

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Lana Crnac, Mirta Sabol, Juraj Vuić

Sferična kristalizacija ceritiniba: optimizacija i uvećanje procesa

Zagreb, 2024.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvom pod vodstvom prof. dr. sc. Jasne Prlić Kardum i neposrednim voditeljstvom Ive Zokić, mag. ing. oecoing., i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.

*Ovaj rad izrađen je unutar projekta CrystAPC - Napredno vođenje procesa kristalizacije,
KK.01.1.1.07.0017, sufinanciranog od strane Europske unije, sredstvima Europskog fonda za
regionalni razvoj.*

POPIS KRATICA

API – engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, djelatna tvar

BCS – engl. *Biopharmaceutical Classification System*, Biofarmaceutski sustav klasifikacije lijekova

CRT – ceritinib

HPMC – hipromeloza

NSCLC – engl. *Non – Small Cell Lung Cancer*, uznapredovali rak pluća nemalih stanica

PEG – poli(etilen–glikol)

PROP – spiralno propelersko miješalo

PVA – poli(vinil–acetat)

PVP – poli(vinil–pirolidon)

RT6–45 – miješalo sa 6 lopatica nagnutih pod kutom od 45°

RT6–90 – miješalo sa 6 lopatica nagnutih pod kutom od 90°

THF – tetrahidrofuran

XRD – rendgenska difrakcijska analiza

POPIS SIMBOLA

C_0 – konstanta za vrstu i položaj miješala

d_m , mm – promjer miješala

Q_3 , % – masena raspodjela veličina čestica

D , mm – promjer reaktora

h , mm – visina reaktora

j , mm – udaljenost miješala od unutrašnje stjenke reaktora

n , min^{-1} – brzina miješanja

N_{min} , min^{-1} – kritična brzina miješanja

s , mm – udaljenost miješala od dna reaktora

S – širina raspodjele čestica

t , min – vrijeme

X , g/100 g_{otapala} – maseni odnos

x_{10} , μm – kvantil koji pokazuje da je 10 % čestica u uzorku manjih od te veličine čestica

x_{50} , μm – medijan; kvantil koji pokazuje da je 50 % čestica u uzorku manjih od te veličine čestica

x_{90} , μm – kvantil koji pokazuje da je 90 % čestica u uzorku manjih od te veličine čestica

x_{sr} , μm – srednji promjer čestica

GRČKA SLOVA

α_0 – konstanta za vrstu i položaj miješala

ρ_c , kg m^{-3} – gustoća kontinuirane faze

ρ_d , kg m^{-3} – gustoća disperzne faze

θ , $^\circ$ – kut difrakcije

λ , \AA – valna duljina

μ_c , $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ – dinamička viskoznost kontinuirane faze

μ_d , $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ – dinamička viskoznost disperzne faze

σ , N m^{-1} – međupovršinska napetost

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	2
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	3
2.1. Motivacija	3
2.2. Ciljevi rada	3
2.3. Sferična kristalizacija	3
2.3.1. Sferična aglomeracija	4
2.3.2. Kvazi–emulzijska difuzija otapala	4
2.4. Uvećanje procesa sferične kristalizacije	5
3. MATERIJALI I METODE	6
3.1. Kemikalije	6
3.2. Ceritinib	6
3.3. Priprema A forme	7
3.4. Određivanje topljivosti	7
3.5. Optimizacija procesa	7
3.5.1. Određivanje količine antiotapala	7
3.5.3.1. Sferična aglomeracija	8
3.5.3.2. Kvazi–emulzijska difuzija otapala	9
3.5.3.3. Kombinirana metoda sferične kristalizacije	10
3.5.4. Odabir vremena zadržavanja	11
3.5.5. Odabir miješala i brzine miješanja	11
3.6. Određivanje kritične brzine miješanja	12
3.7. Uvećanje procesa sferične kristalizacije	12
3.8. Karakterizacija sferičnih kristala	13
3.8.1. Vanjski oblik i veličina kristala	13
3.8.2. Raspodjela veličina čestica	14
3.8.3. Utvrđivanje unutarnje strukture ceritiniba	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Topljivost i odabir sustava	15
4.2. Odabir područja rada u ternarnom dijagramu	16
4.3. Odabir metode sferične kristalizacije	17
4.4. Odabir optimalnog vremena zadržavanja	19
4.5. Odabir hidrodinamičkih uvjeta	20
4.6. Uvećanje procesa sferične kristalizacije	25
5. ZAKLJUČCI	28
6. ZAHVALE	29
7. POPIS LITERATURE	30

