

TRABAJOS ORIGINALES ORIGINAL WORKS

Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol

Alginate microparticles containing paracetamol

RODRÍGUEZ-LLIMÓS AC, CHIAPPETTA D, SZÉLIGA ME, FERNÁNDEZ A, BREGNI C*

Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (1113) Buenos Aires, Argentina. *e-mail: cbregni@ciudad.com.ar

RESUMEN

Micropartículas conteniendo paracetamol (PCT) han sido obtenidas por emulsificación/gelificación interna de una solución de alginato dispersada en un aceite vegetal. La morfología y la distribución de tamaño de partícula fueron determinadas. Se estudió la concentración de ión calcio resultando ser un parámetro crítico en la producción de las micropartículas. Se observó que el incremento en la concentración de calcio produce un aumento en el rendimiento total de micropartículas y en el encapsulación de PCT. La técnica desarrollada permite obtener un sistema con características micrométricas óptimas y una mayor eficacia de encapsulación de PCT.

Palabras claves: Alginato. Emulsificación. Gelificación interna. Micropartículas. Paracetamol.

ABSTRACT

Microparticles containing paracetamol (PCT) were formed by emulsification/internal gelation of alginate solution dispersed within vegetable oil. The morphology and size distributions of the microparticles were determined. The calcium ion concentration was studied and it seemed to be a critical parameter in the production of microparticles. It was observed that as the calcium ion concentration was increased, there was seen increased the total particle yield and the drug loading of PCT. The technique allowed to obtain a system with ideal micromeritic characteristics and major entrapment efficiency of PCT.

Key Words: Alginate. Emulsification. Internal gelation. Microparticles. Paracetamol.

INTRODUCCIÓN

Los procesos de microencapsulación son utilizados para obtener sistemas de liberación sostenida o controlada de principios activos. Además, ofrecen la ventaja de enmascarar olores y sabores desagradables, proteger frente a la oxidación, volatilidad o fotosensibilidad, y reducir la acción irritante gastrointestinal de algunos fármacos¹.

En sus orígenes las técnicas de microencapsulación involucraban el uso de solventes orgánicos, lo cual no lo hacía apto para aplicaciones biológicas. En la década de los años 80, sustancias naturales comienzan a ser utilizadas, tales como proteínas (colágeno, gelatina) y polisacá-

INTRODUCTION

Microencapsulation processes are widely used to obtain sustained or controlled drug release systems. In addition, it offers other advantages such as masking unpleasant odors or tastes, protecting easily oxidizable, volatile or photosensitive substances, and reducing gastro-intestinal irritating action of some drugs¹.

In the beginnings, microencapsulation techniques involved organic solvents and, therefore, they were not suitable for biological application. In the 80's, natural substances started to be used, such as proteins (collagen, gelatin) and polysaccharides (agar, calcium alginate, carrageenan), that had good biocompatibility and they allowed

ridos (agar, alginato cálcico, carragenano), los cuales tienen buena biocompatibilidad y han demostrado una rápida incorporación de los principios activos en los sistemas.

Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Ellos son extraídos primariamente de tres especies de algas marrones. Estas incluyen *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*. Otras incluyen *Laminaria japónica*, *Eclonia maxima* y *Lesonia negrescens*. Los alginatos son una familia de polisacáridos lineales no ramificados, conteniendo cantidades variables de ácido (1,4') β -D-mannurónico y de ácido α -L-gulurónico. La composición y extensión de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los alginatos².

Las micropartículas de alginato cálcico son generalmente preparadas por dos métodos³: a – por goteo de una solución de alginato de sodio en una solución de una sal de calcio; b – por gelificación del alginato en una emulsión A/O. Las partículas producidas por el primer método son generalmente grandes y el empleo de una técnica de goteo por jeringa no es aplicable para una escala industrial. La producción de micropartículas por emulsificación puede ser obtenida por gelificación externa o interna. La gelificación externa, donde una sal de calcio soluble es agregada en el seno de una emulsión A/O, es la más estudiada. Sin embargo, el tamaño de partícula no puede ser bien controlado y las partículas tienden a coagular en grandes masas antes de adquirir la consistencia apropiada⁴.

