

# Odabir sustava za provedbu sferične kristalizacije

---

**Vučić, Ivan**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:182410>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Ivan Vučić**

Odabir sustava za provedbu sferične kristalizacije

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, veljača 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Ivan Vučić**

Odabir sustava za provedbu sferične kristalizacije

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum
2. prof. dr. sc. Aleksandra Sander
3. v. pred. dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, veljača 2024.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum i asistentici Ivi Zokić na pomoći, susretljivosti i velikom strpljenju ukazanom prilikom izrade ovoga rada.*

*Hvala kolegama Lani, Mirti i Juraju za veliku pomoć tijekom provođenja eksperimentalnoga dijela.*

*Hvala mojoj obitelji koja mi je ovo omogućila i bila konstantna podrška.*

*Također, zahvaljujem se svim mojim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene u ovom periodu moga života i učinili ga nezaboravnim.*

*Naposljetku, hvala dragom Bogu što mi je sve ove osobe stavio na životni put i vodio me kroz njega.*

## SAŽETAK

Kristalizacija je jedan od najvažnijih procesa u farmaceutskoj industriji budući da se većina djelatnih tvari proizvodi u kristalnom obliku. Sferičnom kristalizacijom omogućava se istodobno odvijanje kristalizacije i aglomeracije što rezultira formiranjem kristalnih sfernih oblika koji se mogu direktno tabletirati što pogoduje smanjenju broja koraka pri formulaciji lijeka.

Ceritinib je djelatna tvar lijeka Zykadia® koji se koristi za liječenje odraslih osoba s metastatskim karcinomom pluća te prema BCS klasifikaciji djelatnih tvari spada u IV. skupinu.

Svrha ovoga rada bila je pronaći optimalan sustav otapala i metodu za dobivanje sferičnih kristala ceritiniba te ispitati njihov utjecaj na oblik i strukturu kristala. Preliminarnim istraživanjima određeno je s kojim otapalima, antiotapalima, kapljevinama za premošćivanje i aditivima te u kojim omjerima će se provoditi sferična kristalizacija. Provedene su tri metode sferične kristalizacije, osim klasične sferične aglomeracije i kvazi-emulzijske difuzije otapala isprobana je i kombinacija ovih dvaju metoda.

Kao najuspješniji sustav za provedbu sferične aglomeracije pokazao se THF-voda-heptan, za provedbu QESD-a THF-voda-PVP, a za kombiniranu metodu sustav THF-voda-heptan-PVP. Dobivenim sferičnim kristalima ispitana je morfologija putem optičkog mikroskopa kao i njihova struktura metodom rendgenske difrakcije.

Ključne riječi: *kristalizacija, sferični kristali, ceritinib, sustav otapala*

## ABSTRACT

Crystallization is one of the most important processes in the pharmaceutical industry since most active substances are produced in crystalline form. Spherical crystallization allows for the simultaneous development of crystallization and agglomeration, resulting in the generation of crystalline spherical forms that can be directly tableted, minimizing the number of steps in the drug formulation process.

Ceritinib is the active substance of the drug Zykadia®, which is used for the treatment of adults with metastatic lung cancer. According to the BCS classification of active substances, it belongs to the IV. group.

The purpose of this work was to find an optimal solvent system and method for obtaining ceritinib spherical crystals and to examine their influence on the size, shape, and structure of the crystals. Preliminary research has determined with which solvents, antisolvents, bridging liquids, and additives and in what proportions spherical crystallization will be carried out. Three methods were implemented, in addition to classical spherical agglomeration and quasi-emulsion diffusion of solvents. A combination of these two methods was also tried.

The THF-water-heptane system has been shown to be the most successful for spherical agglomeration, the THF-water-PVP for QESD, and the THF-water-heptane-PVP for a combination of methods. The obtained spherical crystals were examined for their morphology using an optical microscope as well as their structure using the X-ray diffraction method.

**Keywords:** *crystallization, spherical crystals, ceritinib, solvent system*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. KRISTALIZACIJA.....	2
2.1.1. Topljivost.....	2
2.1.1.1. Odabir otapala .....	3
2.1.2. Širina metastabilne zone .....	4
2.1.3. Prezasićenost.....	5
2.2. KRISTALIZACIJA DODATKOM ANTIOTAPALA.....	6
2.3. SFERIČNA KRISTALIZACIJA .....	6
2.3.1. Sferična aglomeracija.....	7
2.3.2. Kvazi-emulzijska difuzija otapala.....	9
2.4. KRISTALIZACIJA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI .....	10
2.4.1. Formulacija lijeka .....	10
2.4.2. Biofarmaceutski sustav kvalifikacije .....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	12
3.1. SVRHA RADA .....	12
3.2. MATERIJAL .....	12
3.2.1. Ceritinib .....	13
3.3. METODE I UREĐAJI.....	13
3.3.1. Preliminarna istraživanja .....	14
3.3.1.1. Određivanje topljivosti .....	14
3.3.1.2. Odabir sustava otapala .....	16
3.3.1.3. Odabir aditiva za QESD i njihova priprema .....	17
3.3.1.4. Određivanje kinetike kristalizacije i omjera komponenti .....	17
3.3.2. Provedba sferične kristalizacije .....	18
3.3.2.1. Sferična aglomeracija.....	19
3.3.2.2. Kvazi-emulzijska difuzija otapala.....	19
3.3.2.3. Kombinirana metoda sferične kristalizacije .....	19
3.3.3. Karakterizacija kristala .....	19
3.3.3.1. Mikroskopija.....	19
3.3.3.2. Određivanje unutarnje strukture kristala .....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21

<b>4.1. TOPLJIVOST I ODABIR SUSTAVA.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. KINETIKA I ODREĐIVANJE KOLIČINE ANTIOTAPALA.....</b>	<b>22</b>
<b>4.3. ODREĐIVANJE OMJERA KOMPONENATA .....</b>	<b>23</b>
<b>4.4. SFERIČNA AGLOMERACIJA .....</b>	<b>25</b>
<b>4.5. KVAZI-EMULZIJSKA DIFUZIJA OTAPALA.....</b>	<b>28</b>
<b>4.6. KOMBINIRANA METODA.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7. ODREĐIVANJE VREMENA ZADRŽAVANJA.....</b>	<b>32</b>
<b>4.8. ODREĐIVANJE STRUKTURE CERITINIBA.....</b>	<b>34</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>35</b>
<b>6. POPIS SIMBOLA .....</b>	<b>36</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>37</b>



## 1. UVOD

Kristalizacija je jedan od najvažnijih procesa kemijske industrije. Toplinsko-separacijski je proces u kojemu dolazi do izdvajanja čvrste faze iz plinovite, kapljevite ili čvrste smjese. Ovaj proces ima vrlo široku primjenu, ponajviše u farmaceutskoj industriji u kojoj se koristi kao metoda proizvodnje, pročišćavanja ili separacije čvrstih tvari.

S obzirom na način postizanja prezasićenosti razlikuje se nekoliko vrsta kristalizacije: kristalizacija hlađenjem, kristalizacija isparavanjem, vakuum kristalizacija, kristalizacija dodatkom antiotapala itd. Ove metode kristalizacije pokazale su se vrlo uspješnima, iako radi istovremenog odvijanja više procesa (nukleacija i rast kristala) dizajn i optimiranje postupka mogu biti otežani.<sup>1</sup>

Većina djelatnih tvari se proizvode u kristalnom obliku budući da se na taj način najbolje održava kemijska stabilnost tijekom pakiranja, transporta i skladištenja. Nakon procesa kristalizacije, djelatna tvar mora proći nekoliko koraka obrade (mljevenje, prosijavanje, miješanje i granuliranje) kako bi bila spremna za tabletiranje. Ovi procesi mogu biti energetski neučinkoviti i dugotrajni stoga je razvijena nova metoda proizvodnje tableta, tzv. direktno tabletiranje. Budući da aglomerati nastali postupkom sferične kristalizacije mogu biti podvrgnuti ovakvom načinu tabletiranja danas se sferičnoj kristalizaciji daje sve više pažnje.<sup>2</sup>

Sferična kristalizacija je metoda koja omogućava istodobno odvijanje kristalizacije i aglomeracije sa svrhom formiranja kristalnih sfernih oblika uz pomoć kapljevine za premošćivanje. Ovako nastali aglomerati osim što se mogu direktno tabletirati mogu imati i poboljšana fizikalno-kemijska svojstva.<sup>3</sup>

Ispitivanjima u okviru ovoga rada pokušao se pronaći odgovarajući sustav (otapalo, antiotapalo, kapljevina za premošćivanje i aditiv) za provedbu sferične kristalizacije djelatne tvari (ceritinib). Također istražen je utjecaj izbora otapala i metode na oblik i strukturu kristala.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KRISTALIZACIJA

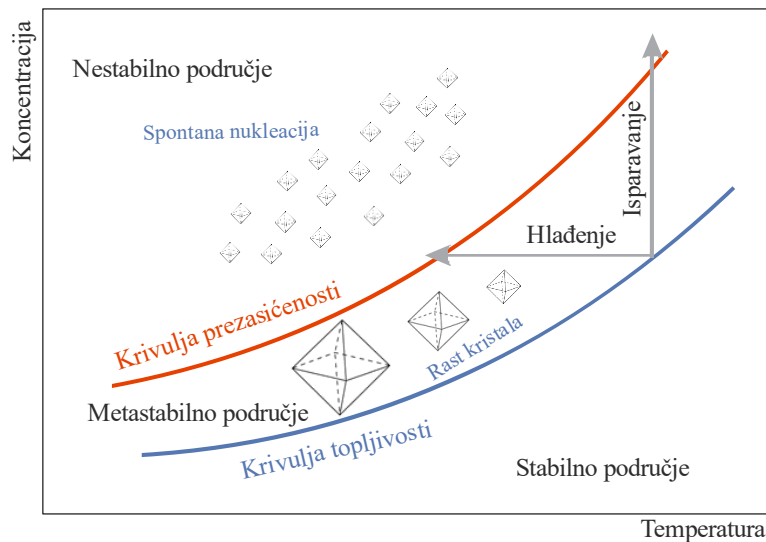
Kristalizacija je jedan od najvažnijih procesa kemijske industrije. Ovaj toplinsko-separacijski proces rezultira nastajanjem nove, čvrste faze. Svrha procesa može biti nastajanje novih kristala, pročišćavanje postojećih ili separacija smjese. Većina industrijskih i laboratorijskih kristalizacija temelji se na kristalizaciji iz otopine, a osim iz otopine kristalizacija se može provoditi i iz plinske smjese te taline. Mehanizam stvaranja kristala se odvija se u nekoliko faza: postizanje prezasićenosti, nukleacija te rast kristala. Prezasićenost je pokretačka sila procesa kristalizacije koja dovodi do stvaranja inicijalnih kristalnih jezgara, nukleusa, koji se u sljedećoj fazi povećavaju do nastanka makroskopskih kristala. Struktura i raspodjela veličine kristala uvelike ovise o uvjetima provedbe procesa kao što su temperatura, tlak, stupanj prezasićenosti, koncentracija aditiva i prisutnih nečistoća, intenzitet miješanja i brzina hlađenja.<sup>1</sup>

Dizajn procesa kristalizacije uglavnom se bazira na termodinamičkom ponašanju sustava. Čimbenici koji definiraju termodinamiku procesa kristalizacije su topljivost, prezasićenost i širina metastabilne zone.

#### 2.1.1. Topljivost

Topljivost se definira kao maksimalna količina tvari koja se može otopiti u danj količini otapala. Takva otopina naziva se zasićenom te je u njoj postignuto stanje termodinamičke ravnoteže. Topljivost tvari ovisi o vrsti otapala i temperaturi te u većini slučajeva topljivost raste s povećanjem temperature, ali stupanj ovisnosti varira od spoja do spoja.<sup>2</sup> Osim temperature na topljivost utječu pH otopine, aditivi i različite nečistoće. Topljivost je vrlo važno odredit jer o tome ovisi na koji način će se provesti kristalizacija.

Na slici 1., donja krivulja u  $c$ - $T$  dijagramu predstavlja krivulja topljivosti odnosno ravnotežnu krivulju. Područje ispod ravnotežne krivulje je stabilno područje nezasićene otopine u kojem neće doći do kristalizacije. Gornja krivulja predstavlja krivulju prezasićenosti iznad koje se nalazi nestabilno, prezasićeno područje u kojem dolazi do spontane nukleacije. Područje između ravnotežne krivulje i krivulje prezasićenosti naziva se metastabilno područje. U metastabilnom području postoji pokretačka sila, međutim, u tom području ne dolazi do spontane nukleacije. Spontana nukleacija nastupa tek nakon što otopina prijeđe u nestabilno područje.<sup>1</sup>



Slika 1. Ovisnost koncentracije soli o temperaturi otopine.<sup>4</sup>

### 2.1.1.1. Odabir otapala

Dobar odabir otapala jedan je od ključnih preduvjeta za uspješnu provedbu procesa kristalizacije. Budući da molekule otapala različito utječu na rast kristala, osim na topljivost tvari, otapalo ima veliki utjecaj i na polimorfnu selektivnost kao i na oblik kristala.