SAŽETAK	32
SUMMARY	33

1. UVOD

U današnje vrijeme, lijekovi se najčešće primjenjuju oralnim putem. Među oralnim oblicima primjene lijeka, tablete se ističu kao najbolji odabir zbog duge tradicije i niske cijene proizvodnje te preciznosti prilikom doziranja.¹ Upravo zbog toga, tablete čine 70 % ukupnih proizvedenih farmaceutskih proizvoda.²

Oko 40 % lijekova koji su odobreni na tržištu i gotovo 90 % molekula u procesu razvoja su slabo topljivi u vodi, što predstavlja problem pri apsorpciji lijeka nakon oralne primjene.^{3,4} S pojavom raznih tehnologija za isporuku netopivih lijekova, izazov formuliranja slabo topivih lijekova moguće je riješiti. Zbog jednostavnijeg sistematiziranja djelatnih tvari (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) prema njihovoj topljivosti u vodi i propusnosti u ljudskom organizmu, biofarmaceutski sustav klasifikacije (engl. *Biopharmaceutical Classification System*, BCS) razvrstava djelatne tvari u četiri razreda.⁵

Istraživanja su pokazala kako se na nisku topljivost lijekova može utjecati optimizacijom procesa kristalizacije, jednog od najčešće primjenjivanih procesa u farmaceutskoj industriji. Osim poboljšanja topljivosti lijekova, kristalizacijom je moguće postići željenu tečivost i kompresibilnost, svojstva koja su rezultat određenog oblika, veličine i raspodjele veličina čestica djelatne tvari. Među raznim metodama kristalizacije ističe se sferična kristalizacija, metoda pri kojoj se koraci kristalizacije i aglomeracije provode istovremeno, što rezultira nastankom sferičnih kristala. Time se skraćuje postupak i smanjuju troškovi proizvodnje lijekova zbog lakšeg rukovanja s djelatnom tvari.⁶

Zbog visoke cijene koju na tržištu postiže djelatna tvar te složenog procesa s velikim brojem parametara koje je potrebno optimizirati, proces kristalizacije se najčešće provodi u malom mjerilu. Nakon podešavanja procesnih uvjeta proces sferične kristalizacije potrebno je provesti u kristalizatoru većeg volumena. Prilikom uvećanja procesa, postizanje geometrijske, dinamičke i/ili kinematičke sličnosti, predstavlja veliki izazov. Ne postoji jedinstveni kriterij uvećanja procesa. Uvećanje je moguće provesti zadovoljavanjem različitih kriterija prilikom čega je važno uzeti u obzir utjecaj na ostale parametre i bezdimenzijske značajke.⁷

Djelatna tvar korištena u ovom radu, ceritinib, odabrana je zbog svojih karakteristika niske topljivosti i propusnosti, što ju svrstava u razred IV BCS-a. Ceritinib se upotrebljava u obliku tablete ili kapsule za liječenje uznapredovalog raka pluća nemalih stanica (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*, NSCLC).⁸⁻¹⁰

U ovome radu optimizirani su parametri procesa sferične kristalizacije ceritiniba te je za eksperimente s najboljim rezultatima proveden postupak uvećanja procesa.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

2.1. Motivacija

Kristali ceritiniba imaju nepovoljna granulometrijska svojstva koja izazivaju probleme prilikom procesa filtracije i sušenja nakon kristalizacije. Procesom sferične kristalizacije ceritiniba pokušala su se poboljšati granulometrijska svojstva ceritiniba. Radi smanjenja broja procesnih koraka, a samim time i proizvodnih troškova, postoji potreba za utvrđivanjem optimalnih parametara za provođenje sferične kristalizacije.