La gelificación interna se basa en la liberación de ión calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio. Esto se lleva a cabo por acidificación en un sistema aceite-ácido soluble, con partición en la fase acuosa del alginato.

Un número de parámetros ha sido estudiado tales como el tiempo de agitación con ácido acético glacial, el tiempo de contacto con el ión calcio, el efecto de ruptura de la emulsión con y sin centrifugación y la concentración de ión calcio.

El objetivo de este trabajo ha sido microencapsular PCT en una matriz de alginato por una metodología simple, y estudiar la influencia de los parámetros antes mencionados en el encapsulacion de principio activo.

to incorporate easily the active principles in the systems.

Alginates are one of the most widely used polymers in microencapsulation. They are extracted primarily from three species of brown algae (kelp). These include *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* and *Macrocystis pyrifera*. Other sources include *Laminaria japónica*, *Eclonia maxima* and *Lesonia negrescens*. Alginates are a family of linear unbranched polysaccharides, which contain varying amounts of 1,4'-linked β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid residues. The composition and extent of the sequences and the molecular weight determine the physical properties of the alginates².

Calcium alginate microparticles are generally prepared by two methods³: a- by dropping sodium alginate solution into a solution of calcium salt; b- by gelification of alginate in W/O emulsion. The particles produced by the first method are generally large and the use of a syringe-droplet technique is not suited for industrial scale-up. The production of microparticles by emulsification can be achieved by external or internal gelation. External gelation, where a soluble calcium salt is added into a W/O emulsion, is the most studied. However, the particle size cannot be easily controlled and the particles tend to coagulate into large masses before hardening properly⁴.

Internal gelation is based on the release of calcium ion from an insoluble complex, in the sodium alginate solution. This is achieved by acidification with an oil-soluble acid, which partitions to the aqueous alginate phase.

A number of parameters were investigated such as stirring time with glacial acetic acid, contact time with calcium ion, effect of breaking the emulsion with/without centrifugation and calcium ion concentration.

The purpose of this research was to microencapsulate PCT in an alginate matrix by a simple method and to study the influence of the parameters mentioned above in drug loading.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Alginic acid with 65-75 % guluronate and 25-35 % mannuronate (Protacid F-120 NM, FMC

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Ácido algínico con 65-75 % guluronato y 25-35 % manuronato (Protacid F-120 NM, FMC BioPolymer); paracetamol, 99,74 % (Parafarm); carbonato de calcio (Parafarm); monooleato de sorbitan (Span® 80, Merck); monooleato de sorbitan polioxietilenado (Tween® 80, Merck); aceite de Canola (Refinerías de Maíz S.A.I.S.F. Argentina); hidróxido de sodio (Baker); ácido acético glacial (Merck); cloruro de calcio dihidratado (Parafarm); fosfato de potasio monobásico (Berna). Todos los materiales fueron utilizados como se recibieron.

Preparación de las micropartículas de alginato

La solución de alginato de sodio (40 ml) se preparó de la siguiente manera: 3,0 g de ácido algínico (*Protacid F-120 NM*) se dispersó en 25 ml de agua destilada. 1,0 g de hidróxido de sodio se disolvió en 15 ml de agua destilada y se adicionó a la dispersión de ácido algínico bajo agitación. 6,0 g de PCT se dispersaron homogéneamente en la solución de alginato. Finalmente, 0,4175 g de carbonato de calcio se dispersaron uniformemente. La solución de alginato resultante se calentó a 60 °C y se adicionó a 200 ml de aceite de Canola, conteniendo 4,84 g de Span® 80, precalentado a 60 °C. El sistema se agitó a 470 rpm durante 15 min (formación de una emulsión A/O). Con agitación constante, se adicionaron 40 ml de aceite de Canola conteniendo 1,7 ml de ácido acético glacial a la emulsión para iniciar la gelificación interna. Luego de un tiempo determinado bajo agitación, las micropartículas pregelificadas se separaron de la dispersión oleosa por mezclado con una solución de cloruro de calcio. Se separaron las fases dejando sedimentar las micropartículas (120 min). El sobrenadante fue descartado, separando las micropartículas por centrifugación. Las mismas se filtraron y lavaron con 200 ml de una solución de Tween® 80 al 1% V/V bajo vacío, y secadas hasta peso constante a 37 °C. Finalmente, se tamizaron para separar por tamaño de partícula (*Tabla 1*).