Da bi otapalo bilo pogodno za proces kristalizacije trebaju biti zadovoljeni određeni uvjeti :

- Željena tvar treba biti dobro topljiva u odabranom otapalo
- Otapalo treba biti čisto – prisutne nečistoće mogu utjecati na topljivost i kristalizaciju
- Ako se kristalizacija provodi bez dodatka pomoćne komponente, otapalo ne smije reagirati s komponentom koja kristalizira
- Otapalo ne smije biti toksično niti zapaljivo
- Otapalo mora biti učinkovito, tj. mora biti moguća kristalizacija bez pomoćne komponente
- Otapalo se mora moći regenerirati s ciljem ponovnog korištenja te što bolje separacije tvari koja kristalizira.<sup>1</sup>

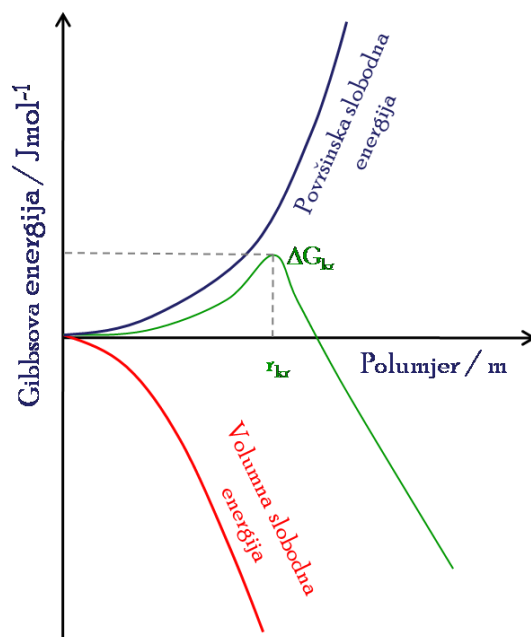
Tvrtka *Pfizer* objavila je vodič za odabir otapala prema kojem su otapala svrstana u tri skupine: preporučljivi, upotrebljivi i nepreporučljivi.

Tablica 1. Pfizerov vodič za odabir otapala.<sup>3</sup>

Preporuča se	Upotrebljivo	Ne preporuča se
Voda	Cikloheksan	Pentan
Aceton	Heptan	Heksan
Etanol	Toluen	Diizopropil eter
2-propanol	Metilcikloheksan	Dietil eter
Propanol	Tercijarni butil metil eter	Diklormetan
Etil-acetat	Izooktan	Dikloretnan
Izopropil – acetat	Acetonitril	Klorform
Metanol	2-MeTHF	N-metil-2-pirolidon
Butan-2-ol	THF	Dimetilformamid
<i>n</i> -butanol	Ksilen	Piridin
<i>t</i> -butanol	Dimetil sulfoksid	Dimetilacetamid
	Octena kiselina	1,4-dioksan
	Etilen-glikol	Dimetiloksietan
		Benzen
		Ugljikov tetraklorid

### 2.1.2. Širina metastabilne zone

Metastabilna zona je područje između krivulje topljivosti i krivulje prezasićenosti. U tom području postoji mala pokretačka sila za proces prijenosa tvari, no nedovoljna za nastanak stabilnih nukleusa. Razlog je u tome što se tijekom kristalizacije istovremeno odvijaju procesi stvaranja nukleusa i njihovog otapanja. Samo stabilni nukleusi nastavit će rasti. Male nakupine strukturnih jedinica kristala su nestabilne, promjena Gibbsove energije (suma površinske i volumne Gibbsove energije) je pozitivna i dolazi do otapanja. Kada  $\Delta G$  postane negativna dolazi do spontanog rasta, odnosno nukleacije, a nukleus je postigao kritičnu veličinu,  $r_c$ . Svi nukleusi manji od  $r_c$  će se otapati, a oni veći će nastaviti rasti. Što je veća prezasićenost otopine, veća je i pokretačka sila pa je potrebna manja kritična veličina nukleusa. S porastom prezasićenosti otopina postaje nestabilnija čime su sve povoljniji uvjeti za spontanu nukleaciju.<sup>1</sup>



Slika 2. Metastabilno područje.<sup>4</sup>

Širina metastabilne zone jedan je od važnih parametara za provedbu procesa kristalizacije jer značajno utječe na kinetiku nukleacije i rasta kristala te na njihovu raspodjelu veličina.<sup>5</sup> Na širinu metastabilne zone utječu nečistoće, brzina hlađenja i intenzitet miješanja. Povećanjem brzine hlađenja otopine povećava se i širina metastabilne zone jer što je veća brzina hlađenja, nukleus ima manje vremena da naraste do kritične veličine. S druge strane, što je veća brzina miješanja otopine širina metastabilne zone bit će manja. Razlog tome je to što povećanjem brzine miješanja stvaraju se povoljniji hidrodinamički uvjeti, tj. smanjuju se otpori prijenosu količine gibanja, topline i tvari, prijenos je brži pa je potrebna manja prezasićenost otopine za stvaranje stabilnog nukleusa. Prisutnost nečistoća također smanjuje širinu metastabilne zone.<sup>1</sup>

### 2.1.3. Prezasićenost

Prezasićenost je pokretačka sila procesa kristalizacije. Definira se kao razlika koncentracije i ravnotežne koncentracije tvari pri istoj temperaturi. Neki od načina kojima se može postići prezasićenost:

- Isparavanjem otapala - pokretačka sila raste kao posljedica smanjenja topljivosti tvari uslijed uklanjanja otapala
- Hlađenjem otopine - pokretačka sila raste kao posljedica smanjenja topljivosti tvari uslijed pada temperature

- Dodatkom antiotapala - pokretačka sila raste kao posljedica smanjenja topljivosti tvari uslijed dodatka antiotapala

Odabir metode ovisi o svojstvima tvari koja se kristalizira, pojnoj smjesi i termodinamici sustava. Primjerice, tvari niske topljivosti najčešće se dobivaju precipitacijom ili uz dodatak antiotapala.<sup>1,6</sup>

## **2.2. KRISTALIZACIJA DODATKOM ANTIOTAPALA**

Kristalizacija dodatkom antiotapala je tehnika kojom se tvar kristalizira iz otapala u kojem ima visoku topljivost dodatkom otapala u kojem ima nisku topljivost. Takvo otapalo naziva se antiotapalo te treba biti dobro mješljivo s primarnim otapalom.

Prednost ove tehnike je mogućnost provedbe procesa pri temperaturama koje su bliže sobnoj temperaturi u odnosu na druge tehnike, što je izrazito bitno s aspekta potrošnje energije i pogodno za toplinski osjetljive tvari. Druga prednost kristalizacije dodatkom antiotapala je da promjena u sastavu otapala može favorizirati jednu kristalnu strukturu u onim slučajevima kada otopljena tvar može kristalizirati u dvije ili više kristalnih faza (polimorfizam), a samo je jedna od njih poželjna za primjenu proizvoda. Budući da su farmaceutski proizvodi općenito osjetljivi na toplinsku razgradnju i često se javljaju u više kristalnih faza, ova metoda se često koristi u farmaceutskoj industriji. Nedostatak ove metode je to što dodatak antiotapala zahtjeva dodatan stupanj separacije i regeneracije te na taj način utječe na povećanje troškova procesa.<sup>7</sup> Ovu metodu moguće je kombinirati s kristalizacijom hlađenjem kako bi se dobilo veće iskorištenje procesa.

## **2.3. SFERIČNA KRISTALIZACIJA**

Sferična kristalizacija je tehnika dizajna čestica koja omogućava istodobno odvijanje procesa kristalizacije i aglomeracije sa svrhom formiranja kristalnih sfernih oblika uz pomoć kapljevine za premošćivanje. Aglomeracija se odvija u kontroliranim uvjetima, a nastali sferični aglomerati veličine su između 300 i 500  $\mu\text{m}$ .<sup>8</sup>

Nekoliko je metoda sferične kristalizacije djelatne tvari, a dvije osnovne su sferična aglomeracija i kvazi-emulzijska difuzija otapala tzv. QESD.

### 2.3.1. Sferična aglomeracija

Prilikom provedbe sferične aglomeracije koriste se tri različita otapala. U jednom od otapala (dobro otapalo) željena komponenta ima visoku topljivost, u drugom ima nisku topljivost (antiotapalo), dok se treće otapalo koristi kao kapljevina za premošćivanje. Dobro otapalo i antiotapalo moraju biti mješljivi i to na način da afinitet između njih mora biti jači nego afinitet između tvari i dobrog otapala što dovodi do trenutnog nastanka kristala. Kapljevina za premošćivanje ne smije biti mješljiva s antiotapalom i treba močiti površinu kristala. Zasićenoj otopini dodaje se antiotapalo, što dovodi do kristalizacije. Zatim se u smjesu u malim količinama dodaje kapljevina za premošćivanje kako bi se pospješilo stvaranje sferičnih aglomerata<sup>2</sup>. Aglomeracija se odvija u četiri koraka:

#### 1. Zona flokulacije:

U ovoj zoni kapljevina za premošćivanje adsorbira se na površinu kristala i povezuje čestice tvoreći most između njih.

#### 2. Zona nultog rasta

Rastresite flokule prelaze u gusto zbijene aglomerate, a kapljevina za premošćivanje se istiskuje na površinu. Pokretačka sila javlja se kao posljedica miješanja suspenzije, sudara između aglomerata te sudara s miješalom.

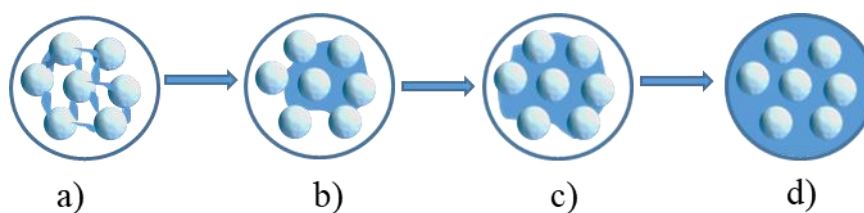
#### 3. Zona brzog rasta

Zona brzog rasta uočava se nakon što se dovoljno kapljevine za premošćivanje istisne s površine malih aglomerata. Nasumičnim sudarima dobro oblikovanih nukleusa dolazi do formiranja velikih čestica. Za uspješan sudar potreban je višak vlage na površini nukleusa.

#### 4. Zona konstantne veličine

U ovoj zoni aglomerati prestaju rasti ili se čak smanjuju kao posljedica mrvljenja ili lomljenja.<sup>8</sup>

Četiri zone aglomeracije ilustrirane su na slici 3:



Slika 3. Četiri koraka odvijanja aglomeracije: a) zona flokulacije, b) zona nultog rasta, c) zona brzog rasta, d) zona konstante veličine.

Glavni parametri sferične aglomeracije su izbor otapala, vrsta i količina kapljevine za premošćivanje, topljivost, brzina miješanja i temperatura. Polarnost otapala i njihove međusobne interakcije utječu na oblik kristala, izgled površine i zaobljenost kristalnih aglomerata. Sustav otapala većinom se određuje principom pokušaja i pogreške, prateći uvjete koje otapala moraju ispunjavati. Vrsta i količina kapljevine za premošćivanje jedan su od najbitnijih parametara ove metode. U većini slučajeva, s povećanjem količine kapljevine za premošćivanje dolazi do povećanja veličine sferičnih aglomerata. Količina kapljevine za premošćivanje određuje se iz trinarnog dijagrama.<sup>8</sup>

Neke od prednosti i nedostataka sferične aglomeracije prikazani su u *tablici 2*.