2.2. Ciljevi rada

Cilj rada je razumjeti i optimizirati parametre sferične kristalizacije koji kontroliraju proces i utječu na svojstva sferičnih kristala ceritiniba. Kako bi se postigao željeni rezultat, potrebno je provesti optimizaciju parametara navedenih u tablici 1. Nakon uspješne optimizacije procesa u malom mjerilu, provedeno je uvećanje procesa te su uspoređeni dobiveni rezultati.

Tablica 1. Optimizacijski parametri procesa sferične kristalizacije.

Optimizacijski parametri			
Metoda sferične kristalizacije			
Sferična aglomeracija	Kvazi–emulzijska difuzija otapala	Kombinirana metoda	
Sustav otapala			
Otapalo	Antiotapalo	Kapljevina za premoštenje	Dodatak
Vrijeme zadržavanja			
Vrsta miješala			
RT6–45	PROP	RT6–90	
Brzina miješanja			

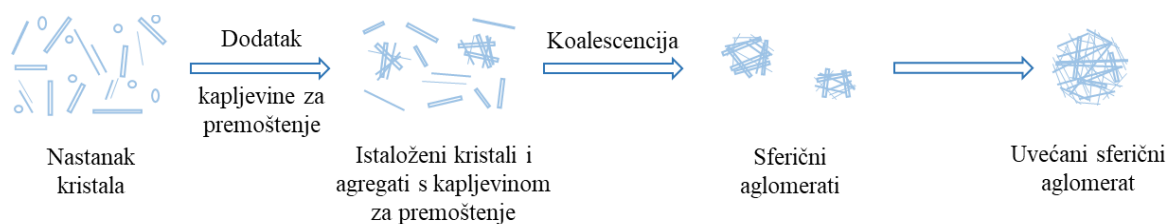
2.3. Sferična kristalizacija

Sferična kristalizacija često je primjenjivana metoda u farmaceutskoj industriji koja rezultira izravnim nastankom kristala sferičnog oblika, čime se ostvaruje jednostavnija kontrola nad kvalitetom konačnog proizvoda. Ova metoda smatra se vrlo učinkovitom prilikom dobivanja sferičnih kristala željenih

svojstava. Pospješuju se sljedeća svojstva: tecivost, kompresibilnost, mehanička čvrstoća, elastičnost i sposobnost močenja. Upotrebom ove metode ostvaruje se bolja topljivost lijekova te mogućnost nastanka različitih polimorfnih oblika djelatne tvari, što rezultira boljom bioraspodivošću lijeka.² Kako ovom metodom nastaju kristali željenih svojstava, olakšavaju se postupci naknadne obrade poput filtriranja, sušenja i tabletiranja te se skraćuje vrijeme proizvodnje lijeka.⁶ Međutim, navedena metoda uz brojne prednosti ima i određene nedostatke. Sferična kristalizacija, s ciljem odabira pogodnog sustava otapala i procesnih uvjeta, zahtijeva provođenje dugotrajnih preliminarnih istraživanja.¹¹ Sferična kristalizacija može se provoditi primjenom metoda sferične aglomeracije, kvazi–emulzijske difuzije otapala, difuzije amonijaka, metode neutralizacije i metode kristalne koaglomeracije. Sferična aglomeracija i kvazi–emulzijska difuzija otapala najčešće su primjenjivane metode.

2.3.1. Sferična aglomeracija

Sferična aglomeracija provodi se korištenjem triju otapala: dobrog otapala u kojemu je djelatna tvar dobro topljiva, antiotapala u kojemu je djelatna tvar loše topljiva te kapljevine za premoštenje koja omogućava stvaranje aglomerata. Djelatna tvar se otapa u dobrom otapalu do zasićenja, te se dodaje u reaktor u kojemu je prethodno dispergirana kapljevine za premoštenje u antiotapalu. Odabir sustava otapala je ključan korak prilikom čega je potrebno zadovoljiti nekoliko uvjeta. Otapalo i antiotapalo moraju biti mješljivi, a kapljevine za premoštenje mora biti nemješljiva s antiotapalom te je kapljevinu za premoštenje potrebno dodati u optimalnoj količini kako bi vlažila nastale kristale.² Time se manji kristali, kao rezultat međufazne napetosti između kristala i kapljevine za premoštenje, vežu u veće, sferične kristale. Proces sferične aglomeracije prikazan je na slici 1.

