

Primjena procesne analitičke tehnologije u praćenju kristalizacijskih procesa

Udovčić, Natalija

Master's thesis / Diplomski 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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:950787>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
DIPLOMSKI STUDIJ

Natalija Udovčić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Natalija Udovčić

*Primjena procesne analitičke tehnologije u praćenju kristalizacijskih
procesa*

*Application of process analytical technology for monitoring
crystallization processes*

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Dr. sc. Martina Hrkovac

Zagreb, rujan 2018.

Ovaj rad izrađen je u PLIVA Hrvatska d.o.o. TAPI Istraživanje i Razvoj pod neposrednim vodstvom dr.sc. Martine Hrkovac i mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Prlić Kardum u akademskoj godini 2017/2018.

Zahvala

Veliko hvala dr. sc. Martini Hrkovac, mojoj neposrednoj voditeljici, na ukazanoj prilici i povjerenju za izradu eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada u suradnji s Pliva Hrvatska d.o.o. TAPI Istraživanje i Razvoj; na velikoj pomoći, podršci, strpljenju i svim savjetima tijekom planiranja, provedbe i tumačenja eksperimenata, ali i prilikom izrade rada.

Također hvala dr. sc. Damiru Šahniću i ostalim zaposlenicima iz Pliva Hrvatska d.o.o. TAPI Istraživanje i Razvoj, na pomoći i brojnim savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada za vrijeme iste suradnje.

Veliko hvala mojoj mentorici dr. sc. Jasni Prlič Kardum, na savjetima, strpljenju i pomoći pri izradi ovog rada.

Hvala i dr. sc. Aleksandri Sander, kao članici povjerenstva.

...mojoj obitelji koja mi je bila podrška tijekom cijelog studiranja, a posebice mojoj majci i sestri Aneli na brojnim savjetima i pomoći.

...mojem dečku Ivanu na podršci, bodrenju i vjeri u mene.

...mojim prijateljicama koje su uvijek uz mene.

...last but not least, hvala Ti Bože jer bez Tebe ništa od ovoga ne bi bilo moguće.

SAŽETAK

U današnje moderno doba farmaceutske industrije, proces kristalizacije je jedan od najvažnijih procesa prilikom proizvodnje farmaceutika u čvrstom obliku, odnosno u obliku tableta, što je jedan od najpopularnijih oblika uzimanja lijekova. Također je to jedan od najvažnijih načina dobivanja čvrstih tvari u čistom obliku. U tehnologiji se raznovrsni oblici kristala koriste za dobivanje tvari u obliku kristala određenog oblika, boje i svojstava. Iz tog razloga, postoji stalna potreba za razvitkom novih tehnika i usavršavanja samog procesa kristalizacije kako bi se dobili što čišći i pravilniji oblici kristala.

U ovom radu istraživani su procesi kristalizacije u cilju dobivanja triju polimorfni formi (A, B i C) aktivne farmaceutske supstance omeprazola, koji je na tržištu poznat kao lijek za želučane bolesti. Proces kristalizacije provedeni su prema procesnim uvjetima prikazanim u patentnim prijavama za pojedini polimorf. Provedena su tri seta eksperimenata pripreme navedenih polimorfa: prva dva seta provedena su u mjerilu od 250 ml, a zadnji set eksperimenata uvećan je na volumen od 7 l u svrhu *in-line* praćenja procesa pomoću Ramanove spektroskopije za identifikaciju polimorfa te FBRM (*Focused Beam Reflectance Measurement*) uređaja koji daje uvid u dinamiku procesa. Granulometrijske karakteristike produkta (oblik, veličina i raspodjela veličina) okarakterizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) te metodom laserske difrakcije za određivanje raspodjele veličina kristala.

U prva dva seta eksperimenata, metodom rendgenske difrakcije (XRD) potvrđene su polimorfne forme A, B i C. Prilikom uvećanja procesa XRD analizom kao i Ramanovom spektroskopijom identificirani su samo C polimorfi omeprazola bez obzira po kojem je postupku provedena kristalizacija. Dobiveni rezultati ukazuju na važnost optimiranja i parametriziranja industrijskih procesa kristalizacije te na utjecaj uvećanja procesa na karakteristike finalnog produkta.

Ključne riječi: granulometrijske karakteristike, kristalizacija, omeprazol, polimorfne forme, procesna analitička tehnologija.

ABSTRACT

In the modern age of the pharmaceutical industry, the process of crystallization is one of the most important processes for producing pharmaceuticals in solid form or tablet form, which is one of the most popular forms of drug taking. It is also one of the most important ways of obtaining solid substances in pure form. In the technology, various forms of crystals are used to obtain the crystalline substance of a particular shape, color and properties. For this reason, there is a constant need for developing new techniques and perfecting the crystallization process itself in order to obtain as clear and correct forms of crystals as possible.

In this work, crystallization processes were investigated in order to obtain three polymorphic forms (A, B and C) of the active pharmaceutical substance omeprazole, on the market also known as a gastric disease drug. Processes of crystallization were carried out according to the process conditions disclosed in the patent applications for a particular polymorph. Three sets of experiments were prepared for the preparation of mentioned polymorphs: the first two sets were performed at a volume of 250 ml and the last set of experiments was increased to a volume of 7 l for the purpose of in-line monitoring of the Raman spectroscopy for polymorphic identification and FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement) device that gives insight into the dynamics of the process. The granulometric characteristics of the product (shape, size and size distribution) were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and laser diffraction method to determine crystal size distribution.

In the first two sets of experiments, X-Ray Diffraction (XRD) methods were confirmed by polymorphic forms A, B and C. At the amplification of XRD analysis as well as Raman spectroscopy only C omeprazole polymorphs were identified irrespective of which process the crystallization was carried out. The obtained results point to the importance of optimizing and parameterizing the industrial process of crystallization and the effect of increasing the process on the characteristics of the final product

Key words: crystallization, granulometric characteristic, omeprazole, polymorphic forms, process analytical technology.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1. OPĆI DIO | 2 |
| 1.1. OSNOVE KRISTALIZACIJE IZ OTOPINE | 2 |
| 1.2. NUKLEACIJA I RAST KRISTALA | 5 |
| 1.2.1. Nukleacija | 5 |
| 1.2.2. Rast kristala | 7 |
| 1.3. OBLIK KRISTALA | 7 |
| 1.3.1. Polimorfizam | 9 |
| 1.4. PROCESNE ANALITIČKE TEHNOLOGIJE (PAT) | 10 |
| 1.4.1. Važnost za farmaceutsku industriju | 10 |
| 1.4.2. Principi praćenja fizikalno- kemijskih promjena <i>in situ</i> | 12 |
| 1.4.3. Vibracijska spektroskopija | 13 |
| 1.4.4. Ramanova spektroskopija <i>in line</i> | 16 |
| 1.4.5. Kritične varijable u procesima kristalizacije | 17 |
| 2.4.5. Omeprazol | 18 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 20 |
| 3.1. SVRHA RADA | 20 |
| 3.2. MATERIJALI | 20 |
| 3.3. APARATURA ZA PROVEDBU EKSPERIMENATA | 21 |
| 3.4. METODE ZA PROVEDBU EKSPERIMENTA | 24 |
| 3.4.1. ODREĐIVANJE KRIVULJA TOPLJIVOSTI | 24 |
| 3.4.2. SUŠENJE SIROVOG OMEPRAZOLA | 25 |
| 3.4.3. PRIPRAVA POLIMORFNIH FORMI OMP A,B I C IZ PREKRISTALIZIRANOG I SIROVOG OMEPRAZOLA | 25 |
| 3.4.4. UVEĆANJE PROCESA PRIPREME RAZLIČITIH POLIMORFNIH FORMI OMEPRAZOLA..... | 27 |
| 3.4.5. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINA ČESTICA I <i>IN-LINE</i> PRAĆENJE PROCESA..... | 28 |
| 3.4.6. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH KRISTALA <i>SEM</i> ANALIZOM..... | 29 |
| 4. REZULTATI | 30 |
| 4.1. KRIVULJA SUŠENJA SIROVOG OMEPRAZOLA | 30 |
| 4.2. KRIVULJE TOPLJIVOSTI | 31 |
| 4.3. REZULTATI POKUSA PRIPRAVE OMP A, B I C KRISTALA IZ SIROVOG I PREKRISTALIZIRANOG OMEPRAZOLA U REAKTORIMA RAZLIČITIH VELIČINA | 32 |
| 4.3.1. REZULTATI DOBIVENI IZ PREKRISTALIZIRANOG OMEPRAZOLA..... | 33 |
| 4.3.2. REZULTATI DOBIVENI IZ SIROVOG OMEPRAZOLA | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.3. REZULTATI DOBIVENI UVEĆANJEM PROCESA IZ PREKRISTALIZIRANOG OMEPAZOLA | 38 |
| 5. RASPRAVA | 48 |
| 6. ZAKLJUČAK | 52 |
| 7. POPIS SIMBOLA | 53 |
| 8. LITERATURA | 54 |
| 9. PRILOZI | 59 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 61 |

1. UVOD

U današnje moderno doba, uporaba farmaceutskih proizvoda je postala sastavni i gotovo nezaobilazni dio ljudskog života. Kroz zadnjih par desetljeća, cilj farmaceutske industrije je bio unaprijediti formulacije kako bi se pružila još inovativnija i učinkovitija rješenja i samim time postigao komercijalni proboj. Za navedena poboljšanja potrebne su bile nove tehnologije. U tom smislu svoju primjenu sve više nalazi procesna analitička tehnologija (*Process Analytical Technology, PAT*), koja obuhvaća širok spektar različitih analitičkih tehnika. Te tehnike omogućavaju uvid u kemijske i fizikalne promjene u realnom vremenu. Iako je od razvoja i početka primjene PAT-a prošlo već skoro tri desetljeća, njezina primjena, barem prema dostupnim literaturnim podacima, još je uvijek ograničena. Inicijativa koju 2004. godine predlaže Američka agencija za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration, FDA*) u svojem dokumentu o PAT smjernicama za industriju, trebala je potaknuti farmaceutsku industriju na značajniju primjenu. No unatoč tome, primjena ni približno nije dosegla razine koje su predviđane u vrijeme uvođenja koncepta, iako je ostvaren zamjetan broj publikacija na temu PAT-a u proteklih 10 godina. Nadalje, i dalje postoji mnogo otvorenih pitanja i problema prilikom primjene ove tehnologije. To se prvenstveno odnosi na nedovoljnu robusnost PAT metoda. Manjak robusnosti često je posljedica manjkavih kalibracijskih modela u aspektu nedovoljno široko opisanih procesnih varijacija kao primjerice, varijacija u količini reagensa i otapala, temperature, dinamične promjene volumena tijekom mjerenja i općenito nedovoljnog broja kalibracijskih uzoraka.

Jedna od PAT grupa koja je našla značajniju primjenu u realnim primjerima u farmaceutskoj industriji, svakako su tehnike vibracijske spektroskopije (*IR- Infrared Spectroscopy* i Ramanova spektroskopija) te UV/Vis (*Ultraviolet/Visible*) spektroskopija. Napretkom u tehnologiji optičkih vlakana omogućena je primjena navedenih spektroskopskih tehnika u praćenju i kontroli različitih fizikalno-kemijskih promjena *in situ* preko principa *in-line* i *at-line* koji će biti detaljnije objašnjeni u sljedećim poglavljima.

1. OPĆI DIO

1.1. OSNOVE KRISTALIZACIJE IZ OTOPINE

Ako se kruti materijal doda u otapalo, njegovim potpunim otapanjem nastaje homogena otopina. Pri danoj temperaturi otopit će se maksimalna količina krutine. Ta temperatura se naziva temperatura zasićenja, a takva otopina naziva se zasićenom. Količina krutog materijala koja je potrebna za dobivanje zasićene otopine pri danim uvjetima (temperatura, otapalo, tlak) je poznata kao topljivost.⁶ Topljivost farmaceutskih i nefarmaceutskih materijala je specifična za određenu tvar i varira u širokom rasponu. U farmaceutskoj industriji otkriveno je da u prosjeku više od 40 % novootkrivenih lijekova ima slabu topljivost u vodi.⁷ Niska topljivost aktivnih farmaceutskih sastojaka (*Active Pharmaceutical Ingredient - API*) u vodenom mediju može rezultirati niskom bioraspoloživošću, a osim toga i niskom farmaceutskom učinkovitošću. Stoga je topljivost jedna od najvažnijih fizikalno-kemijskih svojstava koja se istražuje tijekom razvoja farmaceutske industrije.⁸

U većini slučajeva, porastom temperature raste i koncentracija otopljene tvari, odnosno, njezina topljivost. Povećanje topljivosti, međutim, široko varira s obzirom na upotrijebljenu krutinu i otapalo.⁶

Topljivost komponente u određenom otapalu može se grafički opisati faznim dijagramom. S termodinamičke točke gledišta, topljivost ili krivulja zasićenosti opisuju isti kemijski potencijal otopljene tvari u otopini pri danoj temperaturi kao i kemijski potencijal pripadajućih vrsta u krutoj fazi.⁶ Termodinamički stabilna otopina ovisi o koncentraciji, temperaturi i tlaku. Za većinu komercijalnih primijenjenih procesa kristalizacije, tlak igra najmanju ulogu, stoga fazni dijagram može biti opisan kao dijagram ovisnosti temperature i koncentracije.^{9,10,11}

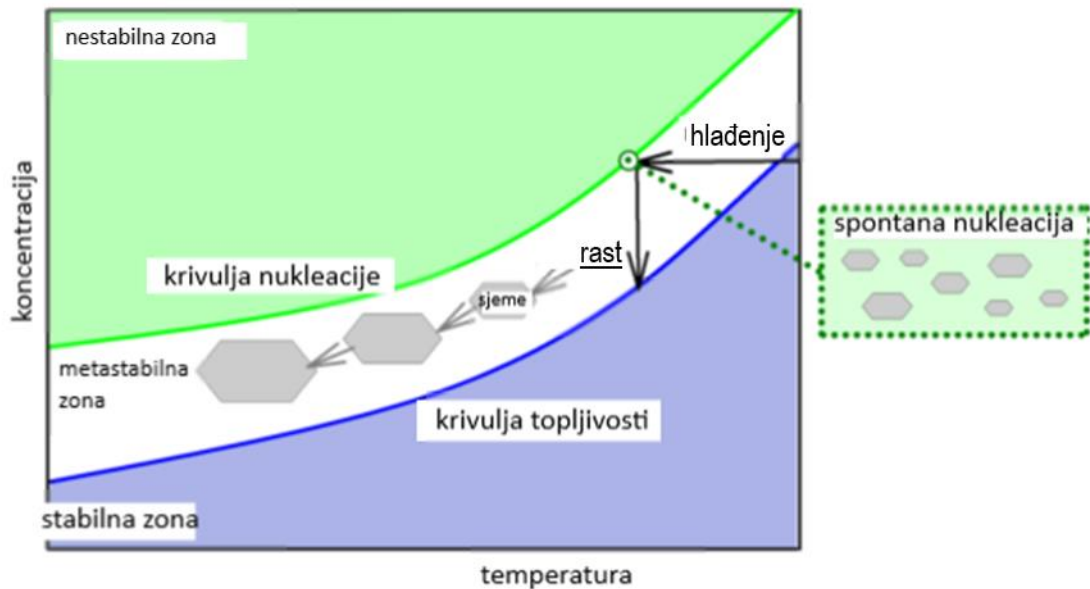
Za industrijske procese kristalizacije često je od interesa samo specifičan dio faznog dijagrama kako je shematski prikazano na slici 1-1-1. Dodatno, prema krivulji topljivosti, fazni dijagram na slici 1-1-1. se može produžiti dodavanjem krivulje prezasićenosti (gornja granica metastabilne zone), što je "netermodinamički" faktor. Suprotno krivulji topljivosti, krivulja nukleacije ovisi o procesnim parametrima kao što je, na primjer, brzina hlađenja, mehaničke smetnje inducirane npr. miješanjem i prisutnošću nečistoća. Krivulja topljivosti i prezasićenosti odvajaju fazni dijagram u tri zone. U stabilnoj zoni otopina je nedovoljno zasićena. Dakle,

kristalizacija je nemoguća i dodavanje kristala vodi do njihovog otapanja. Metastabilna zona predstavlja područje između topljivosti i krivulje nukleacije. Samo u ovom području rast kristala je moguć nakon dodavanja cjepiva, što se naziva procesom kontrolirane kristalizacije. Što je širina područja veća, to je otopina stabilnija. Širina metastabilne zone definira tzv. radni prozor procesa.¹² Korištenjem kristalizatora u području blizu krivulje zasićenosti uz dodavanje cjepiva rezultira sporom stopom rasta i omogućuje poboljšanje kvalitete proizvoda (raspodjela veličine čestica - RVČ, čistoća) i kontrolu polimorfizma.^{13,14} Važni parametri koji se moraju uzeti u obzir pri cijepljenju su masa i veličina kristala cjepiva, kvaliteta materijala (mljeven, prekristaliziran, suspendiran), razina prezasićenosti za vrijeme dodatka cjepiva, brzina hlađenja (kontrolirana, linearna) i mjesto dodatka cjepiva u kristalizator.¹⁵

Otopljen tvar se "održava" u otopini sve dok se ne razvije dovoljno visoka razina prezasićenosti. Otopina je poznata kao izrazito zasićena (metastabilna) kada koncentracija otapala prelazi ravnotežnu (zasićenu) koncentraciju pri određenoj temperaturi. Prezasićenost je pokretačka sila svakog procesa kristalizacije.⁶ Poznavanje pokretačke sile neophodno je, ne samo zbog određivanja kinetike procesa, već i u svrhu korelacije željenih karakteristika produkta s procesnim uvjetima.¹⁶ Prezasićenost se može postići na više načina¹⁷:

- Hlađenjem otopine, u slučaju da se topljivost komponente povećava s povećanjem temperature ili zagrijavanjem otopine u kojoj se topljivost komponente smanjuje povećanjem temperature;
- Isparavanjem otapala, pri konstantnoj temperaturi, čime se povećava koncentracija otopine;
- Adijabatskim isparavanjem otapala, snižava se temperatura otopine uslijed gubitka topline isparavanja;
- Dodavanjem manje djelotvornog otapala, koje je mješivo s primarnim otapalom, te se ta komponenta u njemu slabije otapa;
- Vakuu kristalizacijom, vruća zasićena otopina uvodi se u posudu u kojoj vlada vakuum te dolazi do vrenja otopine. Dio otapala isparava, a istovremeno dolazi i do adijabatskog hlađenja otopine te se prezasićenost postiže i hlađenjem i isparavanjem;
- Isoljavanjem; dodaje se tvar u krutom, tekućem ili plinovitom stanju, koja smanjuje topljivost soli u otopini;
- Kemijskom reakcijom, dolazi do taloženja novonastale soli;

- Elektrokemijskom reakcijom, na površini čvrste faze.



Slika 1-1-1 Shema dijagrama topljivosti

Ako se prezasićena otopina ohladi do temperature nukleacije (krivulja prezasićenosti), dolazi do spontane nukleacije. U ovom trenutku, prezasićenost se smanjuje. Postupak kristalizacije koji se provodi bez cijepljenja, najčešće će rezultirati sitnim kristalima i širokom RVČ. Sustav nikad neće doseći zonu izvan metastabilnog područja (nestabilna zona). Razumijevanje širine metastabilne zone je od temeljne važnosti da bi se mogao kontrolirati rast kristala. ¹²

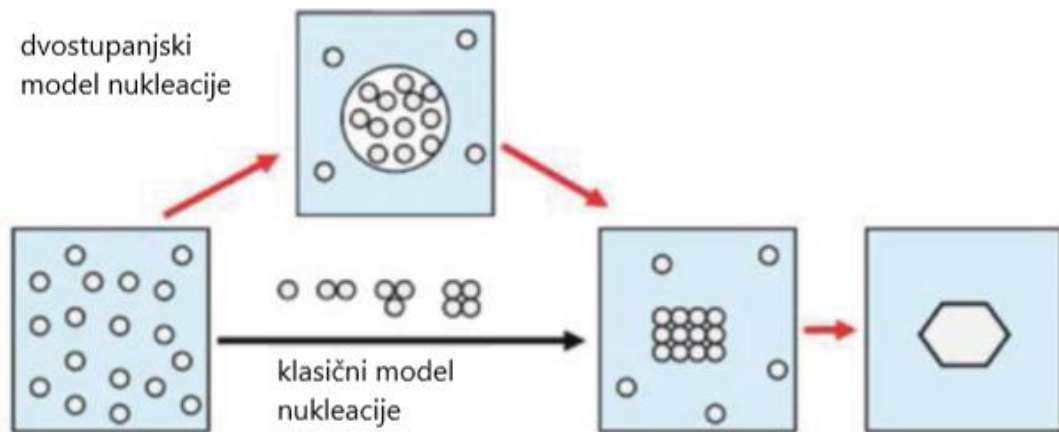
1.2. NUKLEACIJA I RAST KRISTALA

Postizanje prezasićenosti je nužan uvjet za proces kristalizacije. Otopina u ovom stanju, međutim, nije u ravnoteži. Budući da svaki sustav teži postizanju ravnotežnog stanja, prezasićene otopine u konačnici kristaliziraju. Kristalizacija iz otopine se može podijeliti u dva kinetička koraka. Prvi korak je nukleacija, a drugi je rast kristala. Ova dva stupnja kristalizacije se često odvijaju istovremeno.

1.2.1. Nukleacija

Nukleacija proizlazi iz agregacije molekula ili iona u prezasićenoj otopini. Ima vrlo važnu ulogu u određivanju konačnih svojstava kristala (RVČ, morfologija, polimorfni oblik). Dakle, razumijevanje osnova nukleacije je ključno za kontrolu procesa kristalizacije. Da bi došlo do nukleacije, molekule se trebaju približiti jedna drugoj i formirati klaster. Formiranje klastera je stohastički proces i opisan je Teorijom klasične nukleacije (slika 1-2-1). Klasteri kontinuirano mijenjaju svoje veličine pričvršćivanjem ili odvajanjem molekule i trebaju postići kritičnu veličinu sve dok nisu energetski stabilni. Kritična veličina klastera je obrnuta funkciji prezasićenosti i temperature. Kako se prezasićenost povećava, kritična veličina klastera se smanjuje, što dovodi do stvaranja finog kristalnog produkta, budući da se formira više nukleusa.^{18,19}

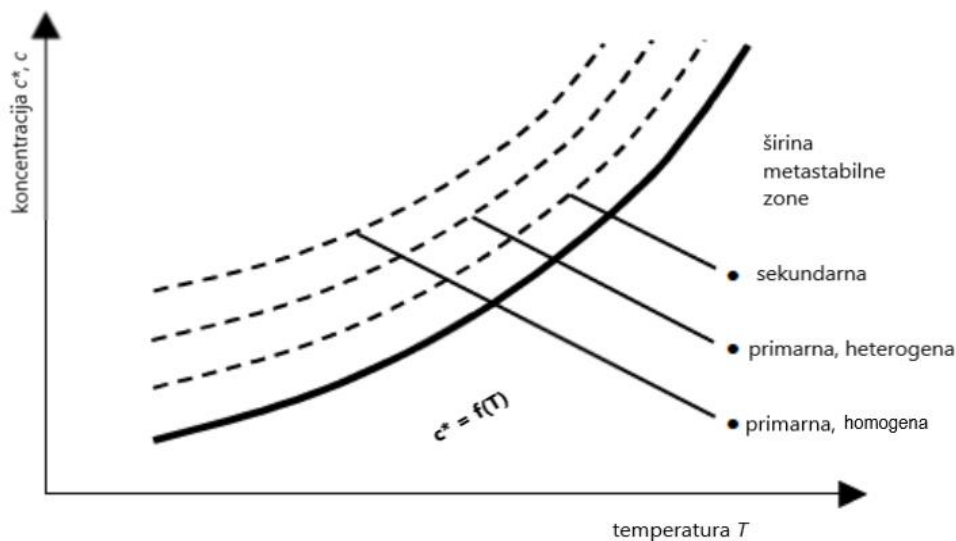
Nukleacija se može opisati i pomoću dvostupanjske teorije nukleacije. Prema toj teoriji, u početku fluktuiraju neuređene strukture, a zatim dolazi do formiranja i fluktuacije uređenih struktura kao što je prikazano na slici 1-2-1. Daljnje informacije o dvostupanjskoj teoriji nukleacije dali su Wolde i suradnici.²⁰



Slika 1-2-1 Shematski prikaz modela dvostupanske nukleacije

Nukleacija se može klasificirati na osnovi prisutnosti ili odsutnosti kristalnog materijala u otopini. Ako otopina ne sadrži kristalne površine (niti čvrste strane čestice, kao niti kristale određene vrste), nukleusi se mogu formirati samo homogenom nukleacijom. Ako su prisutne strane čestice, nukleacija je olakšana i proces je poznat kao heterogena nukleacija. I homogena i heterogena nukleacija su poznate kao primarna nukleacija koje se pojavljuje kada se postigne određena prezasićenost. Homogena nukleacija nije uobičajena tijekom industrijskih procesa kristalizacije. U većini slučajeva nečistoće dovode do indukcije heterogenih tvorbi nukleusa.

