

# Postupci dobivanja kokristala

---

**Radovanović - Perić, Floren**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:039512>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-20**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Floren Radovanović- Perić

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Floren Radovanović- Perić

POSTUPCI DOBIVANJA KOKRISTALA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Prof. dr. sc. Mirela Leskovic

Zagreb, rujan 2018.

*Zahvaljujem se ovim putem mentorici prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na danom povjerenju, zanimljivim razgovorima i vrlo ugodnoj izradi rada.*

*Hvala i svim djelatnicima na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo na vrlo ugodnom boravku i suradnji.*

*Na kraju, posebne zahvale želim poručiti prof. dr. sc. Mireli Leskovic na stručnoj suradnji i vrlo korisnim savjetima i pojašnjenjima.*

## SAŽETAK

Farmaceutski kokristali se u zadnje vrijeme istražuju kao nova vrsta krutih lijekova sa poboljšanim fizikalno - kemijskim svojstvima. Interes pobuđuje činjenica, da se dobivanjem kokristala, povećava broj kristalnih oblika za već postojeće djelatne farmaceutske tvari. Također je važno naglasiti da na ovaj način farmaceutske tvrtke dobivaju mogućnost prijave nove patentne prijave i proboja na tržište s novim generičkim lijekom, ali i poboljšanje svojstva, kao što su: topljivost, stabilnost i bioraspoloživost, a koja su od velike važnosti za primjenu lijeka.

U ovom radu istražen je modelni sustav za dobivanje kokristala: maleinska kiselina i kofein. Cilj rada bio je dobiti sve kokristalne forme maleinske kiseline i kofeina te istražiti utjecaj temperature, početne koncentracije komponenti u otopini i djelovanja ultrazvuka na konačnu faznu ravnotežu. Kokristali su identificirani rendgenskom difrakcijom te dodatno okarakterizirani diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom i pregledom na elektronskom mikroskopu. Samo u jednom slučaju dobivena je čista forma, ali ukupni rezultati daju dobar uvid utjecaja ispitivanih parametara na mogućnosti dobivanja različitih kokristalnih oblika.

**Ključne riječi:** Kokristalizacija, kofein i maleinska kiselina

## SUMMARY

Pharmaceutical co-crystals have lately been explored as a class of solid phase drugs with enhanced physiochemical properties. The fact that awakens interest in co-crystals is that by preparing active pharmaceutical ingredients (API) by methods of co-crystallization increases the total number of possible crystal forms for already existing APIs. It is also important to note that these methods of API preparation open up new pathways and opportunities regarding intellectual property amongst pharmaceutical companies as well as help enhance their properties, such as: solubility, stability and bioavailability which are of great importance for drug application.

In this study, a model system for creating co-crystals; maleic acid and caffeine, was tested. The aim of this study was to generate all existing co-crystal forms of maleic acid and caffeine as well as explore the effect of starting temperature, starting concentration of both components in the solution and ultrasound on the final phase equilibrium. Co-crystals were identified by X-ray diffraction, and characterized through differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy (SEM). Despite the fact that only one case a pure form was isolated, the rest of the results nevertheless gave very good insight regarding the effects of the studied parameters on the possibilities of preparing various co-crystal forms.

**Key words:** Co-crystallization, caffeine and maleic acid

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.2. Topljivost.....	5
2.3. Prezasićenost i metastabilna zona .....	7
2.4. Nukleacija.....	9
2.5. Rast kristala .....	11
2.6. Heterosintoni i forme kofeina i maleinske kiseline .....	12
2.7. Primjena ultrazvuka u kristalizaciji .....	15
2.8. Metode karakterizacije kokristala.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
3.1. Svrha rada.....	17
3.2. Kofein, maleinska kiselina .....	17
3.4. Aparatura.....	18
3.5. Uređaji za karakterizaciju nastalih kokristala.....	20
3.5.1. Oblik kristala .....	20
3.5.2. Određivanje topografije površine kristala .....	20
3.5.3. Određivanje strukture kristala .....	21
3.5.4. Određivanje toplinskih svojstava .....	21
4. REZULTATI .....	22
4.1. Rendgenska difrakcija .....	22
4.2. DSC Termogrami .....	24
4.3. Topografija i oblik kristala .....	26
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK .....	31
7. POPIS SIMBOLA .....	32
8. POPIS LITERATURE .....	33

## 1. UVOD

Većina današnjih farmaceutskih lijekova primjenjuju se u krutim oblicima poput tableta, praha ili kapsula. Oni sadrže aktivnu farmaceutsku tvar (eng. API) u kristalnoj formi, koja se prvo mora otopiti u gastro- intestinalnom traktu prije nego što se može apsorbirati u tijelu. Spojevi koji su loše topljivi u vodi imaju slabu biološku raspoloživost, jer je brzina otapanja aktivne tvari često manja od brzine absorpcije. Uz mnoge primjenjene strategije kako bi se povećala brzina otapanja aktivne tvari, pojavljuju se u zadnje vrijeme i kokristali kao multi komponentni kristali aktivne tvari i ne štetnog koformera s velikom topljivošću u vodi. Cilj kokristaliziranja aktivne lijekovite tvari s koformerom je modificiranje fizikalno- kemijskih svojstava povezanih s topljivošću aktivne tvari u svrhu povećanja njene topljivosti te kontrole brzine njenog otapanja. Izuzev same topljivosti, kokristalizacijom neke važne komponente, mogu se modificirati svojstva poput točke tališta, kristaliničnosti, higroskopnosti te fizikalne i kemijske stabilnosti<sup>1</sup>.

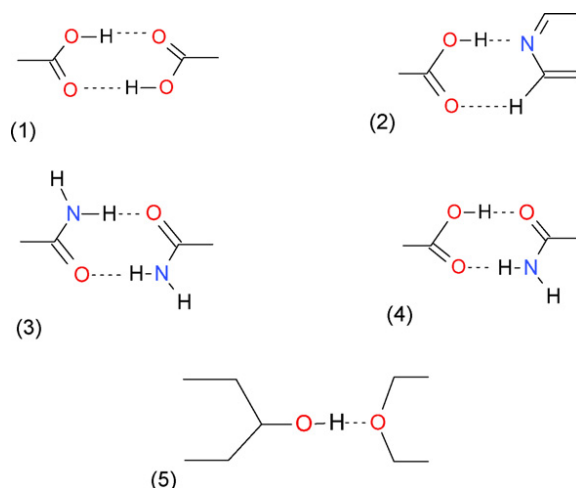
Kokristali su, po najopširnijoj definiciji, multi komponentni molekularni kristali. Ova definicija obuhvaća mnogo vrsta sustava, koji nisu svi pogodni za farmaceutsku primjenu. U ovom radu promatrat će se kokristalni sustavi kao supramolekularni kompleksi, odnosno spojevi dvije (najčešće organske) molekule, od kojih nijedna nije otapalo, koje su međusobno povezane ne kovalentnim međumolekulskim silama u definiranom stehiometrijskom odnosu. U takvim sustavima koformer može direktno utjecati na svojstva aktivne tvari<sup>1</sup>.

U ovom radu razmotrit će se zašto kokristali nastaju, postojanje kokristala iz termodinamičkog aspekta, pregledati će se metode dobivanja kokristala, od kojih će biti isprobana šaržna kristalizacija hlađenjem, te šaržna kristalizacija hlađenjem potpomognuta ultrazvukom na sustavu maleinska kiselina/kofein.



## 2. OPĆI DIO

Kokristalizacija je novija metoda kristalizacije koja omogućava povezivanje dvije ili više građevne kristalne jedinice unutar jedne periodične kristalne rešetke bez stvaranja ili kidanja kovalentnih veza. Ove građevne kristalne jedinice su neutralne molekule povezane preko vodikovih veza. Kokristali predstavljaju grupu neistraženih spojeva koja pruža ogromne prilike za primjenu u farmaceutskoj industriji. Kao što se organska sinteza temelji na stvaranju ili kidanju kovalentnih veza, supramolekularna (kokristalna) sinteza temelji se na povezivanju molekula preko slabijih interakcija.



**Slika 1.** (1) Homosinton dvije karboksilne grupe, (2) heterosinton karboksilne grupe i heterocikličkog dušika, (3) homosinton amid/amid, (4) heterosinton karboksilna grupa/amid, (5) heterosinton hidroksilna grupa/heterociklički kisik

Supramolekularni homosinton sastoji se od dvije iste molekule povezane slabijim interakcijama, što najčešće dovodi do formacije organskih kristala, dok se heterosinton sastoji od dvije različite molekule povezane slabijim interakcijama. Heterosintoni su se pokazali dominantniji u procesu rasta kristala, ako postoji mogućnost njihovog nastanka<sup>4</sup>. Mogućnost nastajanja, te oblici heterosintona mogu se odrediti pomoću par metoda, od kojih je napoznatija metoda Etterovih grafova koji služe za analizu vodikovih veza u kompleksnim organskim molekulama<sup>2</sup>.

Na mnoge načine, dobivanje kokristala iz otopine vrlo je slično kristalizaciji i odvija se u tri koraka: postizanje prezasićenosti, nukleacija te rast kristala. U procesu kokristalizacije postizanje prezasićenosti je ključan korak jer on definira hoće li kokristal uopće nastati<sup>3</sup>.

## 2.1. Metode pripreme

### *Kokristalizacija iz otopine*

Dobivanje kokristala iz otopine je najčešće korišten način u industriji. U odgovarajućem otapalu pripremi se otopina obje komponente. Odvija se u reaktorima, gdje se nakon postizanja prezasićenosti odvija nukleacija, a nakon nje rast kristala. Najčešće pri dobivanju kokristala, koristi se sporo hlađenje kao metoda postizanja prezasićenosti. Isto tako, pri kokristalizaciji iz otopine koristi se i ultrazvuk, koji ima višestruko pogodno djelovanje za ovaj proces. Sonokristalizacija se općenito koristi za kontrolu kvalitete konačnih produkata, a pozitivno djelovanje ultrazvuka se često pripisuje kavitaciji koja se pojavljuje zbog velike snage ultrazvuka. Nukleacija se inducira pri nižim prezasićenostima zbog pojave mjehurića koji se ponašaju kao primarni nukleusi. Utjecaj ultrazvuka na proces kristalizacije izrazito smanjuje period indukcije i sužava metastabilnu zonu, potiče nukleaciju<sup>4</sup>.