Tablica 2. Prednosti i nedostaci procesa sferične aglomeracije:<sup>8</sup>

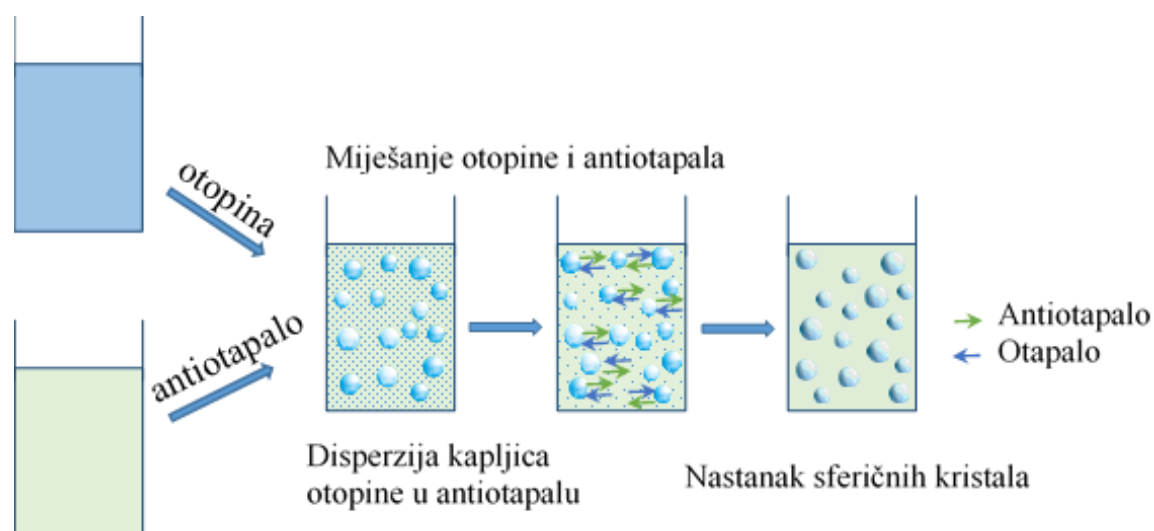
PREDNOSTI	NEDOSTACI
Poboljšana fizikalno-kemijska svojstva kristala za farmaceutski proces	Odabir pogodnih otapala je obično težak i dugotrajan
Mogućnost konverzije u polimorfne oblike, bolja bioraspoloživost	Zahtjevnja optimizacija procesnih parametara (temperatura, miješanje)
Učinkovitije provođenje daljnjih postupaka obrade (separacija, filtracija, sušenje)	
Može se koristiti za prikrivanje gorkog okusa lijeka	
Moguća priprema mikrosfera, mikrospužvi, nanočestica i mikropeleta	



### 2.3.2. Kvazi-emulzijska difuzija otapala

Kvazi-emulzijsku difuziju otapala (engl. *Quasi-emulsion Solvent Diffusion*; QESD) prvi put spominju Kawashima i suradnici 1989. godine.<sup>9</sup> Kod ove metode do aglomeracije može doći sa ili bez kapljevine za premošćivanje. Preduvjet za provedbu ove metode je da interakcija između tvari i dobrog otapala bude jače od interakcije između dobrog otapala i antiotapala. Željena tvar se otapa u dobrom otapalu, a kada se otopina dispergira u antiotapalu, stvaraju se kapljice kvazi-emulzije, iako se dobro otapalo i antiotapalo mogu miješati. Dobro otapalo postupno difundira iz kapljica emulzije u vanjsku fazu, dok antiotapalo difundira u kapljice, što smanjuje topljivost te rezultira kristalizacijom tvari unutar kapljica. Preostalo dobro otapalo u kapljicama djeluje kao kapljevina za premošćivanje te dolazi do aglomeracije stvorenih kristala. Ako su parametri procesa podešeni na odgovarajući način formiraju se sferični aglomerati kristala. Često se u smjesu dodaju površinski aktivne tvari ili polimeri radi smanjenja međufazne napetosti između otapala i radi promjene viskoznosti faza što utječe na oblik nastalih kristala (sprječava se aglomeracija nastalih sferičnih čestica).

Metoda se smatra jednostavnijom od metode sferične aglomeracije, ali teškoću može predstavljati pronalazak odgovarajućeg aditiva za održavanje emulgiranog sustava i osiguravanje odgovarajuće difuzije antiotapala u disperznu fazu.<sup>10</sup> Na difuziju otapala utječu dva osnovna parametra. Prvi parametar je razlika temperature otopine i antiotapala prije disperzije, a drugi je početni omjer masa dobrog otapala i antiotapala.



Slika 4. Shematski prikaz QESD metode.<sup>10</sup>

## 2.4. KRISTALIZACIJA U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Kristalizacija je jedinična operacija koja ima ključnu ulogu u obradi i razvoju unutar farmaceutske industrije, a koristi se u odvajanju i pročišćavanju intermedijarnih spojeva i djelatnih tvari (engl. *Active pharmaceutical ingredient*; API).<sup>11</sup> Osnovne karakteristike bitne za API su topljivost, morfologija, raspodjela veličina čestica, biokompatibilnost te polimorfizam. Za farmaceutsku industriju osobito je važan polimorfizam, a on se može kontrolirati primjenom kristalizacije uz dodatak antiotapala. Raspodjela veličina čestica djelatne tvari, kao i njezini oblici značajno utječu na krajnju formulaciju lijeka.

### 2.4.1. Formulacija lijeka

Budući da ih je jednostavno uzimati i imaju precizno definiranu dozu, tablete u čvrstom obliku najpopularniji su način konzumiranja lijekova. Kvaliteta čvrste doze lijeka primarno je ovisna o mikrometarskim karakteristikama kao što su veličina i oblik kristala. Proces formulacije, u kojem se API miješa sa aditivima i pomoćnim sredstvima ključna je operacija koja određuju konačna farmakokinetička svojstva lijeka. Ovisno o fizikalnim i mehaničkim svojstvima komponenata te o njihovoj topljivosti proces formulacije može biti više ili manje složen. Većina API-ja proizvodi se u kristalnom obliku radi održanja kemijske stabilnost prilikom transporta, pakiranja i skladištenja. Budući da su dobiveni kristali obično nepravilnog i nepovoljnog oblika, te neodgovarajuće veličine, nakon kristalizacije, a prije tabletiranja, podliježu intenzivnim energetskim procesima kao što su mljevenje, prosijavanje, miješanje i granuliranje.

Usitnjavanje i mljevenje energetski su neučinkoviti procesi uz nedostatke kao što su moguća kontaminacija produkta te promjena amorfne oblika. Nakon smanjenja veličine čestica, aktivne komponente miješaju se s prikladnim ekscipijentima, kao što su boje, punila, arome, veziva i konzervansi. Metodama suhe i mokre granulacije reguliraju se slaba mehanička i fizikalna svojstva čestica lijeka. Nedostaci suhog granuliranja su proizvodnja velike količine prašine, te potreba za višestupanjskom kompaktijom i prosijavanjem produkta, što povećava vrijeme trajanja procesa, kao i potrošnju energije. S druge strane, vlažno granuliranje ograničeno je na mješavine koje nisu osjetljive na vlagu te može uzrokovati promjene u polimorfnim oblicima. Posljednji korak je tabletiranje.

Budući da navedeni proces proizvodnje tableta uključuje brojne korake (kristalizacija, filtracija, sušenje, miješanje, granulacija, tabletiranje) razvijena je nova metoda proizvodnje tableta tzv. direktno tabletiranje.<sup>11</sup> Aglomerati nastali postupkom sferične kristalizacije mogu biti podvrgnuti

direktnom tabletiranju bez prethodne obrade što uzrokuje veću financijsku isplativost cijeloga procesa. Osim toga, povećanje topljivosti i brzine otapanja slabo topljivih tvari, poboljšanje tečivosti i kompresibilnosti razlozi su sve većeg korištenja sferične kristalizacije u farmaceutskoj industriji.<sup>2</sup>

#### 2.4.2. Biofarmaceutski sustav kvalifikacije

Biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *Biopharmaceutics Classification System*; BCS) znanstveni je okvir koji djelatne tvari za oralnu primjenu klasificira u četiri biofarmaceutske skupine na temelju njihove topljivosti i permeabilnosti. U *tablici 3.* prikazana je klasifikacija djelatnih tvari u četiri skupine prema BCS-u. Djelatna tvar se smatra dobro topljivom ako se najveća doza djelatne tvari otapa u  $\leq 250$  mL vodenog medija u pH području 1,2 - 6,8 pri 37 °C. Dok se dobro permeabilnom smatra djelatna tvar kojoj je intestinalna apsorcija  $\geq 90$  %. BCS je prihvaćen od strane regulatornih tijela (Europske agencije za lijekove – EMA; Američke agencije za hranu i lijekove – FDA; Svjetske zdravstvene organizacije – WHO) kao sustav za odobravanje oralnih farmaceutskih oblika. Od 1995. kada je BCS objavljen napravljena su značajna poboljšanja u ranim fazama formulacije lijeka. Općenito, djelatne tvari I. i III. skupine zahtijevaju relativno jednostavniji formulacijski pristup, dok je formulacijski pristup za djelatne tvari II. i IV. skupine znatno složeniji.<sup>12</sup>

*Tablica 3.* BCS klasifikacija djelatnih tvari.<sup>12</sup>

I. BCS skupina: - dobro topljive - dobro permeabilne	II. BCS skupina: - slabo topljive - dobro permeabilne
III. BCS skupina: - dobro topljive - slabo permeabilne	IV. BCS skupina: - slabo topljive - slabo permeabilne

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. SVRHA RADA

Svrha rada je pronalazak optimalnog sustava otapala za provedbu sferične kristalizacije ceritiniba. Također, ispitan je utjecaja izbora otapala na oblik i strukturu nastalih kristala.

#### 3.2. MATERIJAL

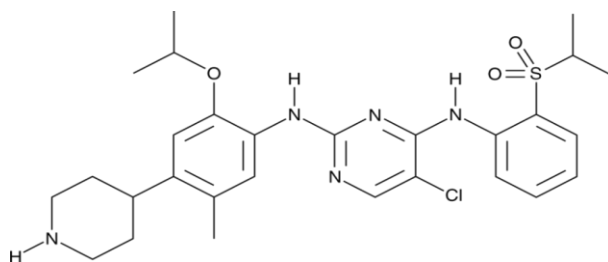
Djelatna tvar korištena u eksperimentu je ceritinib, kao antiotapalo koristila se demineralizirana voda, a popis kemikalija koje su se koristile kao otapalo, kapljevinu za premošćivanje ili aditiv nalazi se u *tablici 4*.

*Tablica 4.* Popis korištenih kemikalija.

Kemikalija	Formula	Proizvođač	Čistoća	CAS broj
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> OH	Lach-Ner	99,98 %	67-64-1
Toluen	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	Macron	99,50 %	108-88-3
Tetrahidrofuran	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> O	Lach-Ner	p.a.	110-54-3
Heptan	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub>	Lach-Ner	99,00 %	142-82-5
Heksan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	Carlo Erba	p.a.	109-99-9
Polivinil acetat	(C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	Acros organics	78,00 %	9003-20-7
Polietilen glikol	C <sub>2n</sub> H <sub>4n+2</sub> O <sub>n+1</sub>	Acros organics	p.a.	25322-68-3
Polivinilpirolidon	(C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NO) <sub>n</sub>	Acros organics	p.a.	9003-39-8
Hipromeloza	C <sub>56</sub> H <sub>108</sub> O <sub>30</sub>	Dupont	p.a.	9004-65-3
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	Lach-Ner	p.a.	67-56-1
2-propanol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Lach-Ner	p.a.	71-23-8
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Gram mol	p.a.	64-17-5

### 3.2.1. Ceritinib

Ceritinib je kemijski spoj koji spada u skupinu aminopirimidina, kemijskog naziva 5-kloro-2-N-(2-izopropoksi-5-metil-4-(piperidin-4-il)fenil)pirimidin-2,4-diamin. Molekulska mu formula glasi  $C_{28}H_{36}ClN_5O_3S$ , a molarna masa iznosi 558,1 g/mol. Ceritinib prema BCS klasifikaciji djelatnih tvari spada u IV. skupinu, odnosno u skupinu slabo topljivih i slabo permeabilnih djelatnih tvari. Djelatna je tvar lijeka *Zykadia*<sup>®</sup> koji se koristi za liječenje odraslih osoba s metastatskim karcinomom pluća nemalih stanica (engl. *non-small cell lung cancer*; NSCLC).<sup>13</sup> Kemijska struktura ceritiniba prikazana je na slici 5.



Slika 5. Kemijska struktura ceritiniba.<sup>14</sup>

Ceritinib je prah bijele/svijetložute boje te prema patentu<sup>15</sup> može kristalizirati u tri polimorfna oblika koji se međusobno razlikuju po fizikalnim svojstvima kao što su topljivost, gustoća, talište itd.

### 3.3. METODE I UREĐAJI

Eksperimentalni dio rada proveden je prema sljedećem redoslijedu:

#### 1. Preliminarna istraživanja

- *Određivanje topljivosti*
- *Odabir sustava otapala*
- *Odabir aditiva za QESD*
- *Određivanje kinetike kristalizacije i omjera komponenti*

#### 2. Provedba sferične kristalizacije

- *Sferična aglomeracija*
- *Kvazi-emulzijska difuzija otapala (QESD)*
- *Kombinirana metoda*

### 3. Karakterizacija kristala

- *Mikroskopija*
- *Određivanje unutarne strukture kristala*

#### 3.3.1. Preliminarna istraživanja

Preliminarnim istraživanjima određeno je koje će se komponente i u kojim omjerima koristiti za provedbu sferične kristalizacije.