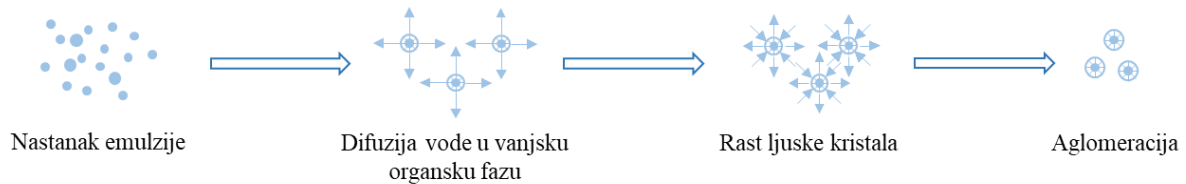


Slika 1. Sferična aglomeracija.

2.3.2. Kvazi–emulzijska difuzija otapala

Kvazi–emulzijska difuzija otapala je metoda kojom se izbjegava korištenje kapljevine za premoštenje. Naime, kristalizacija se provodi uz prisutnost dodatka, najčešće polimera, koji stabilizira emulziju te smanjuje međupovršinsku napetost i poboljšava proces difuzije.² Polimer se otapa u antiotapalu, a djelatna tvar u dobrom otapalu te se postepeno dokapava u antiotapalo. Važno je osigurati da je afinitet između djelatne tvari i dobrog otapala veći nego onaj između djelatne tvari i antiotapala. Zbog

međufazne napetosti između dobrog otapala i antiotapala, otapalo postepeno difundira u antiotapalo kao što je prikazano na slici 2. Ovom metodom sferični kristali ne nastaju povezivanjem pojedinačnih kristala u aglomerate, već se formiraju izvana prema unutrašnjosti bez zadržavanja kapljevine na površini kristala.



Slika 2. Kvazi–emulzijska difuzija otapala.

2.4. Uvećanje procesa sferične kristalizacije

Uvećanje procesa postupak je prelaska eksperimenta s laboratorijskog na industrijsko mjerilo, pri čemu je cilj dobiti proizvod jednake kvalitete i svojstava. Geometrija sustava uvelike utječe na parametre i bezdimenzijske značajke procesa, što postupak uvećanja čini zahtjevnim.¹² Proces uvećanja sferične kristalizacije složen je postupak jer se u sustavu istovremeno odvijaju procesi prijenosa količine gibanja, topline i tvari, a stanje sustava u kristalizatoru se mijenja od homogene otopine, disperzije do suspenzije u kojoj se granulometrijska svojstva čvrste tvari mijenjaju tijekom vremena. Stoga je potrebno voditi računa o utjecaju hidrodinamičkih uvjeta u sustavu prilikom procesa uvećanja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

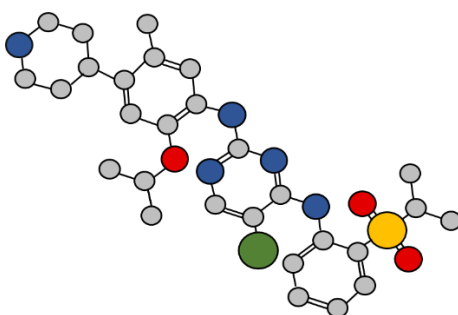
Popis korištenih kemikalija prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija.