### *Ekstruzija potpomognuta taljenjem*

Ekstruzija potpomognuta taljenjem je novija tehnika koja se može primijeniti kao mehanizam za dobivanje kokristala. Adaptirana je iz industrije gume, plastike i prehrane. Zasad, prvobitne primjene ove metode u farmaceutskoj industriji uključuju proizvodnju krutih disperznih sustava koristeći polimerne materijale u svrhu modifikacije svojstava otpuštanja lijekova u organizmu, maskiranje okusa gorkih aktivnih ljekovitih tvari, te pospješivanje topljivosti, brzine otapanja i ukupne biološke raspoloživosti aktivnih ljekovitih tvari slabo topljivih u vodi. Operacija se provodi tako što se sirovina u krutom stanju dovodi u cilindar koji sadrži jedan ili više rotirajućih vijaka paralelno sa smjerom gibanja materijala. Zbog trenja i visoke temperature, odvija se izuzetno dobro miješanje sirovine, usitnjavanje, te stvaranje kokristala. Jedna od glavnih prednosti ove tehnike je to što ima vrlo lako uvećanje na industrijsko mjerilo bez gubitaka u kvaliteti zbog geometrijske sličnosti između raznih veličina ekstrudera te je isto tako i kontinuirani proces, što znali da je ekonomičniji i smanjuje broj potrebnih procesnih koraka jednom kada se dovede u stacionaran rad<sup>5</sup>.

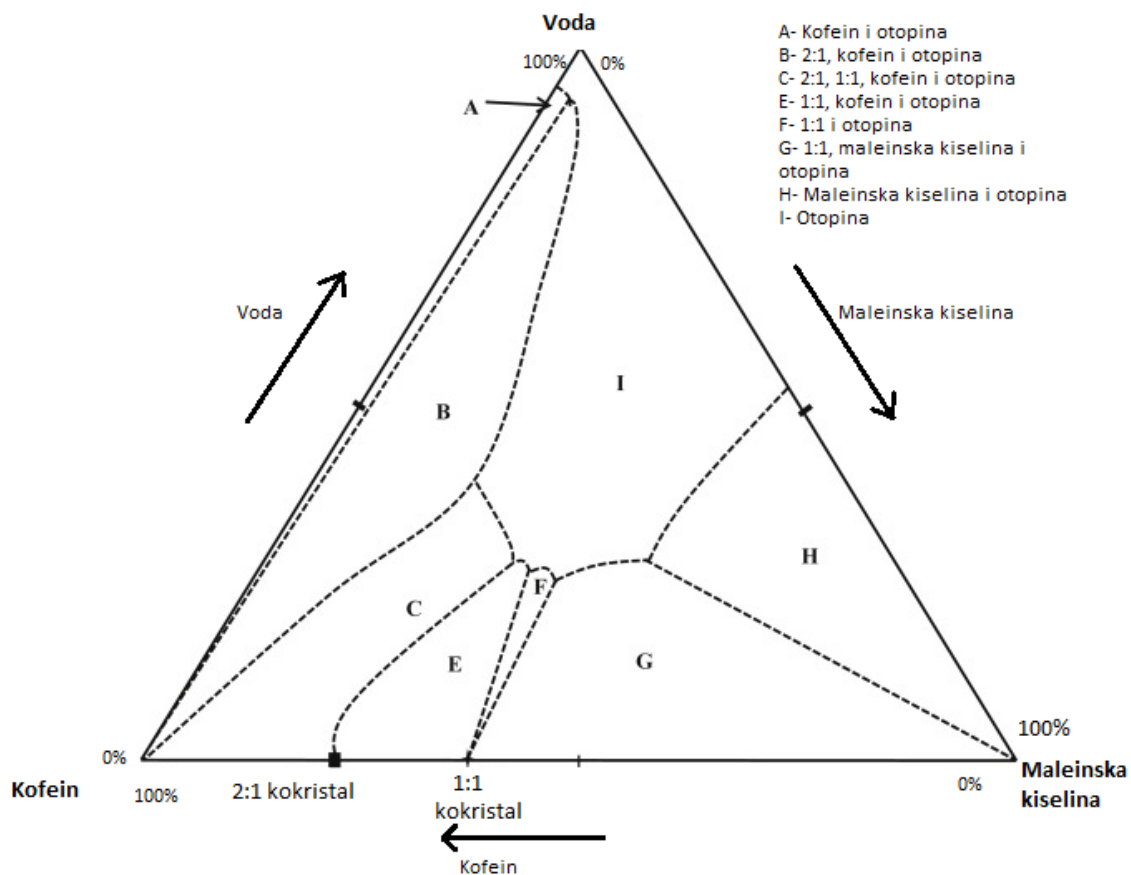
### *Mljevenje*

Dvije su najčešće metode pripreme kokristala pomoću mljevenja. Prva je suho mljevenje, gdje se kokristalne komponente melju skupa ručno ili mehanički. Druga je mljevenje uz pomoć kapljevine, tzv. "solvent drop", gdje se dodaje mala količina kapljevine kao katalizator. Ova metoda pokazala je dobre rezultate pri dobivanju metastabilnih polimorfa

kokristala, te kokristala točno definiranih stehiometrijskih odnosa. Obje tehnike su vrlo slične, iako se mokrim mljevenjem u nekim slučajevima uspjelo dobiti kokristale koji se nisu mogli iskristalizirati suhim mljevenjem (npr. određene forme kofeina). Mljevenje potpomognuto taljenjem također spada pod tehnike mljevenja, i ono rješava glavni problem koje suho mljevenje, uz sve svoje prednosti ima, a to je ogromna količina energije koja je potrebna za formaciju kokristala s obzirom na nedostatak temperature, odnosno grijanja u suhom mljevenju. U ovoj metodi mješavina komponenti tali se i zatim sporo hladi do kokristalizacije. Prednost koju ekstruzija taljenjem ima nad ovom metodom je dodatno smično mešanje<sup>5</sup>.

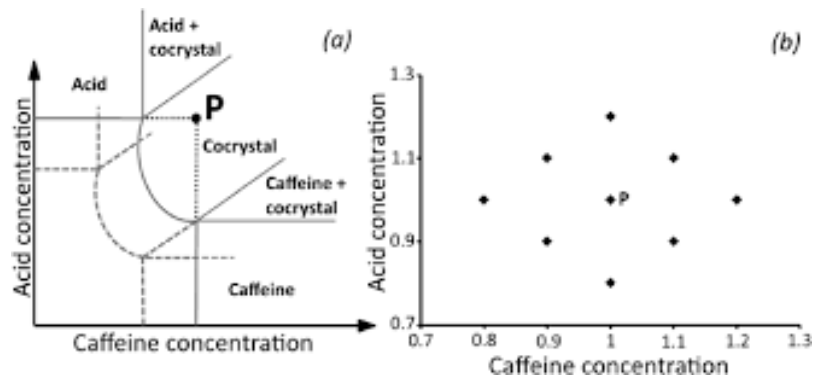
## 2.2. Topljivost

Otopine su homogene smjese dva ili više sastojaka pri kojem je jedan u velikom suvišku (otapalo). Za svaku komponentu, pri danoj temperaturi postoji količina otopljene tvari koja je u ravnoteži sa čvrstom fazom jednakog kemijskog potencijala. Takvo se stanje naziva zasićena otopina i ono je definirano temperaturom i aktivitetom ostalih otopljenih komponenti<sup>11</sup>. U sustavima gdje postoji više krutina otopljenih u kapljevitom fazi, ova se ravnoteža naziva trofazna i definira se ternarnim dijagramom. Ternarni dijagrami ravnoteže (maleinske kiseline i kofeina u acetonu) prikazani su na slici 2. gdje su molarni udjeli izraženi u postocima.



Slika 2. Ternarni dijagram voda, kofein i maleinska kiselina

Još jedan mogući prikaz je preko dijagrama koncentracije koji se nalazi na slici 3.



*Slika 3.* Dijagram ovisnosti koncentracija kofeina i maleinske kiseline.

Pune linije pokazuju ravnotežne krivulje pri višoj temperaturi, dok crtkane linije pokazuju krivulje pri nižoj temperaturi. Svojstva otapala na koja se mora obratiti pažnja su: sposobnost otapala da otopi određenu tvar, čistoća (od izuzetne je važnosti jer prisustvo nečistoća u velikoj mjeri utječe na cjelokupni proces kristalizacije poput ravnoteže, nukleacije, rasta kristala, granulometrijskih svojstava, čistoće kristala), kemijska reaktivnost (otapalo ne smije reagirati s otopljenom komponentom ako se kristalizacija provodi bez dodatka aditiva), rad s otapalima (djelotvornost, mogućnost regeneracije, zapaljivost, toksičnost)<sup>6</sup>, te za kokristalizaciju najbitnije, odabrati otapalo u kojem će razlika između topljivosti nekongruentnih komponenti biti što manja<sup>7</sup>.

### 2.3. Prezasićenost i metastabilna zona

Postizanje prezasićenosti pokretačka je sila svake kristalizacije kao fazne promjene, pa tako i kokristalizacije. Do kristalizacije može doći samo u otopinama čija je koncentracija veća od ravnotežne. Što je veći stupanj prezasićenosti veća je i pokretačka sila. Potreban stupanj prezasićenosti najčešće se postiže hlađenjem otopine ili isparavanjem otapala. Ako se pokretačka sila osigurava kemijskom reakcijom (precipitacija), dvije mješljive tvari dodaju se u otopinu pri čemu nastaje slabo topljiv produkt. Prezasićenost se može ostvariti i promjenom sastava otapala, pri čemu se otopini doda otapalo koje smanjuje topljivost (isaljavanje).