Kada su prisutni kristali u otopini (npr. dodatkom cjepiva), nukleusi se javljaju čak i pri nižoj prezasićenosti. Takva vrsta nukleacije poznata je kao sekundarna nukleacija. No, treba uzeti u obzir da se ona razlikuje od sekundarnih nukleacija uzrokovanih kontaktom, djelovanjem smicanja, lomovima, abrazijom i sl.^{19,21} Kontaktna nukleacija je vjerojatno najčešći mehanizam sekundarnih nukleacija u industrijskim kristalizatorima. Ona je rezultat mikro abrazije koja nastaje kada kristal, kristalni rotor i zid kristalizatora dođu u kontakt.²² Slika 1-2-2 prikazuje shematski utjecaj različitih mehanizama nukleacije na širinu metastabilne zone.



Slika 1-2-2 Širina metastabilne zone za različite mehanizme nukleacije

1.2.2. Rast kristala

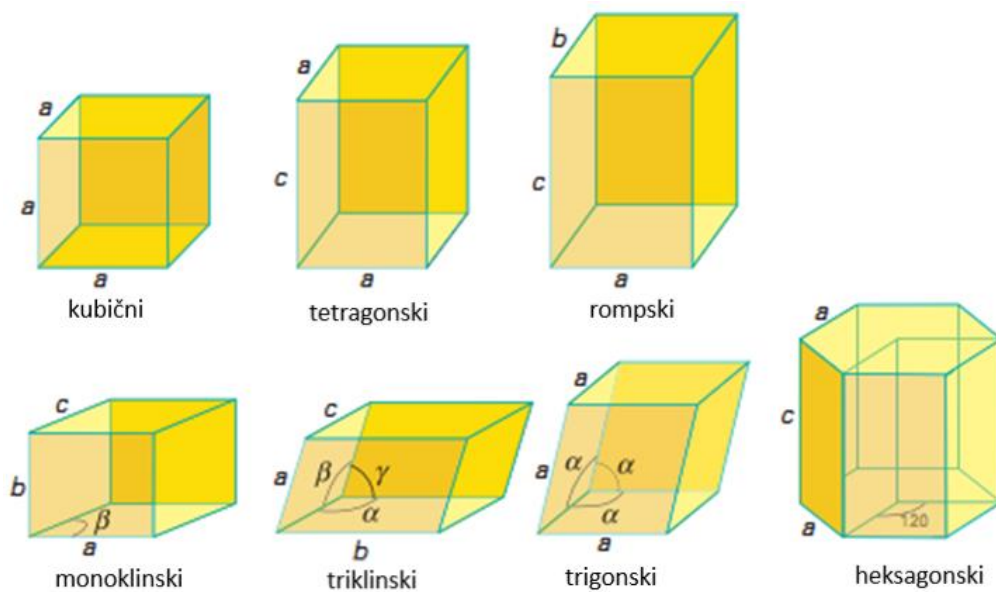
Nakon nukleacije, proces kristalnog rasta uključuje ekspanziju centara za nukleaciju koji su postigli kritičnu veličinu dodavanjem molekula solvata iz prezasićene molekule.^{12,21} Mnogi daljnji koraci moraju se odvijati prije nego što se čestica koja se ugrađuje iz otopine inkorporira u kristalnu rešetku. Postoje različite teorije koje se mogu koristiti za opisivanje procesa rasta kristala, npr. teorija energije površine, teorija difuzije ili teorija adsorpcijskog sloja.^{19,24}

1.3. OBLIK KRISTALA

Materijali se mogu oblikovati u krute tvari koje su kristalne ili amorfne strukture, ovisno o uvjetima. Kristali su krute tvari u kojima su atomi raspoređeni u trodimenzionalnu periodičnu strukturu. Uređenost strukture je karakteristična za kristalne materijale (iznimke mogu biti nanokristalni materijali). Amorfni materijali su spojevi bez uređene strukture, već postoji tzv. principalni strukturni red koji dolazi od približno jednake udaljenosti među susjednim molekulama. Općenito, amorfne krute tvari mogu imati korisna svojstva kao što je veća topljivost i brzina otapanja, jer imaju višu slobodnu energiju, a ponekad i bolje kompresijske karakteristike od kristala. Nažalost, amorfne krutine su fizički i /ili kemijski manje stabilne u

usporedbi s kristalima. Kristalni materijali mogu biti polimorfi, solvati, hidrati, kokristali ili soli. Općenito, ako je farmaceutski spoj netopljiv, higroskopian ili teško kristalizira, provest će se traženje soli ili kokristala. Soli čine biološki dostupnu aktivnu djelatnu tvar, ali više od 30% farmaceutskih spojeva nema prikladnu funkcionalnost za stvaranje soli.²⁵

Nastale produkte kristala karakterizira kristalna rešetka u kojoj se strukturne jedinice ponavljaju u sve tri dimenzije.²⁶ Postoji sedam osnovnih kristalnih sustava prikazanih na slici 1-3-1. Svi kristali su simetrični, a simetrija može biti oko točke, linije ili plove.^{17,27,28}



Slika 1-3-1 Kristalni sustavi

Veličina i oblik kristala određeni su karakterističnim dimenzijama i faktorima oblika, koji zajedno omogućuju određivanje volumena (masa) i specifične površine čestica, koje mogu imati odlučujući utjecaj na ponašanje kristala tijekom procesa kao i na njihovu primjenu u praksi. Stoga je određivanje te kontrola svojstava komponente, koja kristalizira, od velike važnosti za kristalizacijske procesne sustave.

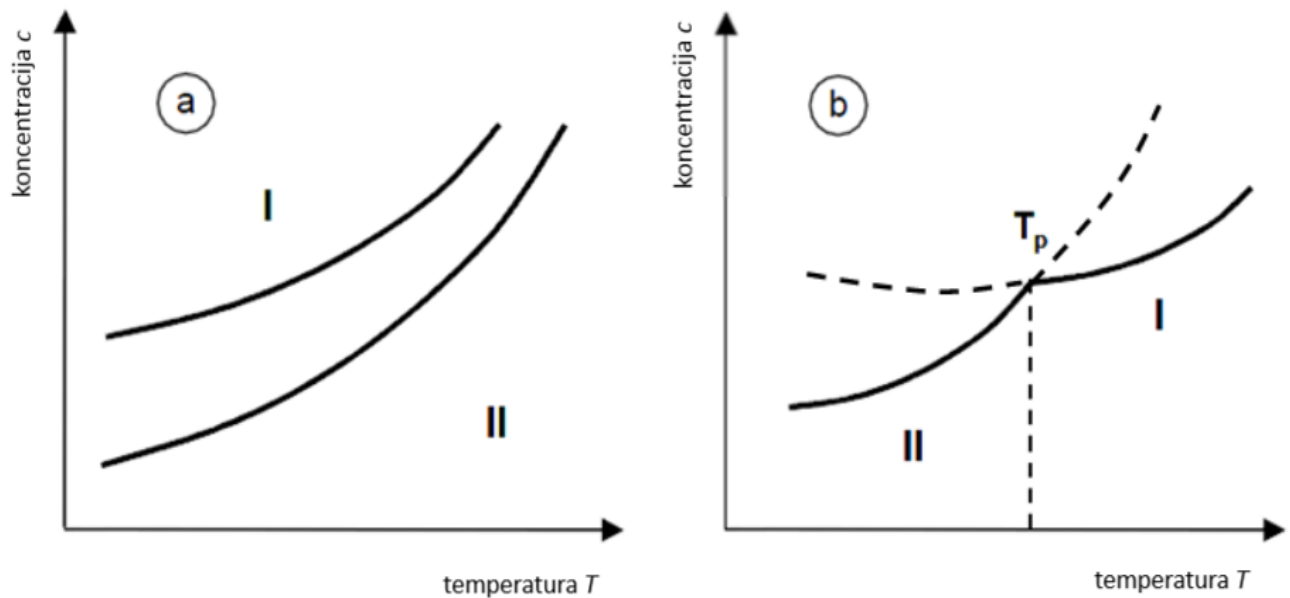
1.3.1. Polimorfizam

Kristali istog kemijskog sastava, ali s različitim rasporedima atoma koji tvore različite trodimenzionalne strukture, poznati su kao polimorfi.^{21,29} Taj fenomen ima veliku važnost u farmaceutskoj industriji budući da različiti polimorfi mogu pokazivati različite kemijske karakteristike kao što su reaktivnost i fizikalna svojstva poput gustoće, točke taljenja, boje, topljivosti i brzine otapanja, što posljedično utječe na bioraspoloživost i stabilnost ljekovite tvari.²⁵

Osim toga, polimorfizam često znači promjenu vanjskog oblika kristala, koji je izravno povezan s učinkovitošću usporednih procesa, kao što je filtracija.³⁰ Nadalje, mogu postojati solvati ili hidrati, koji su u prošlosti bili nazivani "pseudopolimorfi". U slučaju reverzibilnih solvata ili hidrata, molekule otapala ili vode mogu se ukloniti bez utjecaja na kristalnu strukturu krute tvari. Za ireverzibilne solvate ili hidrate, desolvatacija ili dehidratacija vodi do smanjenja kristaliničnosti (amorfizacija).³¹ Kokristali se mogu smatrati posebnim slučajem solvata, pri čemu otapalo u uvjetima okoline nije tekuće. Umjesto otapala, potencijalni spoj je vezan nekovalentnim ili vodikovim vezama na molekulu krute tvari. Dodatci za hranu, konzervansi, vitamini, minerali, aminokiseline, biomolekule i drugi API mogu se također svrstati u kokristalne oblike.²⁵ Polimorfni spojevi mogu imati monotropni ili enantiotropni odnos.³¹ Polimorfni oblici definirani su kao enantiotropni kada se prijelazna točka između dvije faze nalazi na temperaturama ispod točke taljenja. Kada nema prijelazne točke ispod tališta dvaju polimorfni oblika, oblici su povezani monotropno.²⁵

Iako je čvrsto-tekuća ravnoteža definirana termodinamikom, kinetički čimbenici igraju važnu ulogu tijekom procesa kristalizacije. Dakle, predviđanje i kontrola polimorfnog oblika kristala iz otopine je složen zadatak.³² Prema Ostwald-ovom pravilu stadija, česta je pojava najprije nestabilnog polimorfa (najniža energetska barijera), a zatim dolazi do pretvorbe u stabilni oblik (najviša energetska barijera).³⁰ Stoga broj termodinamički dostupnih krutih oblika uvelike ovisi o razini prezasićenosti.²⁵ Ali također i drugi procesni parametri, kao što su otapalo, temperatura, tlak, uvjeti miješanja, prisutnost nečistoća ili aditiva te parametri cjepiva mogu imati utjecaja na kristalizaciju polimorfni oblika.^{25,32} Drugi problem povezan s polimorfizmom je, kada se željeni polimorf dobije procesom kristalizacije, spriječiti transformaciju materijala u drugi polimorfni oblik.³⁰ Relativna stabilnost između čvrstih faza kristala često se mijenja

ovisno o termodinamičkim uvjetima (temperatura, tlak, koncentracija) od kojih je relativna vlažnost okoliša jedan od uvjeta kojega je potrebno posebno uzeti u obzir. Znanje o mehanizmu faznih transformacija vrlo je korisno u identificiranju takvih potencijalnih prijelaza i čimbenika koji utječu na njihovu kinetiku.³³ Tipični dijagrami topljivosti za monotropni i enantiotropni sustav prikazani su na slici 1-3-1-1.



Slika 1-3-1-1 Krivulje topljivosti u monotropnom sustavu (a) i u enantiotropnom sustavu s mestastabilnom fazom (b); I: polimorfni oblik I, II: polimorfni oblik II, T_p : prijelazna točka

1.4. PROCESNE ANALITIČKE TEHNOLOGIJE (PAT)

1.4.1. Važnost za farmaceutsku industriju

Američka agencija za hranu i lijekove (FDA), 2004. godine daje inicijativu za primjenu PAT što predstavlja osnovu dobre proizvođačke prakse (GMP- *Good Manufacturing Practice*) u farmaceutskoj industriji.³⁴ Glavni poticaj inicijative PAT FDA definiran je u FDA vodiču: "PAT- Okvir za inovativni farmaceutski razvoj, proizvodnju i osiguranje kvalitete."³⁵ Budući da je farmaceutska industrija vrlo regulirana, proizvodi moraju zadovoljiti specifikacije koje zahtijevaju visoku kvalitetu, kao što su kemijska i polimorfna čistoća, određena RVČ ili oblik

čestica. Ove karakteristike utječu na fizička (brzina otapanja, topljivost) i kemijska (reaktivnost) svojstva proizvedenih materijala, ali također imaju utjecaj i na operacije koje slijede (npr. filtriranje, sušenje). Dakle, za postizanje željene kvalitete kristala kao proizvoda neophodno je za farmaceutsku industriju. Jedna od najvažnijih izjava unutar PAT koncepta je: "kvaliteta ne bi trebala biti ispitana na proizvodima, već bi trebala biti ugrađena u sam dizajn". Inicijativa PAT naglasila je razvoj i uporabu novih tehnologija kao alata za analizu, kontrolu i poboljšanje procesa kako bi se spriječio rizik od proizvodnje nekvalitetnih proizvoda. Ova načela PAT inicijative vrijede i za druge te srodne grane industrije, kao što su biotehnologija, prehrambena industrija, kao i kemijska industrija.^{35,36}

FDA definira PAT kao: ^{35,37}

- sustav za analizu i kontrolu proizvodnih procesa temeljenih na pravovremenim mjerenjima kritičnih parametara kvalitete i karakteristikama izvedbe sirovina te materijala koji su u procesu
- proces koji osigurava prihvatljivu kvalitetu krajnjeg proizvoda po dovršetku obrade

FDA također navodi da PAT uključuje:^{35,37}

- primjenu alata za PAT
- optimizaciju proizvoda i procesa
- više-varijantne analize podataka i alate za upravljanje informacijama
- upravljanje povratnim informacijama dobivenih pri kontroli procesa
- strategije za proizvodnju lijekova.

Do danas je opisan i primijenjen velik broj različitih tehnika kao primjerice ultrazvučne tehnike, senzori dielektrične konstante, turbidimetrijski, konduktometrijski i fotoakustični senzori, tehnika FBRM i naposljetku spektroskopija UV/Vis, FTIR (*Fourier Transformed Infrared*) odnosno MIR (*Mid Infrared*) i NIR (*Near Infrared*) te Ramanova spektroskopija (FT i disperzivna). Područje primjene je veliko pa se tako navedene tehnike primjenjuju na širok spektar fizikalno-kemijskih promjena kao što su kemijske reakcije, procesi kristalizacije, destilacije i sušenja te ostale operacije proizvodnje gotovih oblika lijekova, FDF-a (FDF - *Final Dosage Form*) kao primjerice granulacija, ekstruzije, tabletiranje.⁴¹

I dalje postoji mnogo otvorenih pitanja i problema prilikom primjene ove tehnologije, a to se prvenstveno odnosi na nedovoljnu robusnost PAT metoda. Manjak robusnosti često je

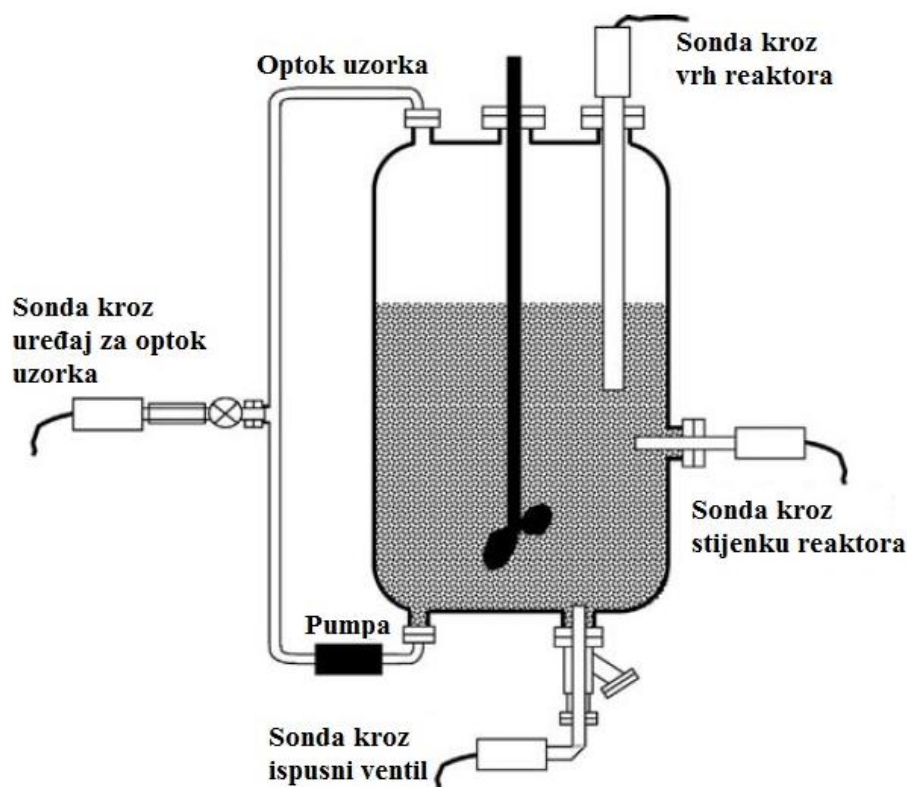
posljedica manjkavih kalibracijskih modela u koje nisu uzete u obzir sve potrebne informacije, kao što su: varijacije u količini reagensa i otapala, temperature, dinamične promjene volumena tijekom mjerenja i općenito nedovoljnog broja kalibracijskih uzoraka.

Tehnike vibracijske spektroskopije (IR i Ramanova spektroskopija) kao i UV/Vis spektroskopija su našle značajniju primjenu u farmaceutskoj industriji. Zahvaljujući napretku tehnologije optičkih vlakana, moguća je primjena navedenih spektroskopskih tehnika u praćenju i kontroli procesa i to putem *in-line* i *at-line* praćenja.⁴²

Kao tehnika praćenja u ovom radu, odabrana je Ramanova spektroskopija iz razloga što daje uvid u kristalizaciju specifičnih polimorfnih formi. Budući da reakcijska smjesa sadrži značajan udio vode, Ramanova spektroskopija provodila se principom *in-line* te *on-line* za snimanje krutih uzoraka.