Kemikalija	Čistoća	Proizvođač	CAS broj
Aceton (C_3H_5OH)	99,98 %	Lach – Ner	67–64–1
Cikloheksan (C_6H_{12})	p.a.	Lach – Ner	110–82–7
Heksan (C_6H_{14})	99,00 %	Carlo Erba	110–54–3
Heptan (C_7H_{16})	p.a.	Lach – Ner	142–82–5
Hipromeloza (HPMC, $C_{56}H_{108}O_{30}$)	$\geq 99,00$ %	Dupont	9004–65–3
Natrijev hidroksid (NaOH)	p.a.	Lach – Ner	1310–73–2
Oleinska kiselina ($C_{18}H_{34}O_2$)	70,00+ %	Lach – Ner	67701–08–0
Poli(etilen – glikol) (PEG, $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$)	$\geq 97,00$ %	Arcos organics	25322–68–3
Poli(vinil – acetat) (PVA, $(C_4H_6O_2)_n$)	78,00 %	Arcos organics	9003–20–7
Poli(vinil – pirolidon) (PVP, $(C_6H_9NO)_n$)	99,00+ %	Arcos organics	9003–39–8
Tetrahidrofuran (THF, $(CH_2)_4O$)	p.a.	Lach – Ner	109–99–9
Toluen ($C_6H_5CH_3$)	99,50 %	Macron	108–88–3

3.2. Ceritinib

Kemijski naziv ceritiniba je 5–kloro–2–N–(2–izopropoksi–5–metil–4–(piperidin–4–il)fenil)pirimidin–2,4–diamin. Strukturna formula prikazana je na slici 3.



Slika 3. Strukturna formula ceritiniba.

3.3. Priprema A forme

Ceritinib u obliku A forme pripremljen je iz ceritinib dihidroklorida prema literaturi.¹³ Ceritinib dihidroklorid (185,67 g) dodan je u sustav aceton–voda 3:1 (640 ml). Kristalizator je ugrijan na temperaturu za 5 °C višu od temperature zasićenosti (45 °C) kako bi se osiguralo da su sve čestice otopljene i time spriječila spontana nukleacija. Ceritinib dihidroklorid otapan je 45 minuta uz brzinu miješanja 300 min⁻¹. Nakon otapanja soli, otopina je filtrirana te vraćena u kristalizator. Podešena je pH vrijednost otopine korištenjem 10 %-tne otopine natrijeva hidroksida (NaOH). pH vrijednost praćena je pomoću pH-elektrode *Sentix 91* (WTW, London, Engleska) spojene na uređaj *InoLab pH/Cond 740* (WTW, London, Engleska). Otopina NaOH postupno je dodavana do vidljive promjene boje iz žute u bijelu (pH ≈ 11). Podešavanje pH vrijednosti rezultira nastankom kristala ceritiniba te natrijevog klorida otopljenog u vodi. Proces kristalizacije proveden je uz konstantnu brzinu hlađenja od 15 °C/h. Dobiveni kristali su filtrirani i osušeni.

3.4. Određivanje topljivosti

Radi odabira sustava za provedbu sferične kristalizacije ispitane su topljivosti djelatne tvari pri 35 °C metodom postizanja konstantne turbidimetrije u sljedećim otapalima: tetrahidrofuranu (THF–u), toluenu, heksanu, heptanu, acetonu, metanolu, etanolu, 2–propanolu i vodi. Ceritinib A forme dodavan je u suvišku sve do postizanja konstante turbidimetrije, koja je praćena pomoću sonde u *CrystalSCAN–u* (*E2153*, h.e.l Ltd., Borehamwood, UK). Otopina je zatim filtrirana. Koncentracija otopine određena je gravimetrijskom metodom pomoću analizatora vlage (*MLS 50–3C*, Kern&Sohn, Balingen, Njemačka) pri temperaturi od 100 °C.

