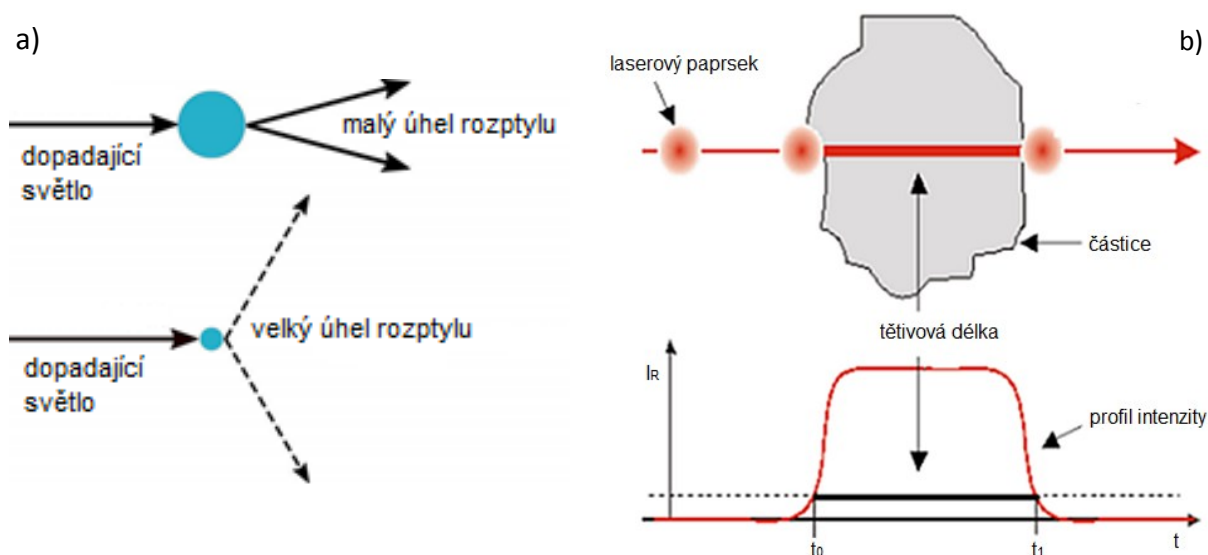
Ve farmacii se PSD nejčastěji zjišťuje z obrazové analýzy optickým a elektronovým mikroskopem nebo laserovou difrakcí. Výhodou mikroskopií je i zjištění tvaru a částečně také informace o povrchu krystalů. Nevýhodou je zahrnutí podstatně menšího souboru částic a delší zpracování výsledků. Laserová difrakce měří částice od 20 nm do 2 cm, analýza je provedena na souboru částic o několik řádů vyšším než v případě mikroskopií a pokud je vyvinutá metoda, zkracuje se i doba měření. Bohužel laserová difrakce neposkytuje informace o tvaru a povrchu. Proto se získané výsledky obvykle doplňují mikroskopickými snímky. Mezi další techniky měření velikosti částic patří dynamický rozptyl světla nebo dynamická obrazová analýza, ze starších technik např. sítování nebo sedimentace.



V současné době se stále více využívá *in situ* měření pomocí FBRM (Focused beam reflectance measurement) sondy.<sup>3</sup>

Princip laserové difrakce spočívá v lišících se úhlech difraktovaného paprsku a odlišné intenzitě rozptýleného světla pro různě velké částice. Čím je částice větší, tím rozptyluje světlo pod menšími úhly a s vyšší intenzitou. Naopak u malých částic dochází k rozptylu pod velkým úhlem, ale s malou intenzitou (obr. 10a). Vzorek o vhodné koncentraci je suspendován do měřicí cely, kde interaguje s laserovým paprskem a detektor zaznamenává signál. Pomocí Mieho teorie rozptylu světla nebo Fraunhoferovy aproximace se spočítá objemově vážená velikostní distribuce studovaného souboru.<sup>61</sup>

FBRM sonda charakterizuje disperzní systém na základě odrazu laserového paprsku od částice. Měří se tětivová délka, což představuje vzdálenost mezi dvěma body na okraji částice (viz obr. 10b). Běžně jsou měřeny tisíce tětivových délek za vteřinu, tudíž se jedná o robustní nedestruktivní metodu, která nezávisí na tvaru částic.<sup>62</sup> Sonda v čase zaznamenává změny velikosti částic i jejich populaci, proto má velký význam pro optimalizaci procesů.<sup>2</sup> Pro lepší porovnávání experimentů je vhodné zachovávat některé parametry měření jako je koncentrace nebo rychlost míchání. Změna úhlu, pod kterým je sonda umístěna do suspenze, mění počet zaznamenaných částic. Menší částice (<10  $\mu\text{m}$ ) jsou k této změně náchylnější.<sup>8</sup>



Obr. 10: a) rozdíl laserové difrakce na různě velkých částicích,<sup>63</sup> b) princip měření tětivové délky FBRM sondou.<sup>64</sup>

Mikroskopie nám umožňují vidět objekty, které bychom okem nebyli schopni spatřit. Ať už se jedná o mikroskop optický, elektronový nebo třeba o mikroskopy skenující sondou. Nejčastěji se využívají k určení velikosti, tvaru a povrchových vlastností. Nejběžnějším je optický (světelný) mikroskop. Jeho předností je jednoduchost a rychlost celého měření. Díky rozlišení, které se odvíjí od použitého zdroje záření, což je v tomto případě viditelné světlo, pozorujeme objekty od několika stovek nanometrů po řádově milimetrové předměty.<sup>15</sup>

O několik řádů většího zvětšení dosahuje elektronový mikroskop, který zobrazuje objekty v řádech nanometrů.<sup>15</sup> Rozlišovací schopnost každého mikroskopu odpovídá zhruba  $\frac{1}{2}$  vlnové délky použitého záření.<sup>65</sup> Elektronové mikroskopy, jak už název napovídá, využívají jako zdroj záření urychlené elektrony. Jejich vlnová délka je  $10^5$ krát kratší, než je vlnová délka viditelného světla, proto nám dovolují pozorovat tak malé objekty. Aby nedošlo k absorpci elektronů, musí být celý systém pod vakuem.<sup>65</sup> Tato podmínka mírně omezuje použití např. u vodných vzorků. Konstrukcí se elektronové mikroskopy podobají optickým, skleněné čočky jsou nahrazeny magnetickými. Bombardováním vzorku letícími elektrony vzniká RTG záření, Augerovy elektrony, sekundární elektrony a jiné.<sup>65</sup> V případě transmisního elektronového mikroskopu (TEM) se detekují prošlé elektrony. U skenovacího (SEM) nás primárně zajímají elektrony sekundární a zpětně odražené, které přináší informace o morfologii a topografii, respektive generují kontrast mezi více komponentami.<sup>15</sup> Pro zlepšení signálu bývají nevodivé vzorky před měřením pokoveny, nejčastěji vrstvičkou zlata. Detekce charakteristického RTG záření poskytuje informace o chemickém složení – Energiově disperzní analýza (EDS).<sup>65</sup>

### **2.8.2. Metody stanovení povrchových vlastností**

Povrchové vlastnosti jako je drsnost se zkoumají pomocí mikroskopii se skenující sondou. Typickým znakem je hrot řízeně se pohybující nad vzorkem v blízké vzdálenosti (do 100 nm). V závislosti na typu mikroskopie se zaznamenávají síly, jakými mezi sebou hrot a vzorek interagují. Vertikální rozlišení dosahuje až 1 pm.<sup>65</sup> Skenovací tunelovací mikroskopie (STM) využívá tunelového jevu. Mikroskopie atomárních sil (AFM) zaznamenává atomární síly působící mezi vzorkem a hrotem. Měří se jak vzorky vodivé, tak nevodivé. Pokud se hrot dostane do blízkosti vzorku, je k němu přitahován nebo odpuzován. Dochází tak k ohybu nosníku hrotu, přičemž se měří míra ohnutí nosníku. Hrot skenuje povrch vzorku, tudíž vlastně mapuje jeho drsnost.<sup>15</sup> Rozlišují se tři módy měření – kontaktní, pokleповý a

bezkontaktní. Při kontaktním módu je hrot velmi blízko vzorku, uplatňují se odpudivé síly. Měří se buď v režimu konstantní výšky nebo s konstantní silou. Kontaktní režim není vhodný pro měkké materiály. Měřením v bezkontaktním režimu se vyhneme možnosti kontaminace vzorku z hrotu. Uplatňují se zde van der Waalsovy síly, které mají delší dosah, ale jsou o tři řády slabší. U semikontaktního režimu hrot osciluje nad vzorkem, poklepává na povrch. Nedochozí k poškození vzorku a rozlišení je lepší než v bezkontaktním režimu.<sup>65</sup>

AFM nachází široké uplatnění napříč vědními obory. Ve farmácii se studují fázové přeměny, růst krystalů<sup>37</sup> nebo rozpustnost.<sup>26</sup> Často se hodnotí právě povrchové vlastnosti.<sup>55</sup> Dále se využívá také pro měření mechanických vlastností.<sup>48</sup>

Specifická plocha povrchu (SSA) a porozita se měří sorpcí plynu. Větší plocha umožňuje látce více interagovat s okolím. Proto má plocha povrchu velký vliv na rozpustnost, biodostupnost anebo stabilitu materiálu.<sup>15</sup> Podle interakce plynu se vzorkem rozlišujeme fyzisorpci a chemisorpci.<sup>66</sup>

Princip SSA spočívá v nasorbování inertního plynu (nejčastěji dusíku nebo kryptonu) na povrch vzorku při postupně se zvyšujícím tlaku plynu. Plocha povrchu se poté vypočítá z BET (Brunauer, Emmett, Teller) izotermy (rovnice 11),<sup>15</sup> která je rozšířením Langmuirovy izotermy:

$$n_a = n_m \times \frac{C \times \frac{p}{p_0}}{\left(1 - \frac{p}{p_0}\right) \times \left[1 + (C - 1) \times \frac{p}{p_0}\right]} \quad (11)$$

kde  $n_a$  je objem absorbovaného plynu,  $n_m$  objem plynu v monovrstvě,  $C$  je konstanta,  $p$  a  $p_0$  odpovídá rovnovážnému, respektive saturačnímu tlaku. Před každým měřením je důležité vzorek odplynit, aby byl měřen „čistý“ povrch. K odstranění nežádoucích plynů z povrchu se používá vakuum nebo průtok inertního plynu, zvýšení teploty celý proces urychlí.<sup>66</sup>

Pro sférické neporézní materiály může být SSA odhadnuta z velikosti částic.<sup>3,58</sup> Jen málo který materiál ale splňuje tyto požadavky, proto se metoda často využívá také k měření velikosti pórů.<sup>60</sup> Znalost specifické plochy povrchu očkovacího materiálu dovoluje rychlejší optimalizaci procesu.<sup>3</sup>

Povrchová energie je energie potřebná k vytvoření jednotkové plochy povrchu. Celková povrchová energie zahrnuje širokou škálu fyzikálních sil. Všechny materiály ale mají nepolární (disperzní) složku povrchové energie a u většiny materiálů přispívají k celkové povrchové energii také polární síly (vodíková vazba, acidobazické interakce). Povrchová energie ovlivňuje interakce mezi pevnými látkami nebo mezi pevnou a kapalnou látkou při jejich smísení, proto hraje důležitou roli ve farmaceutickém průmyslu u zpracování API. Povrchová energie se měří např. metodou sedící kapky, Wilhelmyho metodou nebo inverzní plynovou chromatografií (iGC).<sup>67</sup>

U iGC jsou do kapiláry naplněné zkoumaným materiálem vstřikovány molekulární sondy a měří se čas, který je potřeba pro průchod sondy kapilárou. Retenční čas odráží míru interakcí mezi mobilní a stacionární fází (vzorek). Molekulární sondy představuje série n-alkanů pro určení disperzní složky a páry ethyl acetátu, acetonu nebo chloroformu pro určení polární části povrchové energie.<sup>16,67</sup>

V mnoha případech povrchová energie roste s rostoucí plochou povrchu. Soustava se snaží kompenzovat nárůst energie procesem známým jako Ostwaldovo zrání nebo aglomerací.<sup>16</sup> Vyšší povrchová energie je v kavitách, na rozích nebo hranách částic. Čím je povrchová energie větší, tím je povrch více heterogenní. Pochopení rozložení povrchové energie nám pomůže více porozumět procesům aglomerace.<sup>14</sup> Polární příspěvek k povrchové energii roste s polaritou rozpouštědla, které je použito pro krystalizaci.<sup>67</sup> Povrchovou energii zvyšuje mikronizace,<sup>68</sup> protože během procesu se může zvýšit poměr amorfnní fáze.<sup>14,16</sup> Vliv má také obsah vlhkosti.<sup>67</sup>

### **2.8.3. Metody stanovení mechanických vlastností**

Mechanické vlastnosti pevných látek určují odolnost materiálu vůči deformaci a můžeme je vyjádřit poměrem mezi napětím (silou působící na určitou plochu) a jím způsobenou deformací vzorku. Odezvu pevné látky na aplikované napětí vyjadřují pojmy Youngův modul, objemový modul, smykový modul. Pro charakterizaci mechanických vlastností pevných látek se v literatuře pojednávající o farmaceutických substancích používá nejčastěji parametr Youngův modul.<sup>19,47</sup>

Youngův modul představuje schopnost látky odolávat elastické deformaci a určuje míru účinnosti mikronizace.<sup>47</sup> Nízká hodnota Youngova modulu znamená malou odolnost

vůči elastické deformaci, a proto je mikronizace obtížnější. Naopak materiály s vysokým Youngovým modulem se mikronizují snadněji.<sup>47</sup> Výhodné nejen z finančního hlediska je minimalizovat počet mikronizačních cyklů. Každé další mechanické namáhání totiž ovlivňuje také povrchové vlastnosti.<sup>14</sup>

K měření se používá nanoindentor nebo mikroskopie atomárních sil. Výhodou těchto technik je lokální přesné měření a spotřeba minimálního množství vzorku. Během měření se zaznamenává hloubka průniku hrotu do vzorku a působící síla. Výsledky ovlivňují povrchové vlastnosti (vady, defekty) a můžou být zkresleny, pokud je měření prováděno na heterogenních systémech nebo kompozitech.<sup>69</sup>

Janković *a kol.* studovali mechanické vlastnosti polymorfních forem clarithromycinu s cílem nalézt nejvhodnější formu pro tabletaci. Youngův modul zkoumaných polymorfních forem se podstatně lišil, což bylo způsobeno strukturálními rozdíly v uspořádání molekul. Nejvyšší Youngův modul byl naměřen u termodynamicky nejstabilnější polymorfní formy.<sup>19</sup> Sanphui *a kol.* studovali, jak tvorba solí a kokystalů ovlivňuje tvrdost a Youngův modul u voriconazolu. Samotný voriconazol je příliš měkký pro tabletování, ale jeho sůl s kyselinou chlorovodíkovou vykazuje větší tvrdost a Youngův modul díky silným iontovým vazbám.<sup>70</sup> Vlivem primárních krystalizačních podmínek na mechanické vlastnosti budesonidu se zabývali Kubavat *a kol.* Podmínky krystalizace (volba rozpouštědla) ovlivňují mechanické vlastnosti produktu.<sup>48</sup> Podobné výsledky byly publikovány i v případě fluticason propionátu.<sup>47</sup>

#### 2.8.4. Metody stanovení objemových vlastností

Nejen ve farmacii je velká část látek ve formě prášků. Znalost tokových vlastností hraje důležitou roli pro jejich bezproblémové zpracování. Flowabilita je schopnost materiálu téct za konkrétních podmínek, nezávisí pouze na fyzikálních vlastnostech prášku, ale také na stresových podmínkách prováděného testu.<sup>13,15</sup> K měření tokových vlastností práškových materiálů se nejčastěji využívá měření sypaného úhlu, smykový test, Hausnerův poměr nebo Carrův index.<sup>13</sup>