BioPolymer); paracetamol, 99.74 % (Parafarm); calcium carbonate (Parafarm); sorbitan monooleate (Span® 80, Merck); polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween® 80, Merck); Canola oil (Refinerías de Maíz S.A.I.S.F. Argentina); sodium hydroxide (Baker); glacial acetic acid (Merck); calcium chloride dihydrate (Parafarm); potassium phosphate monobasic (Berna). All materials were used as received.

Alginate microparticles preparation

Sodium alginate solution (40 ml) was prepared as follows: 3.0 g alginate acid (*Protacid F-120 NM*) was dispersed in 25 ml distilled water. 1.0 g sodium hydroxide was dissolved in 15 ml distilled water and added to the alginate acid dispersion under stirring. 6.0 g of PCT was dispersed homogeneously in the alginate solution. Finally, 0.4175 g of calcium carbonate was uniformly dispersed. The resulting alginate solution was heated at 60 °C and added into 200 ml Canola oil, containing 4.84 g Span® 80, pre-heated at 60 °C. The system was stirred at 470 rpm for 15 min (W/O emulsion formation). With continued stirring, 40 ml Canola oil containing 1.7 ml glacial acetic acid was then added to the emulsion to initiate internal gelation. After a determined time under stirring, pregelified microparticles were separated from the oil dispersion by mixing with a calcium chloride solution. The phases were allowed to separate and the microparticles were allowed to settle (120 min). The supernatant was discarded and the microparticles were centrifuged. They were filtered and washed with 200 ml Tween 80® (1 % v/v) under vacuum, and dried until constant weight at 37 °C. Finally, they were sieved to separate by particle size (*Table 1*).

TABLA 1.- Efecto de los procedimientos de preparación en las características de las micropartículas.**TABLE 1.-** Effect of the preparation procedure on microparticles characteristics.

Lote	Tiempo de agitación con ácido acético (min)	Tiempo de contacto con ión calcio (min)	Cloruro de calcio (mM)	Rendimiento total (g)	Distribución del tamaño de partícula(%) < 420 µm	PCT (% w/w) < 420 µm
Batch	Stirring time with acetic acid (min)	Contact time with calcium ion (min)	Calcium chloride (mM)	Total particle yield (g)	Size distribution (%) < 420 µm	PCT (% w/w) < 420 µm
A	5	120	157	4.3962 +/- 0.1256	31.9 +/- 1.5	4.8 +/- 0.1
B	50	120	157	4.0939 +/- 0.1543	44.5 +/- 0.7	13.5 +/- 0.1
C	50	120	157	4.6217 +/- 0.1326	43.9 +/- 0.6	13.7 +/- 0.1
D	50	15	157	4.8802 +/- 0.1023	62.3 +/- 0.9	21.5 +/- 0.1
E	50	15	314	5.1647 +/- 0.1402	68.0 +/- 0.8	26.2 +/- 0.1
F	50	15	629	7.0851 +/- 0.1382	67.0 +/- 1.0	39.1 +/- 0.1

Determinación del contenido de principio activo

Aproximadamente 100,0 mg de micropartículas fueron exactamente pesadas y diluidas a 100 ml utilizando buffer fosfato pH 7,4. La muestra fue sometida a un baño de agua ultrasónico el tiempo necesario para producir la ruptura de las partículas. Se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm, y luego de diluciones apropiadas la muestra se leyó espectrofotométricamente (Shimadzu 1603) a 243 nm. Controles consistentes en micropartículas blanco fueron también ensayados.