##### 3.3.1.1. Određivanje topljivosti

Za određivanje topljivosti ceritiniba korištene su magnetska miješalica (*slika 6.*), Analizator vlage MLS-50-3C, *Kern & Sohn.* (*slika 7.*) te uređaj za provedbu kristalizacije *crystalSCAN* (*slika 8.*). Topljiost je određena pri 35 °C dodavanjem djelatne tvari u otapalo na magnetskoj miješalici do nastanka suviška. Nakon filtracije suviška iz otopine kroz izvagani filter papir, slijedi sušenje na 100 °C, talog se važe te se određuje masa otopljene tvari. Ispitana je topljivost u sljedećim otapalima: tetrahidrofur (THF), metanol, 2-propanol, etanol, aceton, voda, heptan, heksan i toluen.



*Slika 6.* Magnetska miješalica.



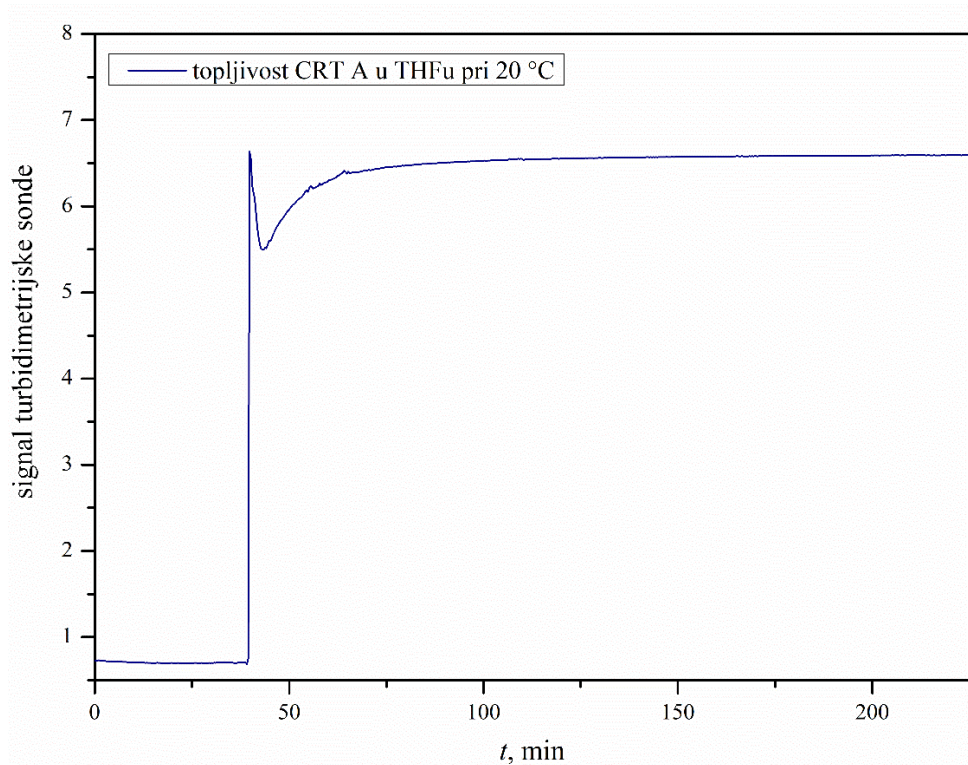
*Slika 7.* Analizator vlage *Kern & Sohn.*

Topljivost ceritiniba detaljnije je ispitana u THF-u i acetonu turbidimetrijskom metodom u temperaturnom rasponu od 5-55 °C s korakom od 5 °C pomoću *crystalSCAN*-a. Turbidimetrijska metoda podrazumijeva praćenje zamućenosti otopine pomoću turbidimetra postavljenog u kristalizator. Zamućenost se mjeri na osnovu intenziteta svjetlosti: smanjenjem broja čestica, intenzitet svjetlosti se povećava, a zamućenost opada.

Nakon postizanja određene temperature dodaje se odvagana masa djelatne tvari u suvišku te se uronjenim turbidimetrom prati zamućenje. Postizanje ustaljene vrijednosti signala, ukazuje da je otopljena maksimalna količina tvari u otapalu pri određenoj temperaturi. Uzorak otopine se zatim stavlja se u analizatoru vlage u kojem se zagrijavanjem uklanja otapalo, a na ekranu se prikaže masa taloga uz pomoću koje se izračunava topljivost tvari pri određenoj temperaturi. Postupak se ponavlja za svaku temperaturu.<sup>16</sup> Na *slici 9*. prikazan je primjer grafa dobivenog praćenjem zamućenja otopine u vremenu.



*Slika 8. CrystalSCAN.*

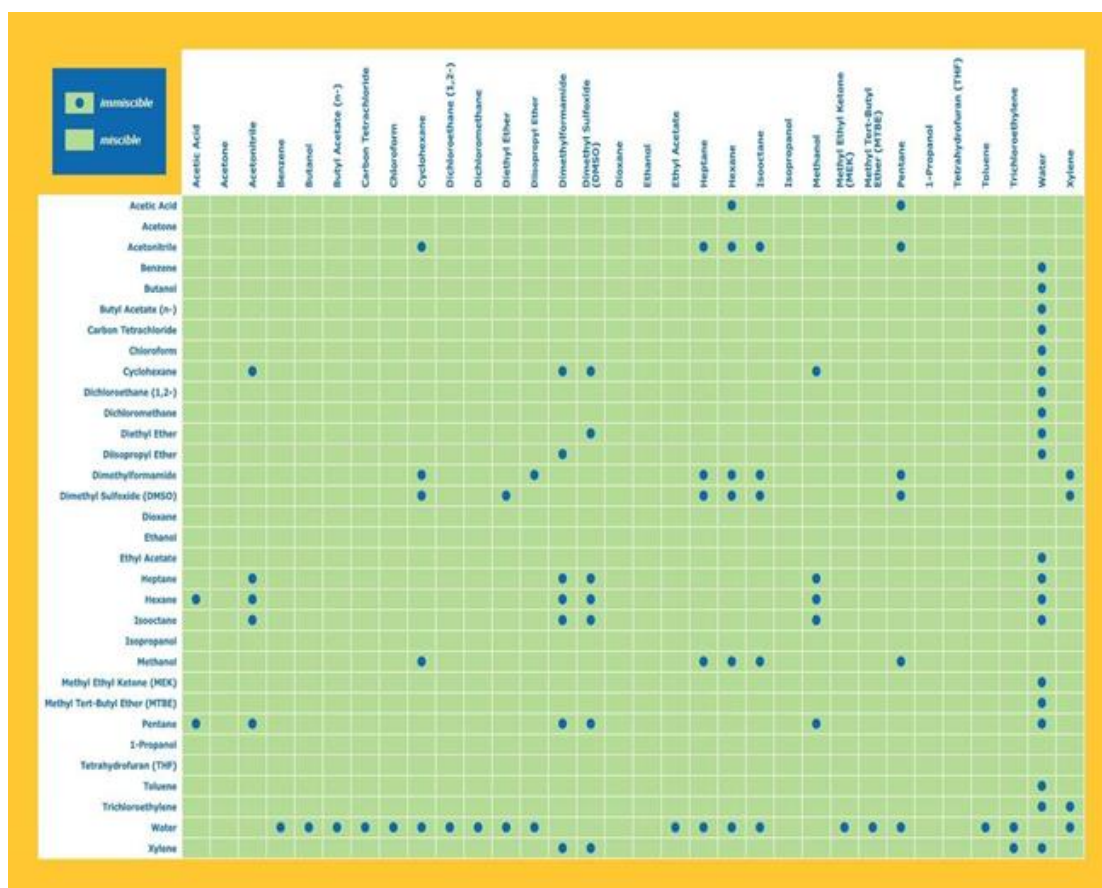


Slika 9. Promjena zamućenja otopine CRT A u THF-u kroz vrijeme pri 20 °C.

### 3.3.1.2. Odabir sustava otapala

Za uspješnu provedbu sferične kristalizacije potrebno je pronaći odgovarajući sustav otapala. Dobro otapalo i antiotapalo trebaju biti međusobno miješljivi, dok kapljevina za premošćivanje ne smije biti mješljiva s antiotapalom. Stoga, za odabiru otapala, antiotapala te kapljevine za premošćivanje trebalo je koristiti prethodno određene podatke o topljivosti ceritiniba, tablicu mješljivosti otapala (*slika 10.*) kao i *Pfizerov* vodič za odabir otapala (*tablica 1.*).





Slika 10. Tablica mješljivosti otapala.<sup>18</sup>

### 3.3.1.3. Odabir aditiva za QESD i njihova priprema

Za uspješnu provedbu kvazi-emulzijske difuzije otapala potrebno je naći prikladan aditiv. Aditivi za provedbu QESD-a odabrani su uz pomoć literature.<sup>17</sup> U navedenoj literaturi kao aditivi korišteni su razni polimeri u rasponu od 0,0080 do 7,50 % (w/w). U ovom radu korišteni su PVA, PEG, PVP i HPMC, odnosno njihove vodene otopine od 1, 3 i 5 % (w/w). Otopine aditiva pripremljene su otapanjem polimera u vodi na magnetskoj miješalici pri 40 °C.

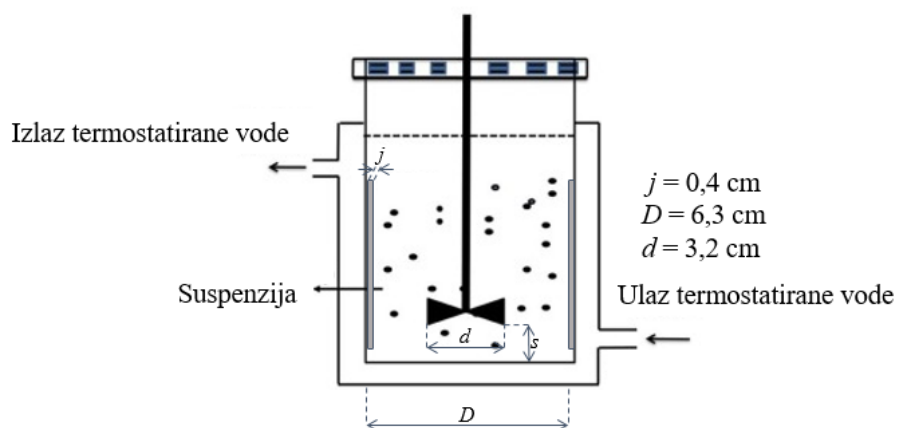
### 3.3.1.4. Određivanje kinetike kristalizacije i omjera komponenti

Kako bi se odredila minimalna količina antiotapala potrebnog za potpunu kristalizaciju djelatne tvari provedeno je ispitivanje kinetike kristalizacije. Kinetika kristalizacije je određena u otopini ceritiniba u THF-u zasićenoj pri 35 °C u uređaju *CrystalSCAN*, dodavanjem vode kao antiotapala brzinom od 0,11 ml/s. Koncentracija ceritiniba u otopini pratila se gravimetrijski pomoću analizatora vlage do potpunog izdvajanja kristala iz otopine. Za određivanje područja

koncentracija za provedbu kristalizacije koristili su se ternarni dijagrami za sustav otapalo, antiotapalo i kapljevina za premošćivanje dobiveni uz pomoć programski paket *Dynochem* te literatura<sup>19</sup>.

### 3.3.2. Provedba sferične kristalizacije

Aparatura u kojoj je provedena sferična kristalizacija sastoji se od kristalizatora s dvostrukom stjenkom i razbijalom (slika 11.), termostata *Julabo F12*, miješalice te turbinskog miješala s četiri ravne lopatice nagnute pod kutom od 45° (slika 12.) (engl. *pitch turbine downpumping*; PTD). Sferična kristalizacija je provedena trima metodama: sferičnom aglomeracijom, kvazi-emulzijskom difuzijom otapala te kombinacijom ovih dviju metoda.



Slika 11. Kristalizator s dvostrukom stjenkom i razbijalom



Slika 12. Turbinsko miješalo sa četiri ravne lopatice nagnute pod kutom od 45°

### **3.3.2.1. Sferična aglomeracija**

Eksperimenti sferične aglomeracije provedeni su dokopavanjem zasićene otopine CRT A zagrijane na 35 °C u antiotapalo u suvišku termostatorano na 20 °C u koje je prethodno dokapana kapljevina za premošćivanje. Volumni omjer otapala, antiotapala i kapljevine za premošćivanje bio je 1:7:1, a eksperimenti su trajali 60 min.

### **3.3.2.2. Kvazi-emulzijska difuzija otapala**

Eksperimenti kvazi-emulzijske difuzije otapala su provedeni u reaktoru s duplom stijenkom dodavanjem zasićene otopine CRT A zagrijane na 35 °C u vodenu otopinu aditiva 1, 3 ili 5 % (w/w) pri 20 °C u omjeru 1:7. Eksperimenti su trajali 60 min.