Index toku ( $ff$ ) charakterizuje tokové vlastnosti materiálu při určitém stupni konsolidace. Je dán poměrem napětí, které působí během konsolidace –  $\sigma_1$ , a mezním stavem napjatosti vzorku –  $\sigma_c$ .

$$ff = \frac{\sigma_1}{\sigma_c} \quad (12)$$

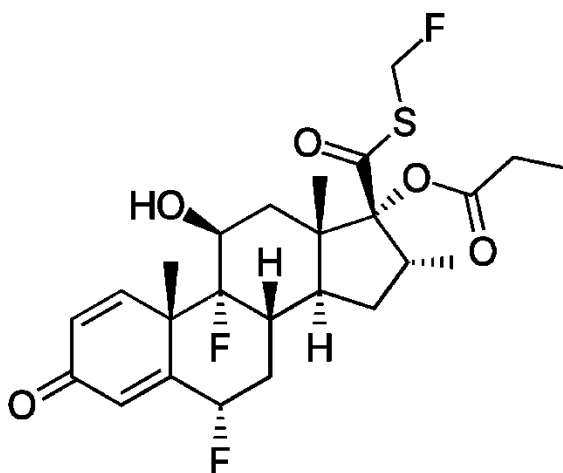
Porovnávat lze pouze hodnoty naměřené po konsolidaci stejným napětím, protože při vyšších konsolidacích se  $ff$  zvyšuje.<sup>13</sup> Čím je index toku vyšší, tím látka ochotněji teče. S rostoucí velikostí částic roste  $ff$ , snižuje se kohezivita prášku a zlepšuje se flowabilita.<sup>13</sup>

Flowabilitu ovlivňuje také obsah vlhkosti v materiálu. V některých případech flowabilita roste se zvyšujícím se obsahem vlhkosti díky vzniku aglomerátů. Pokles flowability je způsoben existencí silnějších kapalných mostů.<sup>71</sup>

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Chemikálie

U všech krystalizací byl jako výchozí materiál použit flutikason propionát (FP) [(6S, 8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R, 17R)-6, 9-difluoro-17-(fluoromethylsulfonyl)-11-hydroxy-10, 13, 16-trimethyl-3-oxo-6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, 16-oktahydrocyklopenta[a]fenanthren-17-yl] propionát (š: 34408-00515) s molekulovou hmotností 500,57 g·mol<sup>-1</sup>. Jako očkovací materiál byl použit mikronizovaný flutikason propionát (š: 43360-00415M). FP patří do skupiny syntetických glukokortikosteroidů. Používá se k léčbě astmatu nebo alergické rýmy.<sup>49</sup>



Obr. 11: chemická struktura FP.<sup>47</sup>

Aceton, n-heptan, oktan, nonan, isopropyl alkohol, ethyl acetát, dichlormethan, 1-methyl-2-pyrrolidon, vše o analytické čistotě, a SPAN<sup>®</sup>85 dodala Sigma Aldrich. Ve všech experimentech byla použita demineralizovaná voda z přístroje Mili-Q<sup>®</sup> firmy Merck. Zirkoniové kuličky Zirmil<sup>®</sup> Y byly zakoupeny od firmy ZirPro (Francie).

#### 3.2. Přístroje a metody

*Crystal16<sup>®</sup> (Technobis Crystallization Systems, Nizozemsko)*

Rozpustnost FP v acetonu byla měřena jako funkce teploty s využitím přístroje Crystal16<sup>®</sup>. Ten pojme 16 (4x4) HPLC vialů o objemu 1,5 ml, které mohou být míchány buď magneticky, nebo mechanicky. Ohřívání a chlazení každého ze čtyř nezávislých bloků je zajištěno kombinací Peltierova prvku a kryostatu. Všechny 16 pozic má senzor na měření turbidity.

Suspence FP v acetonu o různých koncentracích byly zahřívány během 2 hodin na teplotu 55 °C za stálého míchání magnetickým míchadlem (700 rpm). Se zvyšující se teplotou došlo k úplnému rozpuštění, což bylo indikováno 100% transmitancí. Teplota, při které bylo dosaženo 100% transmitance, byla označena jako saturační teplota.

*Laserová sonda FBRM – Lasentec S400 (Mettler Toledo, Švýcarsko)*

Laserová sonda pracuje na principu zpětného odrazu zaostřeného laseru od částic, *in situ* zaznamenává těživové délky (viz obr. 10b).<sup>62</sup> Během experimentů byly zaznamenávány distribuce těživových délek v rozmezí <10; 10–50; 50–150; 150–300 a 300–1 000 μm každých 10 sekund.

*Reaktor EasyMax™ 102 Standard Set (Mettler Toledo, Švýcarsko)*

Krystalizační experimenty byly realizovány ve skleněných 100 ml reaktorech EasyMax™ 102 s mechanickým mícháním, které pracují v teplotním rozmezí od -30 °C do 150 °C.

*Ultrazvuková sonda SONICS vibra cell VCX 750 (Sonics, USA)*

Ultrazvuková sonda SONICS vibra cell VCX 750 byla použita pro iniciaci nukleace u sonokrytalizačních vsádkových experimentů. Sonda pracuje při frekvenci 20 kHz, s amplitudou 10–100%. V experimentech byla nastavena amplituda 20, 40 nebo 60%, což odpovídá energii 15; 33 respektive 54 W. Sonikace, nastavená jako 2 s pulz a 8 s pauza, odpovídá době trvání 20%.<sup>50</sup> Experimenty s pulzem 5 s a pauzou 5 s jsou v tabulce 4 označeny 50% trváním, 80% doba trvání sonikace znamená nastavení 8 s pulz, 2 s pauza.

*Reaktor Atlas Potassium (Syrris, Velká Británie)*

Kontinuální sonokrytalizace byla provedena v reaktoru Atlas Potassium o objemu 500 ml. Sonikace byla zajištěna průtočnou ultrazvukovou celou Sonolab™ SL10 (Syrris, Velká Británie) o objemu 110 ml pracující při frekvenci 20 kHz. Intenzita ultrazvuku byla nastavena na 53 W. Čerpání suspenze mezi reaktorem a celou bylo zajištěno peristaltickým čerpadlem Watson-Marlow 530 Du (Watson Marlow, Velká Británie).

*Distribuce velikosti částic – Mastersizer 2000 (Malvern, Velká Británie)*

Distribuce velikosti částic (PSD) byla měřena na přístroji Mastersizer 2000. Distribuce velikosti částic byla stanovena metodou laserové difrakce na základě Fraunhoferova modelu. Do lékovek bylo naváženo 100±5 mg vzorku, přidáno 5 ml 0,1% SPAN® 85 v n-heptanu a



promícháno na Vortexu. Do měřicí cely byla přikapávána disperze tak, aby obskurace byla v rozmezí 10–15%. Uváděné výsledky jsou průměrem ze dvou nezávislých měření, které bylo provedeno podle platného SOP.

#### *Skenovací elektronový mikroskop*

Snímky krystalů byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu TM 3030 Plus (Hitachi, Německo), snímky z kontinuální sonokrystalizace byly pořízeny na mikroskopu SU 6600 (Hitachi, Německo). Vzorek umístěný na hliníkovém nosiči opatřený oboustrannou lepicí páskou byl před měřením pozlacen.

#### *Plynová chromatografie pro stanovení zbytkových rozpouštědel*

Obsah zbytkových rozpouštědel byl stanoven plynovou chromatografií na přístroji Agilent 7890B na kapilární koloně RES-SOLV (Agilent, USA) s plamenově-ionizačním detektorem. Stacionární fází byl 6% kyanopropyl a 94% methylpolysiloxan, mobilní fází bylo hélium. 50 mg vzorku bylo rozpuštěno v 0,5 ml 1-methyl-2-pyrrolidonu a nastříkováno na kolonu po dobu 2 min. Pro vyhodnocení analýzy byl použit software Empower 3 (Waters, USA).

#### *Práškový reometr FT4® (FreemanTechnology, Velká Británie)*

Flowabilita byla měřena na práškovém reometru FT4®. K měření byla použita 1 ml smyková cela a smyková hlava o průměru 24 mm, bylo aplikováno normálové napětí 9 kPa. Všechny experimenty byly provedeny za laboratorní teploty a relativní vlhkosti vzduchu ~40%.

#### *Specifická plocha povrchu a povrchová energie*

Specifická plocha povrchu byla měřena na přístroji 3Flex (Micromeritics, USA). Byla zaznamenávána izoterma adsorpce N<sub>2</sub> při teplotě kapalného dusíku (77 K). Celková plocha povrchu byla vypočtena z BET izotermy. Před každým měřením byly vzorky odplyňovány po dobu 240 min. při teplotě 40 °C.

Inverzní plynová chromatografie byla provedena na přístroji SMS iGC-SEA 2000 (Surface Measurement System, Velká Británie). 30 cm dlouhá kolona o vnitřním průměru 3 mm byla naplněna zkoumaným materiálem. Měření bylo provedeno při teplotě 30 °C s rychlostí průtoku 10 sccm, použitá rozpouštědla byla n-heptan, oktan, nonan, ethyl acetát a dichlormethan. Disperzní část povrchové energie byla určena metodou Dorris a Gray, acidobazické vlastnosti byly stanoveny pomocí stupnice Della Volpe.

### *Mikroskop atomárních sil*

Drsnost byla určena z AFM snímků. Krystal byl nanesen na oboustrannou lepící pásku a přebytek krystalů byl sfouknut proudem dusíku. Následně byl skenován povrch krystalů mikroskopem NTEGRA (NT-MDT, Rusko). Měření bylo prováděno v semi-kontaktním režimu. Byly použity hroty HA\_NC ETALON B s poloměrem 10 nm. Vypočítané parametry drsnosti byly získány ze 7 různých míst materiálu. Vyhodnocení bylo provedeno v programu Gwyddion, data s rozlišením 512 px byla vyrovnána odečtením střední roviny a řádky byly srovnány polynomem druhého řádu. Drsnost z jednotlivých míst byla stanovena z plochy  $4 \mu\text{m}^2$ .

Youngův modul byl měřen pomocí mikroskopu atomárních sil BioScope Catalyst (Bruker, USA). Při přípravě byl vzorek nanesen na mikroskopické podložní sklo s vrstvou laku a pro odstranění jeho přebytku byl použit proud dusíku. Tím bylo zajištěno pevné přichycení krystalů potřebné pro měření v kontaktním režimu. Z technických důvodů nebylo při kalibraci možné stanovit absolutní hodnoty pro konstantu pružnosti a poloměr hrotu, proto byla provedena pouze relativní kalibrace dle pokynů výrobce, která umožňuje vzájemné porovnávání měřených vzorků. Pro kalibraci AFM byly použity referenční povrchy s vhodnou tvrdostí v závislosti na typu hrotu, pro TAP525 křemíkový a pro TAP150 polystyrenový povrch. Jednotlivé vzorky byly porovnány na základě hodnot Youngova modulu při elastické deformaci 2 nm. Rychlost skenování byla 0,3 Hz.

### **3.3. Krystalizační experimenty**

#### *Experimenty s přidavkem antisolventu*

Do 100 ml skleněného, mechanicky míchaného reaktoru byl navážen FP (4 g) a přidán aceton (70 ml). Suspenze byla zahřáta na 50 °C během 30 min za stálého míchání. Po úplném rozpuštění a zchlazení roztoku na požadovanou teplotu byla přidána voda (28 ml) jako antisolvent. Vzniklá suspenze byla domíchána 3 hodiny při 5 °C, zfiltrována a sušena v teplovzdušné sušárně pod inertní atmosférou při 65 °C po dobu 5 hodin. Jednotlivé experimenty se od sebe lišily teplotou, při které byl antisolvent přidáván a rychlostí jeho přidavku. Poslední dva experimenty (š. AB180130 a AB180201) byly provedeny tzv. reverzním přidavkem, kdy je nasycený roztok FP přidáván k antisolventu.

### *Experimenty s očkováním*

Do 100 ml skleněného, mechanicky míchaného reaktoru byl navážen FP (4 g) a přidán aceton (70 ml). Suspenze byla zahřáta na 50 °C během 30 min za stálého míchání. Po úplném rozpuštění byl roztok ochlazen na teplotu 5 °C během 30 min. Nukleace byla indukována rychlým přidavkem očkovacího materiálu, který byl rozsuspendován v malém množství vychlazeného acetonu. Pro větší výtěžnost bylo dále k suspenzi přidáno 28 ml vody během 30 min. Vzniklá suspenze byla domíchána 3 hodiny při 5 °C, zfiltrována a sušena v teplovzdušné sušárně pod inertní atmosférou při 65 °C po dobu 5 hodin. Experimenty se lišily v množství očkovacího materiálu. U š. AB180212 bylo oko suspendováno ve 28 ml vody, a proto už nebyla přidávána další voda jako antisolvent.

### *Experimenty s využitím templátů*

Do 100 ml skleněného, mechanicky míchaného reaktoru byl navážen FP (4 g) a přidán aceton (70 ml). Suspenze byla zahřáta na 50 °C během 30 min za stálého míchání. Po úplném rozpuštění byl roztok ochlazen na teplotu 5 °C během 30 min. K nasycenému roztoku FP byly přidány zirkoniové kuličky. Intenzivním mícháním došlo ke krystalizaci do 10 minut od jejich přidání. Vzniklá suspenze byla oddělena od zirkoniových templátů po cca dalších 10 minutách. Do suspenze byla přidána voda (28 ml) během 30 min. a po 3 hod míchání byla suspenze zfiltrována a sušena v teplovzdušné sušárně pod inertní atmosférou při 65 °C po dobu 5 hodin. Experimenty se lišily v objemu přidávaných templátů (25 nebo 50 ml) a jejich průměru (2; 1 nebo 0,5 mm).

### *Vsádková sonokrystalizace*

Do 100 ml skleněného, mechanicky míchaného reaktoru byl navážen FP (4 g) a přidán aceton (70 ml). Suspenze byla zahřáta na 50 °C během 30 min za stálého míchání. Po úplném rozpuštění byl roztok ochlazen na teplotu 5 °C během 30 min. Nasycený roztok FP chlazený ledem byl pulzně sonikován 30 min a současně bylo přidáváno 28 ml vody. Vzniklá suspenze byla míchána 3 hodiny při 5 °C, zfiltrována a sušena v teplovzdušné sušárně pod inertní atmosférou při 65 °C po dobu 5 hodin. Jednotlivé experimenty se od sebe lišily amplitudou ultrazvuku (20, 40 nebo 60%) a délkou trvání (20, 50 nebo 80%).<sup>50</sup>

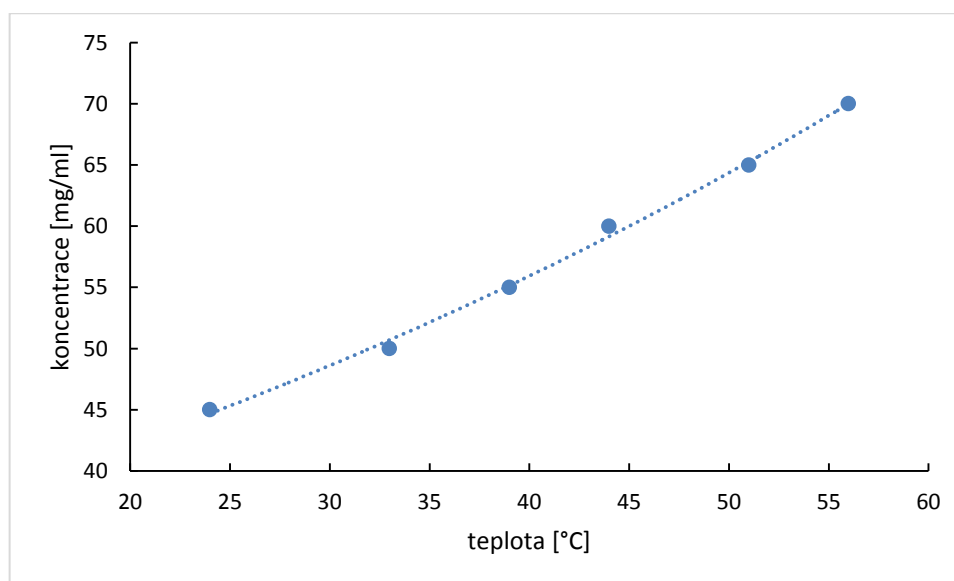
### *Kontinuální sonokrytalizace*

Do 500 ml skleněného reaktoru byla připravena suspenze FP (20 g) v acetonu (360 ml). Suspenze byla zahřáta na 50 °C během 30 min za stálého míchání. Po úplném rozpuštění byl roztok ochlazen na teplotu 15 °C během 30 min. Roztok byl sonikován v průtočné ultrazvukové cele Sonolab™ a zároveň byl do reaktoru přidáván antisolvent (140 ml vody) během prvních 30 min sonikace. Po ukončení sonikace byla suspenze 3 hod domíchána v reaktoru EasyMax™, zfiltrována a sušena v teplovzdušné sušárně pod inertní atmosférou při teplotě 65 °C po dobu 5 hodin. Experimenty se lišily v délce trvání ultrazvukového vlnění, které bylo aplikováno 30; 60 nebo 120 min.