Morfología

Micropartículas desecadas fueron monitoreadas mediante microscopía óptica (Arcano XSZ-107 E, 100X; división mínima del retículo: 10 µm) (Figura 1).

Determination of drug content

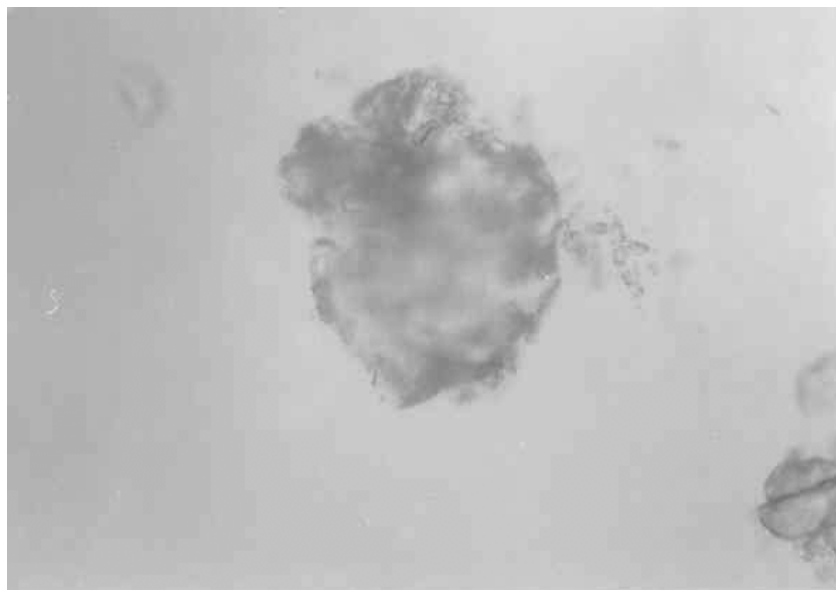
Around 100.0 mg microparticles were accurately weighed and diluted to 100 ml using phosphate buffer pH 7.4. The sample was placed in an ultrasonic water bath for the time necessary to brake the particles. After filtration through a 0.45 µm filter, appropriate dilutions were carried out and sample was assayed spectrophotometrically (Shimadzu 1603) at 243 nm. Controls consisting of blank microparticles were also assayed.

Morphology

Dried microparticles were monitored by optical microscopy (Arcano XSZ-107 E, 100X; minimum division of reticule: 10 µm) (Figure 1).

FIGURA 1.- Micropartículas de alginato de calcio por microscopía óptica (aumento 100x).

FIGURE 1.- Calcium alginate microparticles by optical microscopy (magnification 100x).



Distribución del tamaño de partícula

Las micropartículas obtenidas fueron tamizadas según su tamaño (Zonytest malla N° (ASTM) 40, abertura 420 µm). Este procedimiento se repitió tres veces para los diferentes lotes. Posteriormente, los diámetros equivalentes de Martín de 300 partículas fueron determinados por microscopía óptica⁵ (Figura 2).