Prezasićenost se izražava na nekoliko načina:

prezasićenost

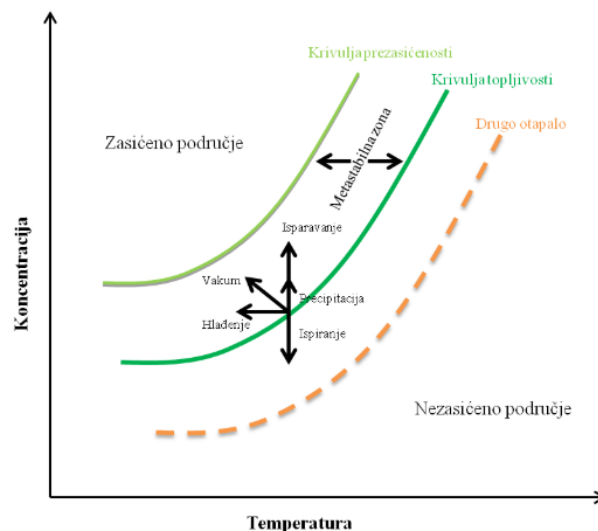
$$\Delta c = c - c^* \quad (1)$$

omjer prezasićenosti

$$S = \frac{c}{c^*} \quad (2)$$

relativna prezasićenost

$$\sigma = \frac{\Delta c}{c^*} = S - 1 \quad (3)$$

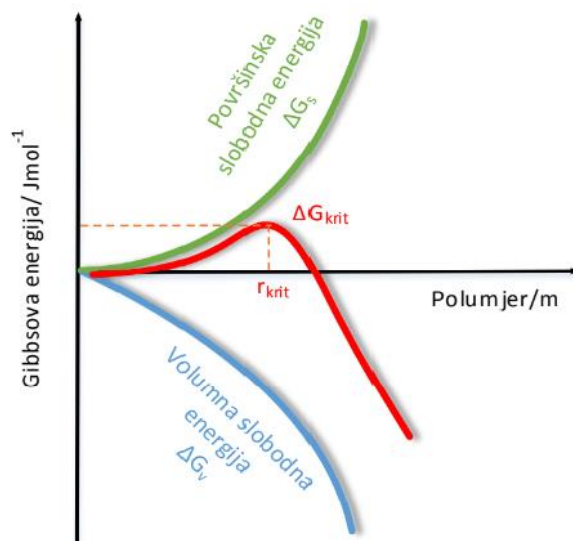


Slika 4. Dijagram krivulje topljivosti i krivulje prezasićenosti

Krivulja topljivosti i krivulja prezasićenosti dijele dijagram na tri dijela. Područje ispod krivulje topljivosti odgovara nezasićenoj (stabilnoj) otopini u kojoj neće doći do kristalizacije. Područje iznad krivulje prezasićenosti je nestabilno područje u kojem dolazi do spontane nukleacije jer je osigurana dovoljno velika pokretačka sila. Između te dvije krivulje nalazi se metastabilna zona unutar koje je mala promjena dovoljna za promjenu stanja. Metastabilna zona je područje u dijagramu topljivosti ograničeno krivuljom zasićenosti i krivuljom prezasićenosti u određenim uvjetima u kojima je otopina u stanju slabe ravnoteže. Širina metastabilne zone je vrlo važan parametar koji utječe na svojstva produkata nastalih kristalizacijom (veličina, raspodjela i oblik kristala)<sup>6</sup>. Pri dobivanju kokristala važno je postići prezasićenost s obzirom na obje komponente, što je često velik problem s obzirom na ogromne razlike u topljivosti između tvari kojoj se topljivost nastoji povećati i njenog koformera<sup>4</sup>.

## 2.4. Nukleacija

Nukleacija je drugi korak u procesu kristalizacije iz otopine i podrazumijeva nastajanje primarnih nukleusa, koji će služiti kao centri za rast kristala. Da bi došlo do stvaranja stabilnih nukleusa (centara kristalizacije) faznom promjenom, nastali nukleusi moraju narasti do kritične veličine koja je definirana slobodnom (exces) Gibbsovom energijom koja predstavlja zbroj površinske i volumne Gibbsove energije čestice. Kritični radijus je mjera kritične veličine nukleusa i odgovara maksimumu na krivulji ukupne Gibbsove energije. Svi nukleusi manji od kritične veličine će se otapati jer je to energetski povoljniji proces, dok će oni veći nastaviti rasti<sup>6</sup>.



*Slika 5.* Kritična veličina nukleusa

Nukleacija u procesu dobivanja kokristala uvelike je kontrolirana prethodnim korakom, odnosno postizanjem prezasićenosti. Dok u procesu kristalizacije jedne komponente širina metastabilne zone definira veličinu i količinu primarnih nukleusa koji će nastati, u kokristalizaciji nukleacija podrazumijeva više kompetitivnih mehanizama kristalizacije s obzirom na mogućnosti povezivanja molekula na razne načine.



Prevelika postignuta prezasićenost s obzirom na koformer koji je skoro uvijek topljiviji od molekule s kojom kokristalizira može izazvati u procesu nukleacije stvaranje primarnih nukleusa kristala koformera, što na kraju procesa dovodi do stvaranja zasebnih kristala koformera i kristala molekule koja je s njime trebala stvarati kokristal<sup>6,3,4</sup>.

## 2.5. Rast kristala

Do rasta kristala dolazi ukoliko postoji pokretačka sila kao rezultat odstupanja od ravnoteže i slijedi nakon nukleacije. Brzina rasta kristala ovisi prvenstveno o vrsti tvari koja kristalizira. Na brzinu rasta utječu temperatura, tlak, sastav otopine, stupanj prezasićenosti, uvjeti strujanja u kristalizatoru, priroda površine kristala te prisutnost aditiva (pomoćne komponente). Poznavanjem brzine rasta kristala može se predvidjeti vrijeme trajanja procesa i veličina kristalizatora. Porastom temperature i stupnja prezasićenosti (ali ne u prevelikoj mjeri da ne bi došlo do dodatne nukleacije) raste i brzina rasta kristala. Što se tiče intenziteta miješanja, postoji optimalna brzina vrtnje miješala nakon koje više nema utjecaja na brzinu rasta. Dakle, pri većim intenzitetima miješanja veća je i brzina rasta kristala zbog povoljnijih hidrodinamičkih uvjeta. Smatra se da je pri optimalnoj brzini vrtnje miješala postignuta minimalna debljina graničnog sloja koji je odgovoran za prijenos tvari. Tijekom rasta kristala razvijaju se glatke plohe ali i plohe različitog stupnja nesavršenosti, što onda utječe na brzinu rasta kristala. Važno je napomenuti da svaka ploha kristala raste svojom brzinom ovisno o uvjetima provedbe procesa, iako su sve plohe izložene istim uvjetima rasta. To u konačnici utječe na vanjski oblik kristala. Brzina rasta kristala izražava se kao linearna i masena brzina rasta, koje se uz poznati faktor oblika kristala mogu preračunati jedna u drugu:

$$R_g = \frac{1}{A} \frac{dm}{dt} = 3 \frac{\alpha}{\beta} \rho G = 3 \frac{\alpha}{\beta} \rho \frac{dL}{dt} \quad (4)$$

Obzirom da tijekom kristalizacije dolazi do istovremenog prijenosa tvari i topline moraju se uzeti u obzir sljedeći stupnjevi:

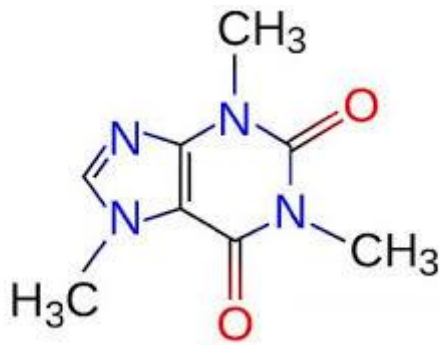
- Prijenos tvari iz mase otopine do graničnog sloja uz površinu kristala
- Prijenos tvari kroz granični sloj do površine materijala (ugradnja u kristalnu rešetku)
- Oslobađanje topline kristalizacije

Koji će od navedenih procesa definirati brzinu kristalizacije ovisi o njihovim brzinama. Najsporiji proces ograničava brzinu rasta kristala<sup>6</sup>.

## 2.6. Heterosinton i forme kofeina i maleinske kiseline

### *Kofein*

Kofein (1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion (IUPAC), trimetilksantin) je alkaloid ksantina koji se nalazi u listovima, sjemenkama i plodovima biljaka, poput kave i guarane. Djeluje kao stimulans, te tako privremeno odgađa umor i pospanost.

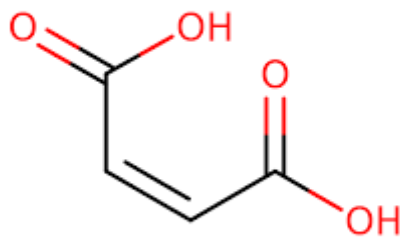


**Slika 6.** Molekulska struktura kofeina

Topljivosti kofeina u vodi je pri sobnoj temperaturi 2g/100 mL, slabo je bazičan i akiralna je molekula<sup>8</sup>.

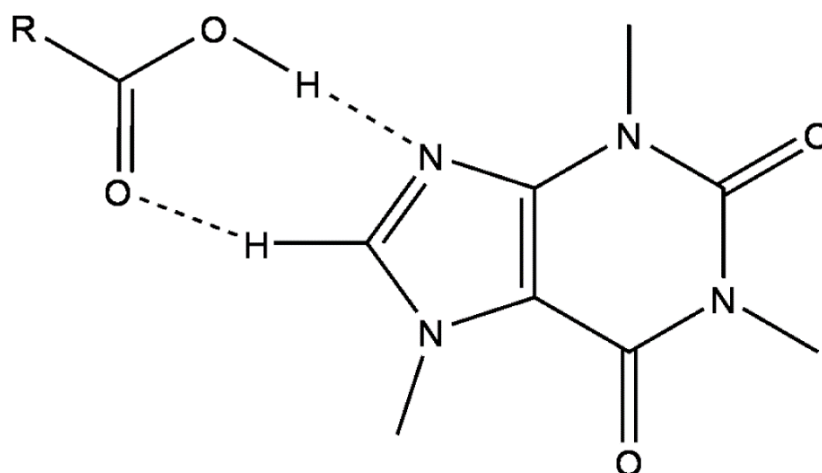
### *Maleinska kiselina*

Maleinska kiselina ili cis-but-dienska kiselina je organska karboksilna kiselina sa dvije karboksilne grupe. Izrazito je polarna molekula pa joj je topljivost u vodi pri sobnoj temperaturi 47,9 g/100 mL<sup>9</sup>.