### **3.3.2.3. Kombinirana metoda sferične kristalizacije**

Eksperimenti su provedeni u reaktoru s duplom stijenkom dokopavanjem kapljevine za premošćivanje u vodenu otopinu aditiva termostatoranu na 20 °C. Nakon postizanja stanje potpune disperzije kapljica, u reaktor se dokapava zasićena otopina CRT A zagrijana na 35 °C. Volumni omjer otapala, antiotapala i kapljevine za premošćivanje bio je 1:7:1, a eksperimenti su trajali 40 min.

## **3.3.3. Karakterizacija kristala**

Nakon provedbe sferične kristalizacije dobivenim aglomeratima određen je oblik i struktura.

### **3.3.3.1. Mikroskopija**

Kako bi se odredilo optimalno vrijeme zadržavanja tijekom provedbe sferične kristalizacije uzimani su uzorci otopine u intervalima od 1, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 min te je praćen oblik nastalih kristala na svjetlosnom mikroskopu *Motic BA200 (slika 13.)*. Mikroskop je spojen na računalo te su uz pomoć računalnog programa dobiveni kristali fotografirani što je omogućilo kasniju usporedbu. Također, nakon filtracije i sušenja dobivene kristalne sfere su analizirane pod mikroskopom te fotografirane.



*Slika 13. Svjetlosni mikroskop Motic BA200.*

### 3.3.3.2. Određivanje unutarnje strukture kristala

Unutarnja struktura kristala dobivenih sferičnom kristalizacijom određena je metodom rendgenske difrakcije na prahu. Mjerenja su provedena na uređaju *Shimadzu XRD-6000* (slika 14.) s  $\text{Cu-K}\alpha$  izvorom zračenja valne duljine,  $\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$ . Primijenjena je jakost struje od 30 mA te narinuti napon 40 kV. Podaci su prikupljeni između  $2\theta = 5 - 50^\circ$ , s korakom od  $0,02^\circ$  i zadržavanjem od 0,6 sekundi po koraku.

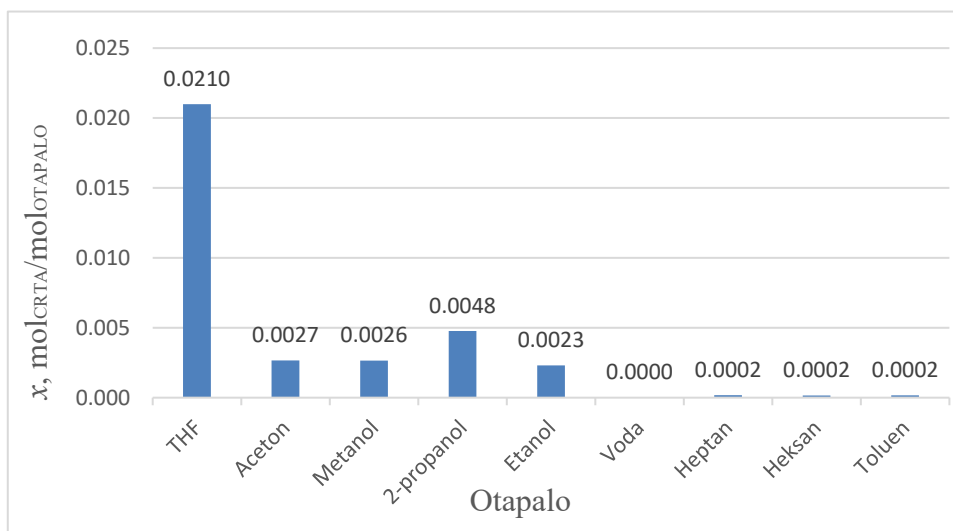


*Slika 14. Shimadzu XRD-6000.*

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

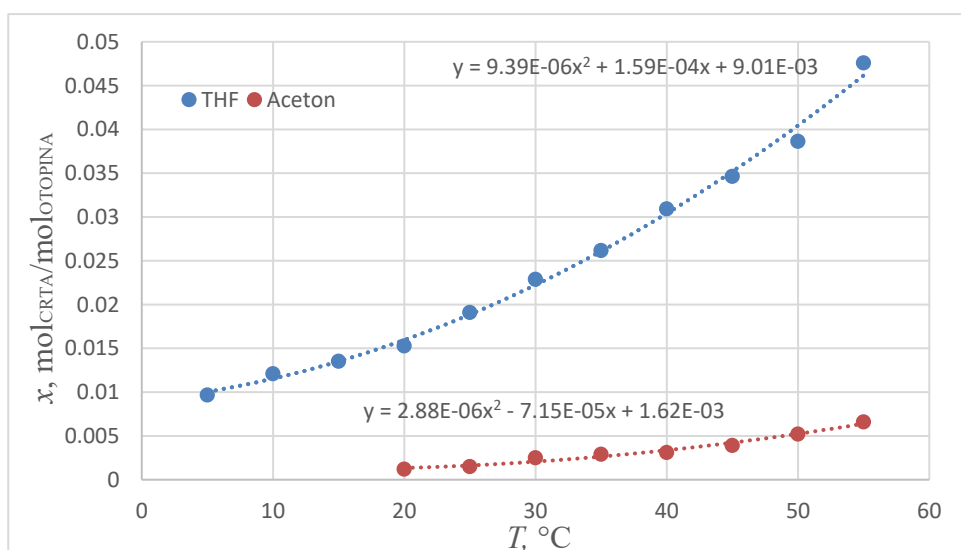
### 4.1. TOPLJIVOST I ODABIR SUSTAVA

Za uspješan odabir sustava otapala (otapalo, antiotapalo i kapljevina za premošćivanje) važno je poznavati topljivost djelatne tvari u otapalima, njihovu međusobnu mješljivost kao i voditi računa o toksičnosti i ekonomičnosti. Topljivost ceritiniba je određena pri 35 °C u različitim otapalima. Rezultati ispitivanja prikazani su u na *slici 15*.



Slika 15. Topljivost CRT A u različitim otapalima pri 35 °C.

Topljivost ceritiniba u THF-u i acetonu je dodatno ispitana turbidimetrijskom metodom te je rezultat prikazan na *slici 16*.



Slika 16. Krivulje topljivosti ceritiniba u THF-u i acetonu.

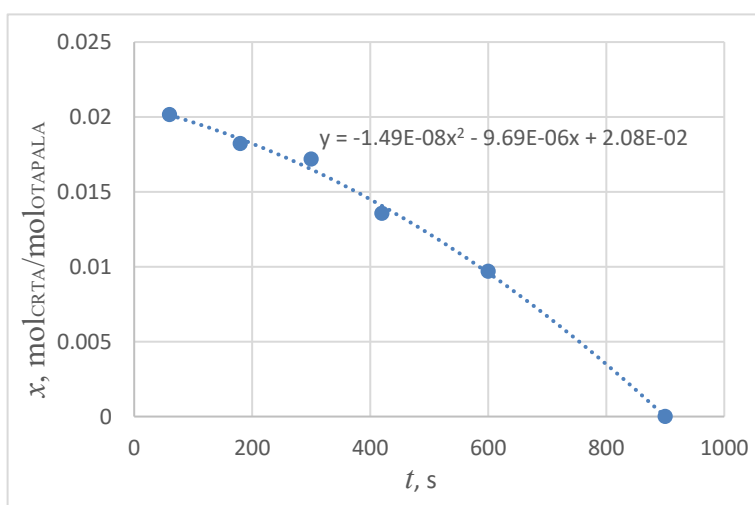
Iz podataka na *slici 15.* vidljivo je da je najbolja topljivost ceritinib u THF-u stoga je on korišten kao otapalo u većini provedenih eksperimenata. Iz eksperimentalnih podataka prikazanih na *slici 16.* vidljivo je da porastom temperature topljivost ceritiniba u THF-u i acetonu raste te da je pri svakoj temperaturi topljivost ceritiniba značajno veća u THF-u u odnosu na aceton. Iako THF pokazuje bolju topljivost ceritiniba, proces sferične aglomeracije se provodio i s acetonom kao otapalom budući da je prema *Pfizerovom* vodiču (*tablica 1.*) za odabir otapala prihvatljiviji nego THF.

Budući da je topljivost ceritiniba u vodi vrlo niska, a voda je mješljiva s odabranim otapalom (*slika 10.*), netoksična i lako dostupna, korištena je kao antiotapalo za sve eksperimente. Kao kapljevinu za premošćivanje korišteni su heptan, heksan i toluen budući da zadovoljavaju potrebne uvjete tj. ceritinib nije topljiv u njima te nisu mješljive s korištenim antiotapalom. Prema *Pfizerovom* vodiču za odabir otapala u farmaceutskog industriji, heptan i toluen su bolji izbor od heksana zbog manje toksičnosti.

Polimerni aditivi su dodavani kako bi se osigurala veća povezanost među nastalim kristalima, samim time i veća vjerojatnost za nastanak sferičnih kristala. Pregledom literature<sup>19</sup>, kao aditiv za provedbu QESD-a odabrani su PVA, PEG, PVP i HPMC, odnosno njihove vodene otopine od 1, 3 i 5 % (w/w).

## 4.2. KINETIKA I ODREĐIVANJE KOLIČINE ANTIOTAPALA

Kinetika kristalizacije ceritiniba iz THF-a dodavanjem vode kao antiotapala prikazana je na *slici 17.*



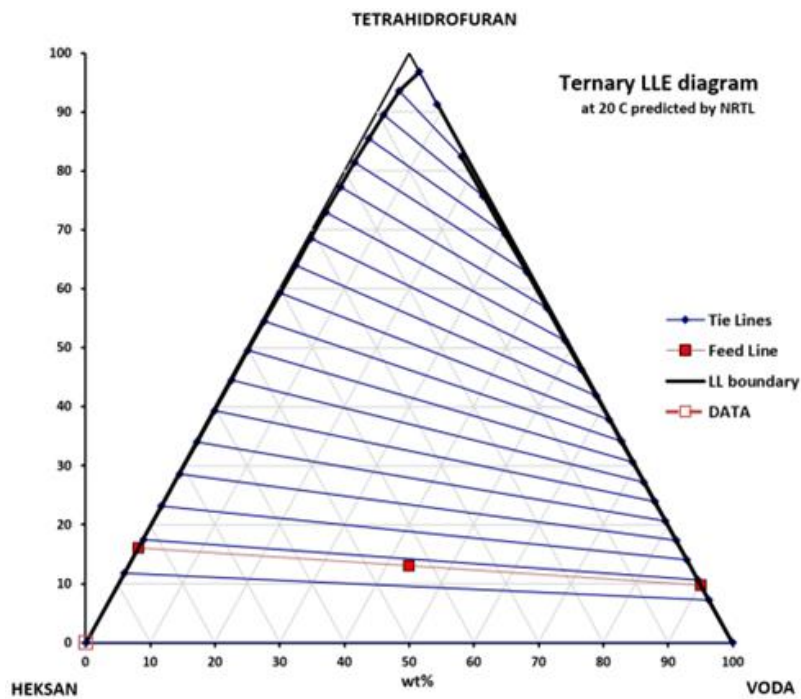
*Slika 17.* Kinetika kristalizacije ceritiniba.

Ispitivanje kinetike kristalizacije je provedeno kako bi se odredila minimalna potrebna količina antiotapala za potpunu kristalizaciju ceritiniba. Eksperiment je proveden pri 35 °C. Iz *slike 17.* vidljivo je da je koncentracija ceritiniba u otopini pala na nulu nakon 900 sekundi, a budući da je voda dodavana brzinom od 0,11 ml/s, za potpunu kristalizaciju ceritiniba utrošeno je 99 ml vode. Budući da je volumen otopine ceritiniba bio 50 ml minimalni potrebni omjer između otapala i antiotapala za potpunu kristalizaciju ceritiniba iznosi približno 1:2. Omjer antiotapala i otapala često se povećava pri provedbi sferične kristalizacije jer je antiotapalo medij u kojem se odvija nastanak sfera.

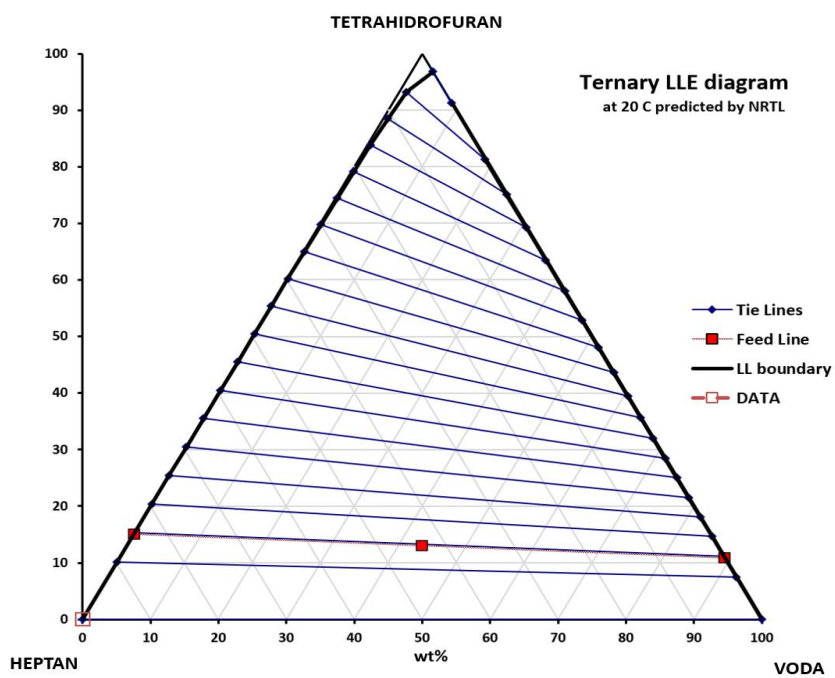
### 4.3. ODREĐIVANJE OMJERA KOMPONENATA

Nakon odabira otapala, antiotapala i kapljevine za premošćivanje bilo je potrebno odrediti područje koncentracija za provedbu sferične kristalizacije. Kristalizaciju je potrebno provoditi u području velikog udjela antiotapala kako bi se izdvojila sva djelatna tvar i omogućilo nesmetano miješanje i formiranje sfera. Kapljevine za premoštenje dodaje se u malom udjelu, kako bi se osigurala dobra raspršenost kapljica u vodi.