3.5. Optimizacija procesa

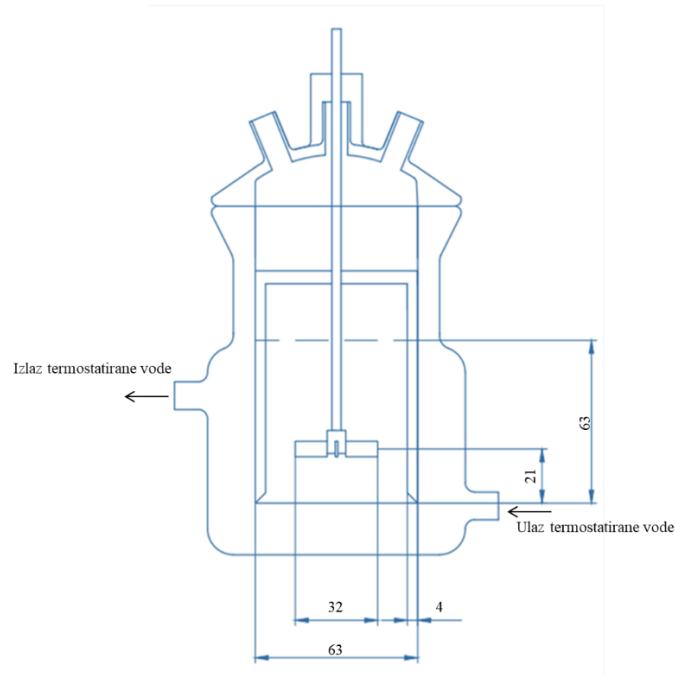
Optimizacija procesa sferične kristalizacije provedena je odabirom sustava otapala, metode sferične kristalizacije, vremena zadržavanja te hidrodinamičkih uvjeta.

3.5.1. Određivanje količine antiotapala

Količina antiotapala potrebna za potpuno izdvajanje ceritiniba iz otopine određena je u otopini zasićenoj na 35 °C. Kristalizacija je provedena u uređaju *CrystalSCAN* dokapavanjem antiotapala. Promjena koncentracije otopine ceritiniba praćena je gravimetrijskom metodom pomoću analizatora vlage do potpune kristalizacije ceritiniba.

3.5.2. Odabir metode sferične kristalizacije

Sferična kristalizacija ceritiniba provedena je korištenjem metoda sferične aglomeracije, kvazi-emulzijske difuzije otapala te kombinirane metode sferične kristalizacije. Kristalizacija je provedena u reaktoru s duplom stjenkom sljedećih dimenzija: $D=h=63$ mm, $d_m=32$ mm, $s=21$ mm, $j=4$ mm. Shema reaktora dana je na slici 4.

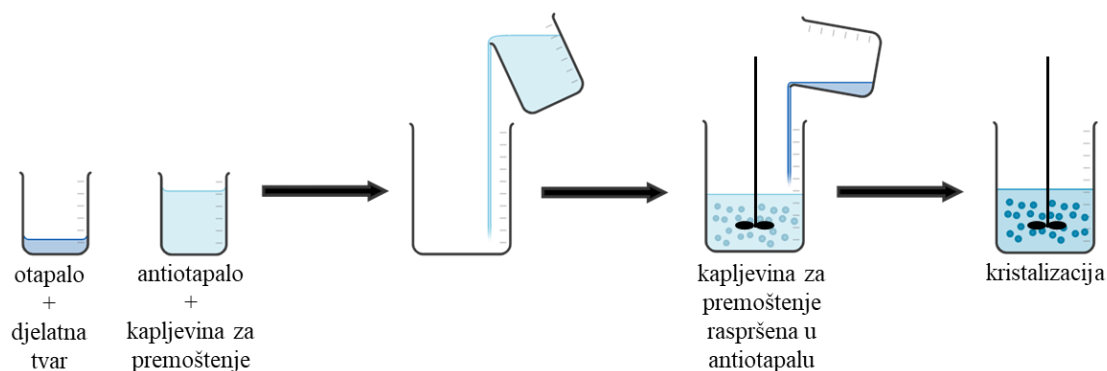


Slika 4. Shema reaktora.

Tijekom procesa kristalizacije, otopine su miješane miješalom s mehaničkom miješalicom (*HEITORQUE Ultimate 100*, Heidolph, Schwbach, Njemačka). Nakon svakog provedenog eksperimenta kristalizacije, sustav se filtrira pomoću filter papira u Büchnerovom lijevku spojenog na vakuum preko boce sisaljke. Kristali se zatim zajedno sa filter papirom suše u sušioniku (*TCN 115 PLUS*, Argo Lab, Sunnyvale, SAD) pri 50 °C.