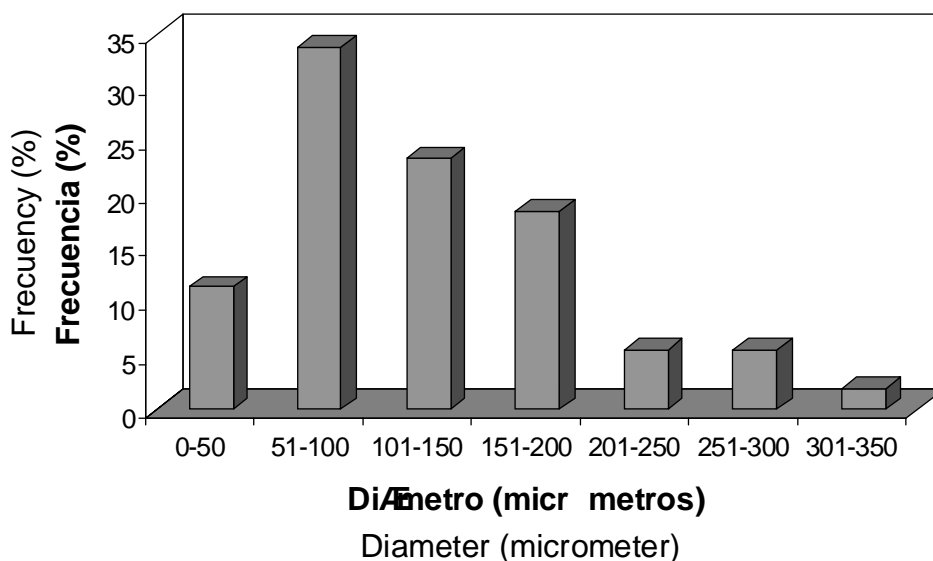
Particle size distribution

Microparticles were sieved to separate by particle size (Zonytest mesh N° (ASTM) 40, sieve size 420 µm). This procedure was repeated three times for different batches.

Later, equivalent Martin's diameters of 300 particles were determined by optical microscopy⁵ (Figure 2).

FIGURA 2.- Distribución de tamaño de partícula (Lote F).

FIGURE 2.- Particle size distribution (batch F).



Estudios de liberación in vitro

Ensayos de liberación *in vitro* fueron efectuados utilizando un equipo Alycar ADS 650 de seis vasos plásticos bajo las siguientes condiciones:

- método: aparato II (paleta)
- medio de disolución: agua destilada, 900 ml
- velocidad de agitación: 50 rpm
- temperatura: 37 °C
- muestra a: micropartículas equivalentes a 250 mg PCT (39,1 +/- 0,1 % P/P)
- muestra b: comprimidos PCT TAFIROL® (LASIFARMA Sidus Division S.A.)
- muestra c: cápsulas conteniendo 250 mg de PCT con Lactosa

Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría a 243 nm (Shimadzu 1603). En cada caso, los resultados son el promedio de tres determinaciones (*Figura 3*).

In vitro release studies

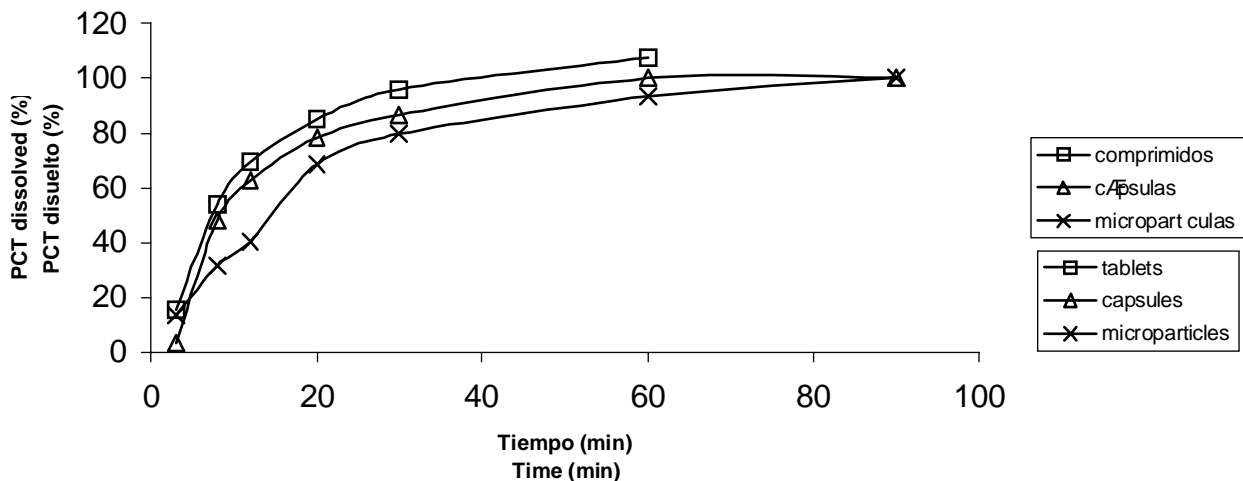
Dissolution test *in vitro* was performed using Alycar ADS 650 six-vessel dissolution equipment under the following conditions:

- method: apparatus II (paddle)
- dissolution medium: distilled water, 900 ml
- stirring speed: 50 rpm
- temperature: 37 °C
- sample a: microparticles equivalent to 250 mg PCT (39.1 +/- 0.1 % w/w)
- sample b: PCT tablets Tafirol® (LASIFARMA Sidus Division S.A.)
- sample c: capsules containing 250 mg PCT with Lactose

The samples taken were analyzed through spectrophotometry at 243 nm (Shimadzu 1603). In each case, the results are an average of three determinations (*Figure 3*).

FIGURA 3.- Perfiles de disolución de PCT desde comprimidos, cápsulas y micropartículas de alginato (lote F).

FIGURE 3.- Dissolution profiles of PCT from tablets, capsules and alginate microparticles (batch F).

*Estudios de calorimetría diferencial de barrido*

Un equipo de calorimetría diferencial de barrido (modelo 910, Du Pont, United States) fue conectado a un sistema de análisis térmico (Thermal Analyst 2000, Du Pont) y calibrado con indio (Du Pont). De 3 a 5 mg de la muestra fue pesada dentro de una cápsula de aluminio y la cápsula fue sellada no herméticamente, calentando en el calorímetro diferencial de barrido de 60 a 145 °C a una velocidad de 10 °C por min. Los estu-

Differential scanning calorimetric studies

A differential scanning calorimeter (model 910, Du Pont, United States) was connected to a thermal analysis operating system (Thermal Analyst 2000, Du Pont) and calibrated with indium (Du Pont). Typically, about 3 to 5 mg of the sample was weighed into an aluminium pan and the pan was crimped non-hermetically and heated in the differential scanning calorimeter from 60 to 145 °C at a rate of 10 °C per min. Differential scan-

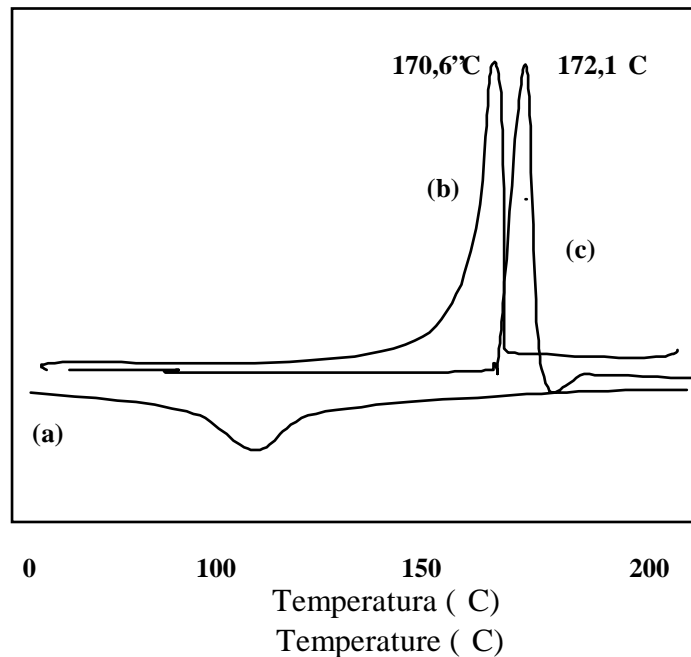
dios de calorimetría diferencial de barrido permitieron determinar cualitativamente el estado físico de la droga en las formulaciones (Figura 4).

ning calorimetry studies were able to qualitatively determine the physical state of the drug in the formulations (Figure 4).