Na *slici 18.* i *slici 19.* prikazani su ternarni dijagrami dobiveni korištenjem programskog paketa *Dynochem* za sustave otapala: THF-voda-heptan i THF-voda-heksan. Dijagrami su određeni s ciljem definiranja heterogenog područja u kojem će se provodi sferična aglomeracija. Ternarni dijagrami za oba sustava izgledaju dosta slično te se većina omjera nalazi u heterogenom području. Za određivanje odgovarajućih omjera otapala pomogla je literatura<sup>20</sup>, u kojoj je provedena sferična aglomeracija djelatne tvari Etodolac, koja ima sličnu, pločastu kristalnu strukturu kao i ceritinib. Uz pomoć definicije zone aglomeracije, za ovaj sustav, procijenjeni su volumni omjeri koji su se primijenili u eksperimentima s ceritinibom. Omjeri između otapala, antiotapala i kapljevine za premošćivanje iznosi 1:7:1.



Slika 18. Ternarni dijagram za sustav THF-voda-heksan i THF – voda – heksan.



Slika 19. Ternarni dijagram za sustav THF-voda-heksan i THF – voda – heptan.

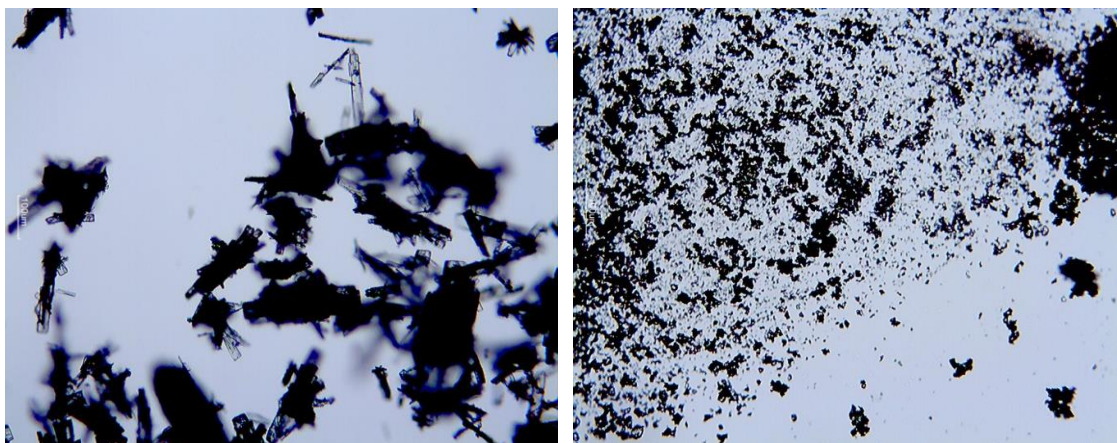


#### 4.4. SFERIČNA AGLOMERACIJA

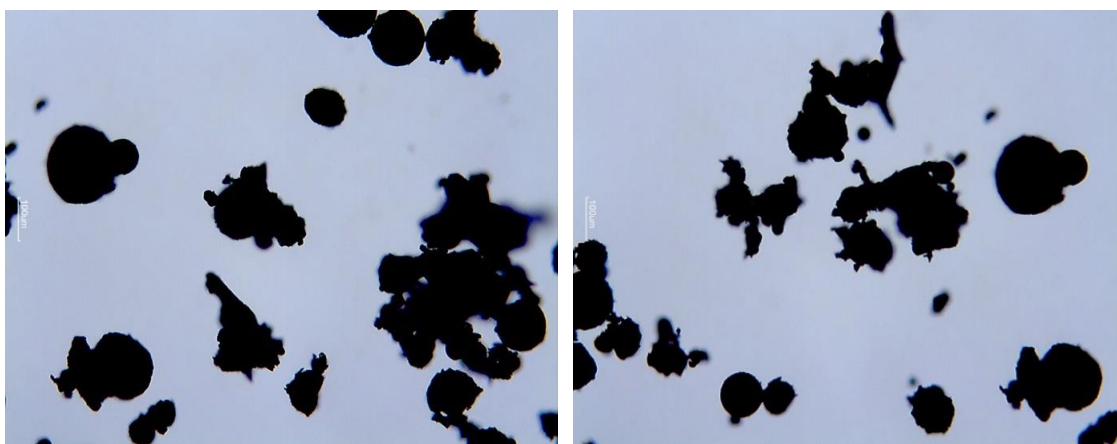
Tablica 5. Sustavi za provedbu sferične aglomeracije.

Naziv eksperimenta	Otapalo	Antiotapalo	Kapljevina za premošćivanje	$n, \text{min}^{-1}$
SA 1	acetone	voda	toluen	500
SA 2	acetone	voda	heptan	700
SA 3	acetone	voda	heksan	700
SA 4	THF	voda	toluen	400
SA 5	THF	voda	heptan	400
SA 6	THF	voda	heksan	500

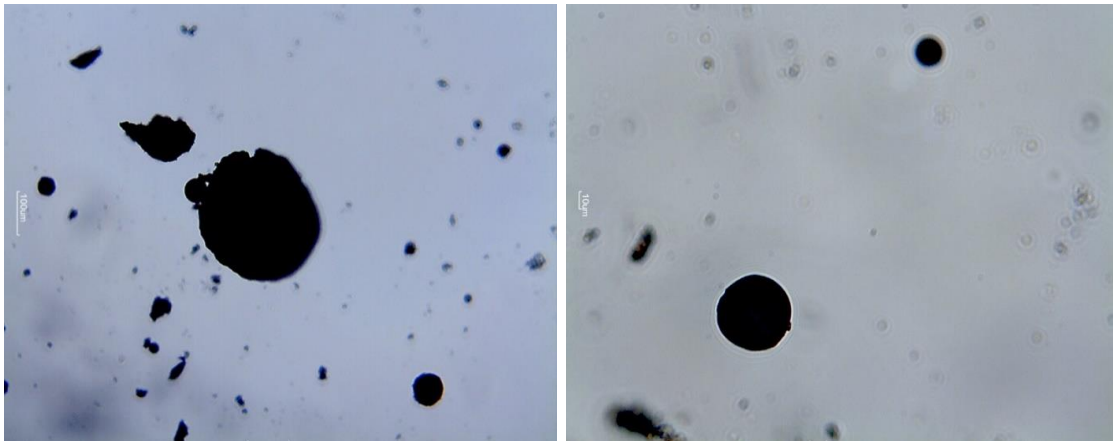
Provedeno je šest eksperimenata sferične aglomeracije, u svim je kao antiotapalo korištena voda, kao otapalo su isprobani THF i acetone, a kao kapljevine za premošćivanje heptan, heksan i toluen. Kod sferične aglomeracije u sustavima s acetonom kao otapalom dolazi do nastanka kristala, međutim, niti s jednom od triju kapljevina za premošćivanje (SA1, SA2, SA3) ne dolazi do formiranja kristalnih sfera, nego nepravilnih oblika (*slika 20.*). Kako je topljivost ceritiniba niska u acetonu, može se pretpostaviti da tijekom dodatka antiotapala ne nastaje dovoljna količina ceritiniba za nastanak sfera. Iz tog razloga, acetone nije korišten za daljnje eksperimente. S druge strane, kod sustava sa THF-om kao otapalom uz heptan i heksan kao kapljevina za premošćivanje nastaje određeni broj kristalnih sfera (SA5 i SA6), dok uz toluen kapljice raspršenog toluena ostaju nepopunjene i ne nastaju sfere (*slika 23.*). Izgled nastalih sfera nakon filtracije i sušenja za sustave THF-voda-heptan i THF-voda-heksan prikazan je na *slikama 21. i 22.* Uočljivo je da su nastale sfere različitih veličina te da je osim sfera došlo do nastanka kristala nepravilnih oblika. Budući da se THF pokazao kao dobro otapalo, a heptan i heksan kao dobre kapljevine za premošćivanje, korištene su dalje kroz rad u pokušaju pronalaska optimalnog sustava za sferičnu kristalizaciju ceritiniba.



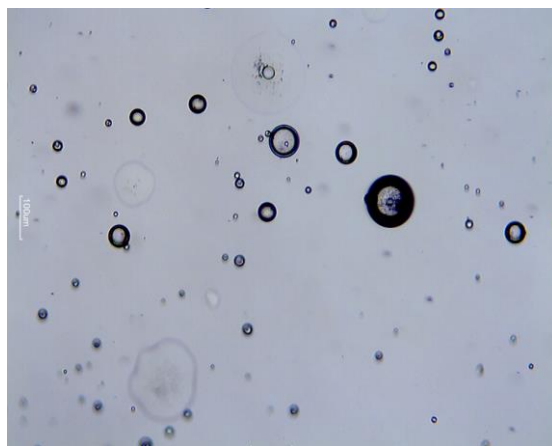
*Slika 20.* Kristali dobiveni sferičnom aglomeracijom ceritiniba u sustavu aceton – voda – heksan (lijevo) i aceton – voda – toluen (desno) pri uvećanju 100x i aceton – voda – heptan (dolje) pri uvećanju 400x.



*Slika 21.* Kristali dobiveni sferičnom aglomeracijom ceritiniba u sustavu THF – voda – heptan pri uvećanju 100x.



*Slika 22.* Kristali dobiveni sferičnom aglomeracijom ceritiniba u sustavu THF – voda – heksan pri uvećanju 100x (lijevo) i 400x (desno).



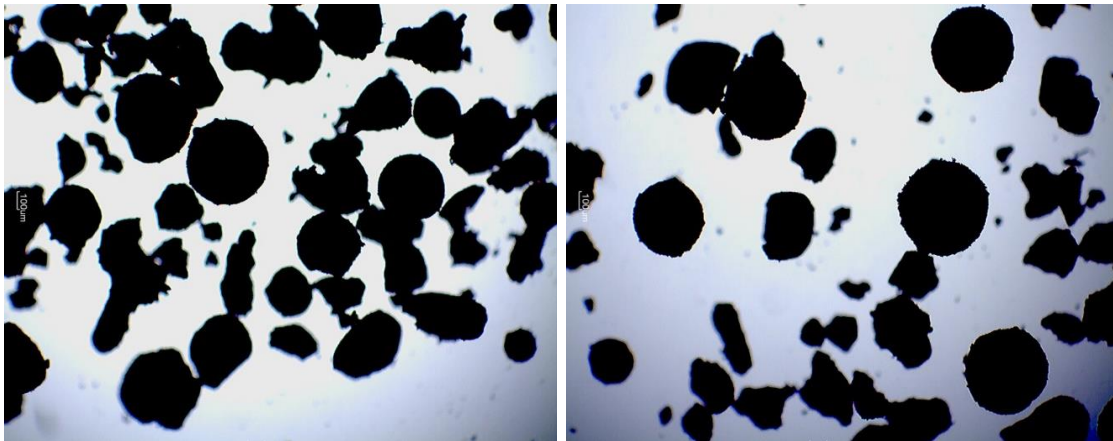
*Slika 23.* Kristali dobiveni sferičnom aglomeracijom ceritiniba u sustavu THF – voda – toluen pri uvećanju 100x.