## **4. Výsledky a diskuze**

### 4.1. Křivka rozpustnosti

Byla stanovena křivka rozpustnosti FP v acetonu jako funkce teploty. Závislost je na obr. 12 a ukazuje pozitivní gradient rozpustnosti, s rostoucí teplotou se zvyšuje rozpustnost. Díky teplotně závislé rozpouštěcí křivce by mohl být FP krystalizován ochlazením roztoku.<sup>23</sup>



Obr. 12: křivka rozpustnosti FP v acetonu.

## 4.2. Krystalizace s přidavkem antisolventu

V této sérii experimentů byla jako antisolvent zvolena voda, protože FP je extrémně hydrofobní látka. Přidavek vody proto způsobí vznik vysokého stupně přesycení.<sup>49</sup> Antisolvent byl přidáván při dvou různých teplotách, při teplotě 50 °C nebo 5 °C, doba přikapávání se pohybovala v rozmezí od 1 min do 2 hodin (viz tabulka 1).

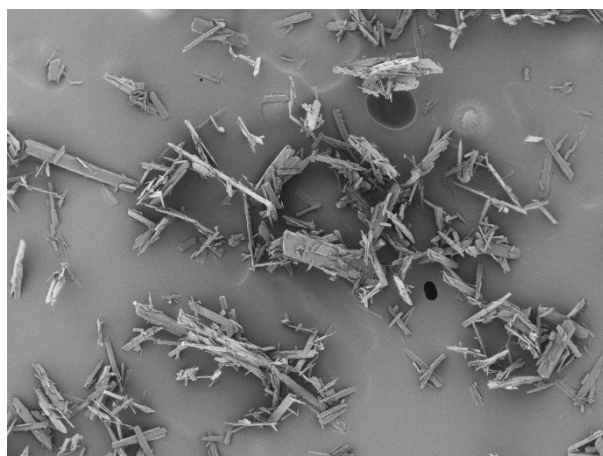
Tabulka 1: charakterizace materiálů připravených krystalizací s antisolventem (parametr D(10), D(50) a D(90) znamená, že 10%, 50% a 90% částic je menších než daná hodnota).

šarže	přidavek antisolventu		PSD [ $\mu\text{m}$ ]			FBRM [ $\mu\text{m}$ ]	zbytková rozp.	ff
	T [°C]	t [min]	D(10)	D(50)	D(90)	D(90)	aceton [ppm]	
AB180831	5	1	9	39	124	183	6999	5,5
AB180125	5	10	7	34	131	-	6533	3,5
AB180828	5	120	17	92	348	233	4240	4,1
AB180124	50	2	16	76	350	304	1538	3,6
AB180130	50	10	4	14	36	-	1322	2,6
AB180201	5	10	2	7	19	-	2525	1,9

Experimenty, kdy byl antisolvent přidán při teplotě 5 °C se lišily jak finální distribucí velikosti částic, tak obsahem zbytkových rozpouštědel. Nejmenší distribuci velikosti částic měl experiment, kdy byl antisolvent přidáván po dobu 1 min. U tohoto experimentu byl také největší obsah zbytkových rozpouštědel. Dle záznamu ze SEM je zřejmé, že krystalický materiál je tvořen jednotlivými krystaly a jejich aglomeráty (viz obr. 13a), jedná se tedy o typický materiál vykrystalovaný při velkém přesycení (díky krátké době přidavku antisolventu). Materiál získaný pomalejším přidavkem antisolventu (10 min) se výrazně nelišil od předešlého. Krystalický FP připravený přidáváním antisolventu po dobu 120 min je odlišný v parametru D(90), který byl v tomto případě 348  $\mu\text{m}$ . Je zřejmé, že tento materiál byl vykrystalován při nižším přesycení než u předešlých dvou experimentů. Krystaly měly větší možnost růstu, krok nukleace byl potlačen. I tento materiál je tvořen jednotlivými krystalitami a jejich aglomeráty (viz obr. 13b). Obsah zbytkových rozpouštědel je nižší, stále však na nevyhovující úrovni.

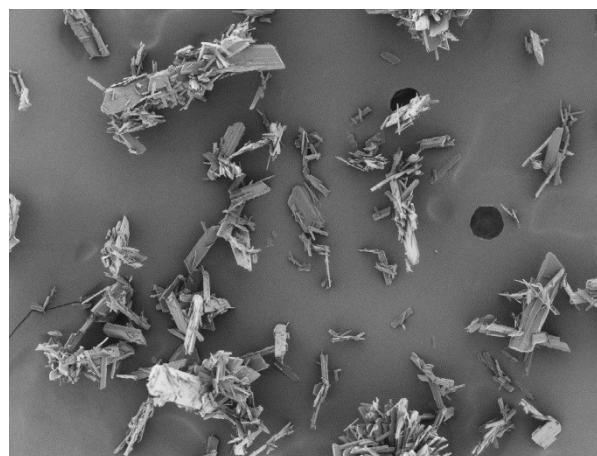
Materiál s nejmenší distribucí velikosti částic byl připraven reverzním postupem, kdy acetonový roztok FP byl přidán do antisolventu. Přidavek proběhl při dvou různých teplotách během 10 min. Krystalický FP připravený při teplotě 50 °C je tvořen jednotlivými krystalitami, aglomerace je potlačena (viz obr. 13c,d) a materiál vyhovuje i obsahem zbytkových rozpouštědel. Materiál vykrystalovaný při teplotě 5 °C má nejmenší distribuci velikosti částic.

Jednotlivé krystality však tvoří aglomeráty (viz obr. 13e,f) a obsah zbytkových rozpouštědel je nadlimitní.



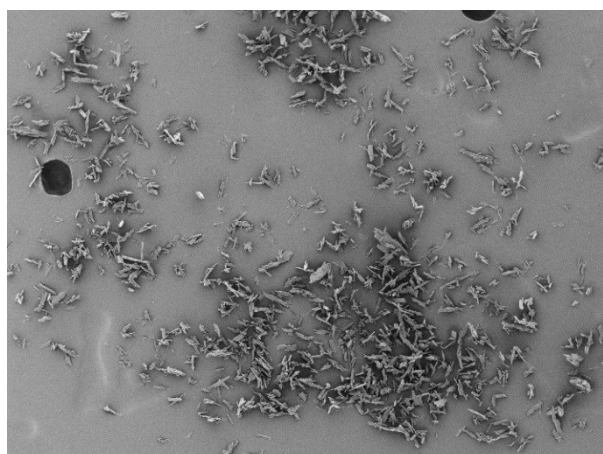
FP0006  
AB180831-01

a)



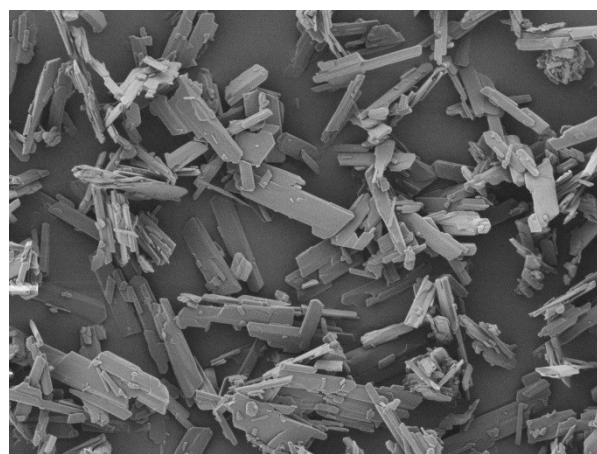
FP0001  
AB180828-01

b)



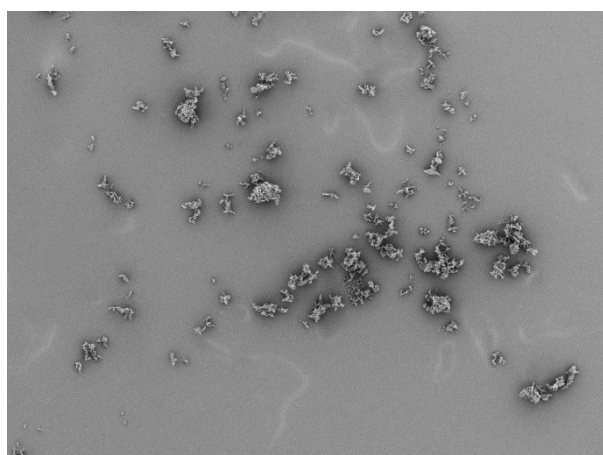
FP0001  
FP\_AB180130-01

c)



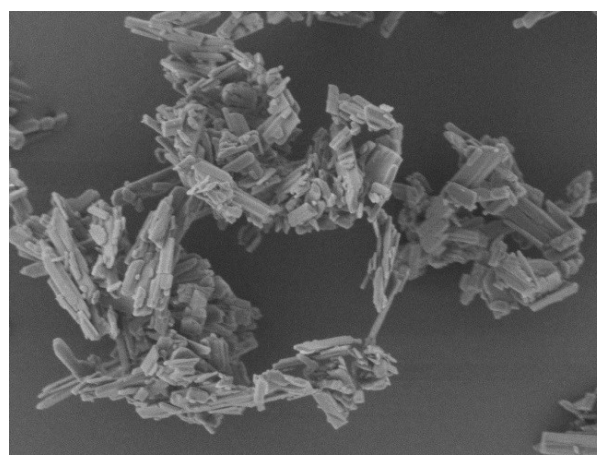
FP0008  
FP\_AB180130-01

d)



PF0001  
FP\_AB180201-01

e)



PF0013  
FP\_AB180201-01

f)

Obr. 13: SEM snímky fluticason propionátu připraveného krystalizací s přidávkem antisolventu: a) – š: AB180831, b) – š: AB180828, c), d) – š: AB180130, e), f) – š: AB180201.

### 4.3. Očkovaná krystalizace

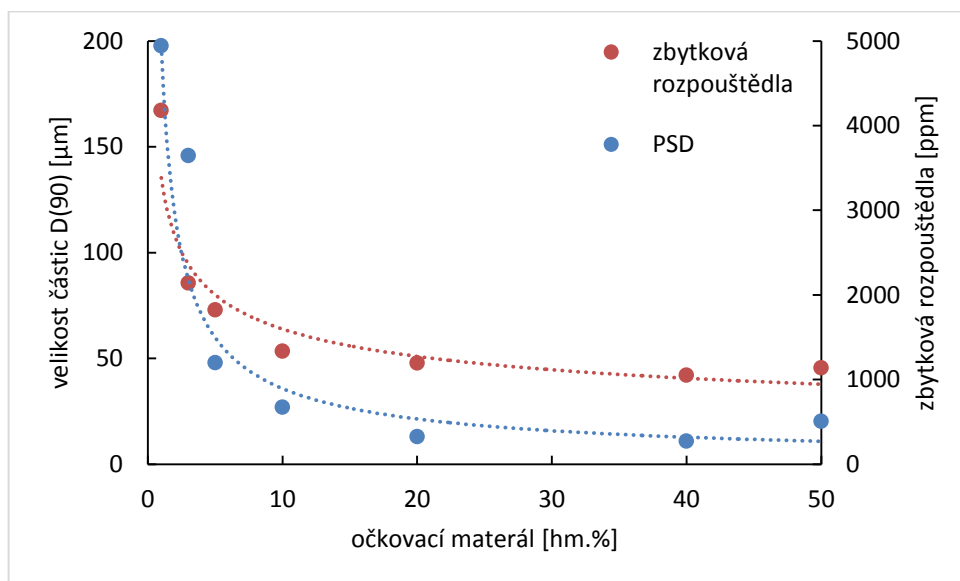
Očkovaná krystalizace je speciálním typem sekundární krystalizace, kdy jsou do roztoku záměrně přidány krystaly dané látky. V této práci byl jako očkovací materiál použit mikronizovaný FP (š: 43360-00415M)<sup>12</sup> s parametrem D(90) 3  $\mu\text{m}$ . Očkovací materiál bývá do roztoku přidáván často ve formě husté suspenze v antisolventu nebo v procesním rozpouštědle.<sup>10</sup> U experimentu š: AB180212 byly 3 hm.% očkovacího materiálu rozsuspendovány ve 28 ml antisolventu. Vzhledem k hydrofobním vlastnostem FP bylo velmi obtížné očkovací materiál rozsuspendovat ve vodě. Proto byl připraven krystalický materiál s parametrem D(90) 18  $\mu\text{m}$ , který byl tvořen převážně agregáty (viz obr. 15a). Obsah zbytkových rozpouštědel byl nadlimitní. Volba solventu pro aktivaci očkovacího materiálu ovlivňuje především velikost finálního produktu. Pokud bylo stejné množství očkovacího materiálu suspendováno v acetonu (š. AB180312), byl parametr D(90) více jak 8krát větší než v případě, kdy byl očkovací materiál rozsuspendován ve vodě (146  $\mu\text{m}$  vs. 18  $\mu\text{m}$ ), toto bylo potvrzeno také SEM snímky (viz obr. 15).