FIGURA 4.- Perfiles de DSC de (a) micropartículas vacías; (b) micropartículas de PCT (39,1% p/P) y (c) PCT puro.

FIGURE 4.- DSC profiles of (a) empty microparticles; (b) microparticles of PCT (39,1% W/W) and (c) pure PCT.

Flujo de calor ↑
Heat flow ↑



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación de micropartículas de alginato

Basándonos en el trabajo de Fundueanu *et al.*³, la solución de alginato de sodio fue preparada a partir de ácido algínico calentando a 60 °C para obtener una parcial despolimerización. De esta manera, fue posible trabajar con altas concentraciones del polímero.

Durante la preparación de micropartículas, fue evaluada la influencia del tiempo de agitación con ácido acético glacial (Tabla 1). Cuando el tiempo de contacto fue incrementado 10 veces, el encapsulacion del PCT aumentó 3 veces. Esto podría deberse a que se lleva a cabo una gelificación más completa debido a una mayor liberación de iones calcio desde el complejo insoluble carbonato de calcio.

A partir del lote C, después de 50 min de agitación con ácido acético, la emulsión fue rota por centrifugación, separando las micropartícu-

RESULTS AND DISCUSSION

Alginate microparticles preparation

Basing on Fundueanu *et al.* work³, sodium alginate was prepared from alginic acid and was heated to 60 °C to get a partial depolymerization. Therefore, it was possible to work with high polymer concentrations.

During microparticles preparation, the influence of stirring time with glacial acetic acid was evaluated (Table 1). When the contact time was increased 10-fold, drug loading increased almost 3-fold. This could be originated by a more complete internal gelation due to a more efficient calcium release from the insoluble complex calcium carbonate.

From batch C, after 50 min stirring with acetic acid, the emulsion was broken by centrifugation, separating the microparticles. The microparticles were then incorporated to the calcium chloride solution. Breaking the emulsion by cen-

las. Las micropartículas fueron luego incorporadas a la solución de cloruro de calcio. Rompiendo la emulsión por centrifugación se logró una mayor recuperación de micropartículas y, por lo tanto, se vio incrementado el rendimiento total de micropartículas.

A su vez, se evaluó el tiempo de contacto de las micropartículas con la solución de cloruro de calcio. Si bien es necesario un tiempo de reacción, el mismo no debe ser excesivo debido a que facilitaría la difusión del paracetamol por gradiente de concentración, por lo cual se observó que al disminuir el tiempo de contacto, se obtuvieron mejores resultados en el encapsulacion y, consecuentemente, mayor rendimiento total de micropartículas.

La concentración de iones calcio parece ser un parámetro crítico en la producción de micropartículas. La influencia de la concentración de ion calcio fue evaluada con tres concentraciones diferentes (157; 314; 629 mM). Se observó que a medida que se incrementó la concentración, se vio incrementado el rendimiento total de micropartículas y el encapsulacion de principio activo. Esto podría deberse a una menor difusión del paracetamol hacia el exterior de la micropartícula por una disminución de la solubilidad de la molécula en el medio.

Morfología y distribución del tamaño de partícula

Se observó un tamaño de partícula entre 30 μm y 350 μm . Las micropartículas exhibieron una forma irregular.

Estudios de liberación in vitro

Los estudios preliminares de liberación *in vitro* muestran la liberación de PCT desde micropartículas de alginato (lote F), comprimidos y cápsulas. Se observó diferencias en sus perfiles ($n = 3$, $P < 0,05$).

A pesar de las diferencias observadas en sus perfiles, estas micropartículas no serían adecuadas para liberación controlada.

trifugation allowed a major recovery of microparticles and, therefore, the total particle yield increased.