#### 4.5. KVAZI-EMULZIJSKA DIFUZIJA OTAPALA

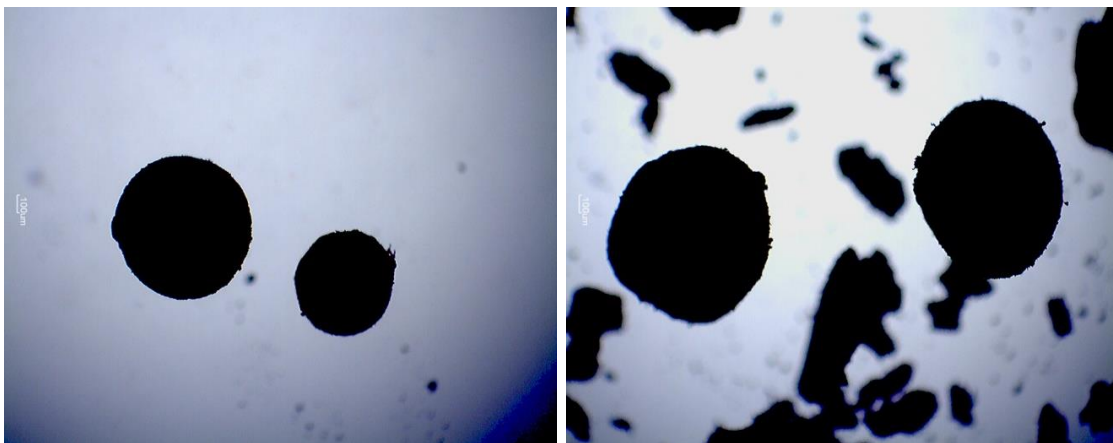
Tablica 6. Sustavi za provedbu QESD-a.

Naziv eksperimenta	Otapalo	Antiotapalo	Aditiv	$n, \text{min}^{-1}$
QESD 1	THF	voda	PVP 1% ( $w_{\text{PVP}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550
QESD 2	THF	voda	PVP 5% ( $w_{\text{PVP}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550
QESD 3	THF	voda	PVA 1% ( $w_{\text{PVA}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	500
QESD 4	THF	voda	PVA 5% ( $w_{\text{PVA}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	700
QESD 5	THF	voda	PEG 1% ( $w_{\text{PEG}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	600
QESD 6	THF	voda	PEG 5% ( $w_{\text{PEG}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550
QESD 7	THF	voda	HPMC 1% ( $w_{\text{HPMC}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550
QESD 8	THF	voda	HPMC 3% ( $w_{\text{HPMC}}/w_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550

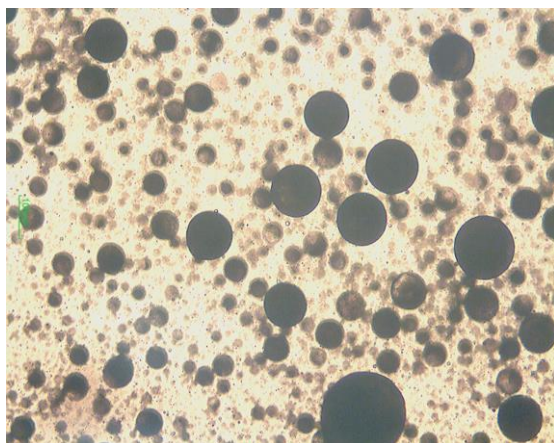
Pri provedbi QESD-a u svim eksperimentima kao otapalo je korišten THF, a aditivi su bile vodene otopine PVP, PVA, PEG i HPMC. Najbolje rezultate pokazao je sustav THF – voda – PVP 1% i 5% (QESD 1 i QESD 2) uz koji je došlo do nastanka kristalnih sfera pravilnog oblika. Vidljivo je da pri većoj koncentraciji PVP-a (5%, *slika 25.*) nastaje manji broj većih sfera, dok pri manjoj koncentraciji PVP-a (1%, *slika 24.*) nastaje veći broj manjih sfera. Sustavima s PVA kao aditivom (QESD 3 i QESD 4) dobivene su kristalne sfere (*slika 26.*), ali pri ispiranju i filtraciji pokazale su se lako lomljivima, budući da su se pod težinom vode za ispiranje, raspale. Sustavi s PEG-om kao aditivom (QESD 5 i QESD 6) nisu se pokazali uspješnim, tj. nastali kristali se nisu formirali u sfere (*slika 27.*). Slično je i kod sustava sa HPMC-om (QESD 7 i QESD 8), koji su rezultirali velikim brojem aglomerata, nepravilnog oblika (*slika 28.*).



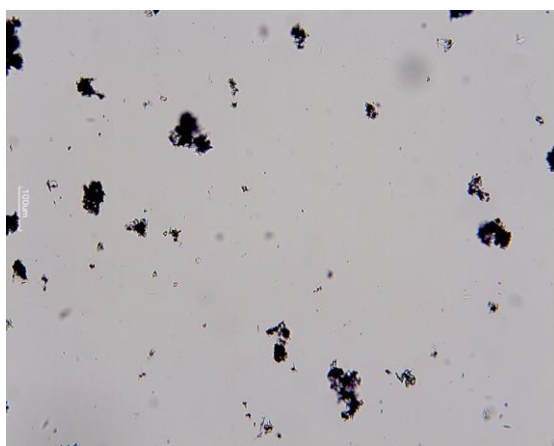
*Slika 24.* Kristali dobiveni QESD-om ceritiniba u sustavu THF – voda – PVP 1% pri uvećanju 100x.



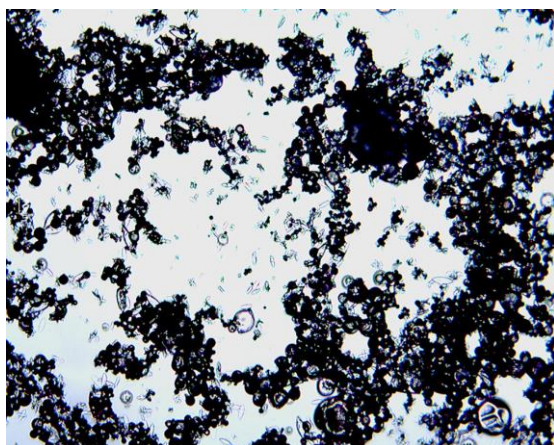
*Slika 25.* Kristali dobiveni QESD-om ceritiniba u sustavu THF – voda – PVP 5% pri uvećanju 100x.



*Slika 26.* Kristali dobiveni QESD-om ceritiniba u sustavu THF – voda – PVA 1% pri uvećanju 100x.



*Slika 27.* Kristali dobiveni QESD-om ceritiniba u sustavu THF – voda – PEG 1% pri uvećanju 100x.



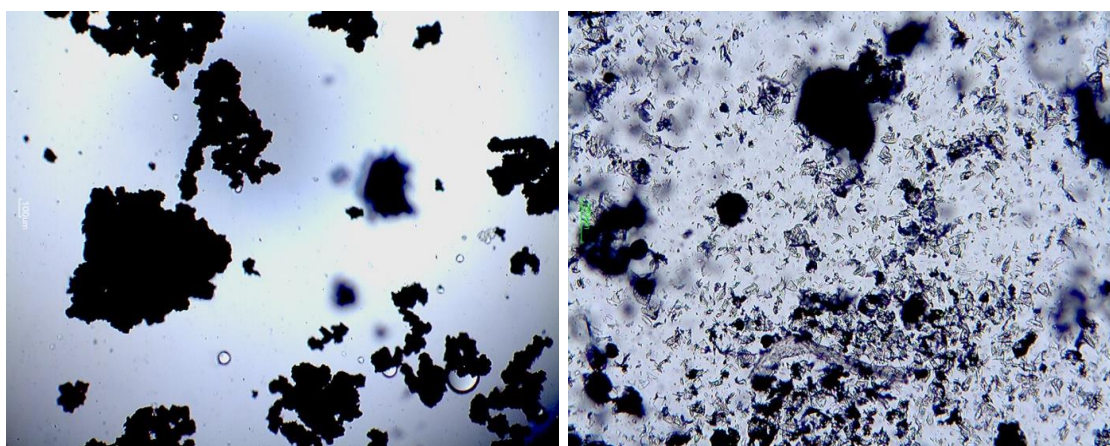
*Slika 28.* Kristali dobiveni QESD-om ceritiniba u sustavu THF – voda – HPMC 3% pri uvećanju 100x.

## 4.6. KOMBINIRANA METODA

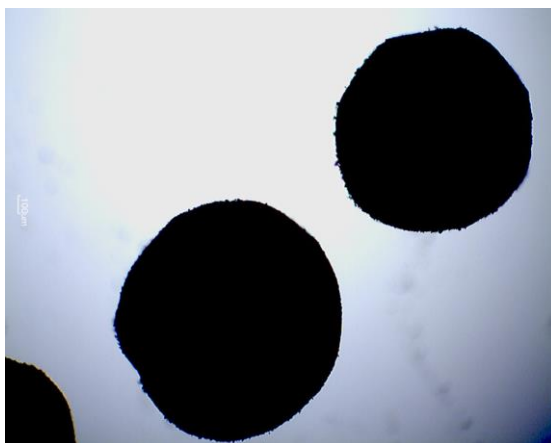
Tablica 7. Sustavi za provedbu kombinirane metode.

Naziv eksperimenta	Otapalo	Antiotapalo	Kapljevina za premošćivanje	Aditiv	$n, \text{min}^{-1}$
KA 1	THF	voda	heptan	PVP 1% ( $W_{\text{PVP}}/W_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550
KA 2	THF	voda	heptan	PEG 1% ( $W_{\text{PEG}}/W_{\text{H}_2\text{O}}$ )	550
KA 3	THF	voda	heptan	HPMC 1% ( $W_{\text{HPMC}}/W_{\text{H}_2\text{O}}$ )	700

Kombiniranom metodom pokušao se dobiti optimalan sustav za sferičnu kristalizacijom povezujući prethodne dvije metode (SA i QESD). Iako su i heptan i heksan do sada pokazali dobre rezultate, prednost je dobio heptan radi manje toksičnosti prema *Pfizerovom* vodiču za odabir otapala. Sustavi s PEG-om i HPMC-om kao aditivima do sada se nisu pokazali uspješnim pa se pokušalo u kombinaciji sa heptanom postići bolje rezultate, no bezuspješno, nisu formirani sferični kristali (*slika 29.*). S druge strane, PVP 1% (QESD 2) je do sada u kombinaciji s vodom i THF-om već rezultirao sferičnim kristalima, no nesavršenog oblika. Kombinirana metoda u sustavu THF – heptan – voda PVP 1% rezultirala je najvećim i oblikom najpravilnijim sferičnim kristalima (*slika 30.*)



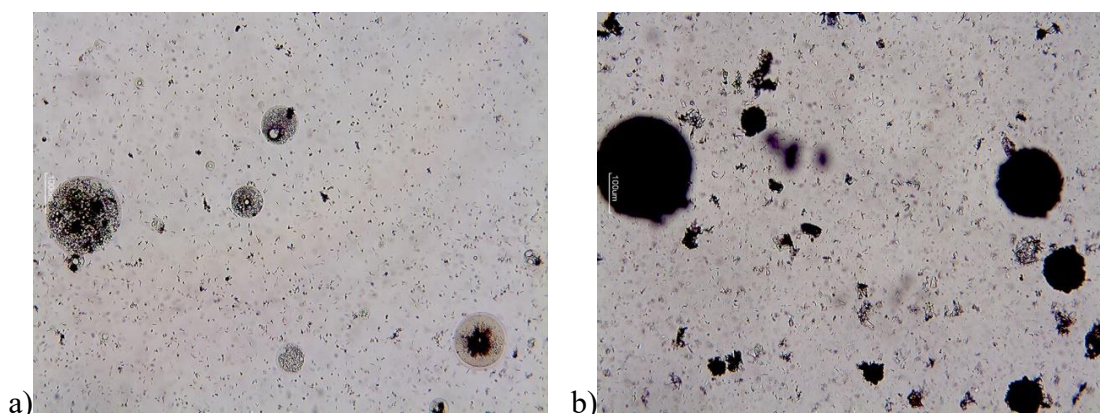
*Slika 29.* Kristali dobiveni kombiniranom metodom kristalizacije ceritiniba u sustavu THF – voda – heptan- PEG 1% (lijevo) i THF – voda – heptan- HPMC 1% (desno) pri uvećanju 100x.