*Tabulka 2: charakterizace materiálů připravených očkovanou krystalizací (parametr D(10), D(50) a D(90) znamená, že 10%, 50% a 90% částic je menších než daná hodnota).*

šarže	očkovací materiál [hm.%]	PSD [ $\mu\text{m}$ ]			FBRM [ $\mu\text{m}$ ]	zbytková rozp. aceton [ppm]	ff
		D(10)	D(50)	D(90)	D(90)		
AB180212	3	2	7	18	-	2075	2,2
AB180416	1	11	77	198	219	4181	2,6
AB180312	3	9	80	146	-	2142	2,6
AB180423	5	4	16	48	112	1823	1,9
AB180319	10	3	11	27	101	1336	1,8
AB180326	20	1	5	13	67	1195	1,9
AB180409	40	1	4	11	55	1051	1,8
AB180820	50	2	8	20	105	1138	2,0

Vzhledem k hydrofobním vlastnostem FP byl očkovací materiál v dalších experimentech rozsuspendován v malém množství vychlazeného acetonu. Jednotlivé experimenty se lišily v přidaném množství očkovacího materiálu, které bylo v rozmezí 1–50 hm.% (viz tab. 2). Se zvyšujícím se množstvím očkovacího materiálu, které bylo do nasyceného roztoku FP přidáno, se zmenšovala distribuce velikosti částic ze 198  $\mu\text{m}$  v případě přidání 1 hm.%, až na 11  $\mu\text{m}$  u experimentu s 40 hm.% očkovacího materiálu (viz obr. 14). Tyto výsledky byly rovněž potvrzeny SEM snímky (obr. 15). Obdobná závislost byla

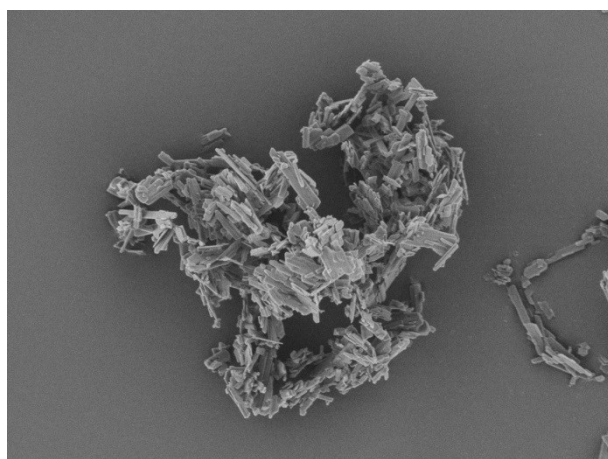
zjištěna i u obsahu zbytkových rozpouštědel (obr. 14). Experimenty očkované 10 hm.% a výše splňovaly limity obsahu zbytkových rozpouštědel (1500 ppm).



Obr. 14: graf závislosti velikosti částic (modře) a obsahu zbytkových rozpouštědel (červeně) na množství očkovacího materiálu.

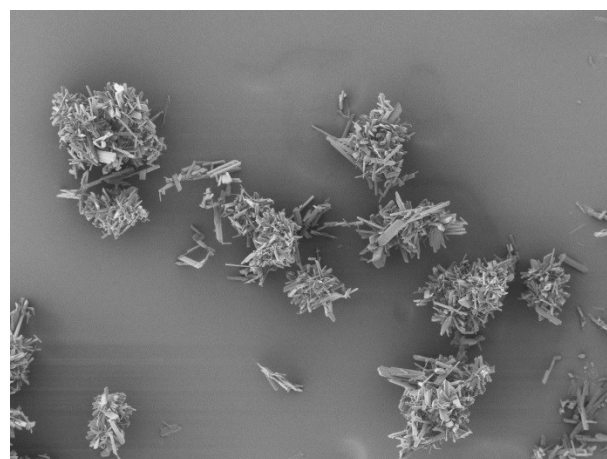
Největší distribuci velikosti částic měl materiál připravený přidáním 1 hm.% očkovacího materiálu (198 μm), který byl tvořen destičkovitými krystality, které aglomerovaly (obr. 15c). V tomto případě dochází k lokálnímu přesycení v místech okolo očkovacích center a vznikají nová nuklea, což vede k finálnímu produktu s širokou distribucí velikosti částic. K výraznějšímu snížení PSD dochází u experimentů, které jsou očkovány od 5 hm.% očkovacího materiálu výše. V těchto případech je do systému vneseno dostatečně velké množství krystalů dané látky, které potlačuje nukleační krok a uplatňuje se hlavně růst. Nejmenší distribuce velikosti částic bylo dosaženo přidáním 40 hm.% očkovacího materiálu. V takovém případě je v suspenzi přítomno velké množství nové fáze<sup>11</sup> disponující velkou plochou povrchu. Přesycení se spotřebovává na růst, generování nových nukleí je minimalizováno a výsledný systém nevykazuje bimodální distribuci velikosti částic (obr. 15e).<sup>3</sup>





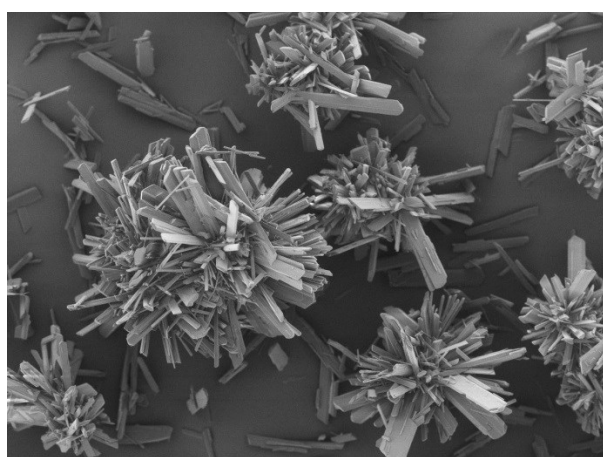
PF0003 2018/04/09 10:20 mL U x1.0k 100  $\mu$ m  
FP\_AB180212-01

a)



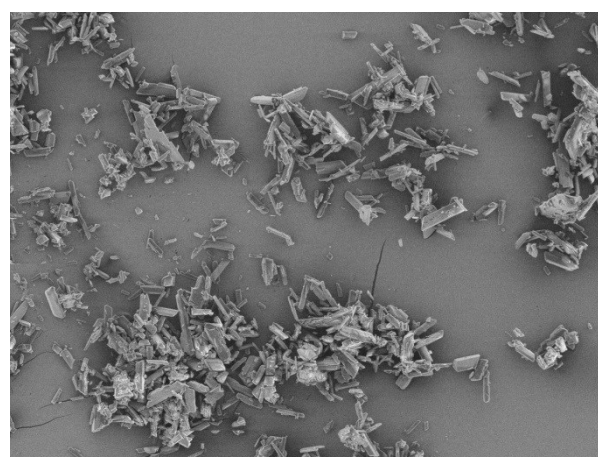
PF0007 2018/04/09 10:47 L U x200 500  $\mu$ m  
FP\_AB180312-01

b)



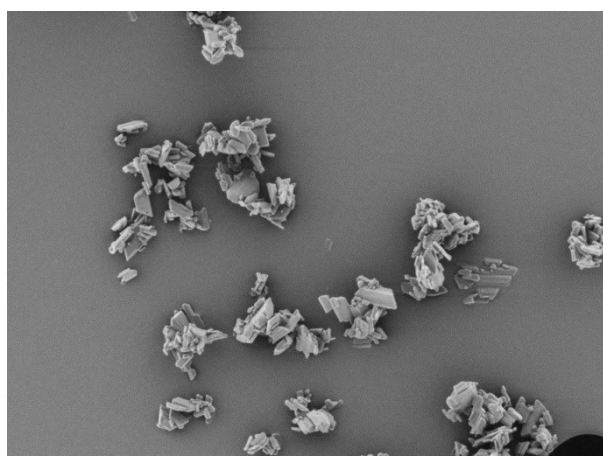
FP0003 2018/04/23 11:10 L U x200 500  $\mu$ m  
FP\_AB180416-01

c)



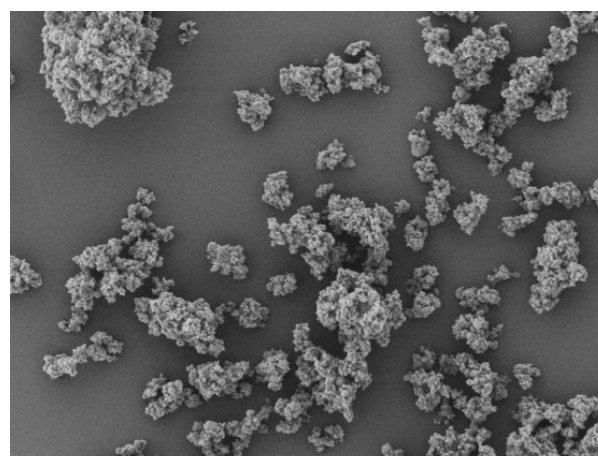
FP0003 2018/06/08 07:37 mMUD4.4 x500 200  $\mu$ m  
FP AB180423-01

d)



FP0009 2018/04/23 10:48 L U x1.0k 100  $\mu$ m  
FP\_AB180409-01

e)



FP0011 2018/02/12 11:21 mL U x1.0k 100  $\mu$ m  
FP\_43360-00415M

f)

*Obr. 15: SEM snímky fluticasone propionátu připraveného očkovanou krystalizací: a) – š: AB180212, b) – š: AB180312, c) – š: AB180416, d) – š: AB180423, e) – š: AB180409, f) – očkovací materiál (š: 43360-00415M).*

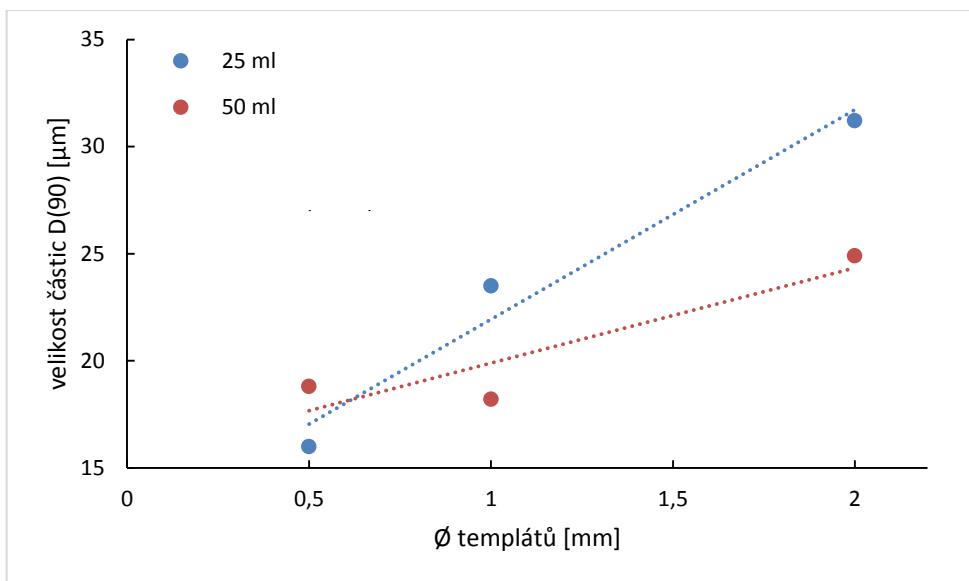
#### 4.4. Krystalizace s využitím templátů

V další sérii experimentů byly použity k iniciaci nukleace zirkoniové kuličky Zirmil® Y o třech různých poloměrech (0,5; 1 a 2 mm) a objemech 25 nebo 50 ml (viz tab. 3). Primárně jsou kuličky určeny k mletí. Je možné je ale také využít k iniciaci nukleace, která v tomto případě proběhla po několika minutách míchání od přidání templátů. Přítomnost cizích povrchů urychluje proces nukleace, který je často nejdelším krokem celé krystalizace.<sup>42</sup> Čím byl průměr kuliček menší a použitý objem větší, tím byla v systému větší plocha, na které mohla proběhnout heterogenní nukleace. Následný přídavek antisolventu způsobil hlavně růst již přítomných nukleí.<sup>23</sup>

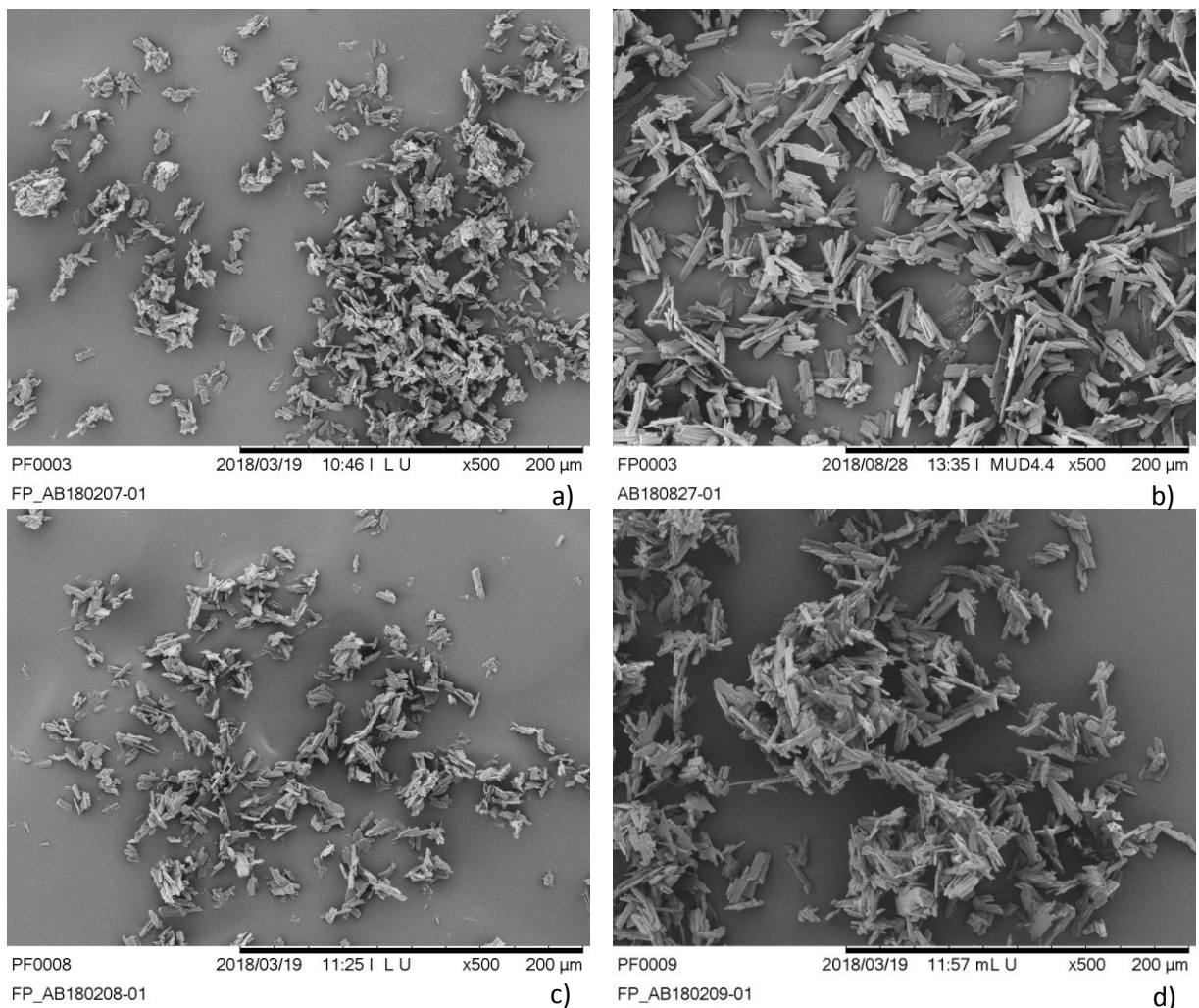
Tabulka 3: charakterizace materiálů připravených krystalizací s templáty (parametr D(10), D(50) a D(90) znamená, že 10%, 50% a 90% částic je menších než daná hodnota).

šarže	templáty			PSD [ $\mu\text{m}$ ]			FBRM [ $\mu\text{m}$ ]	zbyt. rozp.	ff
	V [ml]	$\varnothing$ [mm]	plocha [ $\text{dm}^2$ ]	D(10)	D(50)	D(90)	D(90)	aceton [ppm]	
AB180207	25	0,5	15	3	7	16	-	1374	1,9
AB180903		1	7,5	3	10	23	79	1580	2,4
AB180827		2	3,75	4	13	31	89	1340	2,9
AB180208	50	0,5	30	3	8	19	-	1524	2,2
AB180910		1	15	3	8	18	69	1608	2,0
AB180209		2	7,5	4	10	25	-	1468	2,7

Distribuce velikosti částic roste se zvětšujícím se průměrem použitých templátů při jejich konstantním objemu (viz obr. 16). Nejmenší distribuci velikosti částic, parametr D(90) byl 16  $\mu\text{m}$ , měl materiál připravený přidáním 25 ml zirkoniových kuliček o průměru 0,5 mm. Největší distribuce velikosti částic s parametrem D(90) 31  $\mu\text{m}$  bylo dosaženo krystalizací, kdy do roztoku bylo přidáno 25 ml templátů o průměru 2 mm. Ze SEM snímků je patrné, že ve všech případech byl připraven materiál tvořený jednotlivými krystalitami, které částečně agregovaly (obr. 17). Použité množství ani rozměr templátů neměl výrazný vliv na obsah zbytkových rozpouštědel, který se ve všech experimentech pohyboval kolem limitní hodnoty (1500 ppm).