**Slika 7.** Molekulska struktura maleinske kiseline

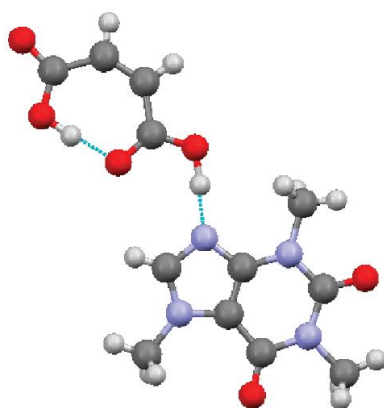
Ove dvije molekule mogu stvarati heterosinton preko karboksilnih grupa maleinske kiseline i dušika i vodika tako što se povezuju vodikovim vezama kao što je prikazano na slici.



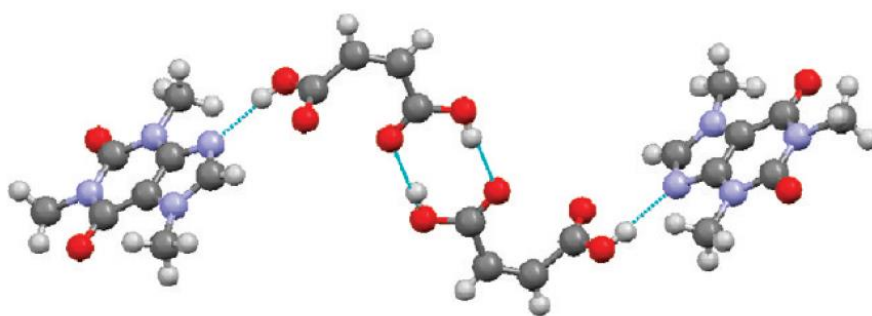
*Slika 8.* Heterosinton karboksilne kiseline i kofeina.

Na dušiku je lokaliziran negativni naboj i on ga dijeli s vodikom na karboksilnoj grupi djelujući kao slaba baza, dok je vodik do dušika u kofeinu slabo kisel te se vodikova veza stvara pomoću lokaliziranog negativnog naboja koji dolazi od kisika iz karboksilne grupe. Ovaj heterosinton je vrlo stabilan s obzirom na jačinu vodikove veze između N-7 i vodika karboksilne grupe i jasno se vidi njegova dominacija nad homosintonima maleinske kiseline i kofeina<sup>10</sup>.

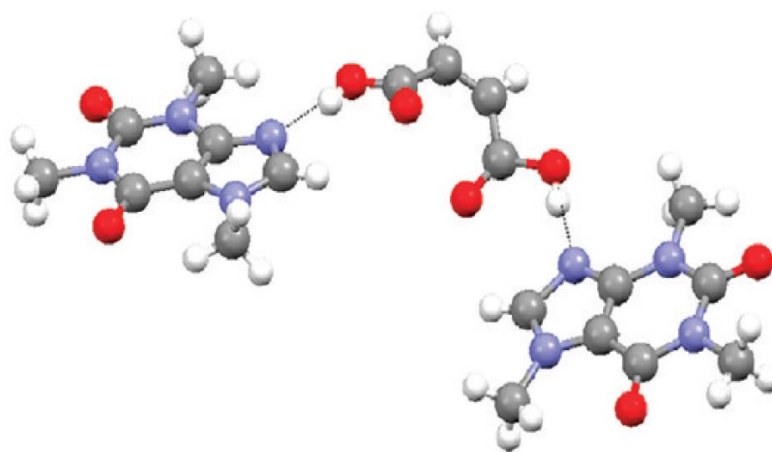
Ovaj kokristal može tvoriti rešetke iz tri različite građevne jedinice (*slika 9,10,11*)<sup>7</sup>.



*Slika 9.* Struktura 1:1 FI.



*Slika 10.* Struktura 1:1 FII.



*Slika 11.* Struktura 2:1.

## 2.7. Primjena ultrazvuka u kristalizaciji

Ultrazvučna obrada je primjena ultrazvučnih valova u frekvencijskom području većem od 20kHz, što je veće od gornje granice ljudske čujnosti. Ultrazvuk se svrstava u valove visokog intenziteta, a koristi se najčešće u prehrambenoj industriji i medicini. U području 20-40 kHz, ultrazvuk ima korisne fizikalne učinke poput kavitacije, a na nižim frekvencijama korisne kemijske učinke. Ultrazvuk u kokristalizaciji kao trofaznoj ravnoteži dramatično može utjecati na širinu određenih područja, pa se smatra da ima velik potencijal za primjenu u kokristalizaciji iz otopine<sup>4,11</sup>.

Ultrazvučna kristalizacija koristi energiju ultrazvuka najčešće u fazi nukleacije za kontrolu kristalizacije. Ultrazvuk se prenosi kao niz kompresijskih i ekspanzijskih (prorijedenih) ciklusa. Ekspanzijski ciklus povećava molekularnu udaljenost prevladavanjem međumolekulskih interakcija u kapljevinu i stvara šupljine koje dalje rastu stvarajući najčešće nestabilne kavitacijske mjehuriće. Mjehurići se brzo raspršuju u mlazu sa zvučnim poljem i ostalim mjehurićima zbog interakcijskih sila molekula u otapalu. Velika količina stvorenih kavitacijskih mjehurića ima za posljedicu veliki udarni val energije unutar kapljevine.

Predložena su tri mehanizma koja potiču proces nukleacije i kristalizacije primjenom ultrazvuka:

1. Ispušteni udarni valovi iz mjehurića potiču prijenos tvari i molekularne sudare koji pospješuju povezivanje molekula u stabilne nukleuse
2. Proračivanje koje mjehurići izazivaju pospješuje prijenos tvari
3. Evaporacija s unutarnje površine mjehurića izaziva lokalno hlađenje, što dovodi do velike prezasićenosti i nukleacije dajući mjehurićima sposobnost da djeluju kao centri nukleacije.

Ultrazvučna sonda uobičajeno radi pri niskim frekvencijama (15-25 kHz) jer pri tim uvjetima nije zabilježena bitna promjena u obliku, srednjoj veličini kristala ili raspodjeli veličine. Također, veličina kristala se smanjuje povećanjem snage ultrazvučne sonde<sup>11</sup>.

## 2.8. Metode karakterizacije kokristala

### *Diferencijalna pretražna kalorimetrija*

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je termoanalitička metoda kojom se mjeri razlika toplina uzorka i referentnog materijala potrebna da mu poveća temperaturu, u ovisnosti o temperaturi i vremenu. U drugim riječima, ova metoda mjeri toplinski tok povezan sa strukturom (amorfna, kristalna) i strukturnim svojstvima (prijelazi). Daje kvantitativne i kvalitativne informacije o fizikalnim i kemijskim promjenama materijala i vrlo je pogodna za identifikaciju i karakterizaciju krutina, pa tako i kokristala<sup>12</sup>.

### *Mikroskopske metode*

Mikroskopi se široko koriste u karakterizaciji kristala, pa tako i kokristala, za određivanje topografije kristala i veličine čestica. Osim najosnovnijeg, svjetlosnog mikroskopa, za bolje uvećanje koristi se pretražni elektronski mikroskop koji predočava sliku tako što ju skenira sa zrakom elektrona visoke energije. Elektroni uzajamno djeluju sa atomima uzorka te proizvode signale koji daju informaciju u topografiji površine uzorka<sup>13</sup>.

### *Rendgenska analiza*

Sintetizirani kokristali se najčešće analiziraju pomoću rendgenske difrakcije prašaka (eng. PXRD) zato što ova metoda daje informacije o kristalnoj strukturi, kemijskom sastavu i fizikalnim svojstvima materijala te pomaže u karakterizaciji strukture uzorka. PXRD detektira promjene u kristalnoj rešetci i to ovu metodu čini vrlo korisnom za izučavanje polimorfizma, farmaceutskih soli i kokristalnih faza<sup>12</sup>.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Svrha rada

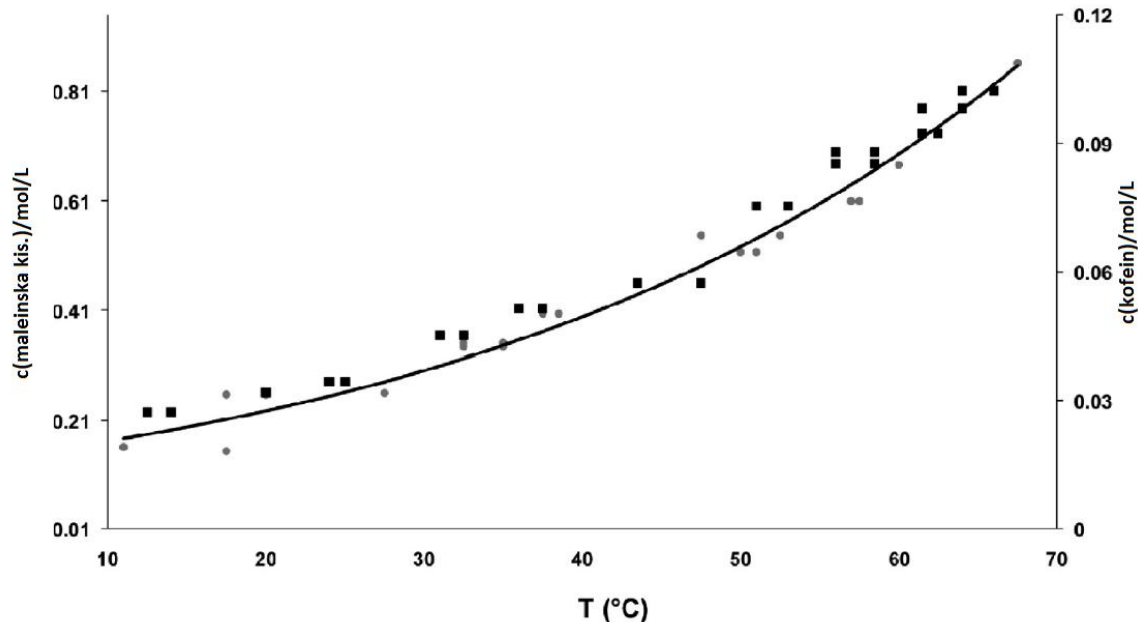
Provedena je šaržna kristalizacija hlađenjem otopine maleinske kiseline i kofeina u etil acetatu, te je istražen utjecaj temperature, početnih koncentracija, prezasićenosti s obzirom na obje komponente te ultrazvuka na nastale produkte.