1.4.2. Principi praćenja fizikalno- kemijskih promjena *in situ*

Izniman i brz tehnološki napredak prvenstveno u polju tehnologije optičkih vlakana i razvoja FT (*Fourier Transformed*) instrumenata, omogućio je i razvoj novih tehnologija za praćenje fizikalno-kemijskih promjena *in situ* i omogućio da koncept PAT-a u potpunosti zaživi u svojoj namjeri. Tako se danas takva mjerenja provode uz pomoć različitih tipova sonde koje su optičkim vlaknima povezane s mjernim instrumentom i omogućuju brzo mjerenje promjena u realnom vremenu. Prema mjernom mjestu na kojem se takvo mjerenje odvija razlikujemo nekoliko principa. Prvi je princip *in-line* gdje se mjerenje provodi direktno u kontaktu s procesnom smjesom. Primjenjivati se može u svim skalama bilo da se radi o šaržnim ili kontinuiranim procesima. Drugi je princip *on-line* gdje se mjerenje provodi na uzorku procesne smjese koja je privremeno izuzeta iz glavnine smjese kao primjerice zaseban optok kao što je prikazano na slici 1-4-2-1. Oba su principa u suštini ista te oba omogućuju mjerenje *in situ* nekom od PAT tehnika. Ovdje valja spomenuti i ostala dva PAT principa, a to su *at-line* i *off-line*. Princip *at-line* uključuje mjerenje uzorka procesne smjese van samog procesa prilikom čega se mjerni uređaj nalazi u neposrednoj blizini mjernog sustava. I naposljetku *off-line* koji uključuje sve tipove mjerenja na uzorcima procesnih smjesa, ali na lokaciji koja je dislocirana od mjesta gdje se odvija proces (npr. kromatografska analiza u laboratoriju kontrole kvalitete).⁴³



Slika 1-4-2-1 Shematski prikaz principa *in-line* i *on-line*⁴³

1.4.3. Vibracijska spektroskopija

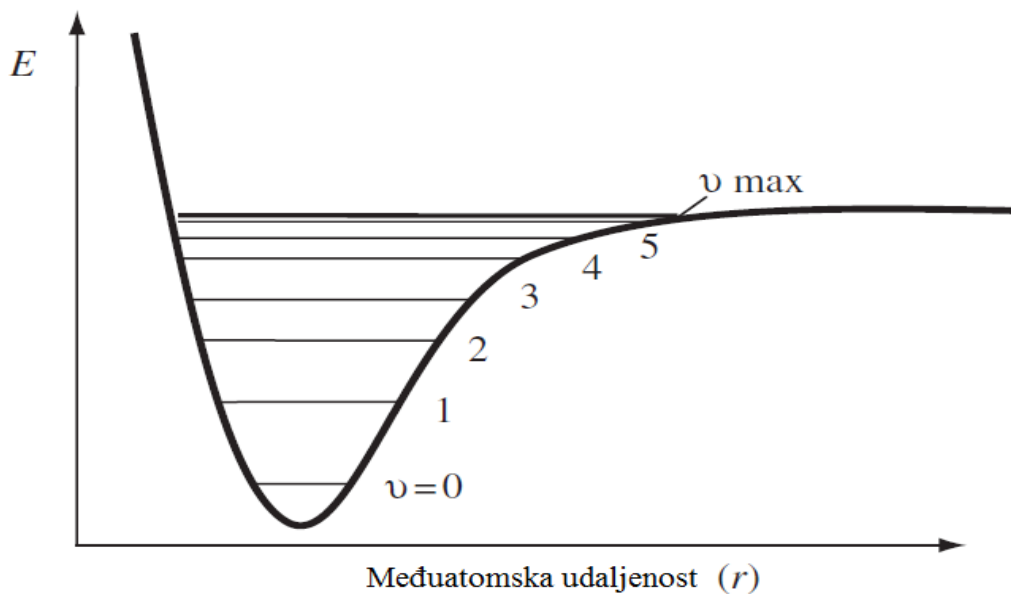
Molekulska vibracijska spektroskopija bazira se na interakciji infracrvenog zračenja i molekula. Procesi promjene molekula prilikom interakcije sa infracrvenim zračenjem mogu se promatrati u vidu diskretnih (kvantiziranih) vibracijskih energetskeg nivoa kao što je prikazano na Morseovoj krivulji prikazanoj na slici 1-4-3-1. Svaka molekula odnosno veza u molekuli egzistira u jednom od tih kvantiziranih nivoa bilo da se radi o osnovnom ili pobuđenom stanju. Svaka od veza u molekuli ima svoju određenu rezonantnu frekvenciju vibracije točno određene energije. Interakcijom zračenja i molekula dolazi do promjene u tom energetskom nivou. Drugim riječima, veza u molekuli će apsorbirati zračenje samo one frekvencije (ν) čija energija (E) odgovara razlici energije kvantnih energetskeg nivoa, odnosno koja je jednaka rezonantnoj frekvenciji veze. Te dvije veličine međusobno su vezane Bohrovom jednađbom:

$$E = h \cdot \nu$$

gdje h označava Planckovu konstantu ($h = 6,626 \times 10^{-34}$ J s). Kao najčešća mjerna jedinica u vibracijskoj spektroskopiji koristi se valni broj ($\tilde{\nu}$) koji označava broj valova u jednom centimetru i u odnosu je s valnom duljinom (λ) i frekvencijom prema sljedećim jednadžbama:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c}$$

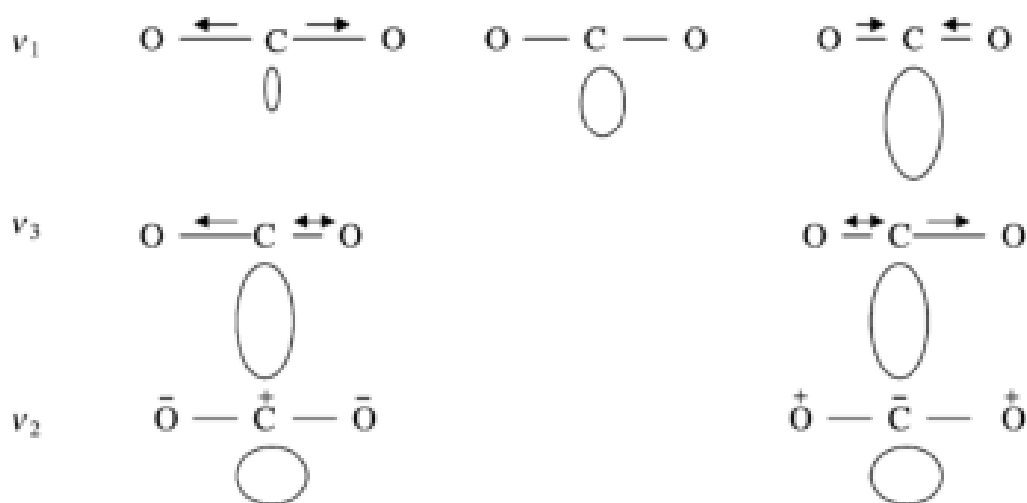
gdje c označava brzinu svjetlosti ($c = 299792458$ m s⁻¹).⁴⁴



Slika 1-4-3-1 Morseova krivulja ovisnosti energije o međuatomskoj udaljenosti u molekuli⁴⁵

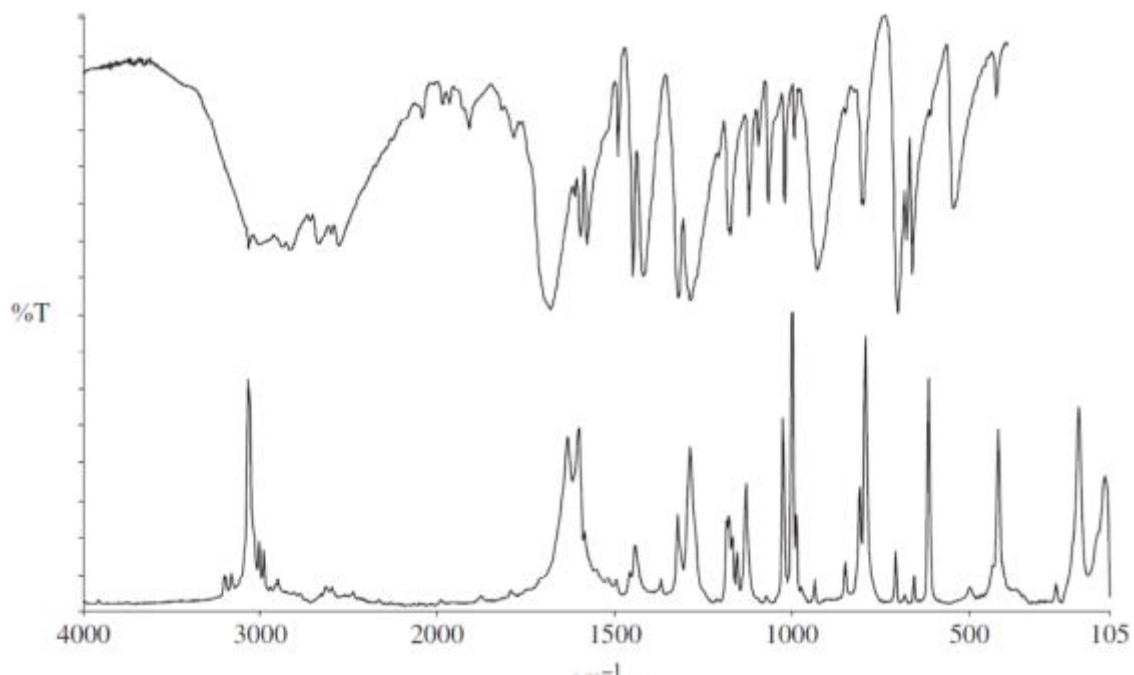
Prema tipu interakcije molekule i zračenja, razlikujemo dva tipa molekulske vibracijske spektroskopije. Prva je apsorpcijska odnosno transmisijaska, ovisno o tome mjeri li se apsorbirano ili propušteno zračenje u rasponu valnih brojeva od 12500 cm⁻¹ do 10 cm⁻¹, i nju se općenito naziva infracrvenom spektroskopijom. Druga je Ramanova spektroskopija koja se temelji na efektu raspršenja zračenja iz monokromatskog izvora gdje pobudno zračenje može biti različite valne duljine. Još jedna bitna razlika diferencira infracrvenu od Ramanove spektroskopije. Da bi molekula mogla apsorbirati infracrveno zračenje, prilikom apsorpcije mora doći do promjene u električnom dipolnom momentu molekule dok kod Ramanove spektroskopije do raspršenja svjetlosti dolazi uslijed promjene polarizabilnosti. To je jasno prikazano na primjeru različitih vibracija linearne molekule CO₂ na slici 1-4-3-2. Vibracija ν_1

prikazuje simetrično istežanje molekule prilikom čega dolazi do promjene elipsoida polarizabilnosti. Takva će vibracija dakle biti Raman aktivna, a IR neaktivna. S druge strane vibracije ν_3 koja prikazuje asimetrično istežanje i ν_2 koja prikazuje strižnu vibraciju van ravnine uslijed kojih ne dolazi do promjene polarizabilnosti biti će Raman neaktivne, ali će biti IR aktivne s obzirom da dolazi do promjene dipolnog momenta molekule uslijed vibracije.⁴³ U oba slučaja intenzitet signala biti će proporcionalan količini promjene Iz navedenih su razloga infracrvena i Ramanova spektroskopija komplementarne tehnike.



Slika 1-4-3-2 Promjena u elipsoidu polarizabilnosti za vibracije molekule CO₂⁴³

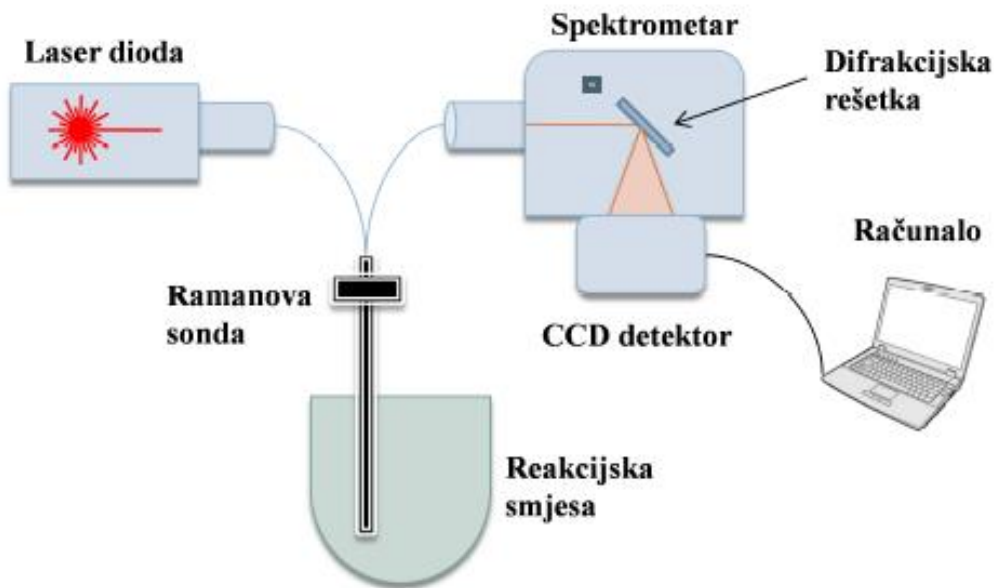
To znači da će jake vrpce u infracrvenim spektrima biti slabe u Ramanovim i obratno kao što je prikazano na slici 1-4-3-3 na primjeru IR i Ramanovog spektra benzojeve kiseline. Različite tehnike infracrvene spektroskopije diferenciraju se prema području valnih duljina odnosno valnih brojeva zračenja. Tako razlikujemo blisko infracrveno područje od 12500 cm⁻¹ do 4000 cm⁻¹, srednje područje od 4000 cm⁻¹ do 400 cm⁻¹ i daleko područje od 400 cm⁻¹ do 10 cm⁻¹. Infracrvena spektroskopija najčešće koristi prva dva područja pa tako razlikujemo NIR (eng. *Near Infrared*) i MIR (eng. *Mid Infrared*) spektroskopiju dok raspršenje svjetla kod Ramanove spektroskopije obično upada u MIR područje bez obzira što pobudno zračenje može biti i unutar vidljivog područja.



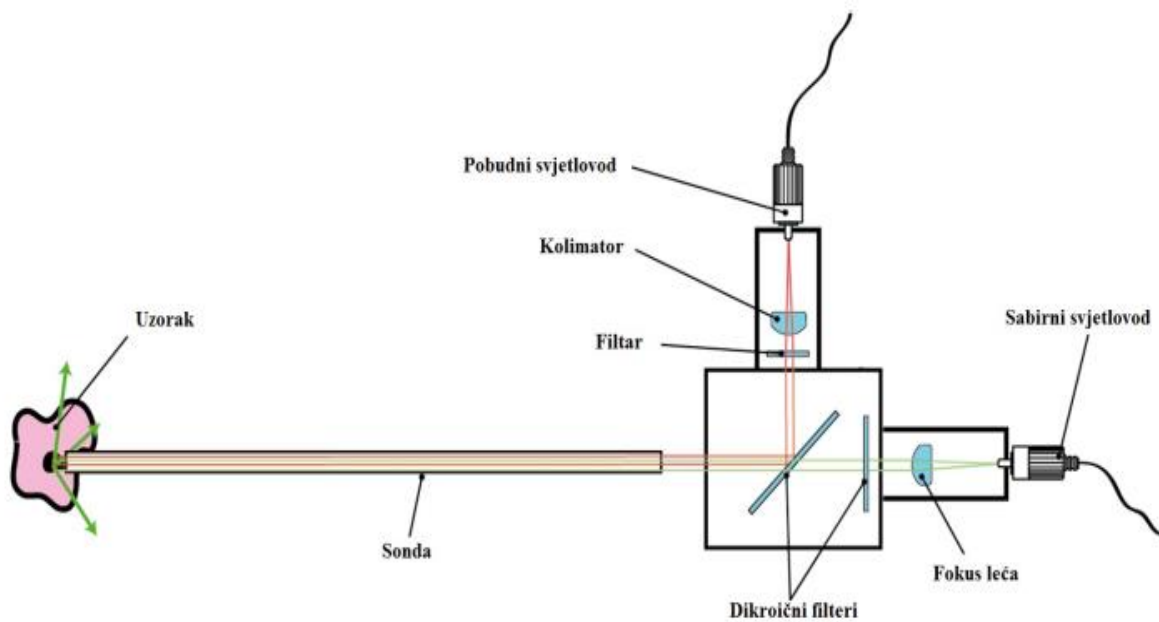
Slika 1-4-3-3 IR i Ramanov spektar benzojeve kiseline⁴⁵

2.4.4. Ramanova spektroskopija *in line*

Princip *in-line* na primjeru disperzivne Ramanove spektroskopije prikazan je na slici 2-4-4-1. Mjerenje se provodi uporabom kontaktne sonde koja se uranja u reakcijsku smjesu i koja je svjetlovodom je povezana sa spektrometrom. Na slici 2-4-4-2 prikazan je presjek tipične Ramanove kontaktne sonde. Sonda se sastoji od glave u kojoj se nalazi set optičkih segmenata za filtriranje i usmjeravanje pobudnog laserskog i raspršenog zračenja i od optičkog segmenta varijabilne dužine koji se uranja u smjesu u kojem se nalazi dodatna fokus leća i na čijem se vrhu nalazi kristalni prozor najčešće izrađen od safira. Prema dubini penetracije pobudnog zračenja u mjerno polje, razlikujemo sonde kratkog i dugog fokusa. Tako su sonde kratkog fokusa primjenjive na sustave veće zamućenosti dok su dugog fokusa prikladnije za mjerenje bistrih otopina.



Slika 2-4-4-1 Shematski prikaz mjerenja disperzivnom Ramanovom spektroskopijom *in-line*



Slika 2-4-4-2 Shematski prikaz sonde i glave sonde s putevima laserskog i raspršenog zračenja

2.4.5. Kritične varijable u procesima kristalizacije

Mjerenje kritičnih parametara kristalizacije ključno je za analizu, praćenje, razumijevanje, optimizaciju i kontrolu procesa. Kritični proces ili parametar proizvoda mjeriva je nezavisna vrijednost koja ima značajan utjecaj na proces ili kvalitetu proizvoda.³⁶ Kako je već naglašeno, kritični parametri koji određuju kakvoću krajnjih proizvoda su veličina čestica, RVČ, oblik

kristala, polimorfni oblik i čistoća kristala.³⁸ Svi ti parametri imaju utjecaj na topljivost i brzinu otapanja (bioraspoloživost, farmaceutski učinak) lijeka i/ili na procese koji slijede (filtracija, sušenje). Općenito, sitne i igličaste čestice se teško filtriraju. Sitne čestice, nadalje, imaju veliku vanjsku površinu, što povećava vjerojatnost da se nečistoće zadržavaju na površini.³⁹ Obično se zahtijevaju veliki kristali s uskom raspodjelom veličine čestica kako bi se poboljšala mogućnost filtracije, čistoća kristala i stabilnost kristalnog produkta pri skladištenju.⁴⁰

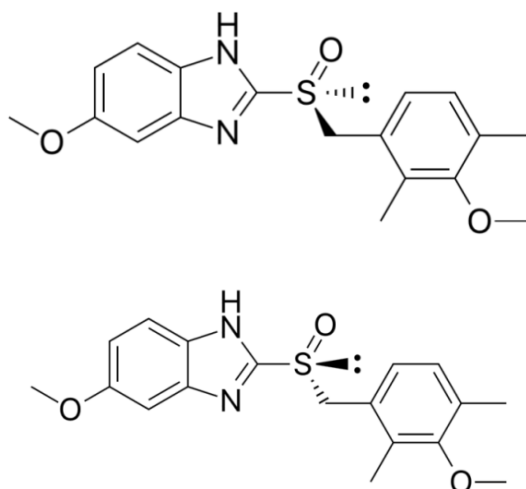
Ključan procesni parametar koji utječe na kvalitetu proizvoda je prezasićenost. To je pokretačka sila svakog procesa kristalizacije. Nukleacija, rast i aglomeracija kristala te, kao posljedica oblika kristala, RVČ i čistoća složena su funkcija prezasićenosti. Kako bi se postigla povoljna ravnoteža između stupnja nukleacije, rasta i aglomeracije te dobio proizvod željenih karakteristika, potrebno je kontrolirati prezasićenost tijekom cijelog procesa kristalizacije.⁴⁰

Kontrolom procesa kristalizacije i slijednih koraka obrade produkta (npr. filtracija, sušenje) postiže se za uspješna izvedba proizvodnog procesa. U praksi je potrebna kombinirana kontrola tih ciljeva, jer je često poželjno postići prihvatljivu učinkovitost procesa proizvodnje (vrijeme obrade, prinos) i tražene karakteristike proizvoda.⁴⁰

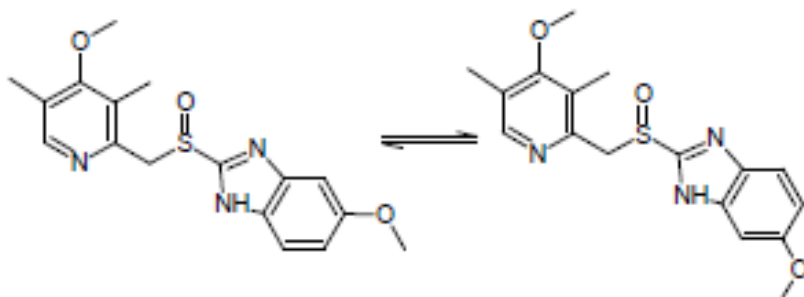
2.4.5. Omeprazol

Spoj 5-metoksi-2-[[[4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol, generičkog naziva omeprazol, je poznat kao potentni, selektivni i ireverzibilni inhibitor protonske pumpe koji inhibira izlučivanje želučane kiseline. Koristi se za liječenje bolesti povezanih sa želučanom kiselinom⁴⁶ te za liječenje simptoma bolesti gastroezofagealnog refluksa i drugih bolesti uzrokovane povećanim lučenjem želučane kiseline. Koristi se i za promicanje liječenja erozivnog ezofagitisa (oštećenje jednjaka uzrokovano želučanim otpadom kiseline).⁴⁷ Osim toga, također se može pripisati zajedno s antibioticima za liječenje čireva u želucu uzrokovane infekcijom *Helicobacter pylori*. Djeluje na način da se ireverzibilno veže na -SH skupinu cisteina H⁺/K⁺ ATP-aze i time blokira sekreciju želučane kiseline.⁴⁸ Molekula omeprazola egzistira u dva tautomerna oblika. Sadrži trikoordinirani sulfinilni atom sumpora, što znači da može egzistirati u dva enantiomerna oblika kao što je prikazano na slici 2-4-5-1. Ukupno dakle valja razlikovati četiri specije, a to su dva enantiomera od kojih svaki

može postojati u dva tautomerna oblika. Komercijalni omeprazol na tržište se stavlja kao racemat. Literaturno su opisane tri polimorfne forme omeprazola, A, B i C.



Slika 2-4-5-1 Molekulska struktura (S)-(-)-omeprazola (gore) i (R)-(+)-omeprazola (dolje)⁴⁹



Slika 2-4-5-2 Molekulska struktura dvaju tautomera omeprazola

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. SVRHA RADA

Kontrola procesa kristalizacije je od velikog značaja za selektivnu kristalizaciju polimorfa. Kontrola temperature i prezasićenosti otopine, nužni su uvjeti za kvalitetnu provedbu procesa, a kristalizacija određenog polimorfa je najčešće pod utjecajem aditiva, otapala kao i njihovih međusobnih interakcije. Ovim radom prikazano je kako različiti uvjeti kristalizacije mogu utjecati na dobivanje različitih polimorfnih struktura određene aktivne supstance. Transformacija polimorfa tijekom procesa pri određenim procesnim uvjetima prikazana je Ramanovom spektroskopijom, a kinetika kristalizacije prikazana je FBRM tehnologijom.

U svrhu dobivanja triju različitih polimorfnih struktura kristalizacijom iz polazne komponente omeprazola, provedena su tri seta eksperimenata: 1. set obuhvaća pripremu polimorfnih formi A, B i C iz prekristaliziranog omeprazola (OMP A-1, B-1 i C-1); 2. set također obuhvaća pripremu svih triju polimorfnih formi, ali iz sirovog osušenog omeprazola (OMP A-2, B-2 i C-2); a u 3. setu je provedeno uvećanje volumena, tzv. *scale up*, odnosno provodila se priprema svih triju polimorfnih formi na isti način kao i u prethodnim setovima i to iz prekristaliziranog omeprazola.

3.2. MATERIJALI

Pri provođenju kristalizacije omeprazola hlađenjem (forme OMP B i C) te pri sobnoj temperaturi (forma OMP A), korištene su sljedeće kemikalije u različitim količinama:

- sirovi omeprazol (krutina),
- prekristalizirani omeprazol (krutina),
- aceton,
- metanol,
- 40.0%-tna vodena otopina metilamina,
- 25.0%-tna vodena otopina amonijaka.