Obr. 16: graf závislosti velikosti částic na průměru použitých templátů pro objemy 25 ml (modře) a 50 ml (červeně).



Obr. 17: SEM snímky fluticasonu propionátu připraveného krystalizací s použitím templátů: a) – š: AB180207, b) – š: AB180827, c) – š: AB180208, d) – š: AB180209.

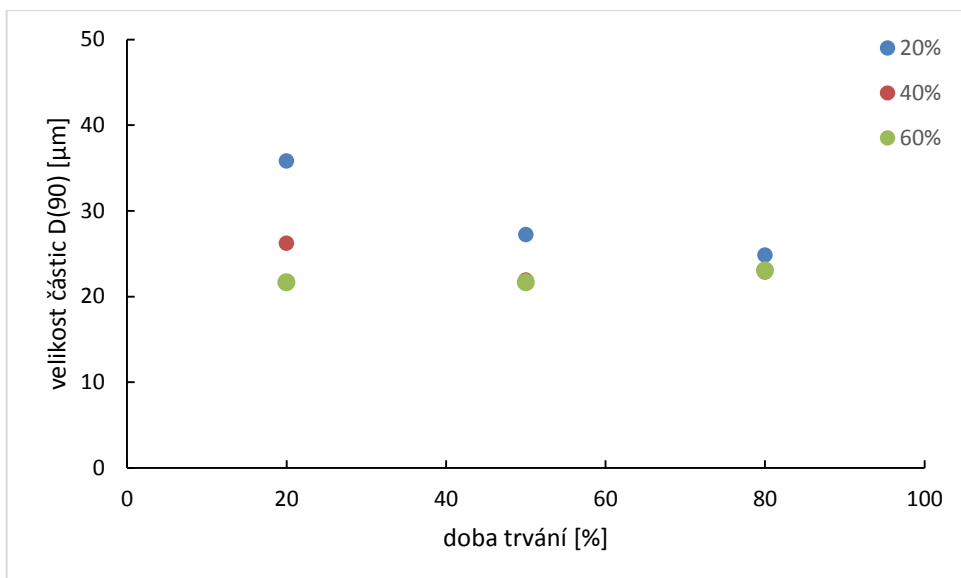
## 4.5. Sonokrytalizace

V poslední skupině experimentů byla nukleace indukována ultrazvukovým vlněním, které bylo aplikováno buď v pulzech (vsádková sonokrytalizace), nebo kontinuálně v průtočné ultrazvukové cele. Díky ultrazvuku vznikalo v krystalizačním roztoku daleko více nukleí ve srovnání s předchozími experimenty.<sup>52</sup> Během procesu dochází také k sekundární nukleaci díky mechanickému rozrušování již vzniklých krystalů nebo rozbíjení slabě vázaných aglomerátů.<sup>51</sup> U vsádkové sonokrytalizace se experimenty lišily amplitudou vlnění, která byla v rozmezí 20–40%, a délkou pulzu respektive pauzy. Nastavení 2 s pulz a 8 s pauza je v tab. 4 označeno jako 20% doba trvání sonikace, experimenty s 5 s pulzem a 5 s pauzou jsou označeny jako 50% doba trvání ultrazvuku a v případech označených jako 80% délka sonikace byl pulz 8 s a pauza 2 s.

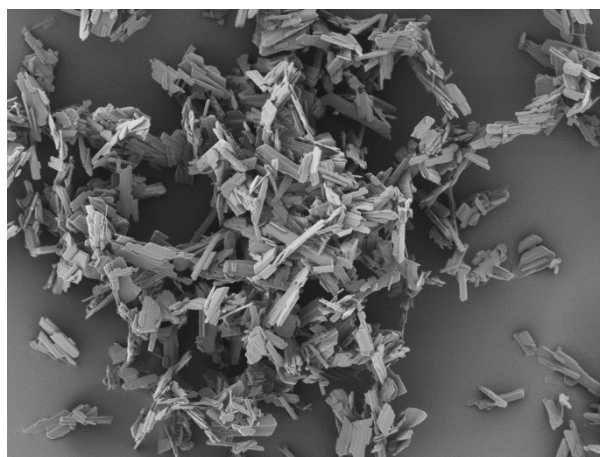
Tabulka 4: charakterizace materiálů připravených vsádkovou sonokrytalizací (parametr D(10), D(50) a D(90) znamená, že 10%, 50% a 90% částic je menších než daná hodnota).

šarže	vsádková sonokrytalizace		PSD [ $\mu\text{m}$ ]			FBRM [ $\mu\text{m}$ ]	zbyt. rozp.	ff
	amplituda [%]	doba trvání [%]	D(10)	D(50)	D(90)	D(90)	aceton [ppm]	
AB181116	20	20	4	15	36	98	2560	2,5
AB181123		50	4	12	27	73	2172	2,2
AB181130		80	4	12	25	65	2310	2,0
AB181105	40	20	4	12	26	72	1969	2,0
AB181109		50	3	11	22	93	1766	2,2
AB181108		80	4	12	23	65	914	2,2
AB181207	60	20	4	10	22	62	1759	1,8
AB190111		50	4	11	22	59	993	2,0
AB190114		80	4	12	23	59	841	2,0

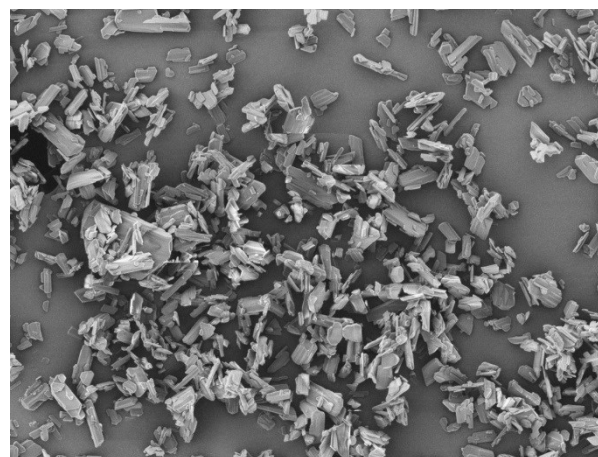
Jak je vidět z obr. 18, amplituda ani doba trvání ultrazvuku neměly vliv na distribuci velikosti částic finálního produktu.<sup>41</sup> Parametr D(90) se pohyboval v rozmezí 22–36  $\mu\text{m}$ . Krystalický materiál je tvořen převážně jednotlivými krystalitami (viz obr. 19), ultrazvuk částečně zabránil tvorbě aglomerátů. Doba trvání ultrazvukového vlnění nemá tak výrazný vliv na přítomnost zbytkových rozpouštědel, jako volba amplitudy. Se zvyšující se amplitudou ultrazvuku klesal obsah zbytkových rozpouštědel až na 841 ppm v případě 60% amplitudy s 80% dobou trvání.



Obr. 18: graf závislosti velikosti částic na době trvání ultrazvuku pro různé amplitudy vlnění: 20% (modře), 40% (červeně) a 60% (zeleně).



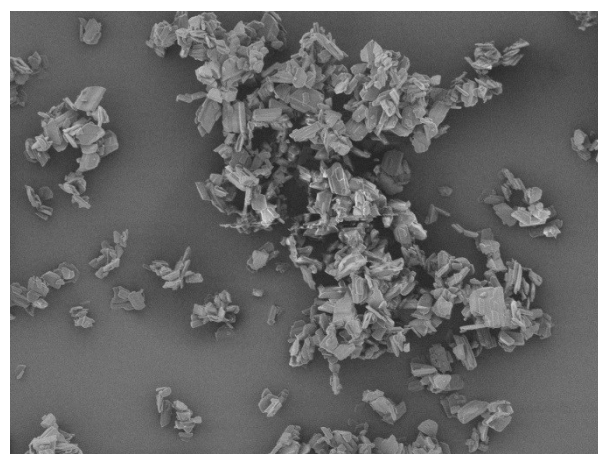
FP0007 2018/11/30 11:28 | MUD4.1 x500 200 µm  
FP\_AB181116-01\_Au a)



FP0002 2019/01/10 14:41 | MUD4.6 x500 200 µm  
FP\_AB181130-01 b)



FP0003 2019/01/10 09:38 | MUD4.3 x500 200 µm  
FP\_AB181207-01\_Au c)



FP0003 2019/01/18 11:07 h | MUD4.1 x500 200 µm  
FP\_AB190111-01\_Au d)

Obr. 19: SEM snímky fluticason propionátu krystalizovaného pulzní sonokystalizací: a) – š: AB181116, b) – š: AB181130, c) – š: AB181207, d) – š: AB190111.

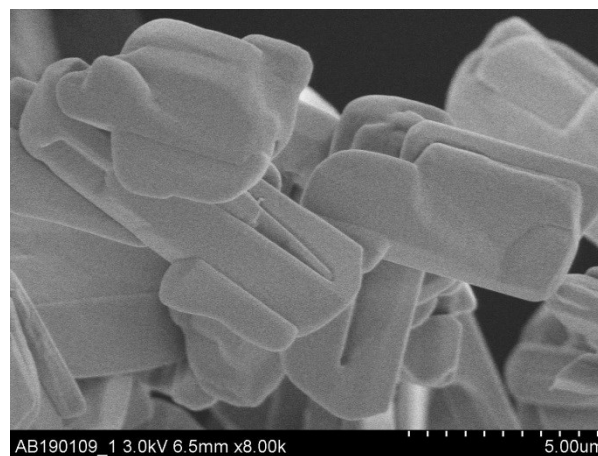
U experimentů provedených v průtočné cele byl ultrazvuk aplikován kontinuálně, měnila se pouze doba působení ultrazvuku (viz tab. 5). Délka sonokrytalizace neměla vliv na distribuci velikosti částic. Finální produkty tvoří jednotlivé krystality, aglomerace je potlačena (viz obr. 20). Materiál s nejmenším PSD byl připraven 60 min sonokrytalizací. Ukázalo se, podobně jako u vsádkové sonokrytalizace, že s prodlužující se dobou sonikace klesá obsah zbytkových rozpouštědel ve studovaném materiálu. Ultrazvuk způsobuje obušování krystalů,<sup>55</sup> rozbíjí případné agregáty<sup>53,54</sup> a tím se snižuje možnost zachycení solventu např. v pórech.

Tabulka 5: charakterizace materiálů připravených kontinuální sonokrytalizací (parametr  $D(10)$ ,  $D(50)$  a  $D(90)$  znamená, že 10%, 50% a 90% částic je menších než daná hodnota).

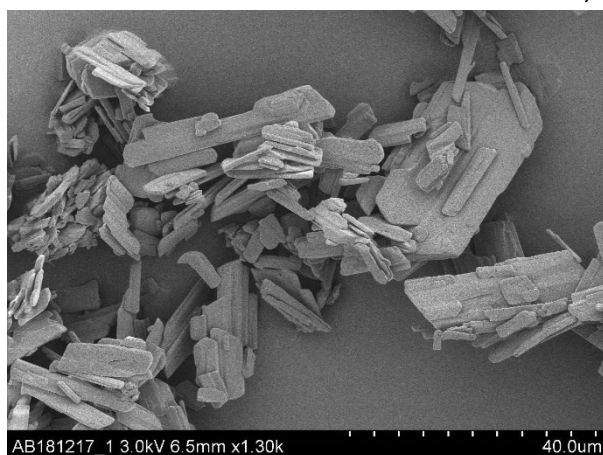
šarže	sonikace	PSD [ $\mu\text{m}$ ]			FBRM [ $\mu\text{m}$ ]	zbytková rozp.	ff
	t [min]	D(10)	D(50)	D(90)	D(90)	acetón [ppm]	
AB181217	30	3	9	20	93	2120	2,0
AB190109	60	3	8	17	63	1323	1,6
AB190122	120	5	17	32	75	1283	2,1



a)



b)



c)



d)

Obr. 20: SEM snímky fluticason propionátu připraveného kontinuální sonokrytalizací: a, b – š: AB190109, c – š: AB181217, d – š: AB190122.

#### 4.6. Povrchové vlastnosti

U vybraných zástupců byly dále studovány jejich povrchové vlastnosti, jako je specifická plocha povrchu (SSA), povrchová energie (SEA) a drsnost. Získané výsledky jsou shrnuty v tabulce 6.

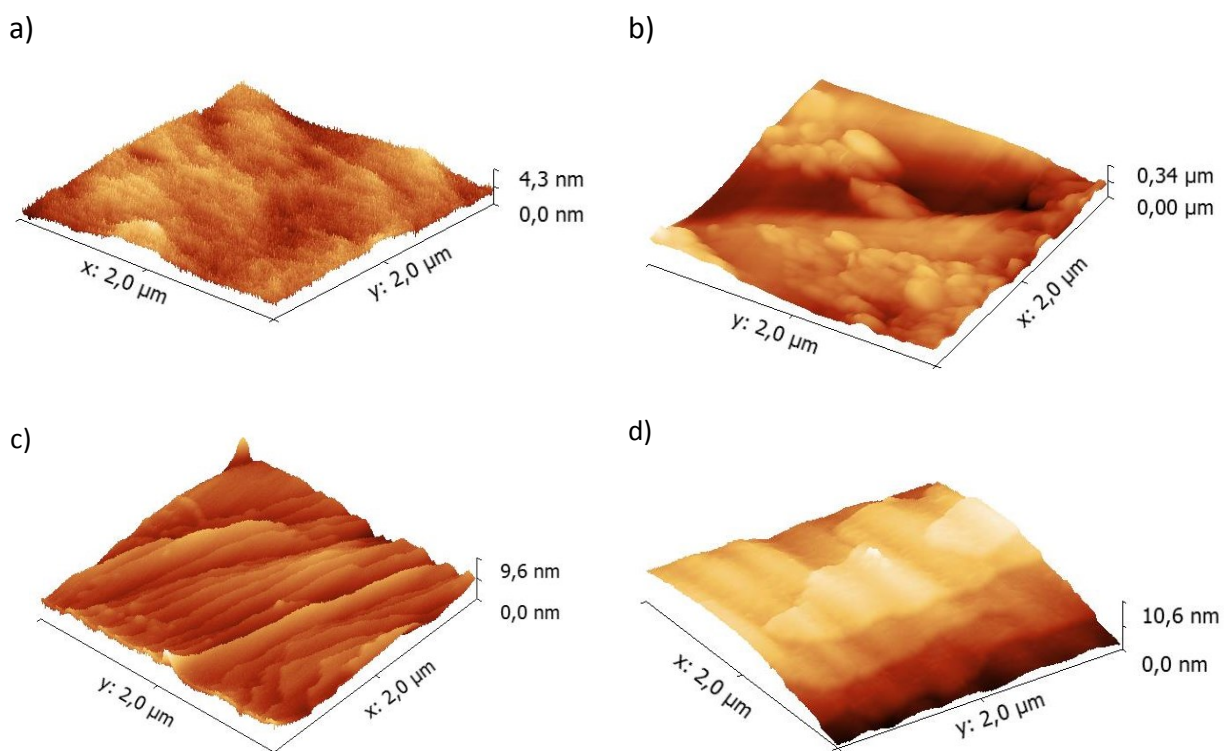
*Tabulka 6: charakterizace materiálů připravených různými krystalizačními postupy (parametr D(90) znamená, že 90% částic je menších než daná hodnota,  $\gamma_t$  představuje celkovou povrchovou energii a YM je Youngův modul).*