#### 3.2. Kofein, maleinska kiselina

*Tablica 1.* Fizikalna svojstva kofeina i maleinske kiseline

Naziv	Kofein	Maleinska kiselina
Molekulska formula	$C_8H_{10}N_4O_2$	$C_4H_4O_4$
Temperatura tališta (°C)	235	135
Relativna molekulska masa( $g\text{mol}^{-1}$ )	194,19	116,1
Gustoća ( $g\text{cm}^{-3}$ )	1,23	1,59

#### 3.3 Topljivost kofeina i maleinske kiseline u etil acetatu

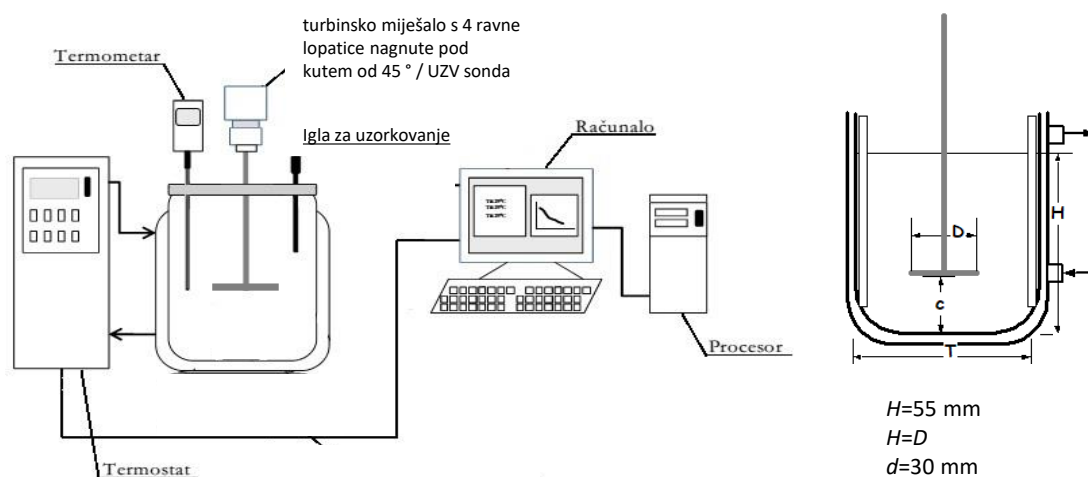


*Slika 12.* Krivulje topljivosti za kofein i maleinsku kiselinu u etil acetatu, eksponencijalna krivulja je provučena za maleinsku kiselinu.



### 3.4 Aparatura

Procesna shema šaržne kristalizacije prikazana je na slici (fali slika). U spremniku su otopljene potrebne količine kofeina i maleinske kiseline (Tablica 2.) u 100 mL etil acetata, a zatim termostatirane na potrebne temperature zasićenosti (35 °C ili 55°C). Ako je nakon 30 minuta otopina i dalje sadržavala neotopljene komponente, prije početka hlađenja otopina se brzo profiltrirala kroz lijevak s filter papirom u čašu te vratila u spremnik. Nakon postizanja temperature zasićenosti, namješta se linearna brzina hlađenja otopine,  $BH = 20 \text{ } ^\circ\text{C h}^{-1}$ , te brzina vrtnje mješalice,  $n = 385 \text{ min}^{-1}$ . Strujanjem vode iz termostata kroz dvostruku stijenku kristalizatora kontrolira se temperatura otopine. Ako se primjenjivao ultrazvuk, nakon što je temperatura otopine snižena na 20 °C, miješanje se prekida i u kristalizator se stavlja sonda, te se otopina tretira ultrazvukom amplitude zračenja 30% 5 minuta. Otopina se zatim ponovno miješa i hladi do 5 °C i na toj temperaturi ostaje termostatirana još 60 minuta.



Slika 13. Aparatura za provođenje šaržne kristalizacije.

**Tablica 2.** Procesni uvjeti u eksperimentima.

Broj okretaja mješalice,  $n = 385 \text{ min}^{-1}$

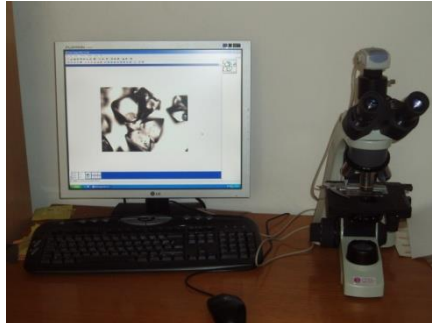
Volumen etil acetata,  $V = 100 \text{ mL}$

Linearna brzina hlađenja otopine,  $BH = 20 \text{ }^\circ\text{C h}^{-1}$

Broj uzorka	$C_{\text{kofeina}}$ ( $\text{mol l}^{-1}$ )	$C_{\text{maleinska kis.}}$ ( $\text{mol l}^{-1}$ )	Temperaturni gradijent ( $^\circ\text{C}$ )	Ultrazvuk	Otopina zasićena sa	Očekivana forma
1	0,047	0,350	35/5	Ne	Obje komponente	1:1 PI
2	0,080	0,579	55/5	Ne		
3	0,073	0,525	55/5	Ne	Nijednom komponentom	1:1 PII
6	0,073	0,525	55/5	Da		
4	0,089	0,543	55/5	Ne	Kofeinom	2:1
5	0,089	0,543	55/5	Da		

### 3.5 Uređaji za karakterizaciju nastalih kokristala

#### 3.5.1. Oblik kristala



*Slika 14. Svjetlosni mikroskop Motic BA200*

Svjetlosnim mikroskopom (*Motic BA200*) (*slika 14.*), spojenim na računalo, analiziran je oblik dobivenih kristala tijekom i nakon provedbe procesa, a uz pomoć software-a *Motic Plus* određene su dužina ( $L_a$ ) i širina ( $L_b$ ) kristala te njihov omjer ( $L_a/L_b$ ). Korištena uvećanja su 40 i 100 puta.

#### 3.5.2. Određivanje topografije površine kristala

Pretražnim elektronskim mikroskopom *Tescan Vega III Easyprobe* (*slika 15.*) određena je topografija površine suhih kristala.



*Slika 15. Pretražni elektronski mikroskop Tescan Vega III Easyprob*

### 3.5.3. Određivanje strukture kristala

Struktura kristala određena je rendgenskom analizom pomoću XRD uređaja *Shimadzu XRD-6300* (*slika 16.*). XRD uređaj se u prvom redu koristi za određivanje kristalne strukture materijala te kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Pri ozračivanju materijala rendgenskim zračenjem dolazi do difrakcije rendgenskih zraka koja ovisi o veličini i orijentaciji kristala odnosno strukturi. Uređaj je osjetljiv pa stoga moraju biti strogo definirani uvjeti rada.



*Slika 16.* Uređaj za rendgensku difrakciju praha Shimadzu XRD

### 3.5.4. Određivanje toplinskih svojstava

Ispitivanja toplinskih svojstava praškastih materijala kristala i kokristala kofeina i maleinske kiseline provedeno je diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom na uređaju MettlerToledo DSC 822<sup>e</sup> (*slika 17.*). Uzorci mase ~ 10 mg, stavljeni su u aluminijske posudice i hermetički zatvoreni. Mjerenje je provedeno u struji dušika 60 cm<sup>3</sup>/min, pri brzini zagrijavanja 10 °C/min u temperaturnom području od 0 °C do 270 °C.