Tablica 3-2-1 Tehnički podaci korištenih kemikalija

| Kemikalije → | OMP sirovi | OMP prekristalizirani | aceton | metanol | metilamin | amonijak |
|--|---|---|---------------------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------|
| Kontrolni br. | 34/3, 27320218 | M-23, 28190218 | 6911107 | 6876075 | M0137 | 161801 |
| Molekulska formula | C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S | C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S | C ₃ H ₆ O | CH ₃ OH | CH ₃ NH ₂ | NH ₄ OH |
| Relativna molekulska masa, g mol ⁻¹ | 345,417 | 345,417 | 58,08 | 32,04 | 31,01 | 17,03 |
| Gustoća, kg m ⁻³ | | | 784 | 792 | 700 | 0,73 |
| Temperatura tališta, °C | 156 | 156 | -95 | -97,6 | -93 | -77,73 |
| Temperatura vrelišta, °C | | | 56 | 64,7 | -6 | -33,34 |
| Topljivost, mg/mL H ₂ O (25°C) | 82,3 | 82,3 | topljiv | topljiv | topljiv | topljiv |
| Čistoća, % | | | 99,5 | | | |

3.3. APARATURA ZA PROVEDBU EKSPERIMENATA

Aparaturu za praćenje krivulja topljivosti, čine:

- staklena tikvica volumena 250 ml opremljena mehaničkim miješalom
- laboratorijski termometar
- laboratorijska vaga
- zagrijana kupelj
- Liebiegovo hladilo

Aparaturu za provođenje kristalizacije hlađenjem, čine:

- staklene tikvice volumena 250 ml i 500 ml opremljene mehaničkim miješalom
- šaržni reaktor volumena 7 L

- termostat
- Liebiegovo hladilo
- laboratorijski termometar
- laboratorijska vaga
- Buchner lijevak
- zagrijana kupelj
- ledena kupelj
- vakuum sušnica

Ostali uređaji za praćenje procesa kristalizacije i identifikaciju polimorfnih oblika omeprazola:

- vlagomjer (HR73 *Halogen Moisture Analyzer*, METTLER TOLEDO, slika 3-3-1)
- Raman uređaj za spektroskopiju (*Reaction Analysis Monitoring And Control*, *RAMANRXN SYSTEMS*, KAISER, OPTICAL SYSTEMS INC., slika 3-3-2)
- FBRM uređaj za praćenje veličine čestica (*Focussed beam reflectance measurement*, ParticleTrack FBRM G600 Ex, METTLER TOLEDO, slika 3-3-3)
- SEM (skenirajući elektronski mikroskop, slika 3-3-4)
- XRPD (uređaj za rendgensku analizu, slika 3-3-5)



Slika 3-3-1 Vlagomjer HR73 Halogen Moisture Analyzer



Slika 3-3-2 Raman uređaj za spektroskopiju RAMANRXN SYSTEMS



Slika 3-3-3 FBRM uređaj za praćenje veličine čestica FBRM G600 Ex



Slika 3-3-4 Pretražni elektronski mikroskop Tescan Vega III Easyprob



Slika 3-3-5 XRPD uređaj, *PANalytical X'Pert Pro powder diffractometer*, model PW3050/60



Slika 3-3-6 Čestični analizator Shimadzu SALD-3101

3.4. METODE ZA PROVEDBU EKSPERIMENTA

3.4.1. ODREĐIVANJE KRIVULJA TOPLJIVOSTI

Za provođenje procesa kristalizacije u svrhu dobivanja triju polimornih formi A, B i C iz sirovog kao i iz prekrizaliziranog omeprazola, bilo je potrebno utvrditi krivulje topljivosti navedenih formi, kako bi dobili optimalne uvjete provođenja kristalizacije. Produkti polimorfa A, B, i C (dobiveni u prvom setu eksperimenata iz prekrizaliziranog omeprazola: OMP A-1, B-1 i C-1) za određivanje krivulje topljivosti priređeni su eksperimentima prema procedurama opisanim u patentnim prijavama US6150380, US7553856 i US6384059 opisanim u poglavlju 3.4.3.

Određivanje krivulje topljivosti za sve tri polimorfne forme provedeno je na isti način. Za polimorfe A i B korišteno je otapalo metanol uz dodatak 25.0 %-tne vodene otopine NH_3 , a za

polimorf C korišten je aceton uz dodatak 40.0 %-tne vodene otopine CH_3NH_2 . Topljivost omeprazola određena je u tikvicama volumena 100 ml i 250 ml. U određeni volumen otapala šaržirana je određena masa kristala. Otopina je miješana magnetskim miješalom te sporo zagrijavana do temperature otapanja što je vizualno određeno. Povećanjem mase omeprazola, dobiven je niz temperatura koje određuju krivulju topljivosti omeprazola u određenim otapalima.

3.4.2. SUŠENJE SIROVOG OMEPRAZOLA

Za dobivanje triju polimorfnih formi omeprazola A, B i C kristalizacijom iz sirovog omeprazola, bilo je potrebno provesti sušenje do sadržaja vlage manjeg od 1.0 %. Sušenje krutog sirovog omeprazola provedeno je pri 30 °C u laboratorijskom vakuum sušioniku s početnim udjelom vlage od 11.0 %. Udio vlage u masi provjeravao se u približno jednakim vremenskim razmacima na uređaju za određivanje gubitka vlage sušenjem (slika 3-3-1) pri 105 °C. Krivulja sušenja, kao i pripadajući eksperimentalni podaci dani su u rezultatima.

3.4.3. PRIPRAVA POLIMORFNIH FORMI OMP A,B I C IZ PREKRISTALIZIRANOG I SIROVOG OMEPRAZOLA

Forme A, B i C iz prekrystaliziranog i osušenog sirovog omeprazola dobivene su prema patentima US6150380, US7553856 i US6384059.^{50,51,52} Provodila se kristalizacija hlađenjem za dobivanje polimornih formi B i C, te pri sobnoj temperaturi za polimorfnu formu A. U tablicama 3-4-1, 3-4-2 i 3-4-3 prikazane su eksperimentalne priprave.

3.4.3.1. Primjer pripreme omeprazola polimorfne forme A prema patentima US6150380 i US6384059:

55.8 g omeprazola dodano je pri sobnoj temperaturi u 348 ml metanola uz dodatak 1.3 ml 25.0 %-tnog amonijaka. Suspenzija je miješana u mraku narednih 45 sati te zatim filtrirana. Filtrat je sušen 18 sati pri 30 °C, pod niskim tlakom (<5 mbar).

3.4.3.2. Primjer pripreme omeprazola polimorfne forme B prema patentima US6150380 i US6384059:

50.0 g omeprazola dodano je pri temperaturi od 50 °C u 750 ml metanola uz dodatak 0.7 ml 25.0 %-tnog amonijaka. Otopina je zatim filtrirana i ohlađena s 20 na 0 °C tijekom 20 minuta. Formirani kristali su zatim filtrirani i isprani ohlađenim metanolom te zatim stavljeni na sušenje. Filtrat je sušen 24 sata pri 40 °C, pod niskim tlakom (<5 mbar).

3.4.3.3. Primjer pripreme omeprazola polimorfne forme C prema patentu US7553856:

125.0 g omeprazola dodano je u mješavinu 100 ml 40.0 %-tne vodene otopine metilamina i 125 ml acetona pri sobnoj temperaturi. Ovoj otopini dodano je još 2000 ml acetona te je ista miješana 1 sat pri sobnoj temperaturi. Zatim je otopina ohlađena na temperaturu od -10 do -15 °C. Nastali produkt filtriran je i ispran acetonom. Formirani, još uvijek vlažni kristali suspendiraju se u 400 ml vode pri sobnoj temperaturi. Suspenzija je intenzivno miješana kroz 1 h i pri tome ohlađena do temperature od 20 °C. Dobiveni filtrirani produkt ispran je s vodom i stavljen na sušenje pri 40 °C do konstantne mase.

Tablica 3-4-1 Način dobivanja polimorfa A iz sirovog omeprazola

| eksperiment br. | OMP A-2 |
|--------------------------------------|---------|
| OMP [g] | 20.0 |
| MeOH [ml] | 125.0 |
| C [g/L] | 160.0 |
| 25.0 % NH ₃ [ml] | 0.46 |
| vrijeme miješanja [h] | 47.0 |
| MeOH za pranje kolača [ml] | 40.0 |
| temp. sušenja [°C] | 30.0 |
| temp. određivanja gubitka vlage [°C] | 105.0 |

Tablica 3-4-2 Način dobivanja polimorfa B iz sirovog omeprazola

| eksperiment br. | OMP B-2 |
|-----------------------------|---------|
| OMP [g] | 20.0 |
| MeOH [ml] | 300.0 |
| 25.0 % NH ₃ [ml] | 0.46 |

| | |
|----------------------------|--------|
| temp. zagrijavanja [°C] | 50.0 |
| temp. hlađenja [°C] | 50.0-0 |
| vrijeme hlađenja [h] | 0.3 |
| MeOH za pranje kolača [ml] | 40.0 |
| temp. sušenja [°C] | 40.0 |
| temp. vlagomjera [°C] | 105.0 |

Tablica 3-4-3 Način dobivanja polimorfa C iz sirovog omeprazola

| eksperiment br. | OMP C-2 |
|-------------------------------------|---------|
| OMP [g] | 25.0 |
| acetone [ml] | 25.0 |
| acetone [ml] | 400.0 |
| vrijeme miješanja [h] | 2.0 |
| temp. miješanja [°C] | 23.0 |
| vrijeme hlađenja [h] | 1.0 |
| Konačna temp. hlađenja [°C] | -10.0 |
| ispiranje acetonom [ml] | 50.0 |
| Volumen vode za pripravu suspenzije | 80.0 |
| vrijeme miješanja [h] | 2.0 |
| temp. miješanja [°C] | <20.0 |
| temp. sušenja [°C] | 40.0 |
| temp. vlagomjera [°C] | 105.0 |

3.4.4. UVEĆANJE PROCESA PRIPREME RAZLIČITIH POLIMORFNIH FORMI OMEPRAZOLA

Priprava polimorfa A, B i C iz prekrizaliziranog omeprazola provodila se i u većem mjerilu, odnosno u reaktoru volumena 7 l opremljenim mehaničkim miješalom, a kako bi se pratila raspodjela veličina čestica, implementirana je FBRM sonda, kao i Raman sonda - za praćenje, odnosno razlikovanje nastalih polimorfnihi formi. Uvećanje volumena u postupku za dobivanje polimorfne forme OMP A je 35 puta, za OMP B je 17,5 puta, a za OMP C je 10,8 puta. Eksperimentalni podaci provođenja *scale up* kristalizacije za forme A, B i C prikazani su u tablicama 3-4-4, 3-4-5 i 3-4-6.

Tablica 3-4-4 Način dobivanja forme A iz prekristaliziranog omeprazola

| eksperiment br. | OMP A-3 |
|-----------------------|---------|
| OMP [g] | 700.0 |
| MeOH [ml] | 4366.0 |
| vrijeme miješanja [h] | 45.0 |

Tablica 3-4-5 Način dobivanja forme B iz prekristaliziranog omeprazola

| Eksperiment | OMP B-3 |
|----------------------|---------|
| OMP [g] | 350.0 |
| MeOH [ml] | 5250.0 |
| vrijeme hlađenja [h] | 0.33 |
| temp. hlađenja [°C] | 50.0-0 |
| temp. miješanja [°C] | 0 |

Tablica 3-4-6 Način dobivanja forme C iz prekristaliziranog omeprazola

| eksperiment br. | OMP C-3 |
|----------------------|---------|
| OMP [g] | 270.0 |
| acetone [ml] | 270.0 |
| temp. miješanja [°C] | 23.0 |
| vrijeme hlađenja [h] | 1.0 |
| temp. hlađenja [°C] | -15.0 |

3.4.5. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINA ČESTICA I *IN-LINE* PRAĆENJE PROCESA

RVČ *in-line* metodom određena je primjenom FBRM uređaja prikazanog na slici 3-3-3 te metodom laserske difrakcije pomoću uređaja prikazanog na slici 3-3-6 čije je mjerno područje 0.4 do 3000 μm . RVČ uzoraka omeprazola iz eksperimenata OMP A-3, B-3 i C-3 izmjerene su više puta pa je rezultat izražen kao srednja vrijednost, odnosno, srednji promjer čestica. Naime, raspodjele koje se dobivaju FBRM uređajem drukčije su od onih dobivenih laserskom difrakcijom, što je vidljivo u rezultatima u poglavlju 4.3.3.

Osim RVČ, FBRM uređajem u sustavu je praćen i broj čestica u ovisnosti o vremenu i temperaturi te prosječna veličina čestica kao i *Fouling index* (zamračenje sonde izraženo u postotcima do čega dolazi taloženjem kristala na površinu sonde). Navedena mjerenja u sustavu prikazana su grafički u rezultatima u poglavlju 4.3.3.

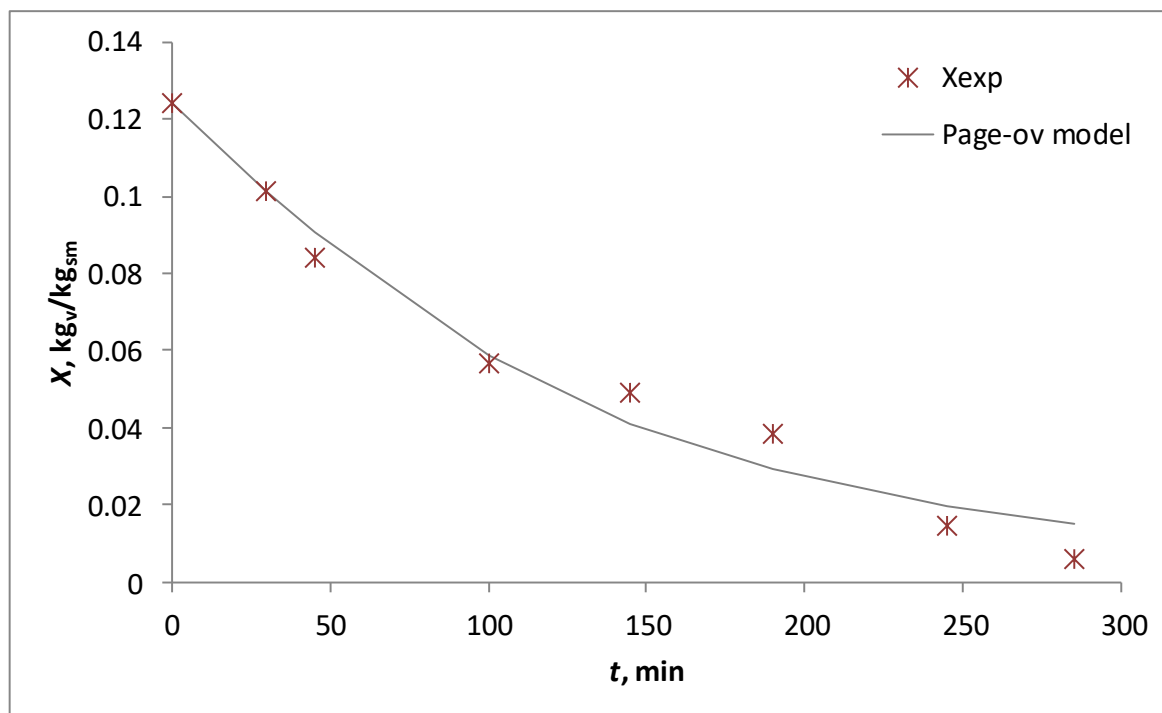
3.4.6. KARAKTERIZACIJA DOBIVENIH KRISTALA SEM ANALIZOM

U svrhu još bolje karakterizacije, dobiveni uzorci snimani su elektronskim pretražnim mikroskopom, odnosno provedena je SEM analiza i to za krute uzorke sirovog i prekrystaliziranog omeprazole te za uzorke dobivenih kristala iz svih triju seta eksperimenata, osim za uzorak iz eksperimenta OMP C-1, dobiven u maloj količini, kojeg nije preostalo nakon provođenja drugih analiza (eksperimenti OMP A-1, B-1, A-2, B-2, C-2, A-3, B-3, C-3). Dobivene slike kristala prikazane su u rezultatima u poglavlju 4.3.1., 4.3.2. i 4.3.3.

4. REZULTATI

4.1. KRIVULJA SUŠENJA SIROVOG OMEPRAZOLA

Na slici 4-1-1 grafički je prikazana dobivena krivulja sušenja sirovog omeprazola.

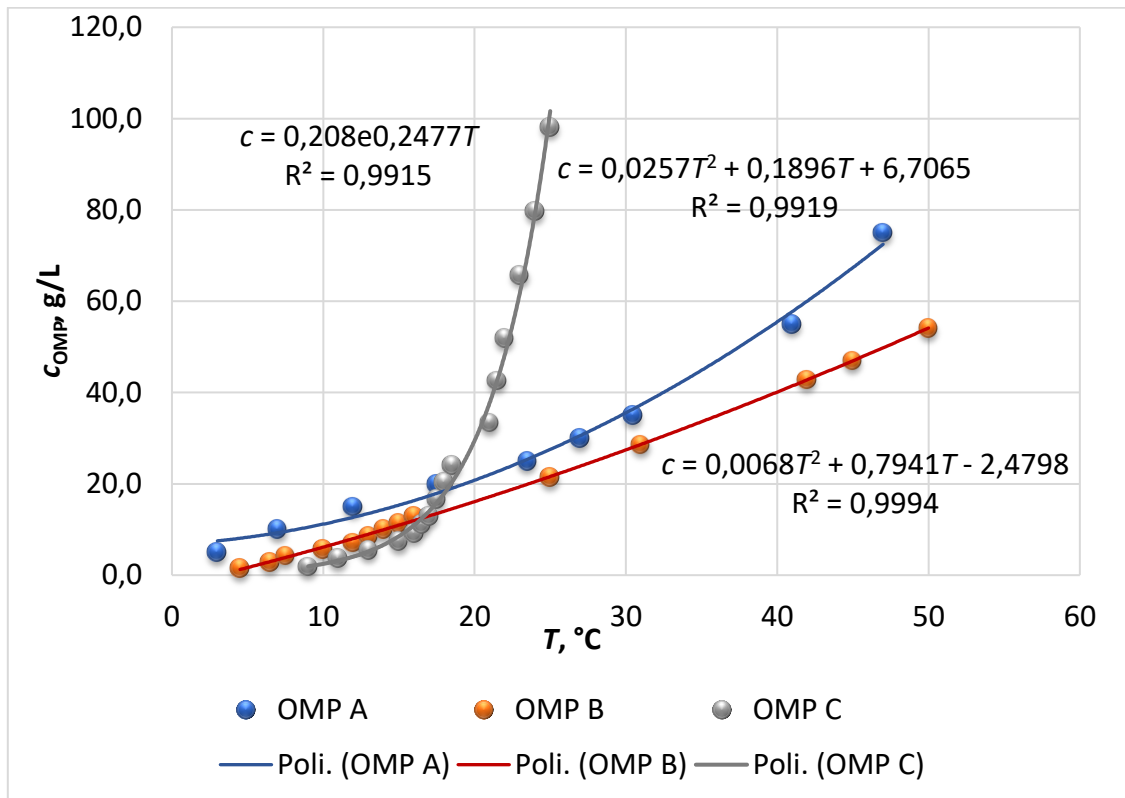


Slika 4-1-1 Grafički prikaz krivulje sušenja sirovog omeprazola

Pagov model $X_{calc} = X_{eq} + (X_0 - X_{eq}) \exp(-k \cdot t^n)$; $k=0,0051$; $n=0,974$

4.2. KRIVULJE TOPLJIVOSTI

Kao što je navedeno u eksperimentalnom dijelu, najprije su bile određivane krivulje topljivosti za sve tri forme omeprazola A, B i C. Na slici 4-2-1 prikazane su dobivene krivulje.



Slika 4-2-1 Grafički prikaz usporedbe krivulja topljivosti za sve tri polimorfne forme OMP A, B i C

4.3. REZULTATI POKUSA PRIPRAVE OMP A, B I C KRISTALA IZ SIROVOG I PREKRISTALIZIRANOG OMEPRAZOLA U REAKTORIMA RAZLIČITIH VELIČINA

U tablici 4-3-1 prikazani su dobiveni rezultati sušenja, udio gubitka vlage [%], masa dobivenog kristala [g], iskorištenje [%] i rezultati identifikacije polimorfa XRD analizom za sve pokuse pripreve kristala triju polimorfnihi formi iz polaznog sirovog i prekrystaliziranog omeprazole.

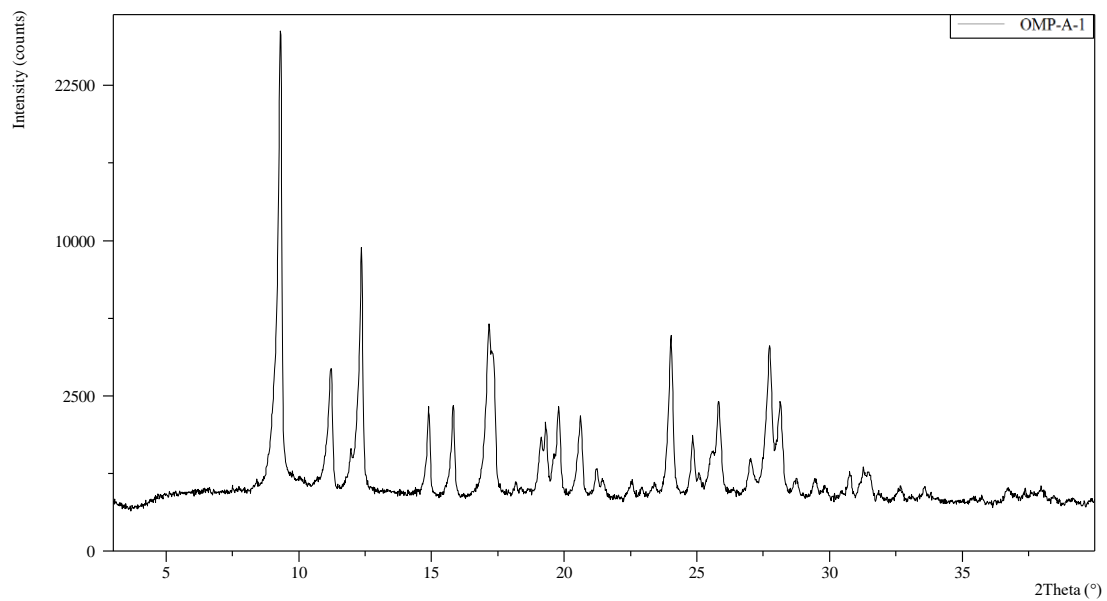
Tablica 4-3-1 Rezultati pokusa pripreve OMP A, B i C kristala

| Eksperiment | Gubitak vlage sušenjem[%] | <i>m</i> (teor.) [g] | Iskorištenje [%] | Polimorf |
|-------------|---------------------------|----------------------|------------------|----------|
| OMP A-1 | 0,15 | 20,0 | 79,45 | A |
| OMP A-2 | 0,60 | 20,0 | 75,05 | B |
| OMP A-3 | 0,29 | 700,0 | 80,7 | C |
| OMP B-1 | 0,75 | 20,0 | 68,55 | B |
| OMP B-2 | 0,35 | 20,0 | 66,8 | B |
| OMP B-3 | 0,51 (T1) / 0,36 (T2) | 300,0 | 81,35 | C |
| OMP C-1 | 0,55 | 25,0 | 59,52 | C |
| OMP C-2 | 0,57 | 25,0 | 76,16 | C |
| OMP C-3 | 0,18 | 270,0 | 65,33 | C |

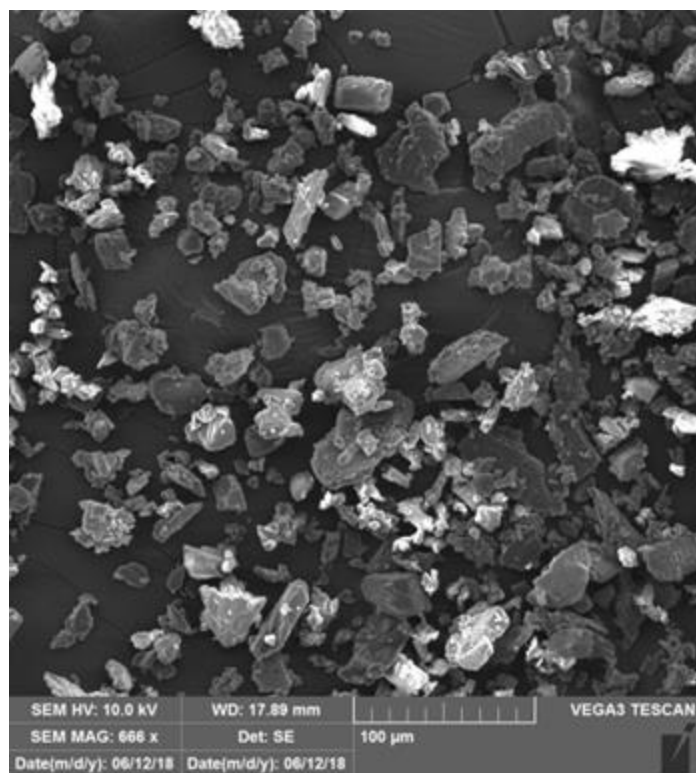
4.3.1. REZULTATI DOBIVENI IZ PREKRISTALIZIRANOG OMEPRAZOLA

U nastavku su za svaki polimorf dobiven iz prvog seta eksperimenata (OMP A-1, B-1 i C-1) prikazani dobiveni XRD spektri i to na slikama 4-3-1-1, 4-3-1-3 i 4-3-1-5 te mikrografi dobivenih kristala na slikama 4-3-1-2 i 4-3-1-4.