šarže	poznámky	PSD	SSA	SEA [mJ/m <sup>2</sup> ]			drsnost [nm]	YM [GPa]
		D(90) [μm]	[m <sup>2</sup> /g]	$\gamma_t$ max	$\gamma_t$ min	$\gamma_t$ rozsah	medián	průměr±SD
43360_00415M	Očkovací materiál	3	5,9	64,2	44,2	20,0	-	-
AB180124	Antisolvent (50 °C, 2 min)	350	0,8	52,6	48,7	3,9	1,8	1,5±0,4
AB180130	Antisolvent (50 °C, 10 min)	36	2,5	61,3	50,2	11,1	3,1	-
AB180212	Očkování (3 hm.%, voda)	18	8,5	48,1	43,8	4,3	41,0	-
AB180416	Očkování (1 hm.%, aceton)	198	1,9	57,0	52,9	4,1	6,6	25,9±10
AB180409	Očkování (40 hm.%, aceton)	11	7,3	47,9	45,1	2,8	32,0	-
AB180207	Templáty (V=25 ml, Ø=0,5 mm)	16	13,3	55,3	49,2	6,1	40,0	12,5±4
AB180827	Templáty (V=25 ml, Ø=2 mm)	31	11,6	53,1	46,7	6,4	44,1	-
AB181116	Vsádková sonokrystal.	36	1,7	62,8	43,1	19,7	1,0	20,0±6
AB190122	Kontinuální sonokrystal.	32	1,3	56,4	45,3	11,1	1,5	22,3±7

Specifická plocha povrchu byla v rozmezí 0,8–13,3 m<sup>2</sup>/g. Nejmenší specifickou plochu povrchu (0,8 m<sup>2</sup>/g) měl materiál š: AB180124, který byl připraven krystalizací s rychlým přidavkem antisolventu při teplotě 50 °C, tento materiál měl nejvyšší hodnotu parametru D(90) a to 350 μm, což je také v souladu s literaturou.<sup>3</sup> Se zmenšující se distribucí velikosti částic rostla specifická plocha povrchu. Výjimku představovaly experimenty, u kterých bylo během krystalizace aplikováno ultrazvukové vlnění (š: AB181116 a AB190122). I když byl parametr D(90) jen 36 μm v případě vsádkové sonokrystalizace, respektive 32 μm u kontinuální sonokrystalizace, specifická plocha povrchu byla pouze 1,7 m<sup>2</sup>/g, respektive 1,3 m<sup>2</sup>/g. Nižší hodnoty specifické plochy povrchu v porovnání s ostatními experimenty, kdy byl parametr D(90) srovnatelný, jsou dány vlivem ultrazvuku, který během sonikace obrušuje povrch jednotlivých krystalů.<sup>50</sup> Tyto výsledky byly potvrzeny také měřením drsnosti, která

byla nejnižší ze studovaných materiálů. Nejvyšší specifická plocha povrchu byla naměřena u materiálů, které byly připraveny krystalizací s templáty (š: AB180207 a AB180827), a to 13,3 m<sup>2</sup>/g u experimentu, kde byly použity templáty s průměrem 0,5 mm o objemu 25 ml, parametr D(90) byl 16 μm, při použití 25 ml dvou milimetrových templátů byla specifická plocha povrchu 11,6 m<sup>2</sup>/g a parametr D(90) byl 31 μm. Tyto výsledky byly také potvrzeny měřením drsnosti, která byla 40 nm respektive 44,1 nm.

Drsnost povrchu krystalů byla měřena na mikroskopu atomárních sil a pohybovala se v rozmezí 1–44,1 nm. Jak už bylo uvedeno výše, nejnižší drsnost měly krystaly, během jejichž přípravy byl použit ultrazvuk. Nejvyšší drsnost měly materiály připravené krystalizací s templáty. U materiálů připravených krystalizací s přidavkem antisolventu je vidět terasovitá struktura povrchu s drsností 1,8 nm pro š: AB180124 a 3,1 nm pro š: AB180130 (viz obr. 21).

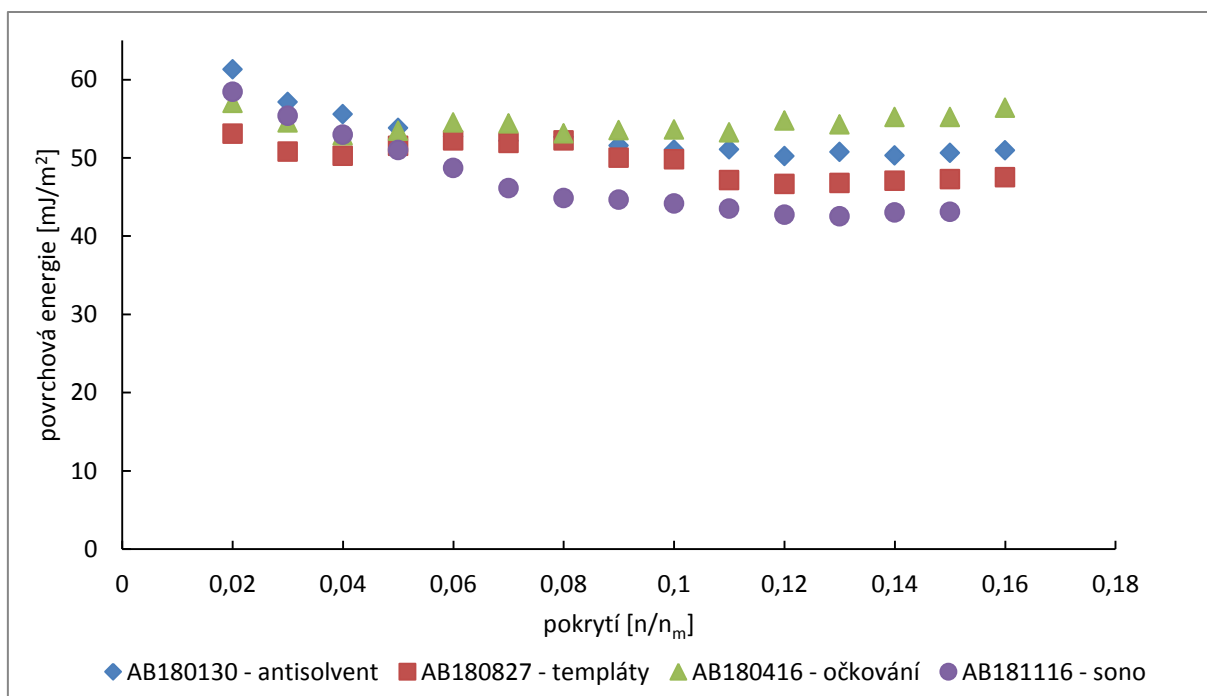


Obr. 21: AFM snímky povrchu krystalů fluticasone propionátu: a) – š: AB181116, b) – š: AB180827, c) – š: AB180124, d) – š: AB180130.

U vybraných zástupců byla dále měřena povrchová energie (SEA). Celková povrchová energie zkoumaného materiálu je dána součtem příspěvků disperzní (nepolární) části a acidobazické (polární) části. U všech měřených vzorků představoval příspěvek acidobazické složky pouze 7–12 % z celkové hodnoty povrchové energie. To může být způsobeno vysoce nepolárním povrchem krystalů. Největší acidobazický příspěvek k celkové povrchové energii



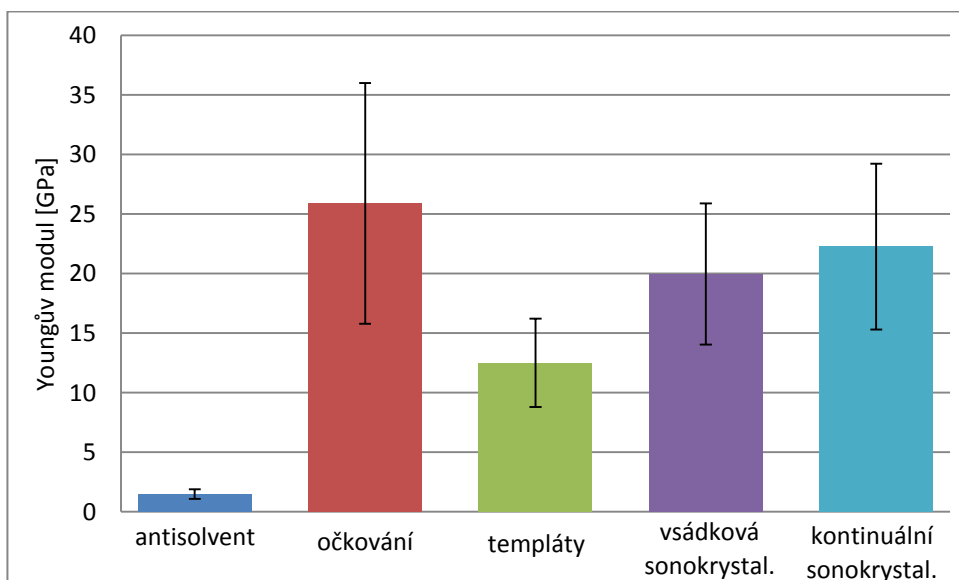
měl mikronizovaný očkovací materiál, což je pravděpodobně dáno přítomností více polárních skupin na povrchu díky mikronizaci materiálu. Všechny materiály vykazují malé rozdíly v celkové povrchové energii (viz obr. 22). Nejvyšší hodnota povrchové energie ( $64,2 \text{ mJ/m}^2$ ) a její rozsah ( $20 \text{ mJ/m}^2$ ) byl naměřen u mikronizovaného fluticason propionátů, který byl použit jako očkovací materiál.<sup>14</sup> Tyto krystaly mají mnoho míst o vysoké energii a ze studovaných materiálů by měly být nejvíce kohezní. Vyšší hodnota distribuce povrchové energie ( $19,7 \text{ mJ/m}^2$ ) byla naměřena také u vzorku š: AB181116, který byl připraven pulzní sonokrytalizací. Naopak nejužší distribuci celkové povrchové energie ( $2,8 \text{ mJ/m}^2$ ), která je známkou homogenního povrchu, měl vzorek š: AB180409 připravený očkovanou krystalizací (40 hm.%). Tyto krystaly by měly být nejméně kohezní.



Obr. 22: profil celkové povrchové energie vzorků fluticason propionátu připraveného různými krystalizačními postupy.

## 4.7. Mechanické vlastnosti

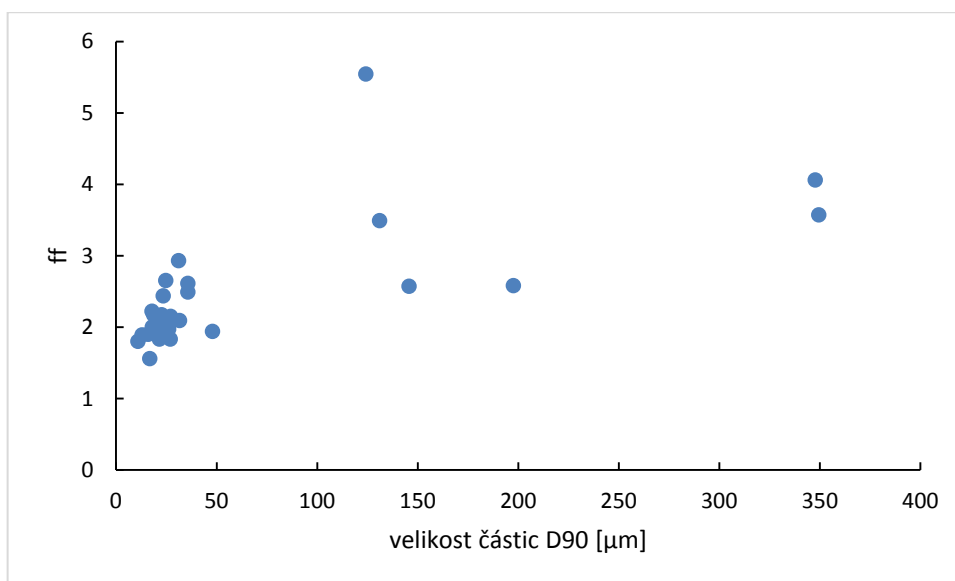
Mechanické vlastnosti hrají fundamentální roli při určování odolnosti proti lomu při mikronizaci. Youngův modul představuje schopnost materiálu odolávat elastické deformaci a má vliv na účinnost mikronizace. Čím je Youngův modul nižší, tím je materiál elastičtější, a proto je potřeba provést více mikronizačních cyklů než u materiálů, které mají vyšší hodnoty Youngova modulu, jsou tvrdší.<sup>47</sup> V této práci byl Youngův modul měřen u vybraných zástupců z každého typu krystalizace. Získané výsledky jsou shrnuty v tab. 6. Studované materiály se lišily způsobem přípravy, a proto také distribucí velikosti částic, specifickou plochou povrchu a drsností. Youngův modul u studovaných šarží byl v rozmezí 1,5–26 GPa. Materiál š: AB180124 připravený krystalizací s přidavkem antisolventu měl nejnižší Youngův modul ( $1,5 \pm 0,4$  GPa). Zbylé čtyři šarže (AB180416, AB180207, AB181116 a AB190122) se výrazně nelišily (viz obr. 23). Nejvyšší Youngův modul byl naměřen u š: AB180416 a to  $25,9 \pm 10$  GPa. Tyto data ukazují, že krystaly š: AB180124 jsou elastičtější a pro jejich mikronizaci by bylo vyžadováno více mikronizačních cyklů v porovnání s ostatními šaržemi.<sup>47,48</sup> Ukázalo se, že způsob krystalizace ovlivňuje mechanické vlastnosti fluticasonu propionátu.



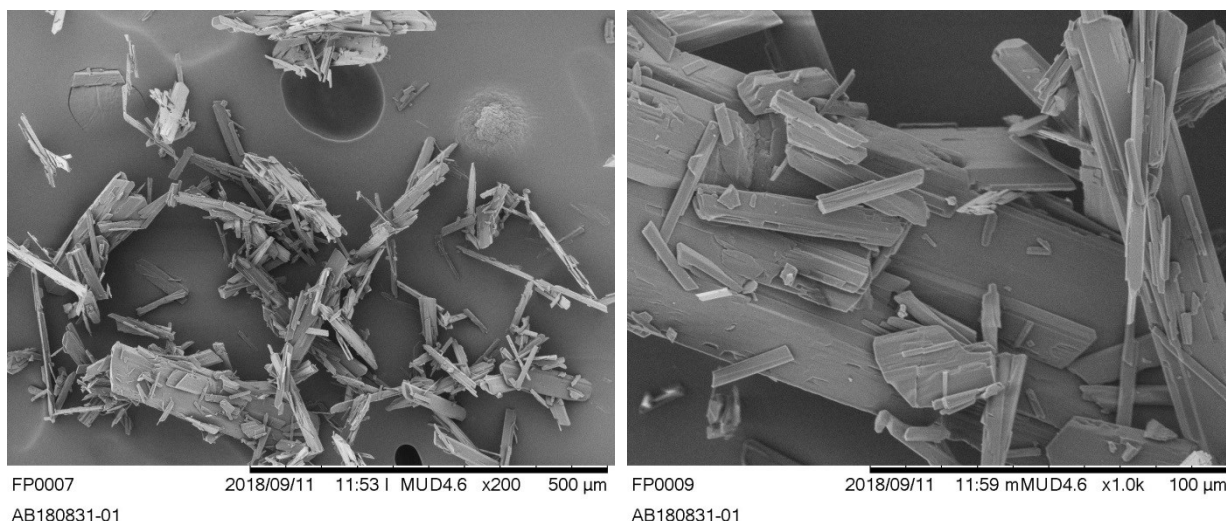
Obr. 23: průměrné hodnoty Youngova modulu pro materiály připravené různými typy krystalizace: antisolvent – š: AB180124, očkování – š: AB180416, templáty – š: AB180207, vsádková sonokystalizace – š: AB181116 a kontinuální sonokystalizace – š: AB190122.