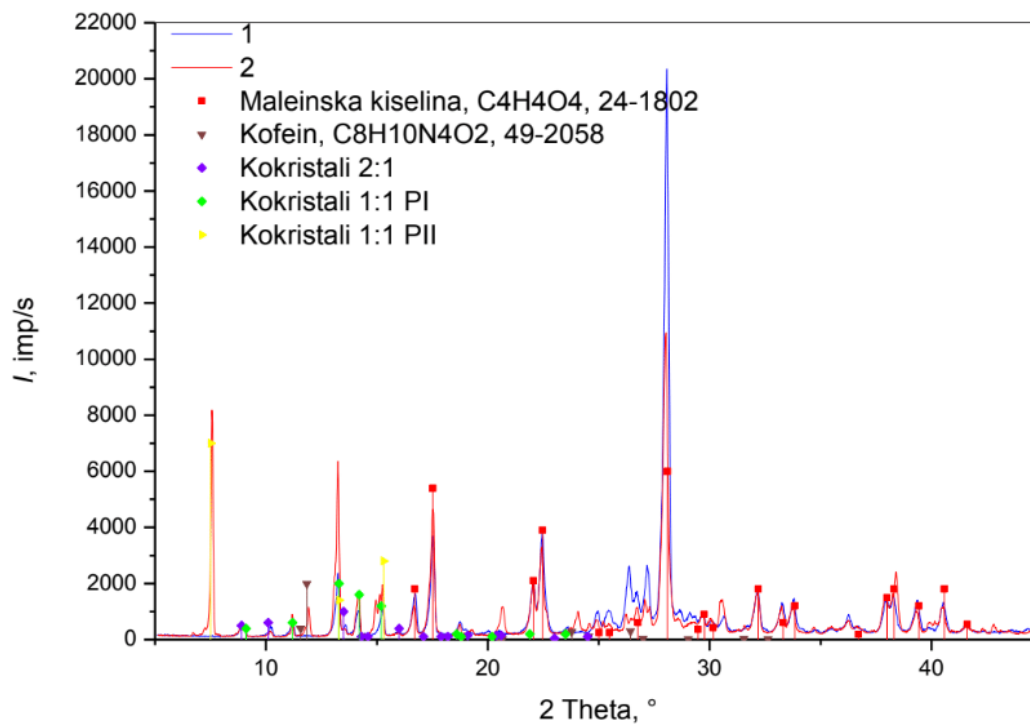


*Slika 17.* DSC uređaj MettlerToledo DSC 822<sup>e</sup>

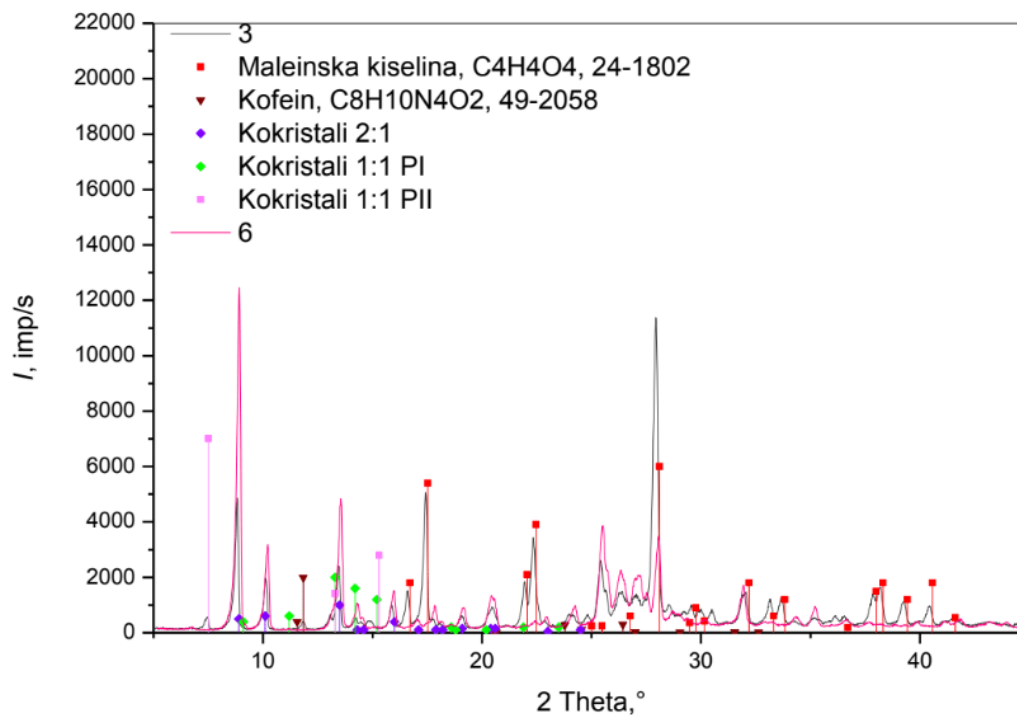
## 4. REZULTATI

Rezultati su prikazani u parovima usporednih uzoraka 1 i 2, 3 i 6 te 4 i 5.

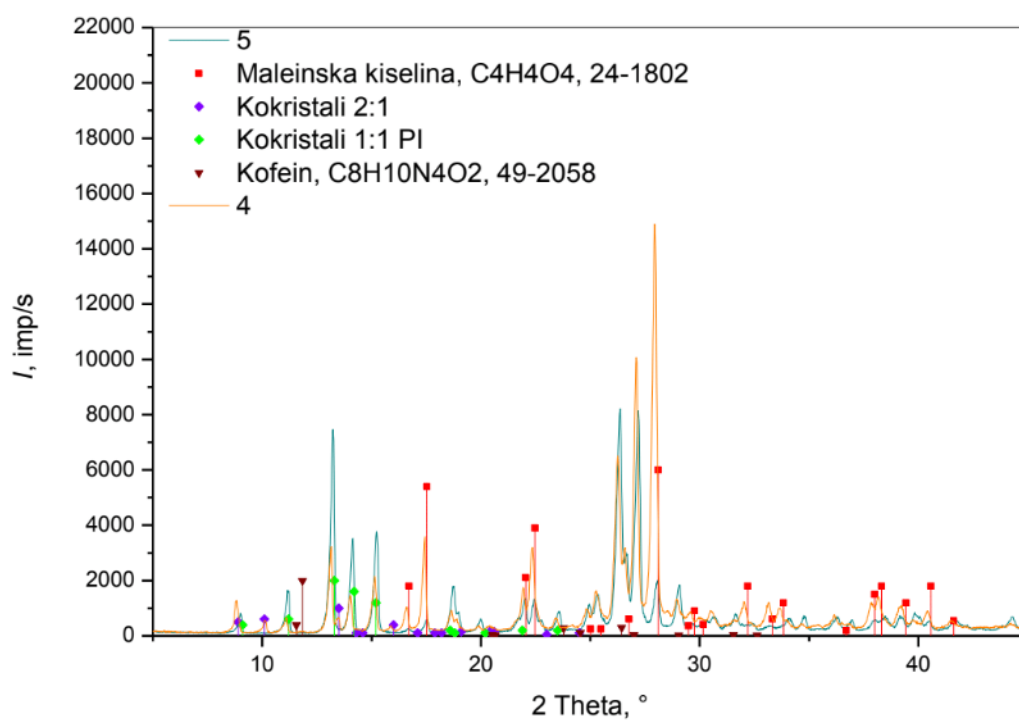
### 4.1 Rendgenska difrakcija



Slika 18. Difraktogram uzoraka 1 i 2.



Slika 19. Difraktogram uzoraka 3 i 6.

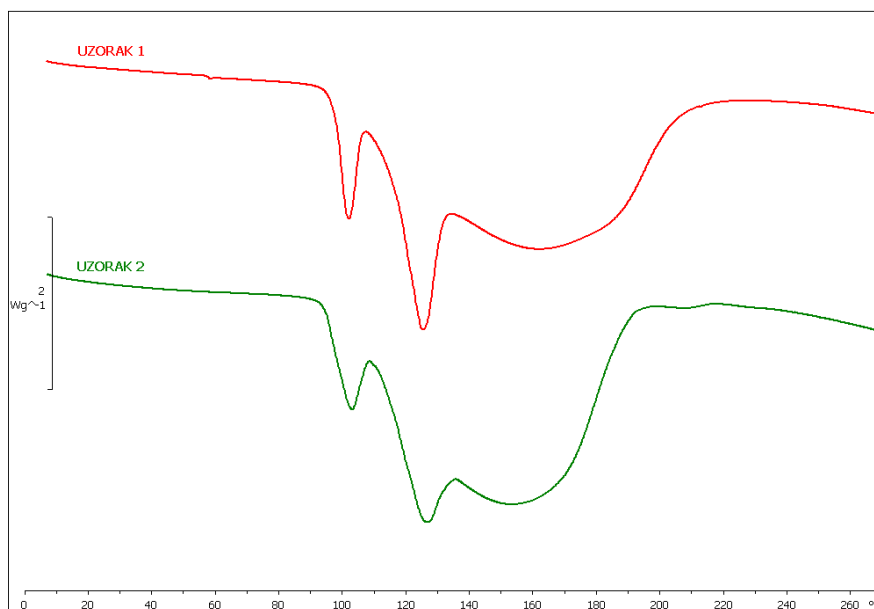


*Slika 20.* Diraktogram uzoraka 4 i 5.

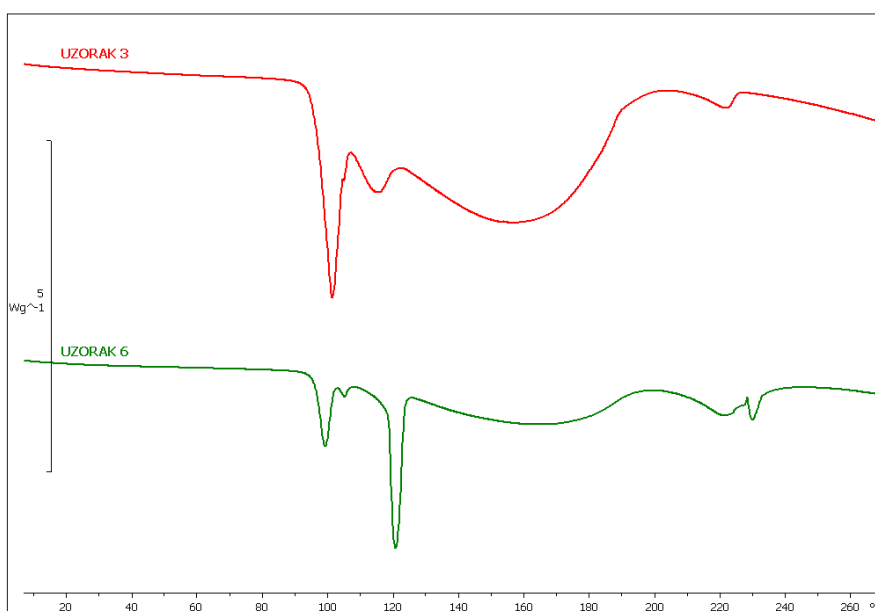
## 4.2. DSC Termogrami

Tablica 3. Literaturni podaci za točke tališta na DSC-u

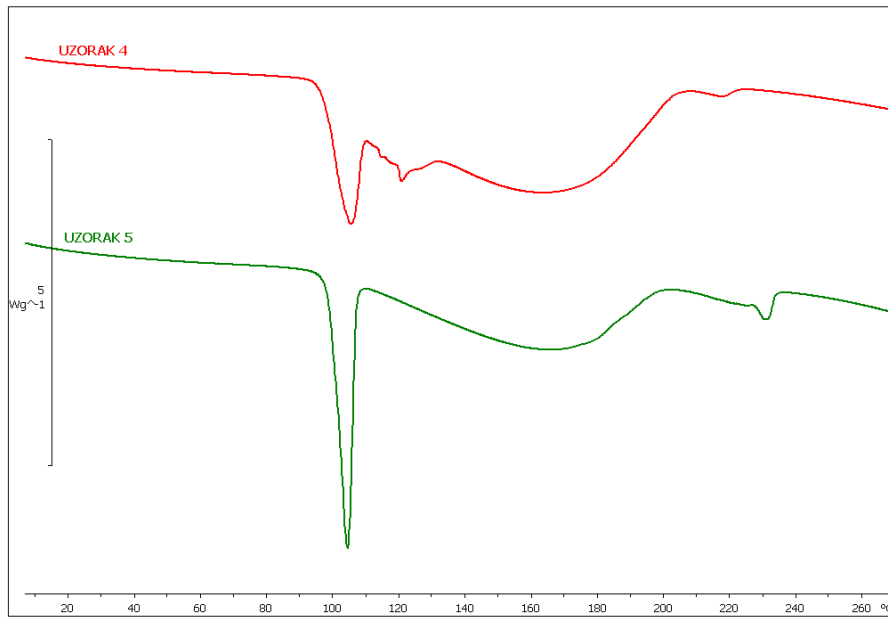
Forma	1:1 PII	1:1 PI	2:1
Temperatura taljenja/ °C	99	105	119



Slika 21. DSC termogram uzoraka 1 i 2, prikaz toplinskog toka u ovisnosti u temperaturi uzorka.