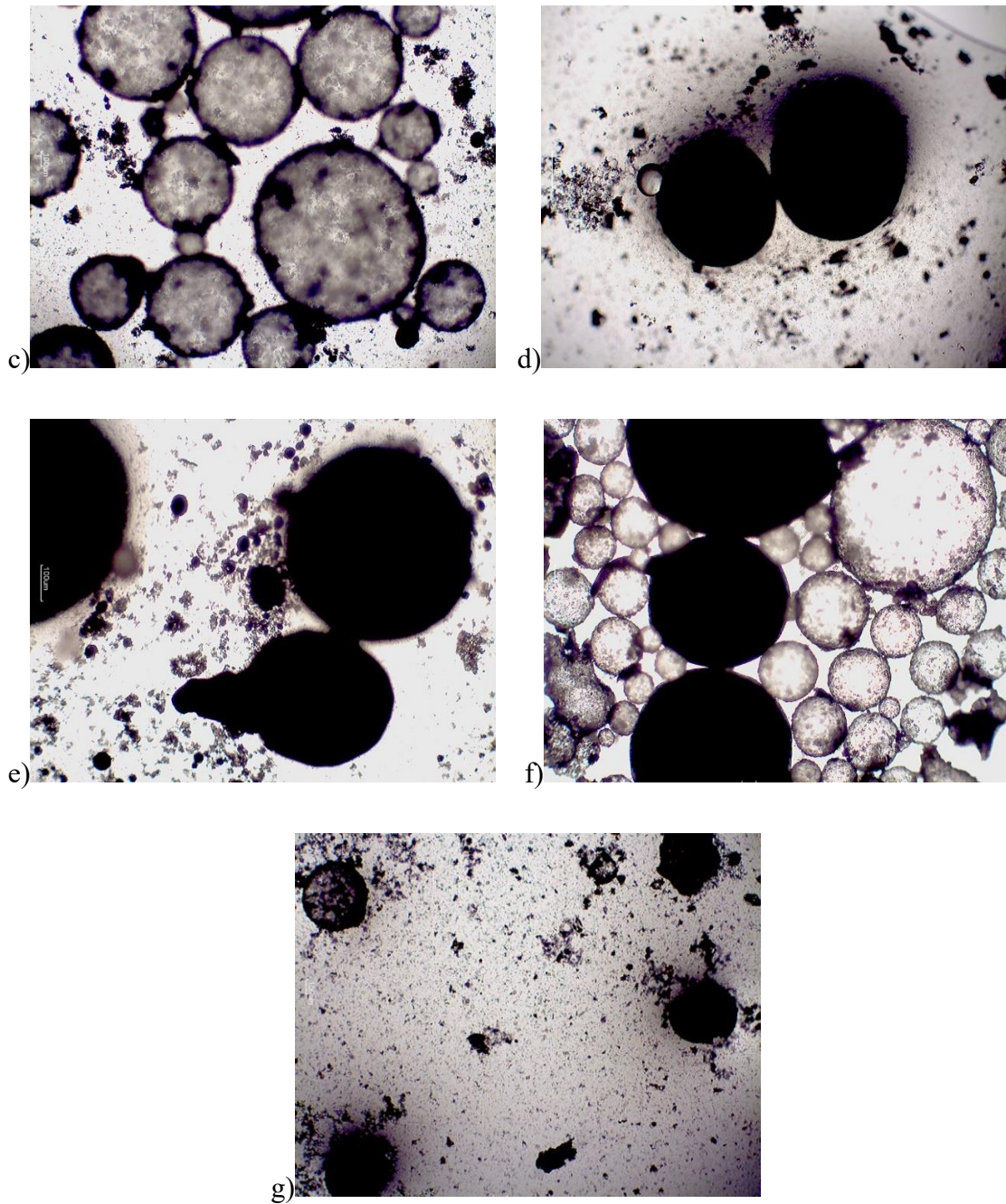
*Slika 30.* Kristali dobiveni kombiniranom metodom kristalizacije ceritiniba u sustavu THF – voda – heptan- PVP 1% pri uvećanju 100x.

#### 4.7. ODREĐIVANJE VREMENA ZADRŽAVANJA

Vrijeme trajanja kristalizacije parametar je od velike važnosti za konačni izgled kristalnih sfera. Ukoliko je vrijeme zadržavanja prekratko kristali neće imati dovoljno vremena za potpuno formiranje sfera, odnosno sfere ostaju prazne ili poluprazne. S druge strane, ukoliko je vrijeme zadržavanje predugo može doći do aglomeriranja sfera ili do njihovog raspada kao posljedica omekšavanja. Kako bi se odredilo optimalno vrijeme zadržavanja praćen je oblik nastalih kristala u intervalima od 1, 10, 20, 30, 40, 50 i 60 min pomoću svjetlosnog mikroskopa za sustav THF – voda – heptan – PVP 1 % (w/w) (*slika 31.*).



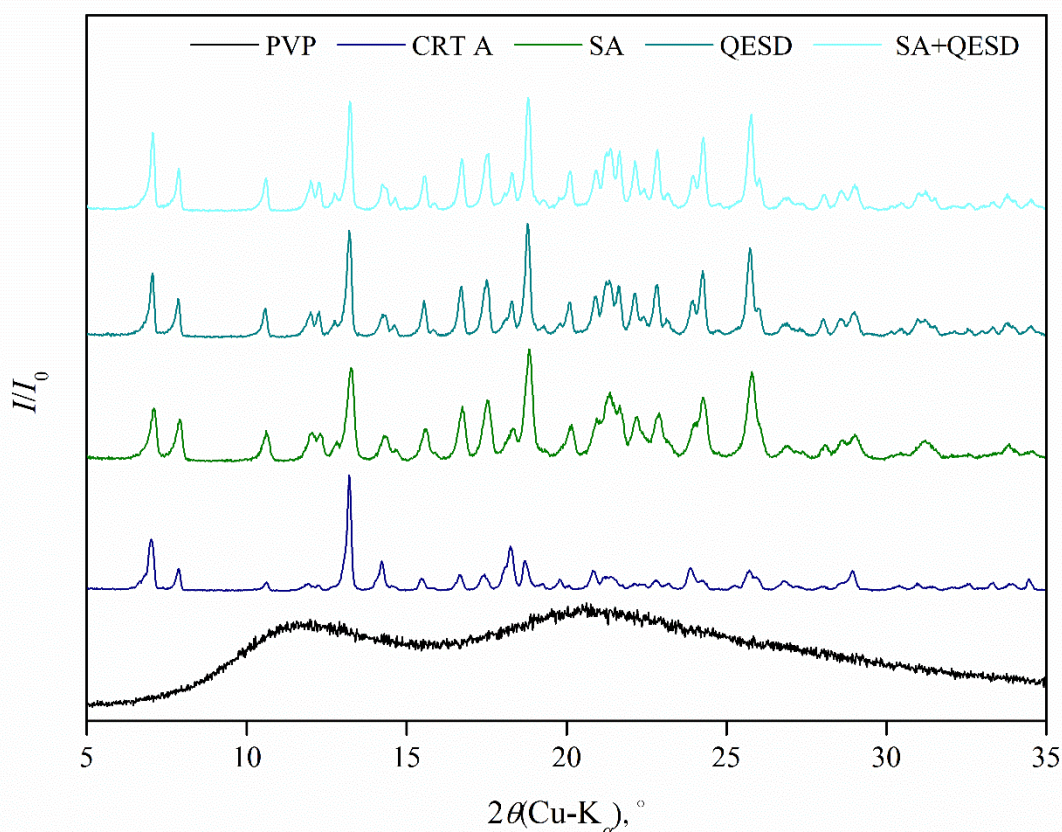




*Slika 31.* Sustav THF – voda – heptan – PVP 1 % (w/w) tijekom provođenja kristalizacije u vremenu od: a) 1min b) 10min c) 20min d) 30min e) 40min f) 50min g) 60min pri uvećanju 100x.

Iz slika je vidljivo da nakon početnog formiranja i rasta sfera (a i b) već nakon 20-30 minuta (c i d) nastaju pravilne sfere koje ostaju formirane do 50. minute, nakon koje počinje raspad sfera.

#### 4.8. ODREĐIVANJE STRUKTURE CERITINIBA



Slika 32. Difraktogrami dobiveni XRD-om.

Nakon provedbe svih eksperimenata uslijedilo je određivanje strukture dobivenih sfera i usporedba s čistom formom A. Na slici 32. spojeni su difraktogrami dobiveni XRD-om za CRT-A i polimer, te za kristale dobivene sferičnom aglomeracijom i kvazi-emulzijskom difuzijom otapala. Iz difraktograma je vidljivo kako dodatak polimera i kapljevine za premošćivanje ne utječe na kristalnu strukturu ceritiniba budući da za ceritinib karakteristični pikovi imaju jednaku vrijednost za čistu formu i za kristale dobivene sferičnom kristalizacijom.

## 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovoga rada pokušalo se pronaći optimalan sustav otapala kao i prikladnu metodu za provedbu sferične kristalizacije ceritiniba.

U preliminarnom istraživanju korišteni su THF i aceton kao otapala, voda kao antiotapalo, heptan, heksan i toluen kao kapljevinama za premošćivanje te vodene otopine PVP-a, PEG-a, PVA-a i HPMC-a kao aditivi za provedbu QESD metode. Odabrani volumni omjer otapala, antiotapala i kapljevine za premošćivanje je 1:7:1.

Pri provedbi sferične aglomeracije, THF se pokazao kao dobro otapalo, dok s druge strane aceton nije rezultirao zadovoljavajućim rezultatima. S druge strane, heptan i heksan su se pokazali kao bolje kapljevine za premošćivanje od toluena. Relativno uspješni sustavi za sferičnu aglomeraciju ceritiniba pokazali su se THF – voda – heptan i THF – voda – heksan.

Pri provedbi kvazi-emulzijske difuzije otapala vodene otopine PEG-a i HPMC-a pokazale su se neuspješnim za dobivanje sferičnih kristala, dok su sustavi s otopinama PVA davali sfere, ali prazne i lomljive. Najbolji sustavi su se pokazali oni sa vodenim otopinama PVP-a. Sfere dobivene QESD-om su veće u odnosu na one dobivene sferičnom aglomeracijom.

Kombinacijom komponenti koje su se do sada pokazale kao najbolje za sferičnu aglomeraciju i kvazi-emulzijsku difuziju otapala pokušalo se dobiti optimalan sustav za dobivanje sferičnih kristala. Stoga je odabrani sustav: THF – voda – heptan – PVP 1% koji je rezultirao sferama najpravilnijeg oblika.

XRD analizom utvrđeno je da kapljevine za premošćivanje i aditivi, odnosno različite metode provedbe kristalizacije nemaju utjecaj na kristalnu strukturu ceritiniba.

## 6. POPIS SIMBOLA

$d$  – promjer miješala, cm

$D$  – promjer baze kristalizatora, cm

$\Delta G$  – promjena Gibbsove energije, J mol<sup>-1</sup>

$I/I_0$  – normalizirani intenzitet, /

$j$  – debljina razbijala, cm

$n$  – broj okretaja u minuti, min<sup>-1</sup>

$r$  – veličina nukleusa, m

$s$  – udaljenost miješala od dna posude, cm

$T$  – temperatura, °C

$t$  – vrijeme, s

$w$  – maseni udio, %

$x$  – množinski udio, %

$2\theta$  – kut difrakcije, °

## 7. LITERATURA

1. A. Sander, Toplinsko procesno inženjerstvo, Merlin, lekcija-Kristalizacija.
2. S. Tiwari, P. Verma, International Journal of Pharmacy and Life Sciences 2, (2011) 1065-1068.
3. URL: <https://www.acs.org/content/dam/acsorg/greenchemistry/industriainnovation/roundtable/solve> (pristup 06.05.2023.)
4. M. Hrkovac, Utjecaj pomoćne komponente na termodinamiku i kinetiku kristalizacije glicina (2012), doktorska disertacija.
5. A. S. Myerson, D. Erdemir, A.Y. Lee, Handbook of Industrial Crystallization, Cambridge University Press, (2019) 32-76.
6. URL: <https://www.soliqz.com/crystallization/types-of-crystallization/> (pristup 08.05.2023.)
7. M. Giuliatti, A. Bernardo, Crystallization by Antisolvent Addition and Cooling, (2012) 380-396.
8. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/48375> (pristup 12.05.2023.)
9. Y. Kawashima, T. Niwa, T. Handa, H. Takeuchi, T. Iwamoto and K. Itoh, Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method, J. Pharm. Sci. 78, (1989) 68–72.
10. B. Kovačić, Spherical crystallization of drugs, Acta Pharm. 62 (2012) 1–14.
11. URL: <https://www.intechopen.com/chapters/82059> (pristup 06.11.2023.)
12. J. Lovrić, A. Hafner, M. Radiković, M. Juretić, M. Duerrigl, G. Perina Lakoš, i I. Pepić, Nanokristali djelatne tvari: fizičko-kemijska, farmaceutsko-tehnološka, biofarmaceutska i terapijska svojstva, Farmaceutski glasnik, 71. (2015) 355-384.
13. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ceritinib> (pristup: 09.11.2023.)
14. URL: <https://www.caymanchem.com/product/19374/ceritinib> (pristup: 07.12.2023.)
15. I. Grebenar, M. Ratkaj, T. Mundorfer, I. Nežić, WO (2016) 081538.
16. I. Zokić, J. Prlić Crystallization Behavior of Ceritinib: Characterization and Optimization Strategies, (2023) 7(5):84.
17. J. Hansen, P. Kleinebudde, Towards a better understanding of the role of stabilizers in QESD crystallizations, Pharmaceutical Research, (2022) 3123–3136.
18. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/BA/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/purification/solvent-miscibility-table> (pristup: 11.12.2023.)
19. S. Jitkar, R. Thipparaboina, R. B. Chavan, N. R. Shastri, Spherical Agglomeration of Platy Crystals: Curious Case of Etodolac, Crystal Growth Design, (2016).