#### 4.8. Objemové vlastnosti

U všech vzorků byly měřeny jejich tokové vlastnosti (viz tab. 1–5). Předpovídat tokové vlastnosti není u prášků vůbec jednoduché, protože je může ovlivňovat řada faktorů jako je velikost, tvar, porozita, povrchová struktura nebo tvrdost.<sup>13,15</sup> Ukázalo se, že se zvětšujícími se částicemi se zlepšují tokové vlastnosti zkoumaného prášku, protože se zmenšuje kontaktní plocha.<sup>13</sup> Závislost indexu toku na velikosti částic je na obr. 24. U menších částic se více uplatňují kohezní síly. Čím jsou částice prášku sféricktější, tím látka lépe teče. To je způsobeno snížením kontaktních ploch.<sup>13</sup> Většina zkoumaných materiálů má  $ff$  okolo hodnoty 2, což odpovídá hranici velmi kohezních až kohezním práškům. Materiály s většími částicemi nedosáhly  $ff$  většího než 4, proto jsou stále klasifikovány jako kohezní. Výjimkou je experiment, kdy byl antisolvent rychle přidán do nasyceného roztoku FP při teplotě 5 °C (š: AB180831). Finální materiál s parametrem  $D(90)$  124  $\mu\text{m}$  tvoří jehlicovité až protáhlé destičkovité krystaly (obr. 25). Index toku měl hodnotu 5,5. Tento materiál je proto klasifikován jako snadno tekoucí.



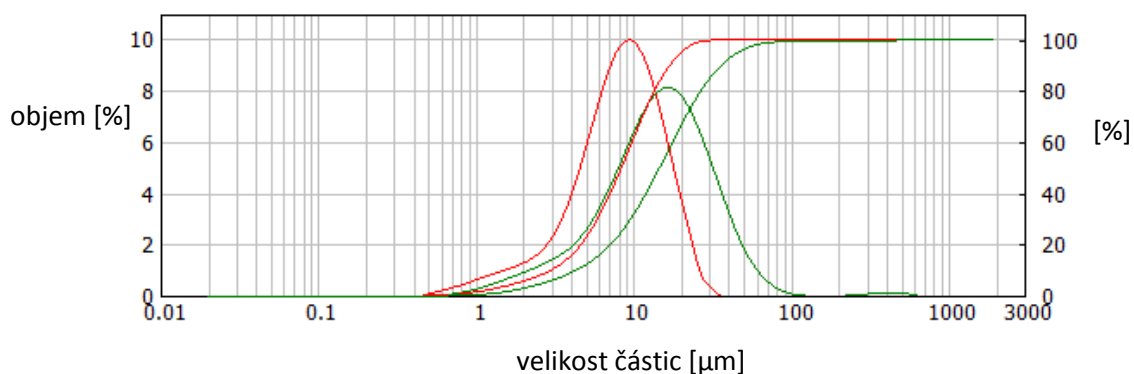
Obr. 24: graf závislosti faktoru tečení ( $ff$ ) na velikosti částic.



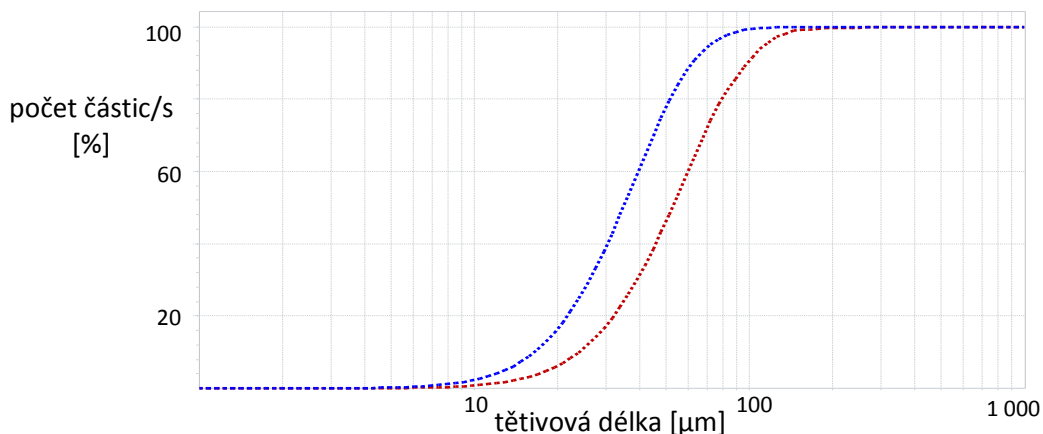
Obr. 25: SEM snímky fluticasone propionátu s nejlepšími tokovými vlastnostmi (š: AB180831).

#### 4.9. Korelace parametru D(90)

V průběhu měření se ukázalo, že distribuce velikosti částic získaných z FBRM sondy na konci experimentu (těsně před filtrací) neodpovídají datům naměřených na přístroji Malvern Mastersizer 2000. Data z FBRM sondy byly v případě malých částic značně nadhodnoceny (viz tab. 1–5). Oba přístroje pracují na rozdílném principu. FBRM sonda měří *in situ* těživové délky díky odrazu laseru. Mastersizer určuje velikost částic díky difrakci. Oproti FBRM sondě se vzorek před samotným měřením filtruje, suší, v suspenzi s povrchově aktivní látkou se dávkuje do měrné cely a těsně před měřením se ještě aplikuje ultrazvuk, aby se rozbily případné agregáty. Během těchto procesů jsou krystaly namáhány a může dojít k jejich rozlomení. Připravené menší krystaly destičkovitého tvaru by mohly být náchylnější na mechanické vlivy než větší a robustnější spíše tyčovité krystaly, které vykristalovaly v provedených experimentech. Na druhou stranu, i měření FBRM sondou je potřeba optimalizovat. Porovnááme-li data z různých experimentů, měla by být zachována koncentrace, rychlost míchání i úhel, pod kterým je sonda umístěna do suspenze.<sup>8</sup>



Obr. 26: porovnání objemově vážené distribuce velikosti částic z přístroje Malvern Mastersizer: š: AB190109 (červeně), š: AB181116 (zeleně).

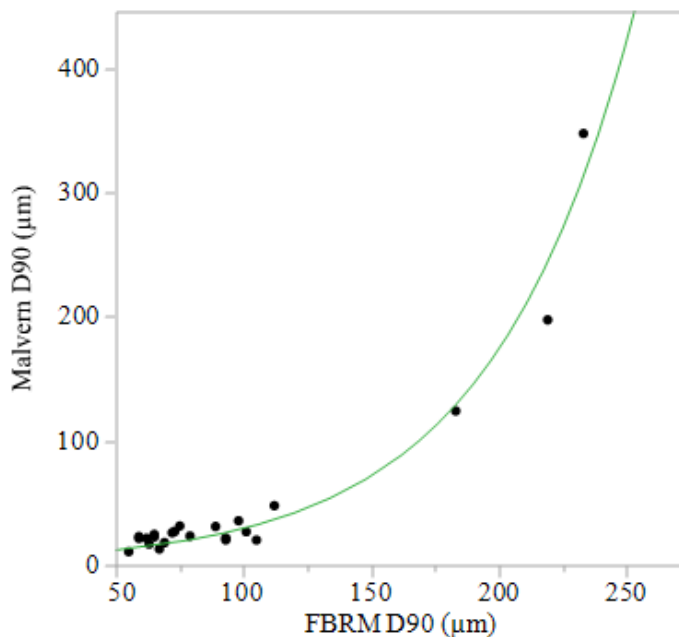


Obr. 27: porovnání objemově vážené kumulativní distribuce velikosti částic z FBRM sondy: š: AB190109 (modře), š: AB181116 (červeně).

Proto bylo provedeno statistické vyhodnocení těchto dat pomocí softwaru JMP. Po vyloučení extrémního bodu (Malvern 350  $\mu\text{m}$ ; FBRM 304  $\mu\text{m}$ ) byly data proloženy exponenciální přímkou popsanou rovnicí:

$$\text{Malvern } D(90) = 5,036 \times \exp[0,018 \times \text{FBRM } D(90)] \quad (13)$$

V experimentech byly připraveny převážně materiály s parametrem  $D(90) < 150 \mu\text{m}$ . Pro lepší pochopení závislosti mezi těmito dvěma technikami by studie musela být doplněna experimenty, kterými by byly připraveny materiály s parametrem  $D(90) > 150 \mu\text{m}$ . Toto ale nebylo primárním cílem této práce.



Obr. 28: graf závislosti parametru  $D(90)$  získaných laserovou difrakcí na přístroji Malvern na parametru  $D(90)$  naměřených FBRM sondou.

## 5. Závěr

V této diplomové práci byl studován vliv krystalizačních podmínek na fyzikálně chemické vlastnosti heterocyklických API látek. Studovanou látkou byl syntetický glukokortikosteroid fluticason propionát (FP). Cílem práce bylo připravit krystalické materiály s různými vlastnostmi. Z fyzikálně chemických vlastností byla studována distribuce velikosti částic metodou laserové difrakce a pomocí FBRM sondy a obsah zbytkových rozpouštědel plynovou chromatografií, tokové vlastnosti byly porovnány na základě flow faktoru, z povrchových vlastností byla sledována specifická plocha povrchu, povrchová energie a drsnost. Mechanické vlastnosti byly porovnány na základě Youngova modulu.

Byly provedeny čtyři druhy krystalizačních experimentů s jednoduchými obměnami. První sérii experimentů představovala krystalizace s přidavkem antisolventu. Antisolvent byl do krystalizačního roztoku přidáván při různých teplotách a různou rychlostí. Tímto způsobem byly připraveny krystalické materiály s parametrem D(90) od 20  $\mu\text{m}$  do 350  $\mu\text{m}$ , které se výrazně lišily také obsahem zbytkových rozpouštědel. U očkované krystalizace byl studován vliv množství očkovacího materiálu na finální vlastnosti produktu. Bylo prokázáno, že se zvětšujícím se množstvím očkovacího materiálu klesá distribuce velikosti částic a snižuje se i obsah zbytkových rozpouštědel. Krystalizace s využitím templátů ukázala, že přítomnost cizích částic v roztoku urychluje nukleační krok, a tedy i celý krystalizační proces. Se zvětšujícím se poloměrem templátů se zvětšovala distribuce velikosti částic (z 16  $\mu\text{m}$  na 31  $\mu\text{m}$ ). Použití templátů nemělo vliv na obsah zbytkových rozpouštědel. V poslední sérii experimentů bylo použito ultrazvukové vlnění. Nejprve byl ultrazvuk aplikován pulzně. Různé délky pulzu, ani změna amplitudy neměly vliv na distribuci velikosti částic. Ale ukázalo se, že při použití větších amplitud a delších sonikačních časů se až 3krát snížil obsah zbytkových rozpouštědel. Následně byl ultrazvuk aplikován kontinuálně s různou délkou sonikace. Podobně jako u pulzní sonokrystalizace, prodloužení sonikačních časů nemělo vliv na distribuci velikosti částic, ale snížil se obsah zbytkových rozpouštědel.

Specifická plocha povrchu připravených materiálů roste se zmenšujícím se PSD. Výjimku představovaly krystaly připravené sonokrystalizací, které i přes malé PSD měly nejnižší specifickou plochu povrchu, což dokazuje, že ultrazvuk vyhlazuje povrch krystalů.<sup>50</sup> Ze zkoumaných materiálů měl největší specifickou plochu povrchu (13,3  $\text{m}^2/\text{g}$ ) materiál

připravený krystalizací s templáty s nejmenším PSD, parametr D(90) 16  $\mu\text{m}$ . U těchto krystalů byla naměřena také vyšší drsnost. Všechny studované vzorky vykazují poměrně malé rozdíly v hodnotách celkové povrchové energie. U všech studovaných vzorků fluticason propionátu je dominantním příspěvkem k celkové povrchové energii disperzní část, acidobazický příspěvek představuje pouze 7–12%. Nejširší distribuci povrchové energie měl mikronizovaný očkovací materiál.<sup>14</sup>

Podařilo se také změřit mechanické vlastnosti studované API. Youngův modul byl studován u vybraného zástupce z každého typu krystalizace. Nejnižší hodnotu Youngova modulu měl materiál připravený krystalizací s antisolventem, pouze 1,5 GPa. Proto by měl být tento materiál velmi obtížně mikronizovatelný. U ostatních krystalů byl Youngův modul podstatně vyšší (až 25 GPa) a tudíž i mikronizace by měla být snazší. Tokové vlastnosti všech připravených materiálů byly vyhodnoceny na základě flow faktoru. Bylo prokázáno, že se zvětšujícími se částicemi roste schopnost látky téct.<sup>13</sup>

Byla provedena série různých typů krystalizačních postupů, z nichž nelze vybrat konkrétní způsob krystalizace, kterým bychom byli schopni připravit materiál o vhodných vlastnostech s ohledem na další zpracování. Např. očkovanou krystalizací se velmi dobře řídí distribuce velikosti částic. Sonokrystalizace zase umožňuje podstatně snížit obsah zbytkových rozpouštědel. Krystalizace je komplexní proces, a proto je nutná jeho optimalizace u každé studované látky.

## 6. Summary

In this master thesis was studied the effect of the crystallization of heterocyclic compounds on the physicochemical properties of the solid phase. The tested pharmaceutical substance was synthetic corticosteroid fluticasone propionate (FP). The aim of this work was to prepare a crystalline material with different properties. From the physicochemical properties was studied the particle size distribution by laser diffraction and by FBRM and the content of residual solvents by gas chromatography, flowability was compared based on flow factor, from surface properties specific surface area, surface free energy and roughness were studied. The mechanical properties were compared by Young modulus.

Four types of crystallization experiments with simple variations were performed. In the first set of experiments, antisolvent was added to the solution at different temperatures and with different speeds of addition. By this way, crystalline materials with parameter D(90) from 20  $\mu\text{m}$  to 350  $\mu\text{m}$  and with different content of residual solvents were prepared. In the case of seeding crystallization, the amount of seeds on the final properties of the product was studied. We demonstrated that with increasing the amount of seeds, particle size distribution decreased as the content of residual solvents too. Crystallization with using templates demonstrated that the presence of foreign particles in solution accelerated nucleation step and thus the whole crystallization process. With increasing the diameter of templates particle size distribution was increased (from 16  $\mu\text{m}$  to 31  $\mu\text{m}$ ). The use of templates did not affect the content of the residual solvents. In the last set of experiments were used ultrasound waves. In the first instance ultrasound was used to the initiation of nucleation in pulses. Different pulse lengths and amplitude changes did not affect the particle size distribution. However, the intensity and time of sonication strongly influenced the content of the residual solvent. If the higher amplitude and longer sonication time were used, the content of the residual solvent was reduced up to 3 times. Further, ultrasound was applied in a continuous regime with different time of sonication. Similarly to the previous case, longer sonication time does not have any influence on the particle size distribution, however, the content of residual solvents was reduced.