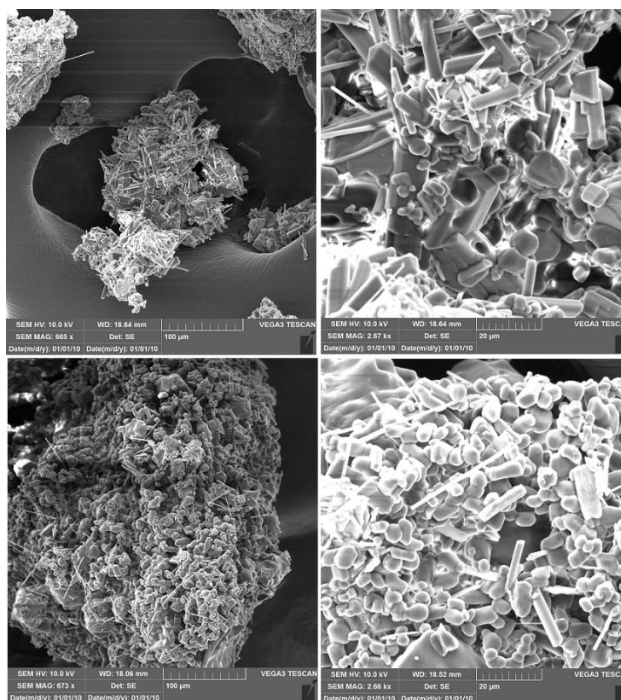
Slika 22. DSC termogram uzoraka 3 i 6, prikaz toplinskog toka u ovisnosti o temperaturi uzorka.



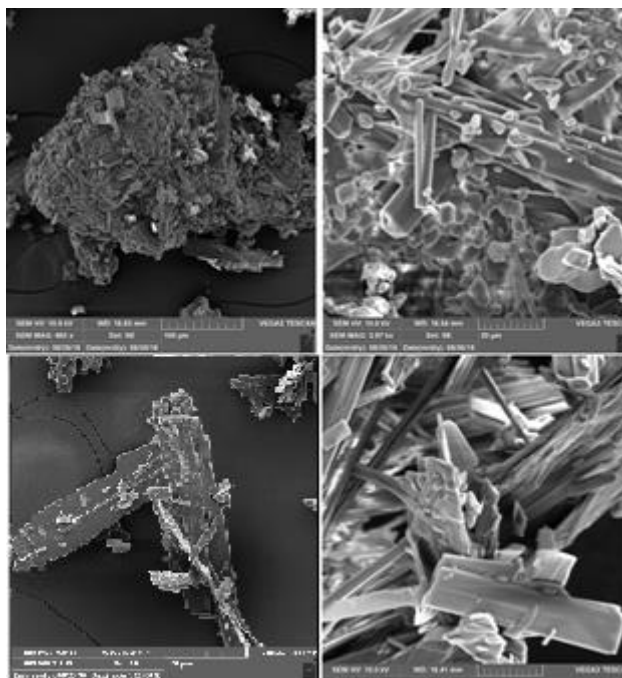
**Slika 23.** DSC termogram uzoraka 4 i 5, prikaz toplinskog toka u ovisnosti u temperaturi uzorka.



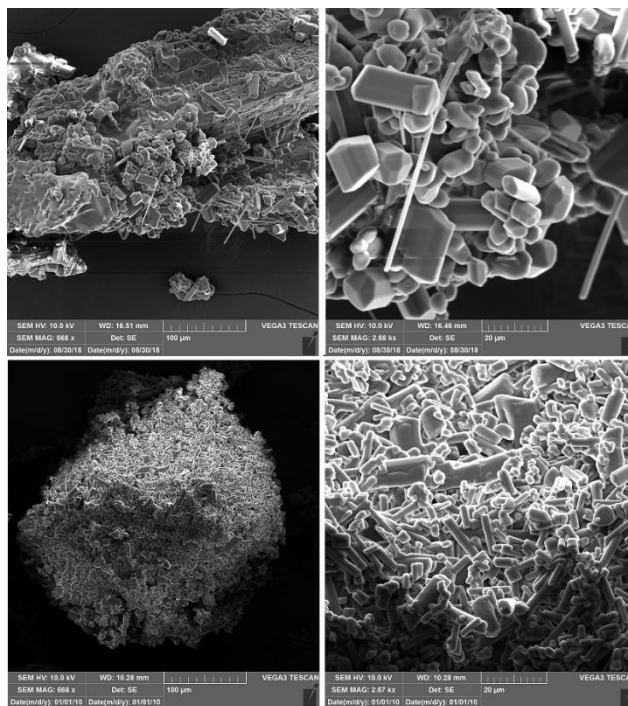
### 4.3 Topografija i oblik kristala



*Slika 24.* Mikrografije uzoraka 1 i 2 nakon kristalizacije dobivene elektronskim pretražnim mikroskopom pri uvećanju od 500 (lijevo) i 2000 (desno) puta.



*Slika 25.* Mikrografije uzoraka 3 i 6 nakon kristalizacije dobivene elektronskim pretražnim mikroskopom pri uvećanju od 500 (lijevo) i 2000 (desno) puta.



**Slika 26.** Mikrografije uzoraka 4 i 5 nakon kristalizacije dobivene elektronskim pretražnim mikroskopom pri uvećanjima od 500 (lijevo) i 2000 (desno) puta.

## 5. RASPRAVA

Provedena je šaržna kristalizacija maleinske kiseline i kofeina hlađenjem iz otopine, uz različite procesne uvjete, te su prikazani usporedbeni rezultati za uzorke 1 i 2, 3 i 6 te 4 i 5 na rendgenskim difraktogramima, DSC termogramima te mikrografijama snimljenim na SEM-u.

Na *slici 18*. prikazan je difraktogram uzoraka 1 i 2, zasićenih s obzirom na obje komponente samo pri različitim temperaturama (35 °C i 55°C). Ono što se odmah može vidjeti je veliki udio maleinske kiseline u uzorku 1 što je normalno s obzirom na činjenicu da je maleinska kiselina, sa svojom topljivosti od 0,579 molL<sup>-1</sup> u etil acetatu (pri 55°C) puno topljivija od kofeina koji ima topljivost 0,080 molL<sup>-1</sup> (pri 55°C) i za jednak pad temperature ona će se izolirati u puno većoj količini. Nadalje u uzorku 1 vidi se prisutnost kokristala forme 1:1 PI i 2:1, dok kofeina ni nema. Krivulja uzorka 2 pokazuje i dalje najveći pik na maleinskoj kiselini, ali otprilike duplo manji od uzorka 1. Vidi se jasna prisutnost formi 1:1 PI i 1:1 PII, te 2:1 u tragovima. U ovom uzorku postojan je i kofein. Može se zaključiti da je povišenjem temperature došlo do izdvajanja i forme 1:1 PII, ali se kofein nije u potpunosti potrošio na formiranje kokristala. Pri nižoj temperaturi iskristaliziran je veći udio maleinske kiseline.

Na *slici 19*. prikazan je difraktogram uzoraka 3 i 6, početne koncentracije otopine bile su ispod krivulja zasićenja za obje komponente. Oba uzorka većinski sadrže kokristale formi 2:1 i 1:1 PII, kokristale forme 1:1 PI u tragovima, znatan udio maleinske kiseline te nešto kofeina. Uzorak broj 6 sadrži veći udio kokristala forme 2:1 od uzorka 3, je vjerojatno biti posljedica korištenja ultrazvuka prije početka nukleacije.

Na *slici 20*. prikazan je difraktogram uzoraka 4 i 5. U uzorku 4 vidi se prisutnost 1:1 PI i 2:1 forme, dok se u uzorku 5 nalaze samo kristali forme 1:1 PI. Obadva uzorka sadrže određenu količinu maleinske kiseline, te kofein.

*Slika 21*. prikazuje termograme uzoraka 1 i 2. Prema literaturnim podacima<sup>7</sup> forma 1:1 PII ima točku tališta na 99 °C, te je na termogramu prvi pik taljenja od 101,37 °C mogle bi se zaključiti da prema točki tališta više odgovara 1:1 PII formi, ali kako je rendgen već pokazao da se ta forma ne nalazi u uzorku 1, zaključuje se da ovaj pik pripada sljedećoj najstabilnijoj formi, 1:1 PI. Ovaj pomak krivulje te svi budući, mogu se objasniti činjenicom da su literaturni podaci točkova tališta eksperimentalno određeni miješanjem čistih formi kokristala

te njihovim uzorkovanjem i daljnjom analizom, dok su u ovim eksperimentima nastajale razne forme u jednako vrijeme te su se kokristali nekih formi manjih udjela inkludirali unutar onih većeg udjela. Takva struktura uzorka mijenja svojstva poput geometrije i ostalih parametara koji utječu na prijenos topline što može dovesti do nepoklapanja točaka tališta određenih formi s literaturnim podacima. Koliko god da je DSC vrlo važna i primjenjiva tehnika za karakterizaciju kokristala, XRD je ipak pouzdaniji što se tiče identifikacije. Osim 1:1 PI forme, u termogramu se vidi i prisutnost forme 2:1 sa pikom taljenja na 124,04 °C, maleinske kiseline, dok kofeina nema što se slaže sa difraktogramom za ovaj uzorak. Uzorak 2 sadrži 1:1 PII formu pri piku taljenja od 102,34 °C, te neku formu pri piku taljenja od 124,87 °C, koji najbolje odgovara formi 2:1. Rendgen je već pokazao da je 2:1 forma u ovom uzorku u manjoj količini, te je najvjerojatnije da je ovaj pik smjesa forme 1:1 PI s kokristalima 2:1 u manjoj količini, te joj je zato talište toliko visoko. Isto tako treba napomenuti da zbog velike količine kristala maleinske kiseline, njen pik interferira sa skoro svim ostalima, te je ona najvjerojatnije glavni razlog zbog slabog slaganja ovih točaka tališta sa literaturnim podacima.