3.5.3.1. Sferična aglomeracija

Sferična aglomeracija provodi se u sustavu koji sadrži otapalo, antiotapalo i kapljevina za premoštenje. Sustav otapala odabran je na temelju rezultata ispitivanja topljivosti ceritiniba u obliku A forme, vodeći računa o međusobnoj mješljivosti otapala. Područje koncentracije pojedinog otapala određeno je pomoću programskog paketa *Dynochem* te literaturnih podataka.¹⁴ Sferična aglomeracija provedena je na način da se u reaktor najprije dodaje antiotapalo u kojemu je određenom brzinom miješanja dispergirana kapljevina za premoštenje do postizanja stanja potpune disperzije. Nakon što je sustav termostatisan na 20 °C, u reaktor se špricom postupno dokapava zasićena otopina ceritiniba zagrijana na 35 °C. Postupak je prikazan na slici 5.



Slika 5. Postupak metode sferične aglomeracije.

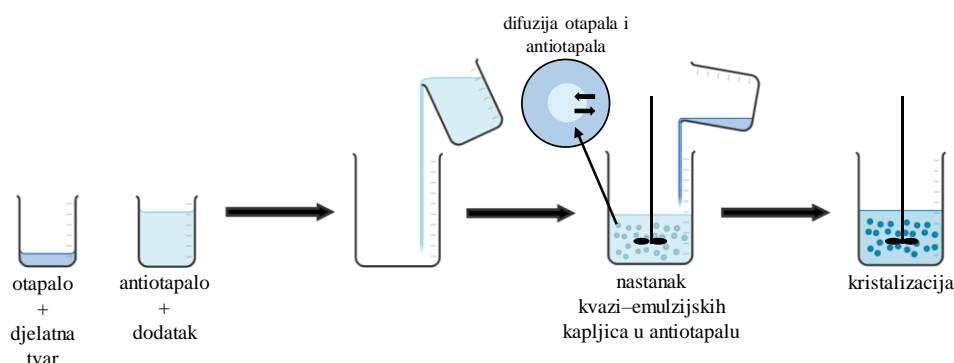
U tablici 3 navedeni su sustavi otapala za koje je provedena metoda sferične aglomeracije.

Tablica 3. Ispitani sustavi otapala za metodu sferične aglomeracije.

Otapalo	Antiotapalo	Kapljevina za premoštenje
Aceton	Voda	Heksan
Aceton	Voda	Heptan
Aceton	Voda	Toluen
THF	Voda	Cikloheksan
THF	Voda	Heksan
THF	Voda	Heptan
THF	Voda	Oleinska kiselina
THF	Voda	Toluen

3.5.3.2. Kvazi–emulzijska difuzija otapala

Metoda kvazi–emulzijske difuzije otapala provodi se tako da se u reaktor najprije dodaje antiotapalo u kojemu je prethodno otopljen dodatak, a zatim se uz miješanje dodaje zasićena otopina ceritiniba zagrijana na 35 °C. Postupak je prikazan na slici 6.



Slika 6. Postupak metode kvazi–emulzijske difuzije otapala.

Prema literaturi¹⁵ odabrani dodaci za provođenje kristalizacije su sljedeći: hipromeloza (HPMC), poli(etilen–glikol) (PEG), poli(vinil–acetat) (PVA) i poli(vinil–pirolidon) (PVP).

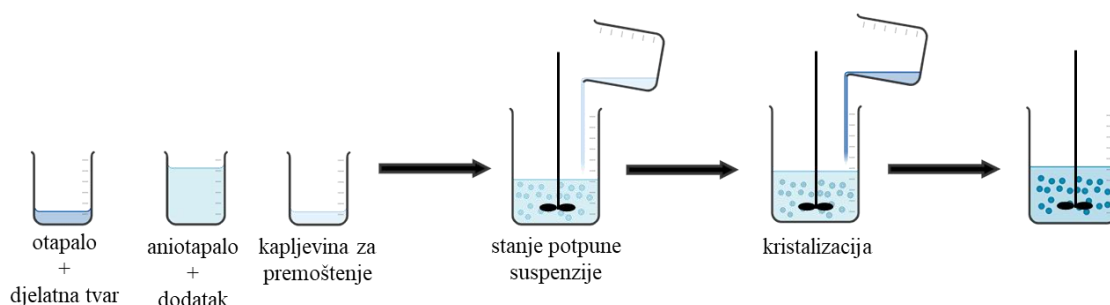
U tablici 4 prikazani su sustavi otapala za koje je provedena metoda kvazi–emulzijske difuzije otapala.