- **polimorf A (eksperiment OMP A-1)**

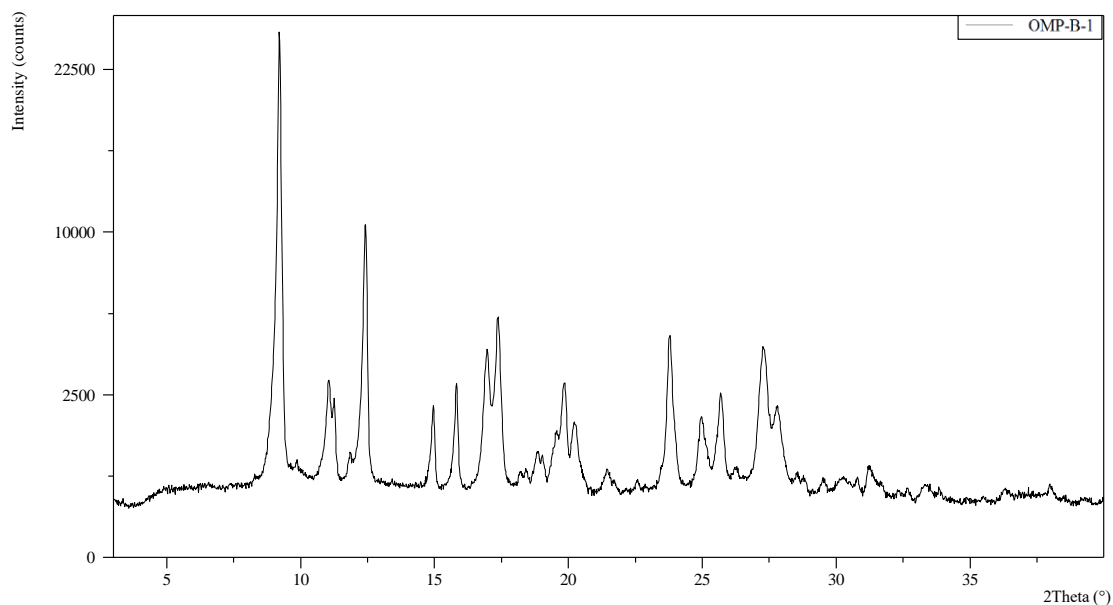


Slika 4-3-1-1 XRD spektar za kristale dobivene eksperimentom OMP A-1

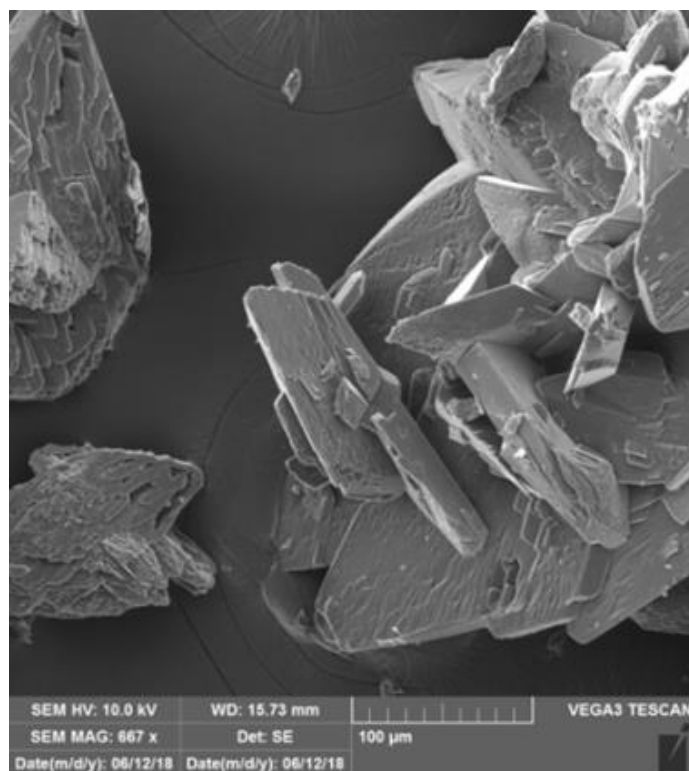


Slika 4-3-1-2 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP A-1 dobiven SEM analizom

- **polimorf B (eksperiment OMP B-1)**

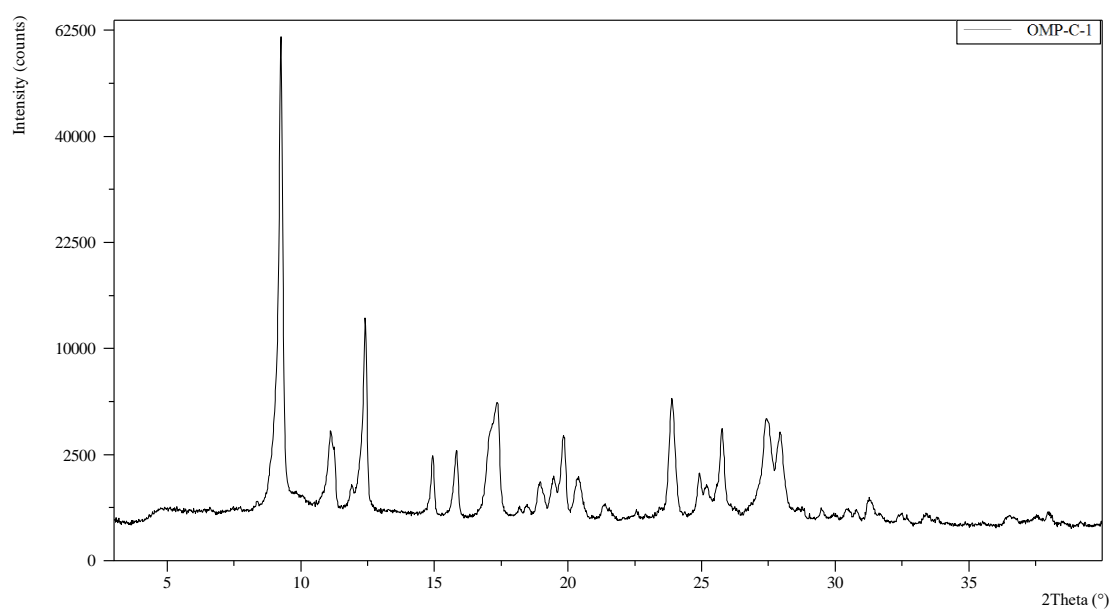


Slika 4-3-1-3 XRD spektar za kristale dobivene eksperimentom OMP B-1



Slika 4-3-1-4 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP B-1 dobiven SEM analizom.

- **polimorf C (eksperiment OMP C-1)**

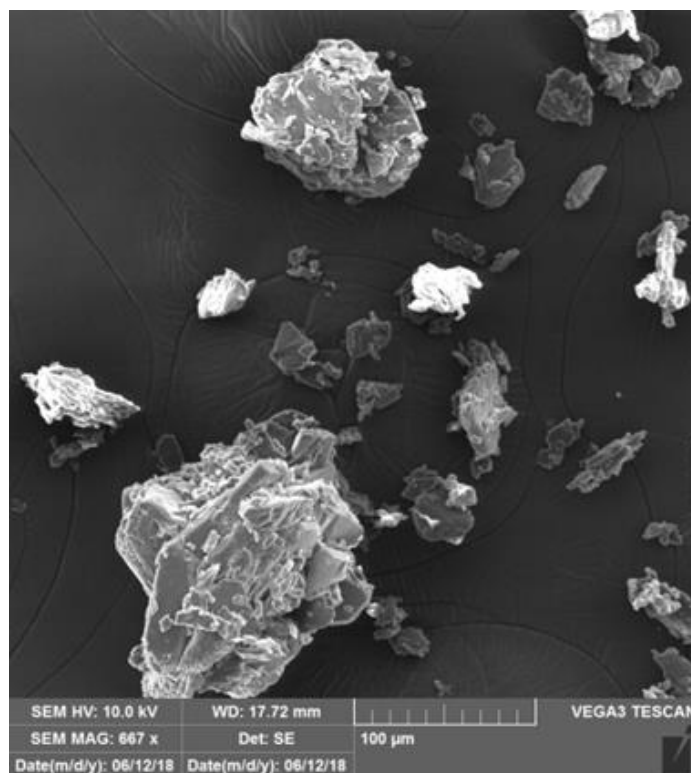


Slika 4-3-1-5 XRD spektar za kristale dobivene eksperimentom OMP C-1

4.3.2. REZULTATI DOBIVENI IZ SIROVOG OMEPRAZOLA

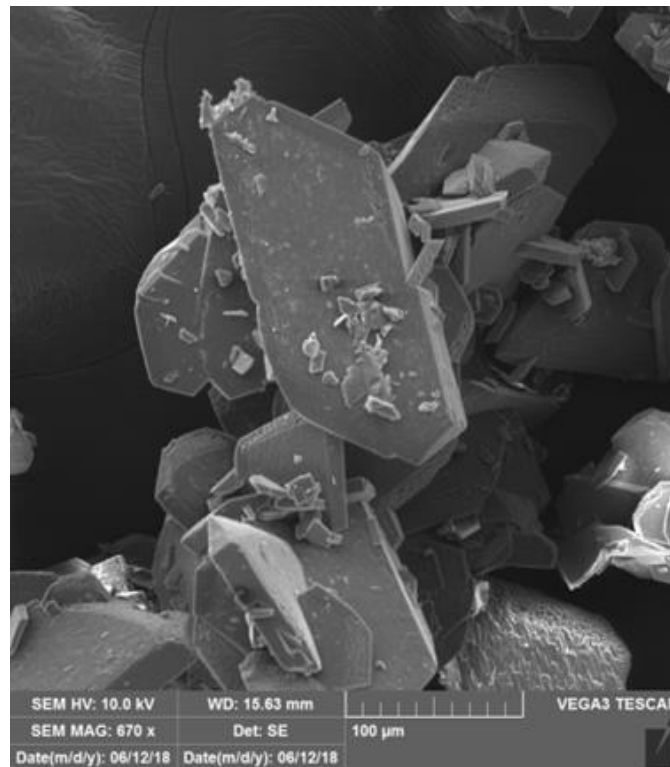
Na slikama 4-3-2-1, 4-3-2-2 i 4-3-2-3 prikazani su mikrografi kristala dobivenih u drugom setu eksperimenata (OMP A-2, B-2 i C-2), u setu priprave triju polimorfnih oblika iz sirovog omeprazola.

- **polimorf A (eksperiment OMP A-2)**



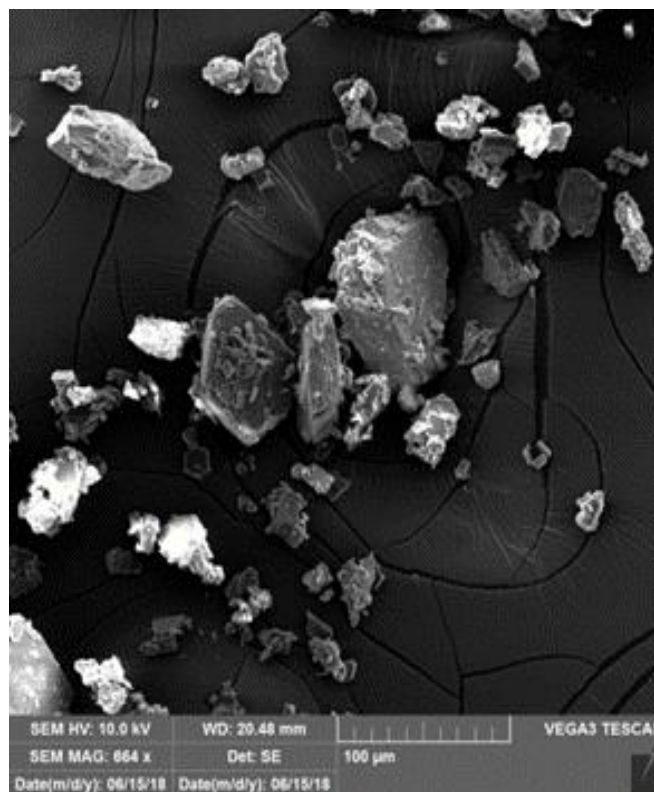
Slika 4-3-2-1 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP A-2 dobiven SEM analizom.

- **polimorf B (eksperiment OMP B-2)**



Slika 4-3-2-2 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP B-2 dobiven SEM analizom

- **polimorf C (eksperiment OMP C-2)**



Slika 4-3-2-3 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP B-2 dobiven SEM analizom

4.3.3. REZULTATI DOBIVENI UVEĆANJEM PROCESA IZ PREKRISTALIZIRANOG OMEPRAZOLA

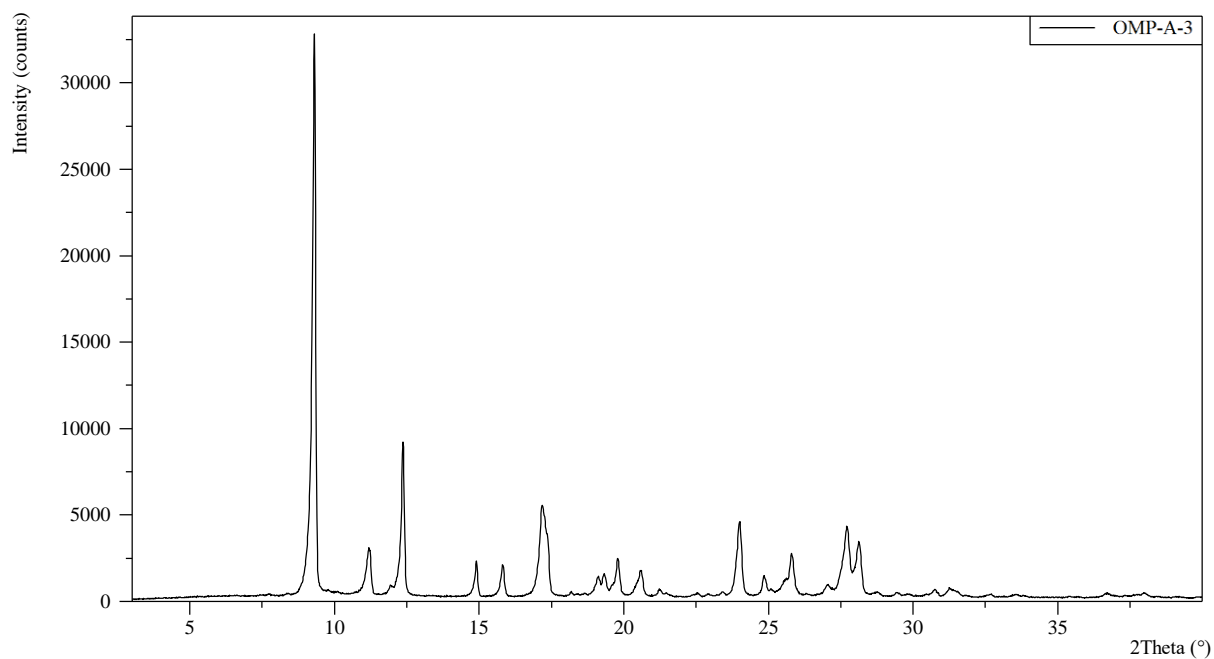
Kao što je navedeno u eksperimentalnom dijelu, za identifikaciju i razlikovanje polimorfnih oblika omeprazola, provodila se XRD analiza te su snimani spektri na Ramanovom uređaju za spektroskopiju. Na slikama 4-3-3-2, 4-3-3-6 i 4-3-3-10 dani su spektri za sve tri forme uzimani *in-line* implementacijom Ramanove sonde u reaktor, uz pripadne grafičke prikaze RVČ praćene u tom vremenu na FBRM uređaju, implementacijom FBRM sonde.

RVČ grafički je prikazana pomoću FBRM uređaja te uređaja laserske difrakcije. Osim RVČ, FBRM uređajem u navedenim *scale up* procesima, praćen je i broj čestica u ovisnosti o vremenu i temperaturi, prosječna veličina čestica te Fouling indeks. Na slikama 4-3-3-3, 4-3-3-7 i 4-3-3-11 grafički su prikazana praćenja navedenog.

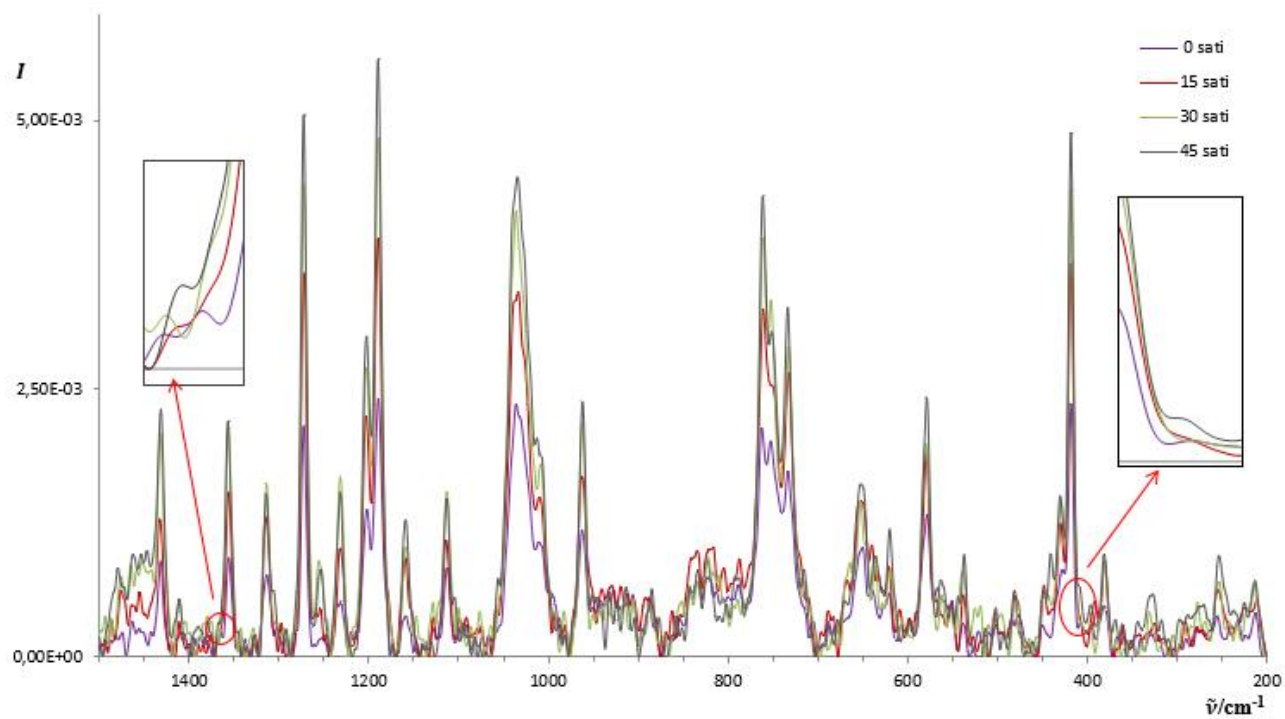
Za svaki dobiveni polimorf iz trećeg seta eksperimenta dobiveni su i mikrografi SEM analizom prikazani na slikama 4-3-3-4, 4-3-3-8 i 4-3-3-12.

Na slici 4-3-3-13 grafički je prikazana usporedba dobivene volumne RVČ za polimorfne forme dobivene trećim setom eksperimenata (OMP A-3, B-3 i C-3) dobivene *in-line*, implementacijom FBRM sonde u reaktor. Osim toga, RVČ je praćena i na uređaju laserske difrakcije, a usporedba volumne raspodjele je na slici 4-3-3-14.