Usporedbom ova dva termograma vidi se da je većina kokristala u uzorku 2 prešla u nešto nestabilnije stanje, jer se pojavljuje 1:1 PII koja je najnestabilnija forma, a skoro nestaje forma 2:1, što pokazuje utjecaj početne temperature, to jest relativnih koncentracija kofeina i maleinske kiseline na konačnu faznu ravnotežu. Ako se pogleda *slika 24*, primjećuje se da nastali kristali u uzorku 1 i 2 nisu toliko različiti u strukturi, jer je kristalizacija oba uzorka provedena na jednak način što se tiče brzine vrtnje miješala i brzine hlađenja.

*Slika 22* prikazuje termogram uzoraka 3 i 6. Na krivulji uzorka 3 prepoznaje se forma 1:1 PII sa pikom taljenja na 100,49 °C, koja unutar sebe ima još jedan mali pik forme 1:1 PI sa maksimumom taljenja 106,00 °C, te forma 2:1 sa pikom taljenja na 114,00 °C, velika količina maleinske kiseline, te kofein. Uzorak 6, tretiran ultrazvukom, pokazuje pik sa dva maksimuma; formu 1:1 PII sa maksimumom taljenja na 98,93 °C te formu 1:1 PI sa maksimumom taljenja na 104,97 °C. Forma 1:1 PII na rendgenu nije dokazana, ali kako se radi o najnestabilnijoj formi, ona je vjerojatno prešla u stabilniju formu 1:1 PI. Slijede pikovi za maleinsku kiselinu, te opet dvostruki pik, vjerojatno kofeina na 219,09 °C i 229,73 °C. Ako se pogleda na *sliku 22*, jasno se vidi da je djelovanjem ultrazvuka na uzorak 6 postignuta uža raspodjela veličina čestica zbog oštrijih pikova, i potaknuta je takva nukleacija, gdje su kasnije kristali, odnosno zasebne forme rasle na svojim primarnim nukleusima bez ugrađivanja kokristala unutar kristala maleinske kiseline. Ovo se može potvrditi činjenicom

da je površina preklapanja u termogramu uzorka 6 drastično manja od površine preklapanja u uzorku 3, i maksimumi tališta kokristala skoro pa bez odstupanja odgovaraju literaturnim podacima, te *slikom 25.* gdje se lijepo vidi da kristali nisu aglomerirani te je puno oštrije definirana njihova geometrija. Još jedna činjenica koja potkrjepljuje ovu tvrdnju je da se u uzorku 3 unutar pika forme 1:1 PII pojavljuje vrlo mali pik forme 1:1 PI, koji se u uzorku 6 skoro pa kompletno odvaja kao zaseban pik. Primjenom ultrazvuka postiglo se dobro razdvajanje i zaseban rast kristala tijekom hlađenja.

Na *slici 23.* prikazani su termogrami uzoraka 4 i 5. Na uzorku 4 prepoznaje se forma 1:1 PI sa maksimumom tališta 104,48 °C, te forma 2:1 sa maksimumom u 119,98 °C. Uzorak 5 pokazuje prisutnost forme 1:1 PI Uzorak 5 tretiran je ultrazvukom i opet se jasno vidi učinak ultrazvuka na otopinu, gdje su raspodjele veličina kristala puno uže i slabije preklapanje površina ukazuje na to da u ovom kristalnom sustavu nije bilo inkluzije, osim što u uzorku 5 dolazi do nestanka 2:1 faze i neznatnog povećanja koncentracije kofeina. Ova pojava je vjerojatno izazvana time što je otopina prezasićena s kofeinom, za razliku od ostalih uzoraka kako bi se izoliralo što više kofeina u fazi nukleacije u svrhu stvaranja primarnih nukleusa kokristala forme 2:1. Na *slici 26.* prikazani su mikrografi ovih uzoraka i vidi se utjecaj ultrazvuka na samu kristalizaciju, jer su nastali kristali vrlo sitni i ima ih puno. Ultrazvuk je vjerojatno svojim djelovanjem dao kofeinu dovoljnu energiju da iskristalizira u čistom obliku, što se vidi jer se u uzorku 5 koncentracija kofeina povećala. Usporedbom utjecaja ultrazvuka na uzorke 5 i 6, dalo bi se zaključiti da ultrazvuk drastično mijenja faznu ravnotežu, što su potvrdili Aher S. i sur.<sup>5</sup>, i to na način da daje kristalima dovoljnu energiju da iskristaliziraju u što stabilnijem obliku moguće. Uzorci 3 i 6 bili su nezasićene otopine na početku hlađenja jer im je svrha bila stvoriti nukleuse pogodne za stvaranje kokristalne forme 1:1 PII koja je najnestabilnija. Primjenom ultrazvuka u uzorku 6 pojavljuje se puno veći udio forme 2:1, te znatna količina kofeina, što znači da je u ovom uzorku, gdje se očekivalo poprilično malo kofeina s obzirom na njegovo nezasićenje, ultrazvuk ipak uspio potaknuti njegovo izoliranje i stvaranje stabilnije forme. Naime, u uzorku 5 otopina je već bila dostatno zasićena kofeinom jer se pokušavalo dobiti što više njegovih nukleusa kako bi se mogli formirati nukleusi najstabilnije faze. U ovom slučaju ultrazvuk je svojim djelovanjem dao dovoljnu energiju da razbije 2:1 fazu, što se vidi po njenom nestanku u uzorku 5, i pojavi većeg pika kofeina s većim talištem. Ova pojava ukazuje na to da je u procesu rane nukleacije zbog ultrazvuka došlo do preraspodjele vrste primarnih nukleusa, 2:1 forma se raspala na formu 1:1 PI, a preostali kofein je iskristalizirao u još stabilnijem obliku.

## 6. ZAKLJUČAK

- U postupku šaržne kristalizacije hlađenjem sustava kofein i maleinska kiselina iz etil acetata dobivene su sve poznate forme kokristala.
- Povećanjem temperature zasićenosti, kristaliziraju nestabilniji oblici.
- Pri istim temperaturama zasićenja dobiveni su kokristali forme PII za nezasićenu otopinu, forme PI za zasićenu obzirom na obje komponente te formu 2:1 iz otopine prezasićene kofeinom.
- Djelovanjem ultrazvuka na otopinu tijekom nukleacije dovodi se energija u sustav što rezultira stvaranjem stabilnijih formi u konačnoj faznoj ravnoteži.
- Izoliranu formu kokristala 1:1 PI dobivena je djelovanjem ultrazvuka na otopinu prezasićenu kofeinom.

## 7. POPIS SIMBOLA

- $A$  - površina kristala,  $m^2$   
 $BH$  - brzina hlađenja,  $^{\circ}C\ h^{-1}$   
 $c$  - molna koncentracija,  $mol\ L^{-1}$   
 $\Delta c$  -apsolutna prezasićenost,  $mol\ L^{-1}$   
 $G$  -linearna brzina rasta,  $ms^{-1}$   
 $\Delta G_{krit.}$  - Gibbsova energija kritičnog nukleusa,  $kJ\ mol^{-1}$   
 $L$  - linearna dimenzija kristala,  $m$   
 $m$  - masa kristala,  $kg$   
 $R_g$  - maseni fluks  $kg\ m^{-2}\ s^{-1}$   
 $S$  - Stupanj zasićenosti  
 $T$  - temperatura,  $^{\circ}C$   
 $t$  - vrijeme,  $s$   
 $V$  - volumen,  $mL$

### Grčka slova

- $\alpha$  - volumni faktor oblika  
 $\beta$  - površinski faktor oblika  
 $\rho$  - gustoća,  $kg\ m^{-3}$   
 $\sigma$  - relativna prezasićenost

## 8. POPIS LITERATURE

1. Steed, J. W., *The role of co-crystals in pharmaceutical design*, *Trends in pharmacological sciences.*, 34 (3), pp. 185-193 (2013).
2. Kavuru Padmini, *Hierarchy of Supramolecular Synthons in the of Design Multi-Component Crystals*, University of South Florida, 2012.
3. Gagnière, E., Mangina, D., Puela, F., Rivoire, A., Monnier, O., Garcia, E., Klein; J.P., *Formation of co-crystals: Kinetic and thermodynamic aspects*, 311 (9). pp. 2689-2695 (2009).
4. Aher S., Dhumal R., Mahadik K., Paradkar A., York P.; *Ultrasound assisted cocrystallization from solution (USSC) containing a non-congruently soluble cocrystal component pair: Caffeine/maleic acid*, 41 (5). p.p. 597-602 (2010.)
5. Ross S. A. ,Lamprou D. A. and Douroumisa D. , *Engineering and manufacturing of pharmaceutical co-crystals: A review on solvent-free manufacturing technologies* , *Chem. Commun.*, 52, 8772-8786 (2016.)
6. Dr. Sc. Aleksandra Sander, red. prof.; *JEDINIČNE OPERACIJE U EKOINŽENJERSTVU*, Zagreb 2011.
7. Leysens Tom, Springuel Geraldine, Montis Riccardo, Candoni Nadin and Veessler Stéphane; *Importance of Solvent Selection for Stoichiometrically Diverse Cocrystal Systems: Caffeine/Maleic Acid 1:1 and 2:1 Cocrystals*, *Cryst. Growth Des.*, 12 (3), pp 1520–1530 (2012)
8. A. Shalmashi and F. Golmohammad; *Solubility of caffeine in water, ethyl acetate, ethanol, carbon tetrachloride, methanol, chloroform, dichloromethane, and acetone between 298 and 323 K*, *Latin American applied research*, 40(3). p.p. 283-285 (2010)
9. Record in the GESTIS Substance Database of the Institute for Occupational Safety and Health
10. Wade L. G.; *Organic Chemistry* (8th Edition), 2014.
11. Zamanipoor H. Mohammad, Mancera L. Ricardo; *The emerging application of ultrasound in lactose crystallisation*, *Trends in Food science & Technology* (2014)
12. Jaswanth S Bhandaru, Narender Malothu, and Raghu Rao Akkinepally, *Characterization and solubility studies of pharmaceutical cocrystals of eprosartan mesylate* , *Cryst. Growth Des.*, 15 (3), pp 1173–1179 (2015)
13. Vir Prasad R., Gadekar Rakesh M., Madan Jyotsna R., Thorat Mangesh, P. Sapkale Anita and Kamble Mayur P., *Pharmaceutical Cocrystallization : A review*, 1(3). p.p. 725-736 (2012)