The specific surface area of prepared materials increases with decreasing of PSD. Exceptions were crystals prepared by sonocrystallization, which, despite their small PSD, had the lowest



specific surface area, demonstrating that ultrasound smoothed the surface of the crystals. The biggest specific surface area ( $13,3 \text{ m}^2/\text{g}$ ) of all studied materials had a material with the smallest PSD, parameter D(90)  $16 \mu\text{m}$  prepared via templates crystallization. Higher values of roughness were also measured in this type of crystallization. All studied samples showed quite small differences in their outcomes of the surface energies. The total surface energies of studied samples of fluticasone propionate were dominated by the dispersive part of surface energy, the contribution of the polar part was only 7-12%. The widest distribution of the specific surface energy had a micronized material that was used as seeds.

Mechanical properties were successfully measured as well. Young modulus was measured for a representative of each type of crystallization. The lowest Young modulus ( $1,5 \text{ GPa}$ ) had material prepared by antisolvent addition. For this reason, the material would be difficult to micronize. In the rest studied sample, Young modulus was substantially higher (up to  $25 \text{ GPa}$ ), so micronization process would be easier. The flowability of all prepared samples was compared by the flow factor value. With increasing particle size, the ability of the substance to flow increased.

A series of different types of crystallization procedures have been performed, from which a particular type of crystallization cannot be selected, by which we would be able to prepare material of suitable properties with respect to further processing. E. g. the particle size distribution is very well controlled by the seeding crystallization. Sonocrystallization, in turn, makes it possible to substantially reduce the residual solvent content. Crystallization is a complex process and therefore requires optimization.

## 7. Reference

1. Schoen, H. M., Grove, C. S. & Palermo, J. A. The Early History of Crystallization. *J. Chem. Educ.* **33**, 373–375 (1956).
2. Bakar, M. R. A., Nagy, Z. K. & Rielly, C. D. Seeded Batch Cooling Crystallization with Temperature Cycling for the Control of Size Uniformity and Polymorphic Purity of Sulfathiazole Crystals. *Org. Process Research Dev.* **13**, 1343–1356 (2009).
3. Frawley, P. J., Mitchell, N. A., O’Ciardha, C. T. & Hutton, K. W. The Effects of Supersaturation, Temperature, Agitation and Seed Surface Area on the Secondary Nucleation of Paracetamol in Ethanol Solutions. *Chem. Eng. Sci.* **75**, 183–197 (2012).
4. Beckmann, W., Otto, W. & Budde, U. Crystallisation of the Stable Polymorph of Hydroxytriendione: Seeding Process and Effects of Purity. *Org. Process Research Dev.* **5**, 387–392 (2001).
5. Kim, J. H. & Scialli, A. R. Thalidomide: The Tragedy of Birth Defects and the Effective Treatment of Disease. *Toxicol. Sci.* **122**, 1–6 (2011).
6. Bauer, J. *et al.* Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism. *Pharm. Res.* **18**, 859–866 (2001).
7. Rietveld, I. & Ceolin, R. Rotigotine: Unexpected Polymorphism with Predictable Overall Monotropic Behavior. *J. Pharm. Sci.* **104**, 4117–4122 (2015).
8. Dave, K. *et al.* Feasibility of Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM) for Analysis of Pharmaceutical Suspensions in Preclinical Development. *AAPS PharmSciTech* **19**, 155–165 (2018).
9. Hansen, T. B., Taris, A., Rong, B., Grosso, M. & Qu, H. Polymorphic Behavior of Isonicotinamide in Cooling Crystallization from Various Solvents. *J. Cryst. Growth* **450**, 81–90 (2016).
10. Tung, H.-H., Paul, E. L., Midler, M. & McCauley, J. A. *Crystallization of Organic Compounds: An Industrial Perspective*. (Wiley, 2009). ISBN: 0471467804
11. Myerson, Allan, S. *Handbook of Industrial Crystallization*. (Butterworth-Heinemann, 2002). ISBN: 0750670126
12. Aamir, E., Nagy, Z. K. & Rielly, C. D. Evaluation of the Effect of Seed Preparation Method on the Product Crystal Size Distribution for Batch Cooling Crystallization Processes. *Cryst. Growth Des.* **10**, 4728–4740 (2010).
13. Guling, X. *et al.* Investigation on Characterization of Powder Flowability Using Different Testing Methods. *Exp. Therm. Fluid Sci.* **92**, 390–401 (2018).
14. Lapčík, L. *et al.* Surface Heterogeneity: Information from Inverse Gas Chromatography and Application to Model Pharmaceutical Substances. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **24**, 64–71 (2016).
15. Byrn, S. R., Zografi, G. & Chem, X. *Solid-State Properties of Pharmaceutical Materials*. (Wiley, 2017). ISBN: 9781119264408
16. Sun, Y. Carrier Free Inhaled Dry Powder of Budesonide Tailored by Supercritical Fluid Particle Design. *Powder Technol.* **304**, 248–260 (2016).
17. Covello, L. Polymorphism: Opportunity or Problem? (21.1.2019) v <<https://www.slideshare.net/CovelloLuca/polymorphism-opportunity-or-problem>>
18. Henck, J., Griesser, U. & Burger, A. Polymorphism of Drug Substances - An Economic Challenge. *Pharm. Ind.* **59**, 165–169 (1997).
19. Janković, B. *et al.* Consolidation Trend Design Based on Young’s Modulus of Clarithromycin Single Crystals. *Int. J. Pharm.* **454**, 324–332 (2013).

20. Pidipeddi, M. & Serajuddim, A. Trends in Solubility of Polymorphs. *J. Pharm. Sci.* **94**, 929–939 (2005).
21. Venkateshaiah, A., Nutenki, R. & Kattimuttathu, S. X-ray Diffraction Spectroscopy of Polymer Nanocomposites. (30.1.2019) v  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323401838000148>>
22. Mullin, J. W. *Crystallization*. (Butterworth-Heinemann Ltd., 2001). ISBN: 0750648333
23. Kratochvíl, B. Krystalizace farmaceutických substancí. *Chem. List.* **12**, (2007).
24. Parambil, J. V, Poornachary, S. K., Tan, R. B. H. & Heng, J. Y. Y. Influence of Solvent Polarity and Supersaturation on Template-induced Nucleation of Carbamazepine Crystal Polymorphs. *J. Cryst. Growth* **469**, 84–90 (2017).
25. Artusio, F. & Pisano, R. Surface-induced Crystallization of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals: A Review. *Int. J. Pharm.* **547**, 190–208 (2018).
26. Cubillas, P. & Anderson, M. W. *Synthesis Mechanism: Crystal Growth and Nucleation*. (Wiley, 2010). ISBN: 9783527325146
27. Dai, H., Lu, X., Peng, Y., Yang, Z. & Zhu, H. Characteristics of Metastable Zone in the Crystallization Process: A Case Study of Sparingly Soluble Hydroxyapatite. *Desalin. Water Treat.* **62**, 192–199 (2017).
28. Gibbs, J. W. *The Collected Works, Vol. I, Thermodynamics*. (Yale University Press, 1948).
29. Volmer, M. *Kinetik der Phasenbildung*. (Steinkopf, 1939).
30. Becker, R. & Döring, W. Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigten Dämpfen. *Ann. Phys.* **416**, 719–752 (1935).
31. Vekilov, P. G. Nucleation. *Cryst. Growth Des.* **10**, 5007–5019 (2010).
32. Sosso, G. C. *et al.* Crystal Nucleation in Liquids: Open Questions and Future Challenges in Molecular Dynamics Simulations. *Chem. Rev.* **116**, 7078–7116 (2016).
33. Kovács, T. & Christenson, H. K. A Two-step Mechanism for Crystal Nucleation without Supersaturation. *Faraday Discuss.* **159**, 123–138 (2012).
34. Agrawal, S. & Paterson, A. Secondary Nucleation: Mechanisms and Models. *Chem. Eng. Commun.* **202**, 698–706 (2015).
35. Roberts, K. J., Docherty, R. & Rui, T. *Engineering Crystallography: From Molecule to Crystal to Functional Form*. (Springer, 2007). ISBN: 9789402411157
36. Trasi, N. S., Baird, J. A., Kestur, U. S. & Taylor, L. S. Factors Influencing Crystal Growth Rates from Undercooled Liquids of Pharmaceutical Compounds. *J. Phys. Chem. B* **118**, 9974–9982 (2014).
37. Schram, C. J., Beaudoin, S. P. & Taylor, L. S. Polymer Inhibition of Crystal Growth by Surface Poisoning. *Cryst. Growth Des.* **G 16**, 2094–2103 (2016).
38. Mosquera-Giraldo, L. I., Trasi, N. S. & Taylor, L. S. Impact of Surfactants on the Crystal Growth of Amorphous Celecoxib. *Int. J. Pharm.* **461**, 251–257 (2014).
39. Eddleston, M. D. & Jones, W. Formation of Tubular Crystals of Pharmaceutical Compounds. *Cryst. Growth Des.* **10**, 356–370 (2010).
40. Liu, W. J., Ma, C. Y., Wang, X. Z., Zhang, Y. & Wang, X. Continuous Reactive Crystallization of Pharmaceuticals Using Impinging Jet Mixers. *Aiche J.* **63**, 967–974 (2017).
41. Dhupal, R. S., Biradar, S. V, Paradkar, A. R. & York, P. Particle Engineering Using Sonocrystallization: Salbutamol Sulphate for Pulmonary Delivery. *Int. J. Pharm.* **368**, 129–137 (2009).

42. Caridi, A., Kulkarni, S. A., Di, G., Curcio, E. & Horst, J. H. Template-Induced Nucleation of Isonicotinamide Polymorphs. *Cryst. Growth Des.* **14**, 1135–1141 (2014).
43. Gao, Z., Rohani, S., Gong, J. & Wang, J. Recent Developments in the Crystallization Process: Toward the Pharmaceutical Industry. *Engineering* **3**, 343–353 (2017).
44. Zhang, D., Xu, S., Du, S., Wang, J. & Gong, J. Progress of Pharmaceutical Continuous Crystallization. *Engineering* **3**, 354–364 (2017).
45. Agnew, L. R. *et al.* Continuous Crystallization of Paracetamol (Acetaminophen) Form II: Selective Access to a Metastable Solid Form. *Cryst. Growth Des.* **17**, 2418–2427 (2017).
46. Nagy, Z. K., Fujiwara, M. & Braatz, R. D. Modelling and control of combined cooling and antisolvent crystallization processes. *J. Process Control* **18**, 856–864 (2008).
47. Kubavat, H. A., Shur, J., Ruecroft, G., Hipkiss, D. & Price, R. Investigation into the Influence of Primary Crystallization Conditions on the Mechanical Properties and Secondary Processing Behaviour of Fluticasone Propionate for Carrier Based Dry Powder Inhaler Formulations. *Pharm. Res.* **29**, 994–1006 (2012).
48. Kubavat, H. A., Shur, J., Ruecroft, G., Hipkiss, D. & Price, R. Influence of Primary Crystallisation Conditions on the Mechanical and Interfacial Properties of Micronised Budesonide for Dry Powder Inhalation. *Int. J. Pharm.* **430**, 26–33 (2012).
49. Murnane, D., Marriott, C. & Martin, G. P. Crystallization and Crystallinity of Fluticasone Propionate. *Cryst. Growth Des.* **8**, 2753–2764 (2008).
50. Su, C., Liao, C. & Jheng, W. Particle Size Control and Crystal Habit Modification of Phenacetin Using Ultrasonic Crystallization. *Chem. Eng. Technol.* **38**, 181–186 (2015).
51. Ruecroft, G., Hipkiss, D., Ly, T., Maxted, N. & Cains, P. Sonocrystallization: The Use of Ultrasound for Improved Industrial Crystallization. *Org. Process Research Dev.* **9**, 923–932 (2005).
52. Gao, Z. *et al.* Ultrasonic Irradiation and Seeding To Prevent Metastable Liquid – Liquid Phase Separation and Intensify Crystallization. *Cryst. Growth Des.* **18**, 2628–2635 (2018).
53. Guo, Z., Zhang, M., Li, H., Wang, J. & Kougoulos, E. Effect of Ultrasound on Anti-solvent Crystallization Process. *J. Cryst. Growth* **273**, 555–563 (2005).
54. Gielen, B., Jordens, J., Thomassen, L. C. J., Braeken, L. & Van Gerven, T. Agglomeration Control during Ultrasonic Crystallization of an Active Pharmaceutical Ingredient. *Crystals* **7**, 40–60 (2017).
55. Kaerger, J. S. & Price, R. Processing of Spherical Crystalline Particles via a Novel Solution Atomization and Crystallization by Sonication (SAXS) Technique. *Pharm. Res.* **21**, 372–381 (2004).
56. Bonyi, E. *et al.* Metal-assisted and Microwave-accelerated Evaporation Crystallization: An Approach to Rapid Crystallization of Biomolecules. *CrystEngComm* **18**, 5600–5610 (2016).
57. Lee, I. S., Lee, A. Y. & Myerson, A. S. Concomitant Polymorphism in Confined Environment. *Pharm. Res.* **25**, 960–968 (2008).
58. Urbanus, J. *et al.* Template Induced Crystallization: A Relation between Template Properties and Template Performance. *Cryst. Growth Des.* **9**, 2762–2769 (2009).
59. Mckellar, S. C., Urquhart, A. J., Lamprou, D. A. & Florence, A. J. Polymer Templating of Supercooled Indomethacin for Polymorph Selection. *ACS Comb. Sci.* **14**, 155–159 (2012).
60. Tan, S., Ebrahimi, A. & Langrish, T. Template-directed Flower-like Lactose with Micro-meso-macroporous Structure. *Mater. Des.* **117**, 178–184 (2017).

61. Scientific, A. A Guide to Understanding Laser Diffraction Principles. (15.2.2019) v <<https://www.atascientific.com.au/principles-laser-diffraction/>>
62. Maass, S., Wollny, S., Voigt, A. & Kraume, M. Experimental Comparison of Measurement Techniques for Drop Size Distributions in Liquid/Liquid Dispersions. *Exp. Fluids* **50**, 259–269 (2011).
63. Croda. Laser Diffraction Particle Sizing. (20.2.2019) v <<https://www.crodalubricants.com/en-gb/discovery-zone/how-we-test-our-products/laser-diffraction-particle-sizing>>
64. Shi, B. *et al.* Viscosity Investigation of Natural Gas Hydrate Slurries with Anti-agglomerants Additives. *Fuel* **185**, 323–338 (2016).
65. Vůjtek, M., Kubínek, R. & Mašláň, M. *Nanoskopie*. (Univerzita Palackého v Olomouci, 2012). ISBN: 9788024431024
66. Pechouček, J. *Měření plochy povrchu pevných látek a určování jejich porozity metodou sorpce plynu*. (Univerzita Palackého v Olomouci, 2010). (18.3.2019) v <<https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/ostatni/BET.pdf>>
67. Grimsey, I., Feeley, J. & York, P. Analysis of the Surface Energy of Pharmaceutical Powders by Inverse Gas Chromatography. *J. Pharm. Sci.* **91**, 571–583 (2002).
68. Gamble, J. F., Leane, M., Olusanmi, D., Toba, M. & Supuk, E. Surface Energy Analysis as a Tool to Probe the Surface Energy Characteristics of Micronized Materials — A Comparison with Inverse Gas Chromatography. *Int. J. Pharm.* **422**, 238–244 (2012).
69. Egart, M., Janković, B. & Srčić, S. Application of Instrumented Nanoindentation in Preformulation Studies of Pharmaceutical Active Ingredients and Excipients. *Acta Pharm.* **66**, 303–330 (2016).
70. Sanphui, P., Mishra, M. K., Ramamurthy, U. & Desiraju, G. Tuning Mechanical Properties of Pharmaceutical Crystals with Multicomponent Crystals: Voriconazole as a Case Study. *Mol. Pharmaceutics* **12**, 889–897 (2015).
71. Emery, E., Oliver, J., Pugsley, T., Sharma, J. & Zhou, J. Flowability of Moist Pharmaceutical Powders. *Powder Technol.* **189**, 409–415 (2009).