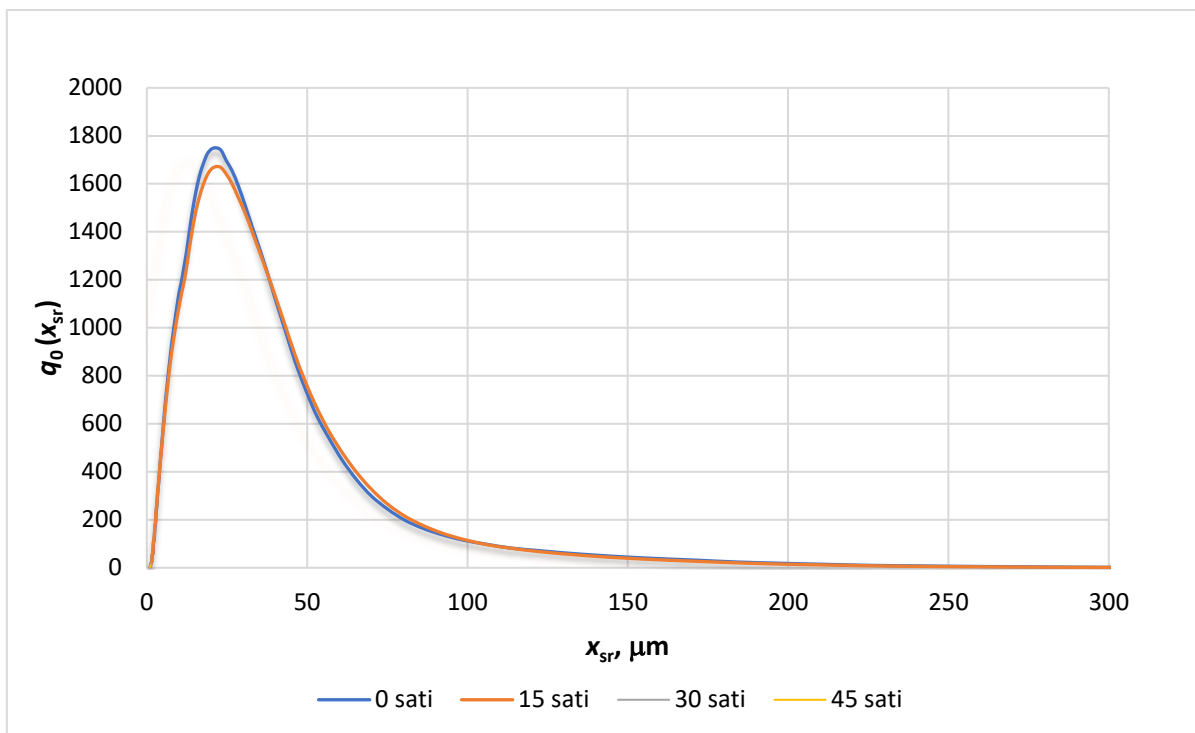
- **polimorf A (eksperiment OMP A-3)**



Slika 4-3-3-1 XRD spektar za kristale dobivene eksperimentom OMP A-3



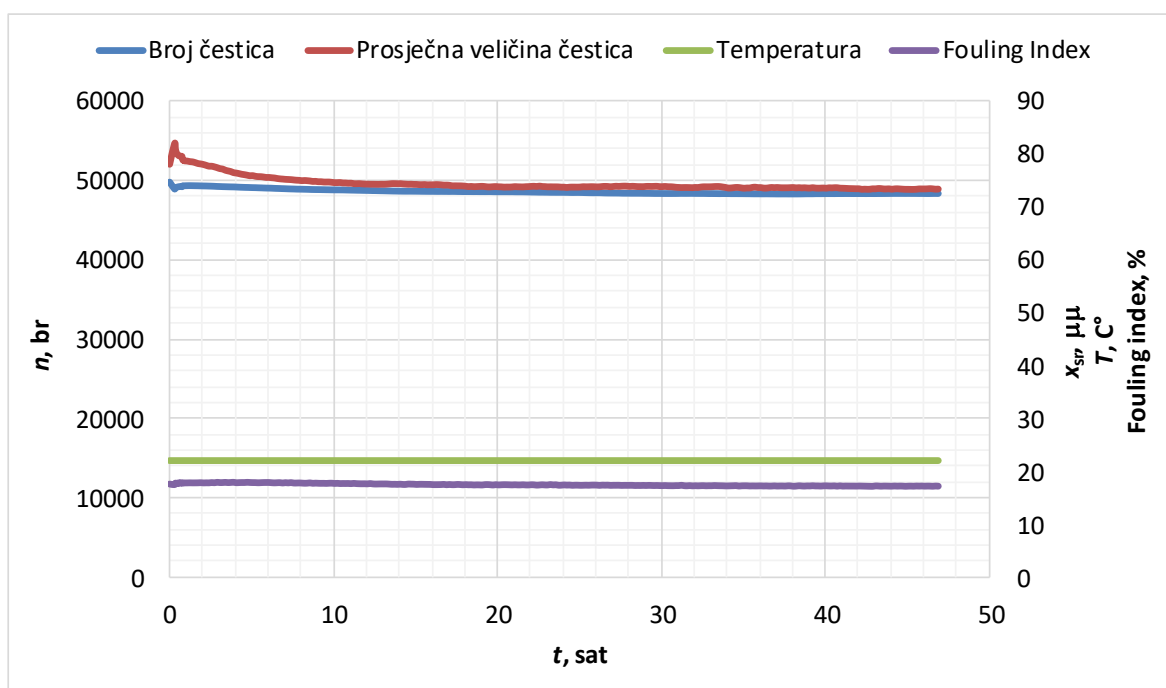
a)



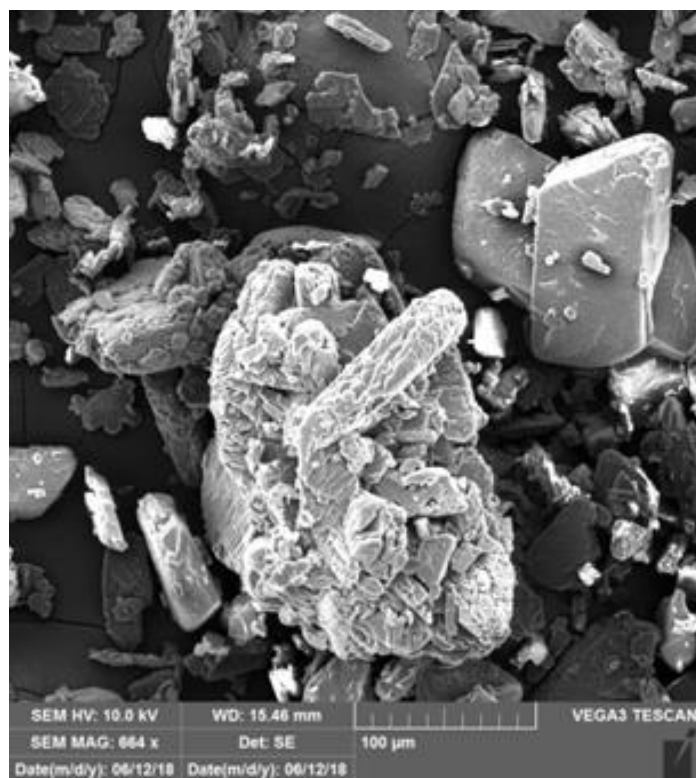
b)

Slika 4-3-3-2 a) Raman spektar za polimorfnu formu A iz eksperimenta OMP A-3 *in-line*,

b) raspodjela veličina čestica praćena kroz vrijeme

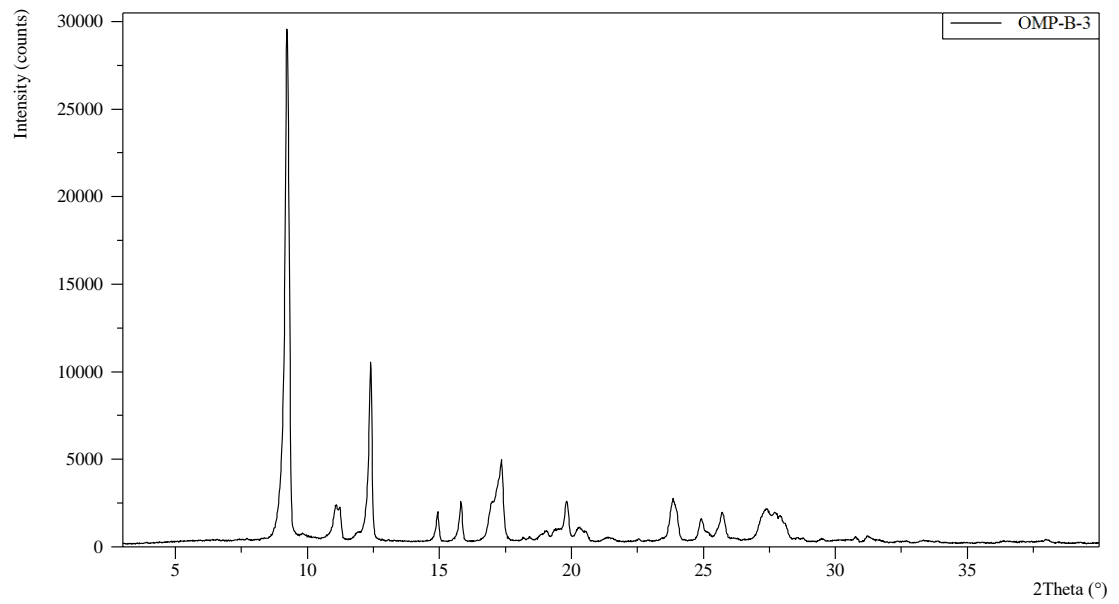


Slika 4-3-3-3 *In-line* praćenje procesa pripreve polimorfa A iz eksperimenta OMP A-3 FBRM uređajem

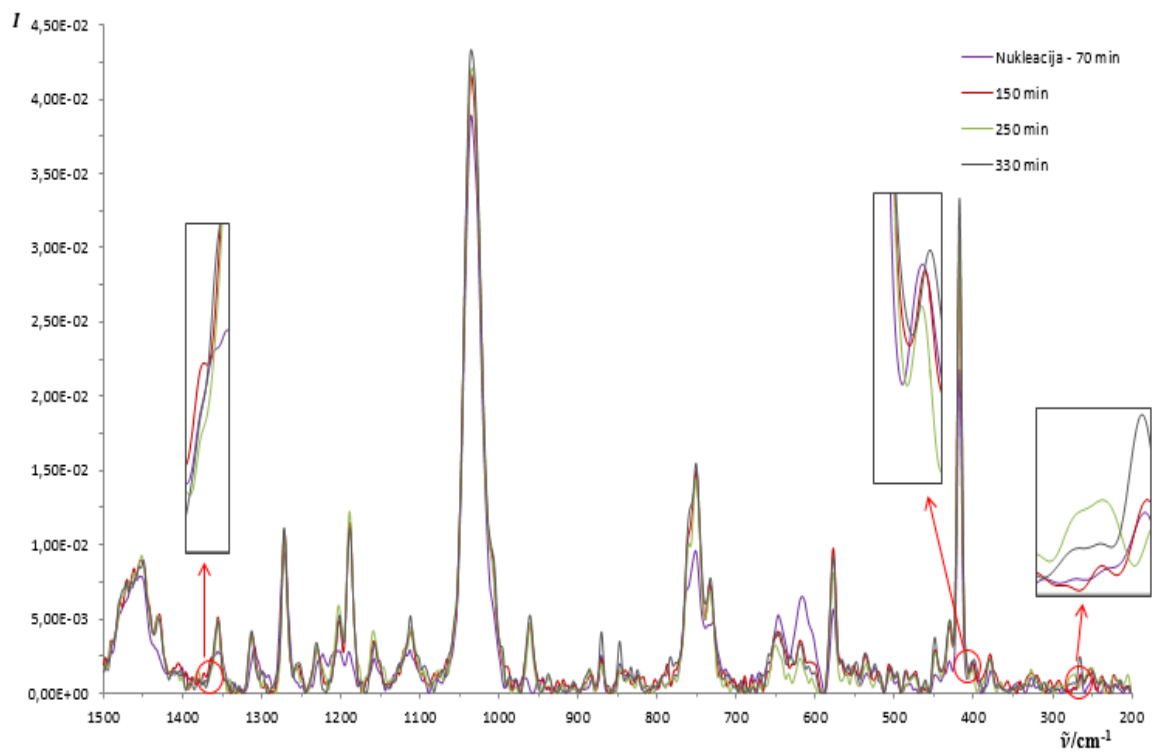


Slika 4-3-3-4 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP A-3 dobiven SEM analizom

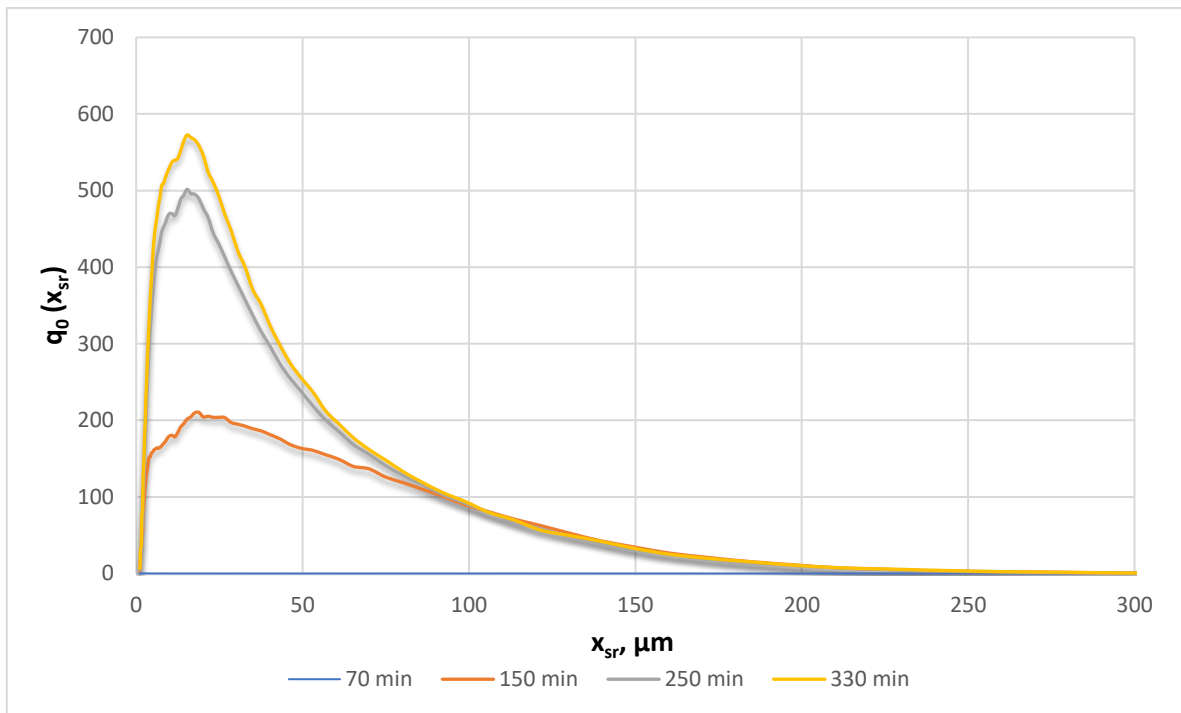
- **polimorf B (eksperiment OMP B-3)**



Slika 4-3-3-5 XRD spektar za kristale dobivene eksperimentom OMP B-3



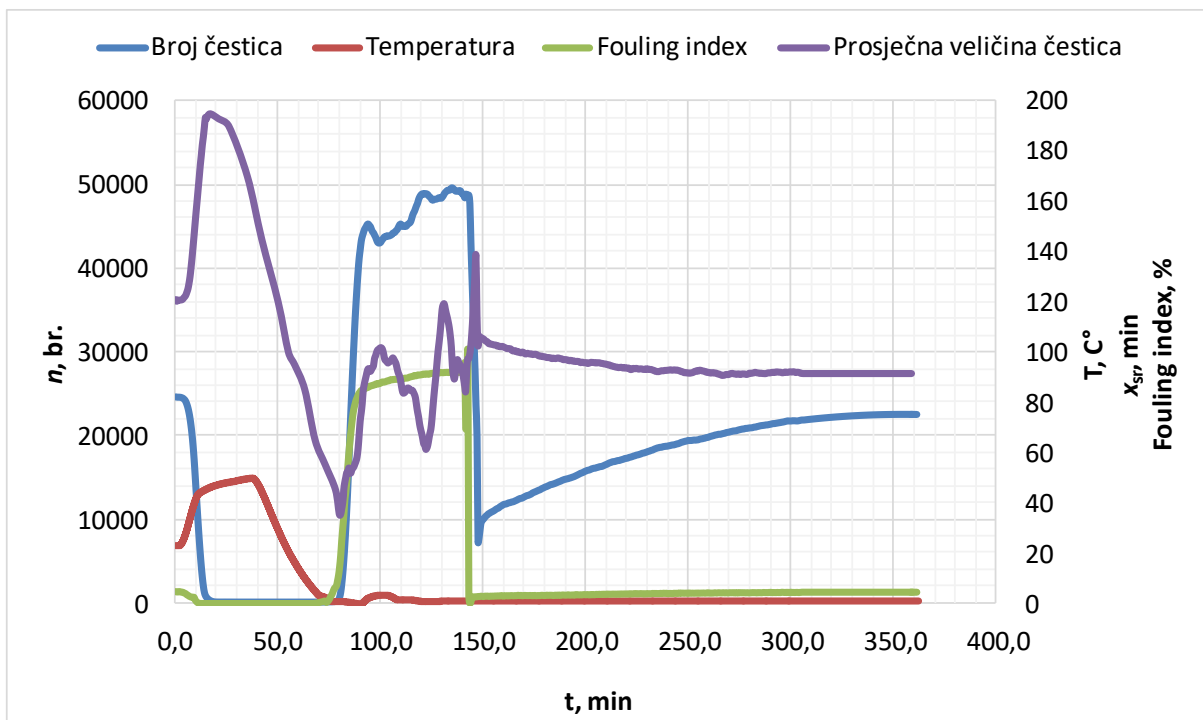
a)



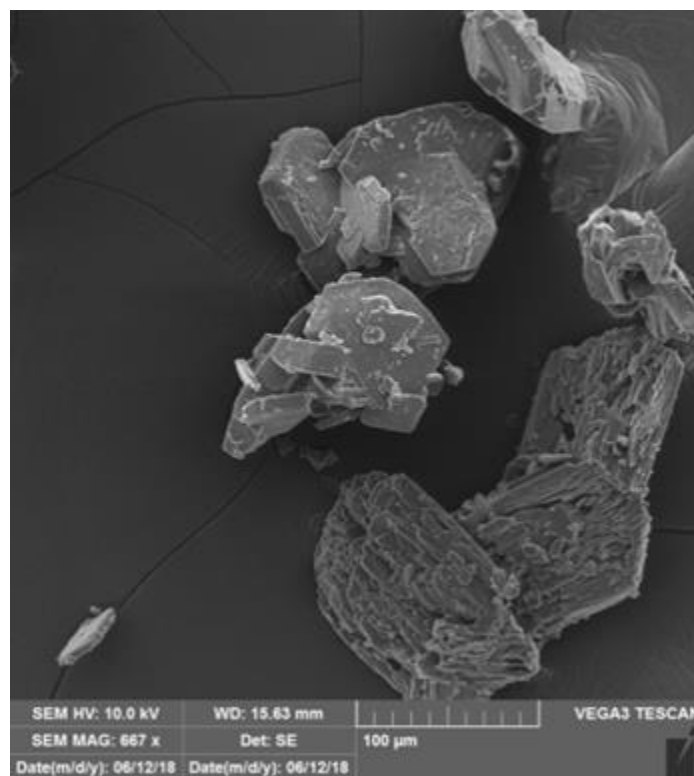
b)

Slika 4-3-3-6 a) Raman spektar za polimorfnu formu B iz eksperimenta OMP B-3 *in-line*,

b) raspodjela veličina čestica praćena kroz to vrijeme

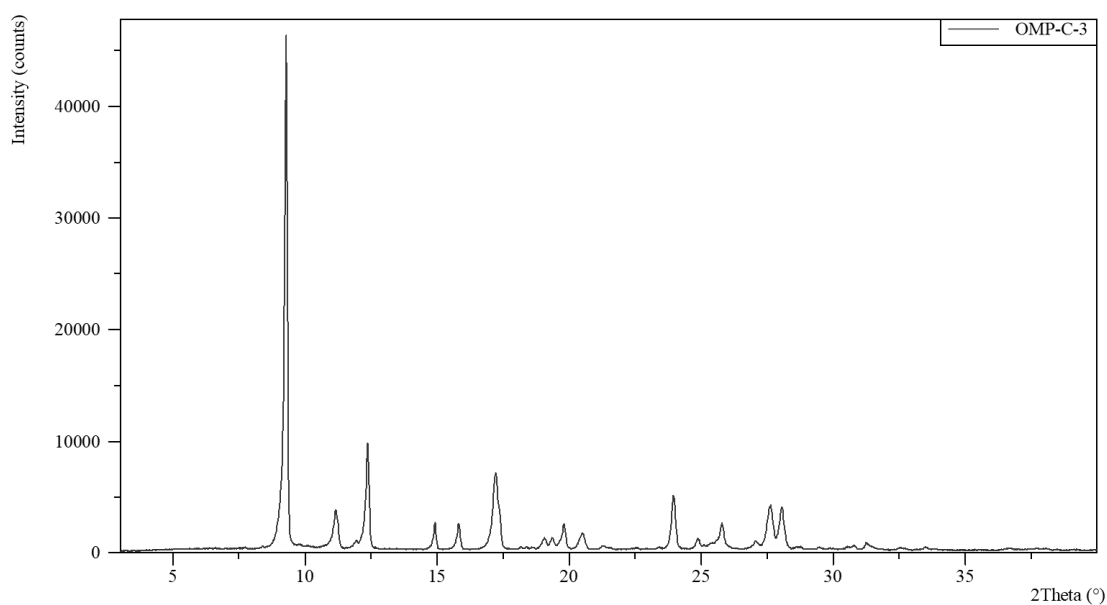


Slika 4-3-3-7 *In-line* praćenje procesa pripreve polimorfa B iz eksperimenta OMP B-3 FBRM uređajem

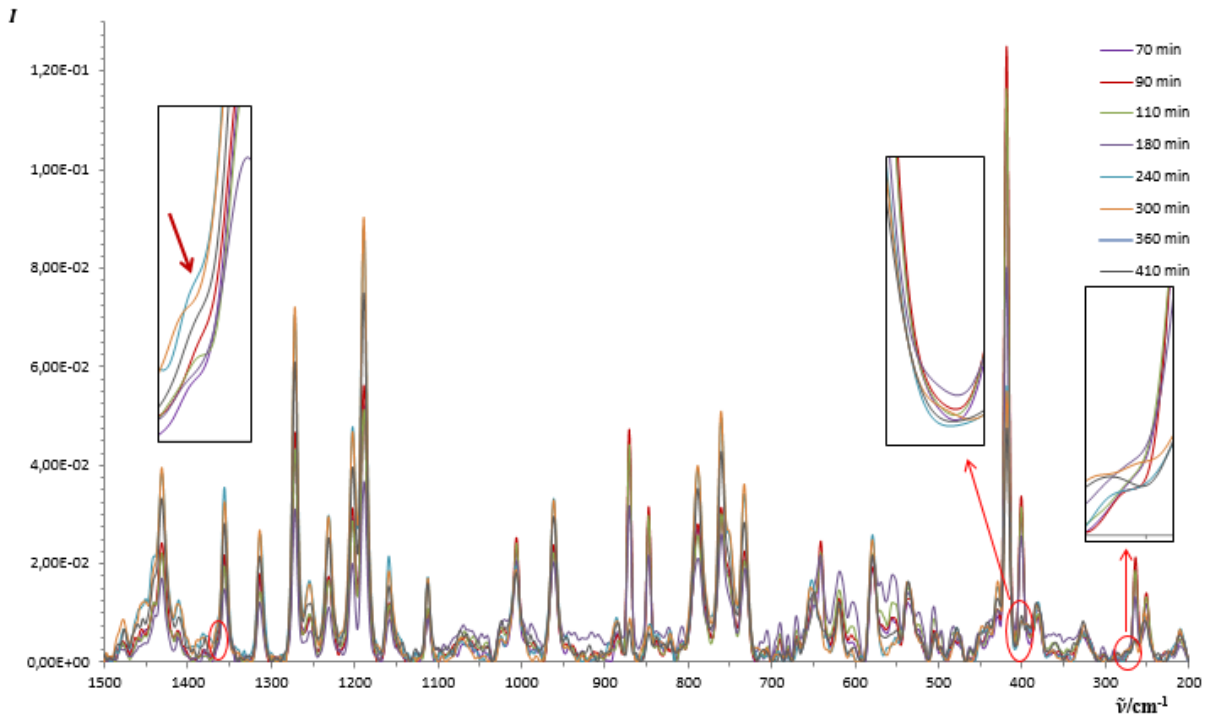


Slika 4-3-3-8 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP B-3 dobiven SEM analizom