In turn, microparticles contact time with calcium chloride solution was also evaluated. Even though a reaction time is necessary, it must not be excessive because this would promote PCT diffusion by gradient of concentration. Therefore, we observed that when the contact time decreased, drug loading increased and, consequently, total particle yield.

Calcium ion concentration appears to be a critical parameter in the microparticle production. The influence of calcium ion concentration was evaluated with three different concentrations (157; 314; 629 mM). An increase in calcium ion concentration increased total particle yield and drug loading. This could be due to a lower PCT diffusion towards the exterior of the microparticle because of a molecule solubility decrease in the media.

Morphology and particle size distribution

Median sizes of the microparticles ranged from 30 μm to 350 μm . The microparticles exhibited irregular shape.

In vitro release studies

Preliminary *in vitro* dissolution tests showed the release of PCT from alginate microparticles (batch F), tablets and capsules. In comparison, it was observed difference between the profiles ($n = 3$, $P < 0.05$). In spite of the differences observed in its profiles, these microparticles would not be suitable for controlled-drug release.

Differential scanning calorimetric studies

DSC studies (Shimadzu, model DSC-50) showed small variations in the point of merger of the pure PCT and the microparticles of PCT indicating the possible existence of interactions between the PCT and the constituent polymer of the microparticles.

Estudios de calorimetría diferencial de barrido

Los estudios de DSC (Shimadzu, modelo DSC-50) muestran pequeñas variaciones en los picos del PCT puro y las micropartículas conteniendo PCT, indicando la posible existencia de interacciones entre el PCT y la constitución polimérica de las micropartículas.

Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados obtenidos de los estudios de PCT fueron analizados utilizando un programa computacional con el test de t por pares de datos ($P = 0,05$) para comparar las diferentes formulaciones.

CONCLUSIONES

Las micropartículas de alginato fueron obtenidas por una emulsificación/gelificación interna, mediante una metodología simple y reproducible, la cual podría ser adecuada para escala industrial. Se ha observado que la concentración de ion calcio es un parámetro crítico en la producción de micropartículas de alginato.

Si bien las micropartículas obtenidas no serían adecuadas para una liberación controlada, podrían ser utilizadas para enmascarar el sabor desagradable del PCT o para evitar incompatibilidades del PCT con otros principios activos como por ejemplo la aspirina⁶.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el aporte financiero para este trabajo provisto por UBACyT (Proyecto B027) y a la Sra. Marta Alianak (Productos Destilados SAICyF).

Statistical treatment of data

The results of the PCT study were analyzed using a computer program by a paired t test ($P = 0.05$) to compare different formulations.

CONCLUSIONS

Alginate microparticles were obtained by emulsification/internal gelation resulting a simple method, which would be suitable for scale up. The calcium ion concentration seemed to be a critical parameter in the production of alginate microparticles.

Even though the obtained microparticles would not be suitable for controlled-drug release, they would be useful to mask the unpleasant taste of PCT. Also, it would be of interest to avoid incompatibilities with other drugs such as aspirin⁶.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support for this work provided by UBACyT (Grant B027) and Mrs. Marta Alianak (Productos Destilados SAICyF).

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Lamas MC, Bregni C, Frías M, Velázquez R. Hydrogel microspheres for flutamide obtained by multiple emulsions. *S.T.P. Pharma Science* 1998; 8(6): 375-378.
2. Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 31: 267-285.
3. Fundueanu G, Esposito E, Mihai D, Carpov A, Desbrieres J, Rinaudo M, Nastruzzi C. Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. *International Journal of Pharmaceutics* 1998; 170: 11-21.
4. Poncelet D, Lencki R, Beaulieu C, Halle JP, Neufeld RJ, Fournier A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation I. Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992; 38: 39-45.

5. Vila Jato JL. Tecnología Farmacéutica – Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas, Editorial Síntesis, Madrid; 1997, pp. 75-90.
6. Connors KA, Amidon GL, Stella VJ. Chemical Stability of Pharmaceuticals. 2nd edition. John Wiley & Sons, New York; 1986, pp. 163-168.