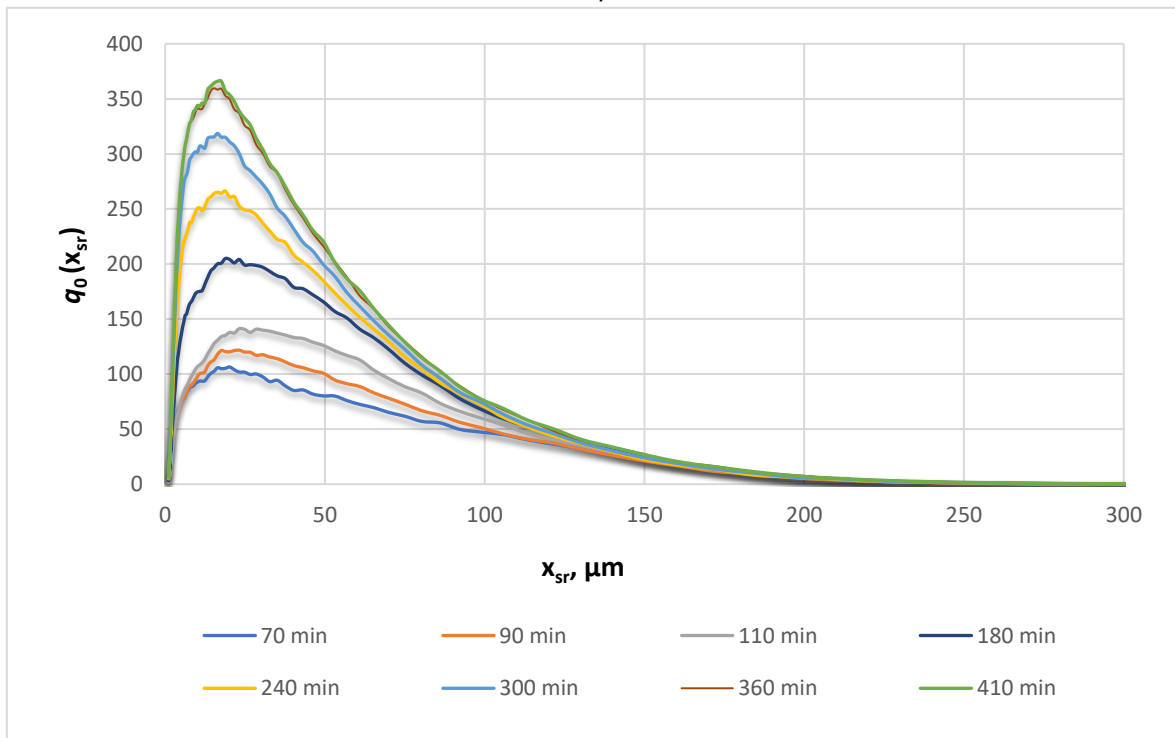
- **polimorf C (eksperiment OMP C-3)**



Slika 4-3-3-9 XRD spektar za kristale dobivene eksperimentom OMP C-3

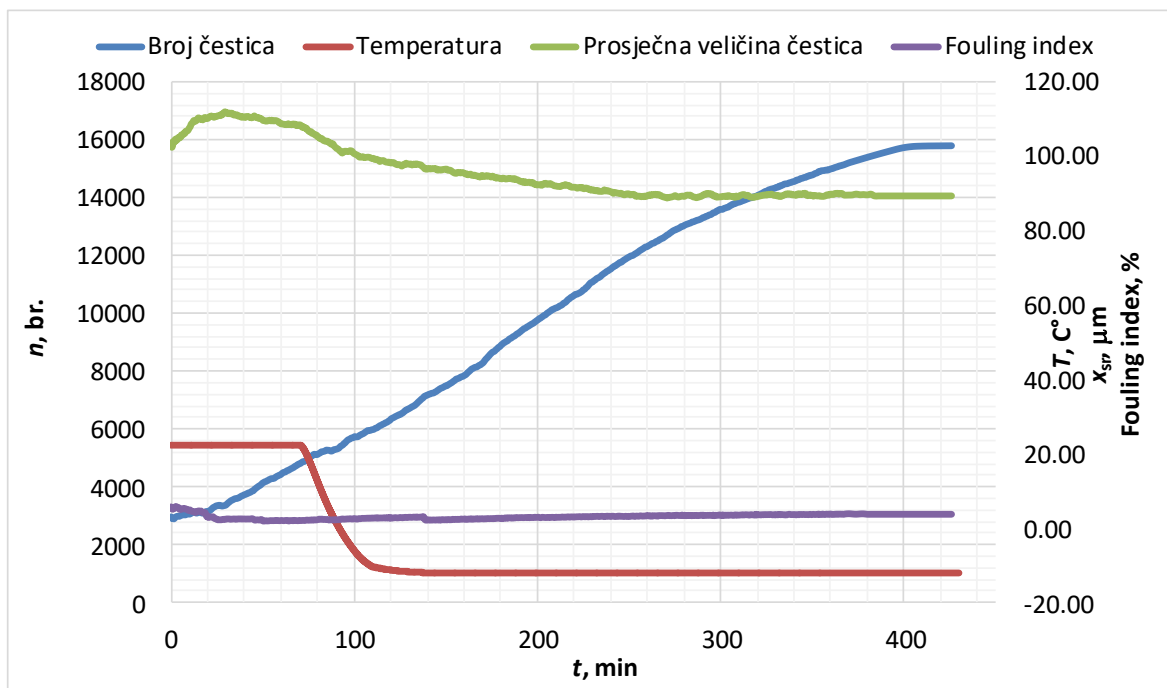


a)

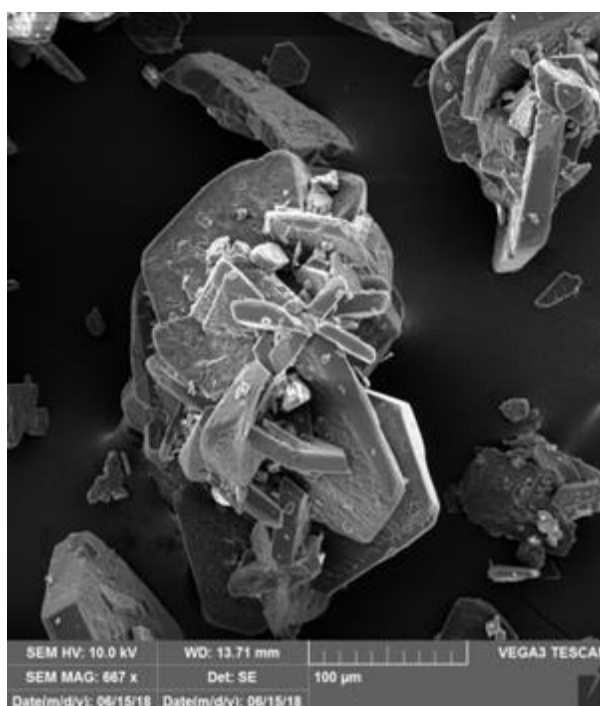


b)

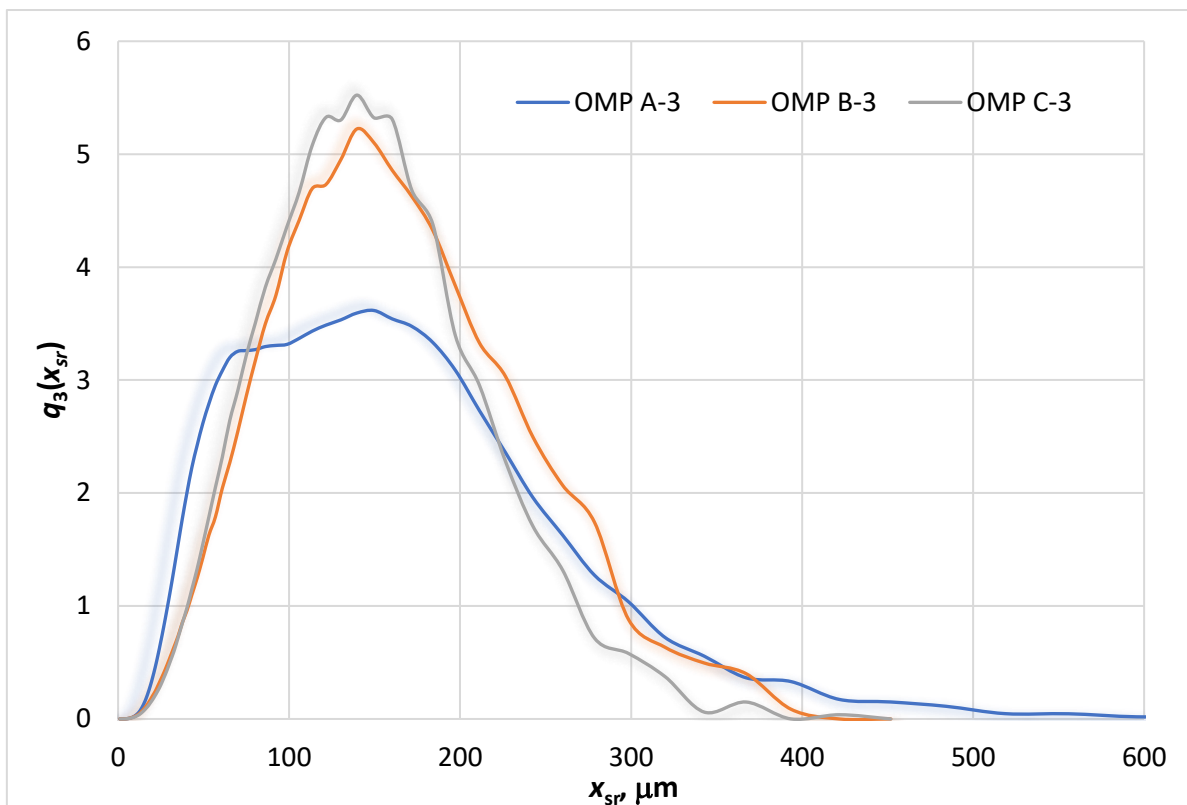
Slika 4-3-3-10 a) Raman spektar za polimorfnu formu C iz eksperimenta OMP C-3 *in-line* ,
 b) raspodjela veličina čestica praćena kroz to vrijeme



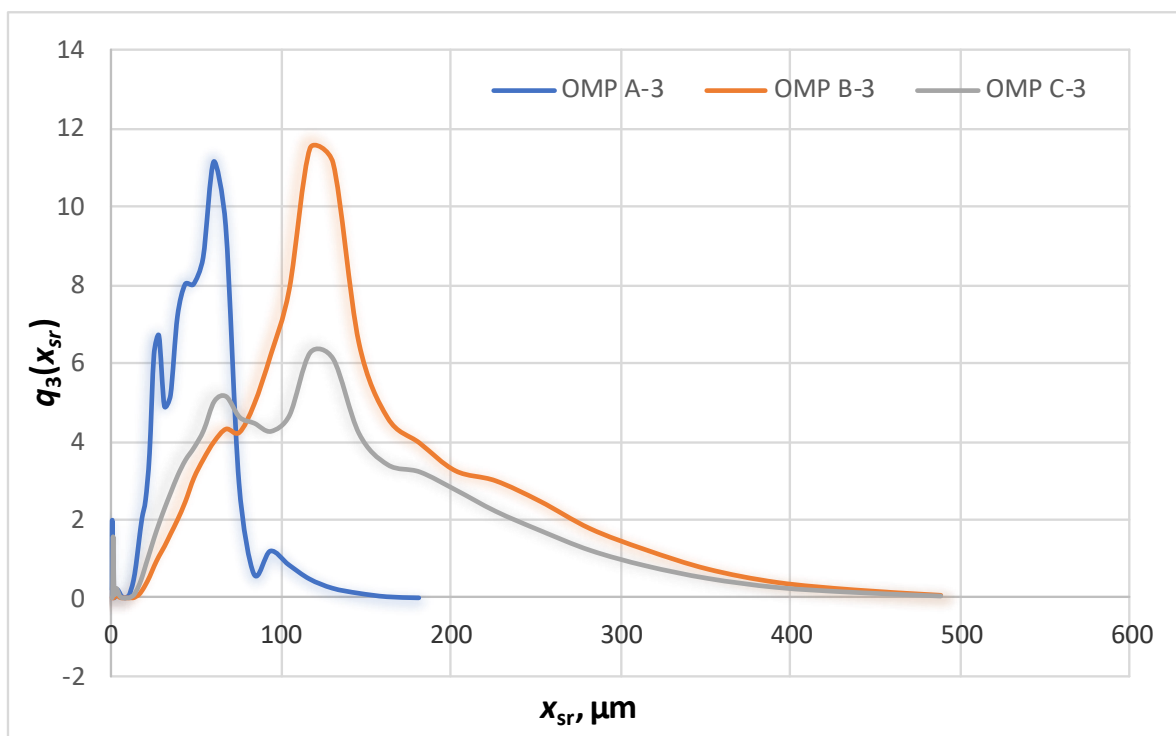
Slika 4-3-3-11 *In-line* praćenje procesa priprave polimorfa C iz eksperimenta OMP C-3 FBRM uređajem



Slika 4-3-3-12 Mikrograf kristala iz eksperimenta OMP C-3 dobiven SEM analizom



Slika 4-3-3-13 Grafički prikazi usporedbe volumne raspodjele veličine čestica za sva tri uzorka omeprazola dobiveni FBRM uređajem



Slika 4-3-3-14 Grafički prikazi usporedbe volumne raspodjele veličine čestica za sva tri uzorka omeprazola dobiveni laserskom difrakcijom

5. RASPRAVA

Ovim radom, kao što je i prethodno navedeno, praćen je proces kristalizacije aktivne komponente omeprazola i to pri različitim uvjetima, a u svrhu dobivanja kristala triju poznatih polimorfnih formi A, B i C. Dobiveni rezultati produkata kristalizacije okarakterizirani su Raman i rendgen spektrima, u svrhu bolje identifikacije polimorfa, odnosno njihovog međusobnog razlikovanja.

Najprije je sirovi vlažni omeprazol osušen u vakuum sušioniku pri čemu je praćen proces sušenja tijekom vremena. Na slici 4-1-1 prikazana je dobivena krivulja sušenja. Eksperimentalne točke korelirane su Page-ovim modelom, a dobiveni parametri Pagovog modela su: $k=0,0051$ i $n=0,974$. Vidljivo je da se u početku vlažnost smanjuje linearno, a nakon 1 sata dolazi do smanjenja brzine sušenja, konačni udio vlage na kraju procesa iznosi manje od 1.0 %.

Određena je i topljivost polimorfa A, B i C, iz krivulja topljivosti na slici 4-1-2 je vidljivo da polimorf C pokazuje najveću topljivost. Npr. pri 25 °C otapa se skoro 120 g OMP C u litri otapala, dok polimorfi A i B pokazuju sličnu topljivost od otprilike 20 g/L. Pri višm temperaturama polimorf A ima najveću stabilnost.

Sva tri polimorfna oblika pripremljala su se najprije iz prekristaliziranog, zatim iz sirovog osušenog omeprazola, a kao posljednji način pripreme, provedeno je uvećanje procesa priprema sva tri oblika, i to u eksperimentu OMP A-3, gdje je volumen je uvećan 35.0 puta, u eksperimentu OMP B-3 17.5 puta te u eksperimentu OMP C-3 10.8 puta. Uvećanje procesa pripreme provedeno je u svrhu *in-line* kontrole procesa te povećanja učinkovitosti – što je i dobiveno u eksperimentima OMP A-3 i B-3, dok je za polimorf C najveće iskorištenje dobiveno pripremom iz prekristaliziranog omeprazola (eksperiment OMP C-2) i to u iznosu od 76,16 % (tablica 4-3-1). Eksperimenti provedeni u kristalizatoru volumena 7 l, praćeni su *in-line* tehnologijom, FBRM metodom praćena je RVČ, a Raman spektroskopijom promjena polimorfne strukture.

Rezultati dobiveni kristalizacijom prekrizaliziranog omeprazola

Suspendiranjem prekrizaliziranog OMP u sustavu otapala acetona i metanola (C=160 g/L) pri sobnoj temperaturi ne dolazi do otapanja kristala. Suspenzija je miješana tijekom 45 h kako bi došlo do transformacije u željeni polimorf A. Struktura A potvrđena je na rendgenu, slika 4-3-1-1, a na mikrografu 4-3-1-2 vidljivo je da su dobiveni kristali sitni, relativno široke RVČ.

I u ostala dva eksperimenta pripremljena iz prekrizaliziranog omeprazola dobivene su očekivane forme B i C, što je potvrđeno rendgenskom difrakcijom prikazanoj na slikama: 4-3-1-3 i 4-3-1-5. Iz mikrografije prikazane na slici 4-3-1-2 vidljivo je da su kristali B forme znatno veći u usporedbi s dobivenom formom A u prethodnom eksperimentu, oštih bridova skupljenih u agregate.

Rezultati dobiveni kristalizacijom sirovog omeprazola

U eksperimentima provedenim na isti način kao i u prethodnom setu eksperimenata, ali iz sirovog omeprazola, dobiveni kristali su sivi što ukazuje na prisutnost nečistoća u dobivenim kristalima. Dobivene forme su B, B i C (tablica 4-3-1). Iako je prvi eksperiment pripremljen prema recepturi propisanoj za A strukturu, zbog prisutnih nečistoća nije došlo do transformacije tijekom dugotrajnog miješanja. Iz mikrografa 4-3-2-1 i 4-3-2-2 vidljivo je da su nastali krupni kristali, dok je njihov vanjski oblik različit, unutarnja struktura im je ista. Ova činjenica ukazuje na to da vanjski oblik nije nužno povezan s unutarnjom strukturom kristala. U ovom slučaju, vanjski oblik kristala (iako ne i veličinu) možemo povezati s načinima provedbe kristalizacije koji se znatno razlikuju za pripremu različitih formi (od korištenih otapala, temperature, miješanja ili trajanja procesa).

Rezultati dobiveni kristalizacijom u velikom reaktoru

Rezultati rendgenske difrakcije pokazuju da je u ovim eksperimentima dobivena isključivo C forma omeprazola, bez obzira na način prekrizalizacije.

Raman spektri potvrđuju rezultate dobivene rendgenskom difrakcijom, dakle identificirani su samo C polimorfi omeprazola, bez obzira po kojem je postupku provedena kristalizacija. To

ukazuje na važnost dobro optimiranog i parametriziranog procesa tijekom uvećanja. Naime, procedure u patentima nisu detaljno istražene te su napisane na temelju rezultata dobivenih iz malih laboratorijskih šarži. Prilikom uvećanja procesa u veće mjerilo, npr. iz tikvice u reaktor, dolazi do izražaja utjecaj hidrodinamičkih uvjeta s obzirom na znatno drukčiju izvedbu opreme. Poznato je da hidrodinamika (miješanje) ima značajan utjecaj na kristalizaciju, odnosno na termodinamiku i kinetiku, a samim time utječe i na kristalizaciju različitih polimorfnih oblika s obzirom da je njihova stabilnost različita. S druge strane, povećanjem volumena reakcijske smjese treba uzeti u obzir sporiju brzinu prijenosa topline nego je to u malom mjerilu što nedovoljnim poznavanjem sustava može uzrokovati kristalizaciju neželjenog polimorfa ili prijelaz jednog polimorfa u drugi tijekom procesa. Nadalje, važno je naglasiti da provedbom procesa kristalizacije u većem mjerilu lako dolazi do kontaminacije otopine drugim polimorfom što mijenja strukturu nastalih kristala.

In-line praćenja scale up procesa pripreme polimorfa u eksperimentima OMP A-3, B-3 i C-3

Polimorf A (slika 4-3-3-3)

Suspendiranjem prekristaliziranog omeprazola u metanolnom sustavu ($C=160$ g/L) pri sobnoj temperaturi ne dolazi do otapanja kristala. Suspenzija je miješana tijekom 45 h kako bi došlo do transformacije već postojeće polimorfne strukture u željeni polimorf A.

Podaci snimljeni FBRM instrumentom to i potvrđuju. Iz grafičkog prikaza na slici 4-3-3-3 je vidljivo da se broj čestica, kao i veličina, ne mijenjanju u suspenziji tijekom miješanja kroz 45 h u izotermnim uvjetima. Fouling index koji upućuje na potencijalnu zamračenost sonde poljepljenim kristalima je konstantan, oko 17.0 %, te vjerodostojnost mjerenja nije upitna. Naime, ako je postotak zamračenosti FBRM sonde kristalima veći od 25.0 %, rezultati dobiveni mjerenjem su manje pouzdani.

- Polimorf B (slika 4-3-3-7)

Prilikom zagrijavanja suspenzije na 50 °C, dolazi do otapanja omeprazola na što ukazuje smanjivanje broja čestica u sustavu. Istovremeno izgleda kao da veličina čestica raste, međutim, takav trend ukazuje na prvo otapanje sitnijih čestica, a zatim onih većih. Otopina je potom ohlađena od 50 °C do 0 °C kroz 30 minuta. Do nukleacije dolazi na 5 °C na što ukazuje

naglo povećanje broja čestica. Uslijed vrlo intenzivne nukleacije zbog visokog stupnja prezasićenosti (relativno niska temperatura) kristali su se zalijepili za prozor sonde na što ukazuje povećanje vrijednosti Fouling indexa (90.0 %). Nakon 60 min miješanja na 0 - 5 °C, FBRM sonda je mehanički očišćena te vraćena nazad u sadržaj reaktora. Vidljivo je da su trend broja čestica te srednje veličine čestica promijenjeni te sada daju stvarni prikaz stanja u sustavu. Također, mjerenje FBRM instrumentom ukazuje na vrijeme koje je potrebno da čitava masa produkta iskristalizira. U ovom slučaju je potrebno minimalno 5h miješanja na temperaturi 0 - 5 °C da se kristalizacija završi. To potvrđuje stagnacija broja i veličine čestica u sustavu.

Iz tog razloga je i iskorištenje doseglo 82.0 % za razliku od patentne procedure (US6150380) gdje je propisano samo hlađenje do 0 - 5 °C bez produljenja vremena miješanja (iskorištenje oko 67.0 %).

- Polimorf C (slika 4-3-3-11)

Suspendiranjem prekrizaliziranog omeprazola u acetonu na sobnoj temperaturi ubrzo dolazi do otapanja. Daljnjim miješanjem pri toj temperaturi dolazi do spontane nukleacije. Rijetka suspenzija je zatim kroz 40 minuta ohlađena do -12 °C (-10 do -15 °C) uz konstantnu nukleaciju što pokazuje porast broja čestica u sustavu. Rezultati dobiveni FBRM mjerenjima ukazuju na to da je potrebno vrijeme miješanja suspenzije na -12 °C (-10 do -15 °C) minimalno 5h kako bi produkt iskristalizirao.

Na slikama 4-3-3-13 i 4-3-3-14 su prikazane volumne RVČ dobivene FBRM sondom na kraju procesa te je uočljivo da se raspodjele dobivene na različitim uređajima razlikuju osobito za uzorak iz eksperimenta OMP A-3. RVČ dobivena nakon kristalizacije, filtracije i sušenja je višemodalna, uska te se nalazi u finijem području veličina (slika 4-3-3-14). Pregledom mikrografa 4-3-3-4 vidljivo je da su dobiveni kristali djelomično aglomerirani, ali vjerojatno ne i agregirani, pa se tijekom manipulacije i pripreme suspenzije kristali razdvajaju što rezultira drugačijom RVČ od one dobivene snimanjem samo malog dijela volumena suspenzije u reaktoru.

6. ZAKLJUČAK

Eksperimentom provedenom iz prekristaliziranog omeprazola u mjerilu od 250 ml, dobivene su sve tri polimorfne forme A, B i C, što je potvrđeno rendgenskom analizom i pokazuje uspješnost eksperimentalnih uvjeta, odnosno receptura rađenih prema patentnim prijavama. No, to nije bio slučaj u drugom setu eksperimenata, gdje je polazna sirovina bio sirovi omeprazol. Recepture za pripravu eksperimenata se nisu mijenjale, ali nije dobiven polimorf A.

Prilikom uvećanja cijelog procesa pripreve triju polimorfni formi omeprazola iz mjerila od 250 ml u reaktor od 7 l, odnosno provođenjem trećeg seta eksperimenata, dobiveni kristali analizirani su rendgenskom difrakcijom te Raman spektroskopijom. U obje analize identificiran je samo C polimorf omeprazola, bez obzira na provedeni postupak kristalizacije.

Provedbom svih triju setova eksperimenata pripreve polimorfa omeprazola, za kristale forme A najveće iskorištenje dobiveno je u *scale up* procesu pripreve, odnosno kristalizacijom u većem mjerilu. Isto vrijedi i za formu B, dok postupak pripreve forme C pokazuje najveće iskorištenje u drugom setu eksperimenata, odnosno u mjerilu od 250 ml i to iz polaznog sirovog omeprazola. Također, od svih eksperimenata pripreve triju polimorfa, dobivene su najveće mase kristala A u usporedbi s kristalima B i C forme, a tako i procesi kristalizacije omeprazola u formu A pokazuju najveća iskorištenja. No, ako se uzmu u obzir transformacije polimorfa, odnosno identificirani polimorfi rendgenskom i Raman analizom, C polimorf se pokazuje najstabilnijim.

Što se tiče topljivosti, polimorf C pokazuje najveću, dok polimorfi A i B pokazuju manju, ali sličnu topljivost u usporedbi s polimorfom C. Također najveću stabilnost pri višim temperaturama pokazuje polimorf A.

7. POPIS SIMBOLA

| | |
|----------------|--|
| C | - koncentracija, g/L |
| c | - brzina svjetlosti, $c=299792458$ m/s |
| E | - energija, J |
| Fouling indeks | - indeks zamračenja FBRM sonde, % |
| h | - Planckova konstanta, $h=6,626 \cdot 10^{-34}$ Js |
| I | - intenzitet, br. |
| m | - masa, g |
| n | - broj čestica |
| T | - temperatura, °C |
| t | - vrijeme, min. ili h |
| q_0 | - brojčana raspodjela, br. |
| q_3 | - volumna raspodjela, br. |
| x_{sr} | - srednja veličina čestica, μm |
| X | - vlažnost uzorka, $\text{kgv}/\text{kg}_{sm}$ |
| ν | - frekvencija, Hz (1/s) |
| $\tilde{\nu}$ | - valni broj, broj valova u jednom centimetru |
| λ | - valna duljina, cm^{-1} |

8. LITERATURA

1. E. Baughman, *Process analytical chemistry: introduction and historical perspective* u: K. E. Bakeev, (Ur.) *Process analytical technology*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2005, str. 1–12.
2. P. Novak i T. Jednačak, *The use of vibrational spectroscopy as a tool for in-line process monitoring* in: A. L. Varney (Ur.) *Process control - theory applications and challenges*, Nova Science Publishers, New York, USA, 2014, str. 69–99.
3. L. L. Simon, H. Pataki, G. Marosi, F. Meemken, K. Hungerbühler, A. Baiker, S. Tummala, B. Glennon, M. Kuentz, G. Steele, H. J. M. Kramer, J. W. Rydzak, Z. Chen, J. Morris, F. Kjell, R. Singh, R. Gani, K. V. Gernaey, M. Louhi-Kultanen, J. O'Reilly, N. Sandler, O. Antikainen, J. Yliruusi, P. Froberg, J. Ulrich, R. D. Braatz, T. Leyssens, M. von Stosch, R. Oliveira, R. B, H, Tan, H. Wu, M. Khan, D. O'Grady, A. Pandey, R. Westra, E. Delle-Case, D. Pape, D. Angelosante, Y. Maret, O. Steiger, M. Lenner, K. Abbou-Oucherif, Z. K. Nagy, J. D. Litster, V. K. Kamaraju i M.-S. Chiu, *Org. Process Res. Dev.* 19 (2015) 3-62.
4. *Guidance for industry, PAT – a framework for innovative pharmaceutical development, Manufacturing and Quality Assurance*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Rockville, MD, U.S.A., 2004., <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf> (preuzeto u kolovozu 2018. godine)
5. L. L. Simon, *Org. Process Res. Dev.* 19 (2015) 1-2.
6. A. M. Schwartz, A. S. Myerson, *Solutions and solution properties*, in: *Handbook of Industrial Crystallization*, A. S. Myerson (Ed), Butterworth-Heinemann, Boston, 2002, 1-32.
7. A. Prasanna Lakshimi, M. Anand Kumar, M. Vamshi Krishna, K. Annie Vijetha, G. Ashwini: *Formulation development of Irbesartan (poorly water-soluble drug) immediate release tablets*, *International Research Journal of Pharmacy*, **3** (2012), 117-120.
8. T. Wei-Qin: *Practical Aspects of Solubility Determination in Pharmaceutical Preformulation*, in: *Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, P. Augustijns, M. E. Brewster (Eds), Springer, New York, Volume VI, 2007, 137-149.

9. P. Gordon, *Principles of Phase Diagrams in Material Science*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1968.
10. A. Mersmann, C. Heyer, A. Eble, *Activated Nucleation*, in: *Crystallization Technology Handbook*, A. Mersmann (Ed.), Marcel-Dekker, Inc., New York, 2001, 1-44.
11. F. Rosenberger, *Fundamentals of Crystal Growth*, Springer Verlag, New York, 1981,
12. L. Cronin, P. J. Kitson, C. C. Wilson, *Process Understanding – Crystallization*, in: *Process Understanding – For Scale-Up and Manufacture of Active Ingredients*, I. Houson (Ed.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2011, 199-225.
13. G. Hofmann: *Kristallisation in der industriellen Praxis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
14. S. Titz-Sargut, J. Ulrich: *Application of a protected ultrasound sensor for the determination of the width of the metastable zone*, *Chemical Engineering and Processing*, 42 (2003), 841-846.
15. A. Warstat, J. Ulrich: *Seeding durch Batch Cooling Crystallization- An Initial Approach to Heuristic Rules*, *Chemical Engineering & Technology*, 29 (2006) 2, 187-190.
16. A. G. Jones: *Crystallization Process Systems*, Butterworth & Heinemann, Oxford, 2002
17. J. Nyvlt, O. Söhnel, M. Matuchová, M. Broul: *The Kinetics of Industrial Crystallization*, Academia Prague, 1985
18. D. Kashchiev, *Nucleation- Basic Theory with Application*, Butterworth- Heinemann, Oxford, 2000.
19. J. W. Mullin, *Crystallization*, fourth ed., Butterworth- Heinemann, Oxford, 2001.
20. P. R. Wolde, D. Fenkel: *Enhancement of Protein Crystal Nucleation by Critical Density Fluctuations*, *Science*, 277 (1997), 1975-1978.
21. A. Mersmann, C. Heyer, A. Eble, *Activated Nucleation*, in: *Crystallization Technology Handbook*, A. Mersmann (Ed.), Marcel- Dekker, Inc., New York, 2001, 45-76.
22. R. Wissing, M. Elwenspoek, B. Degens: *In situ observation of secondary nucleation*, *Journal of Crystal Growth*, 79 (1986), 614-619.
23. J. Ulrich: *Zur Kristallkeimbildung durch mechanischen Abrieb*, *Dissertation*, RWTH, Aachen, 1981.

- 24.** G. Dhanaraj, K. Byrappa, V. Prasad, M. Dudley, *Crystal Growth Techniques and Characterization: An Overview*, in: *Springer Handbook of Crystal Growth*, G. Dhanaraj, K. Byrappa, V. Prasad, M. Dudley (Eds.), Springer Verlag, Heidelberg, 2010.
- 25.** J. Chen, B. Sarma, J. M. B. Evans, A. S. Myerson: *Pharmaceutical Crystallization, Crystal Growth & Design*, **11** (2011), 887-895.
- 26.** J. Garside, J. Gaska, J. W. Mullin: *Crystal Growth rate studies with potassium sulphate in a fluidized bed crystallizer*, *Journal of Crystal Growth*, **13-14** (1972), 510-516.
- 27.** A. S. Myerson: *Handbook of Industrial Crystallization*, Butterworth & Heinemann, Oxford, 2. izdanje, 2002.
- 28.** M. Hrkovac, Utjecaj pomoćne komponente na termodinamiku i kinetiku kristalizacije glicina, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2012, 35-38.
- 29.** R. Hilfiker: *Polymorphism*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.
- 30.** A. S. Myerson, R. Ginde: *Crystals, Crystal Growth, and Nucleation*, in: *Handbook of Industrial Crystallization*, A. S. Myerson (Ed.), Butterworth-Heinemann, Boston, 2002, 33-66.
- 31.** J. D. Am Ende, *Chemical engineering in the pharmaceutical industry: R&D to manufacturing*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2011.
- 32.** M. Louhi-Kultanen, H. Qu, J. Kohonen, S. P. Reinikainen, J. Kallas: *Spectroscopic Monitoring of Carbamazepine Crystallization and Phase Transformation Ethanol-Water Solution*, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **47** (2008), 6991-6998.
- 33.** M. Saifee, N. Indamdar, D. L. Dhamecha, A. A. Rathi: *Drug Polymorphism: A Review*, *International Journal of Health Research*, **2** (2009) 4, 291-306.
- 34.** T. De Beer, A. Burggraeve, M. Fonteyne, L. Saerens, J. P. Remon, C. Vervaet: *Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes*, *International Journal of Pharmaceutics*, **417** (2011), 32-47.
- 35.** US. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: PAT- a Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing and Quality Assurance*, 2004;

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070305.pdf>, preuzeto srpanj 2018.

36. A. Kandelbauer, M. Rahe, R. W. Kessler, Industrial Perspectives (Process Control and Quality Assurance), in: J. Popp, V. V. Tuchin, A. Chiou, S. Heinemann (Eds.), *Handbook of Biophotonics, Vol. 3: Photonics in Pharmaceuticals, Bioanalysis and Environmental Research*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2012, 3-63.

37. M. L. Balboni: *Process Analytical Technology - Concepts and Principles, Pharmaceutical Technology*, **27** (2003) 54-66.

38. A. N. Kalbasenka, A. E. M. Huesman, H. J. M. Kramer: *Basic Recipe Control, in Industrial Crystallization Process Monitoring and Control*, A. Chianese, H. J. M. Kramer (Eds.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2012, 105- 122.

39. R. A. Lionberger, L. X. Yu, A. S. Raw, R. D'Costa, H. Wu, A. S. Hussain: *Applications of process analytical technology to crystallization processes, Advanced Drug Delivery Reviews*, **56** (2004) 349–369.

40. A. N. Kalbasenka, A. E. M. Huesman, H. J. M. Kramer: *Basic Recipe Control, in Industrial Crystallization Process Monitoring and Control*, A. Chianese, H. J. M. Kramer (Eds.), Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2012, 105- 122.

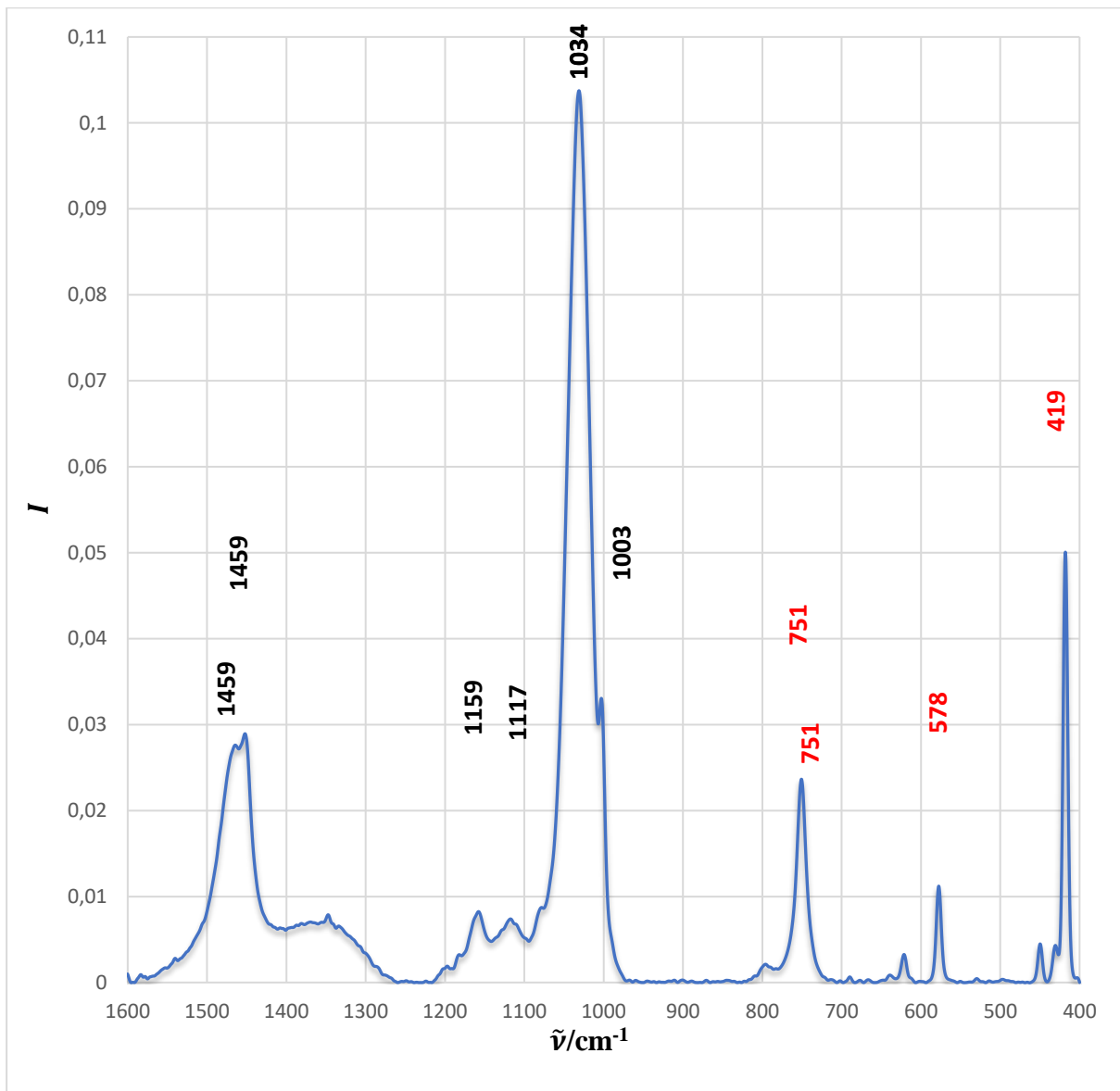
41. L. L. Simon, H. Pataki, G. Marosi, F. Meemken, K. Hungerbühler, A. Baiker, S. Tummala, B. Glennon, M. Kuentz, G. Steele, H. J. M. Kramer, J. W. Rydzak, Z. Chen, J. Morris, F. Kjell, R. Singh, R. Gani, K. V. Gernaey, M. Louhi-Kultanen, J. O'Reilly, N. Sandler, O. Antikainen, J. Yliruusi, P. Froberg, J. Ulrich, R. D. Braatz, T. Leyssens, M. von Stosch, R. Oliveira, R. B, H, Tan, H. Wu, M. Khan, D. O'Grady, A. Pandey, R. Westra, E. Delle-Case, D. Pape, D. Angelosante, Y. Maret, O. Steiger, M. Lenner, K. Abbou-Oucherif, Z. K. Nagy, J. D. Litster, V. K. Kamaraju i M.-S. Chiu, *Org. Process Res. Dev.* **19** (2015) 3-62.

42. D. Šahnić: Kvantitativno praćenje reakcije sinteze i kristalizacije omeprazola Ramanovom spektroskopijom *in-line*, Doktorski rad, Prirodoslovno- Matematički Fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017, 20-30.

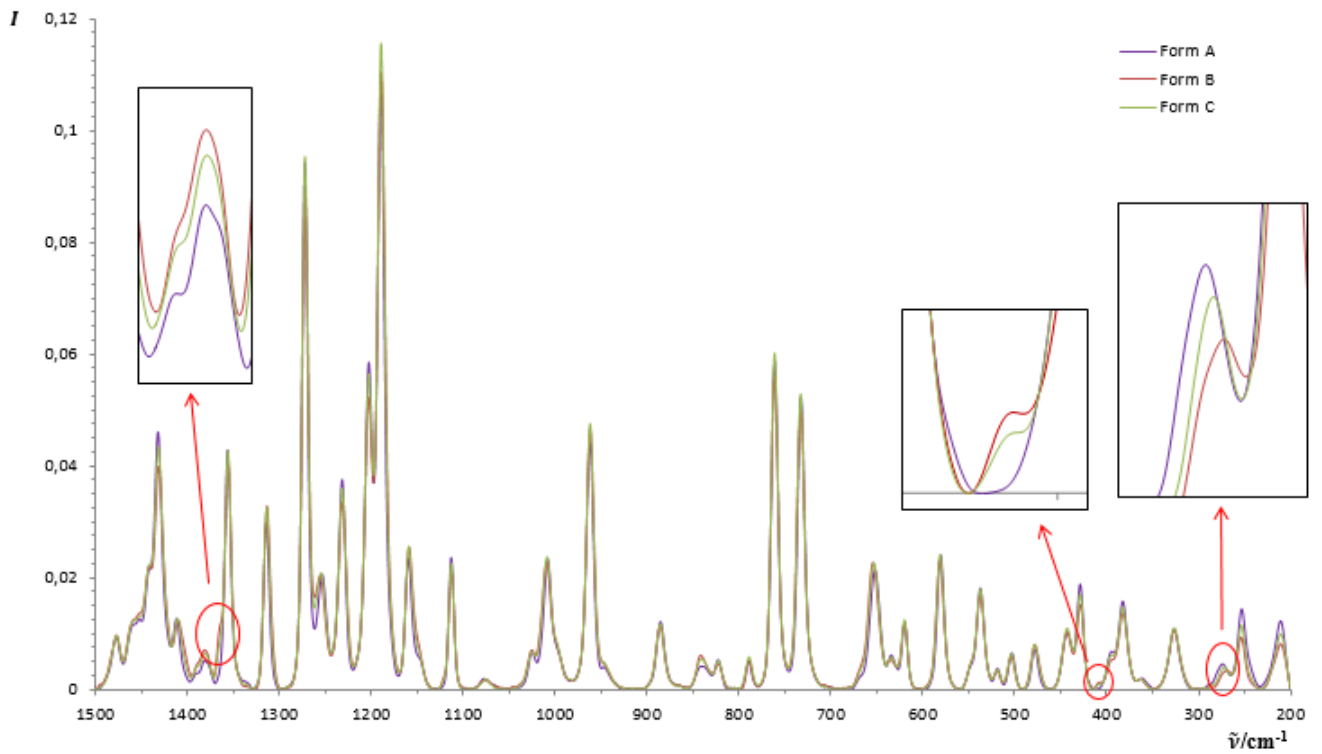
43. S. Šašić, *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*, John Wiley & Sons Inc., New York, 2008.

- 44.** B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons Inc., New York, USA, 2004.
- 45.** E. Smith i G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons Inc., West Sussex, England, 2005.
- 46.** *PerkinElmer Technical Innovation Center: Raman spectroscopy, a Powerful Tool to Differentiate Pharmaceutical Polymorphs*, Application note, 301/302, Corporate Centre, "B" wing, J. B. Nagar, Andheri (E), Mumbai 400 059. India
- 47.** T. Lind, C. Cederberg, G. Ekenved, U. Haglund, L. Olbe, *Effect of Omeprazole™ – a gastric proton pump inhibitor – on pentagastrin stimulated acid secretion in man* Gut 1983;24:270-276 doi:10.1136/gut.24.4.270.
- 48.** J. M. Shin, O. Vagin, K. Munson, M. Kidd, I. M. Modlin i G. Sachs, *Cel. Mol. Life Sci.* **65** (2008) 264-281.
- 49.** https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/40/Omeprazole_enantiomers.svg
(preuzeto u srpnju 2018. godine)
- 50.** U.S. Pat. 6,150,380 (Nov. 21. 2000), K. Löqvist, G. Sundén, D. Noreland, I. Ymén
- 51.** U. S. Pat. 7,553,856 B2 (Jun. 30, 2009), N. H Milac, A. Copar, B. Podobnik, A. C. Belcic, A. Kosak, B. Ornik, U. Orleb
- 52.** U. S. Pat. 6,384,059 B1 (May 7, 2002), K. Löqvist, G. Sundén, D. Noreland, I. Ymén

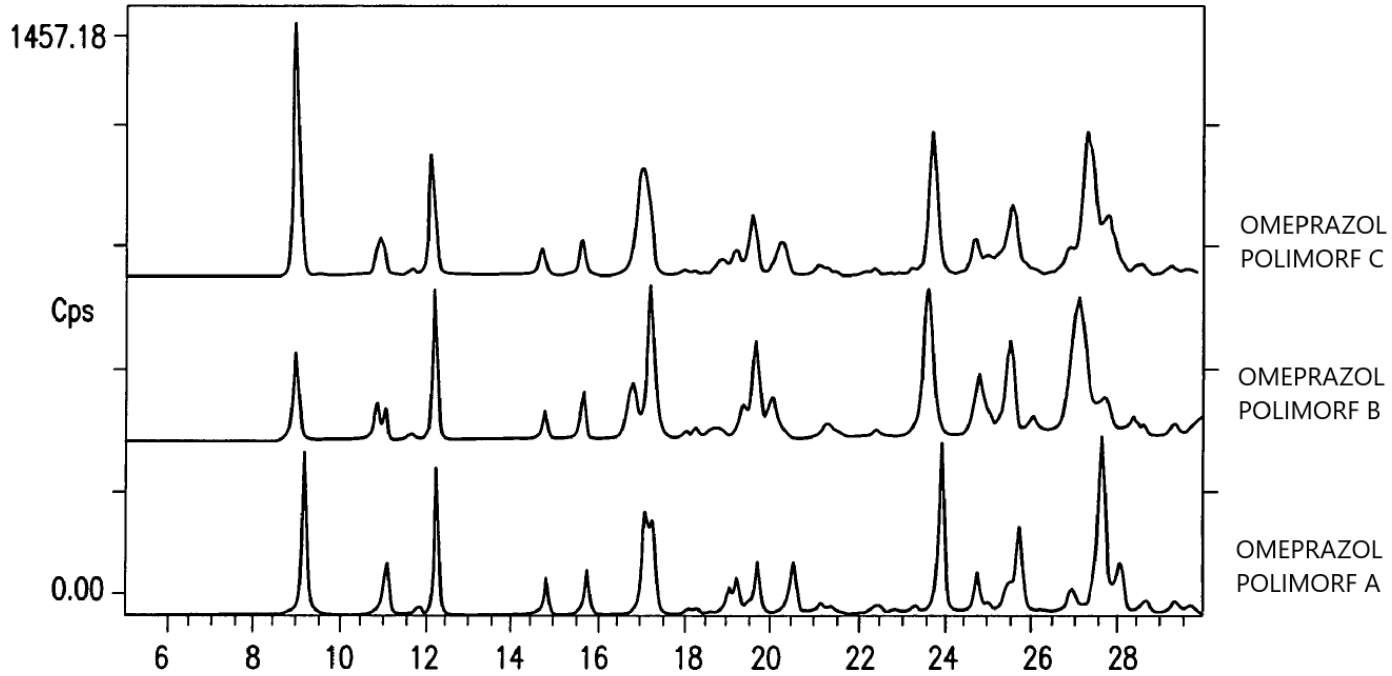
9. PRILOZI



Prilog 1. Raman spektar za metanol



Prilog 2. Raman spektri za čvrste forme OMP A, B i C



Prilog 3. Difraktogrami polimorfa A, B i C omeprazola

10. ŽIVOTOPIS

Osnovnu školu završavam u Gradu Sveta Nedelja, a Prvu, opću gimnaziju u Zagrebu te uspješno polažem maturu.

Akadske godine 2013/14. upisujem Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo. Završni rad pod nazivom "Razgradnja memantina u vodi UV-C/H₂O₂ procesom" obranila sam u rujnu akademske godine 2015/16. pod mentorstvom doc. dr. sc. Hrvoje Kušić. Upisujem diplomski studij na istom fakultetu.

Diplomski rad pod nazivom "Primjena procesne analitičke tehnologije u praćenju kristalizacijskih procesa" odrađujem od veljače do lipnja 2018. godine u suradnji s Pliva Hrvatska d.o.o. TAPI Istraživanje i Razvoj pod neposrednim vodstvom dr. sc. Martine Hrkovac i pod mentorstvom dr. sc. Jasne Prlić Kardum.