Tablica 4. Odabrani sustavi otapala za metodu kvazi–emulzijske difuzije otapala.

Otapalo	Antiotapalo+dodatak
THF	Voda+HPMC (1 % w/w)
THF	Voda+HPMC (3 % w/w)
THF	Voda+PEG (1 % w/w)
THF	Voda+PEG (5 % w/w)
THF	Voda+PVA (1 % w/w)
THF	Voda+PVA (5 % w/w)
THF	Voda+PVP (1 % w/w)
THF	Voda+PVP (3 % w/w)
THF	Voda+PVP (5 % w/w)

3.5.3.3. Kombinirana metoda sferične kristalizacije

Kombinacija metoda sferične aglomeracije i kvazi–emulzijske difuzije otapala provedena je za odabrane najuspješnije eksperimente. Eksperimenti su odabrani usporedbom oblika i količine dobivenih sferičnih kristala, što je određeno vizualno. Kristalizacija kombiniranom metodom provedena je na način da je kapljevinu za premoštenje dokapavana u otopinu dodatka u antiotapalu termostataranu na 20 °C, uz konstantno miješanje kako bi se postiglo stanje potpune disperzije kapljica. Kada je postignuto stanje potpune disperzije, u reaktor je postupno dodavana zasićena otopina ceritiniba u otapalu zagrijana na 35 °C. Eksperimenti su provedeni za više sustava. Shema procesa je prikazan na slici 7.



Slika 7. Proces kombinirane metode sferične kristalizacije.

Tablica 5 prikazuje sustave otapala za koje je provedena kombinirana metoda sferične kristalizacije.

Tablica 5. Ispitani sustavi otapala za kombiniranu metodu sferične kristalizacije.

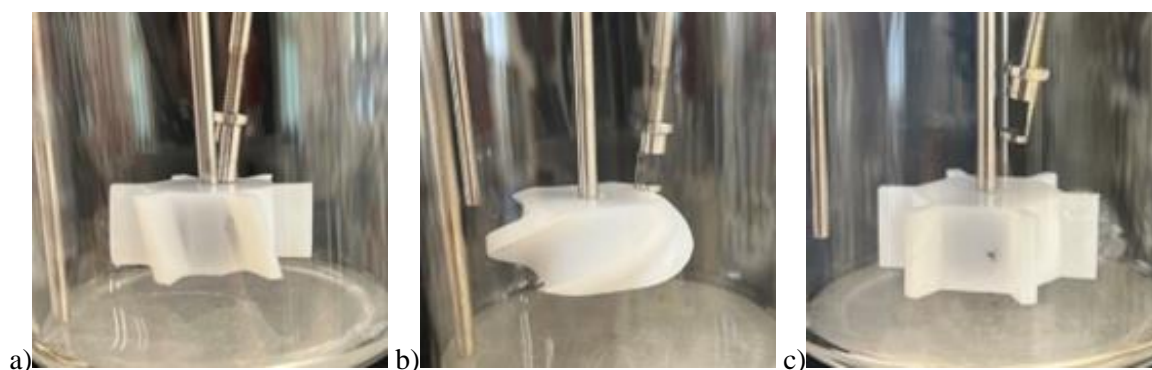
Otapalo	Antiotapalo+dodatak	Kapljevina za premoštenje
THF	Voda+HPMC (1 % w/w)	Heptan
THF	Voda+HPMC (3 % w/w)	Heptan
THF	Voda+PEG (1 % w/w)	Heptan
THF	Voda+PVP (1 % w/w)	Haptan

3.5.4. Odabir vremena zadržavanja

Optimalno vrijeme zadržavanja i rasta kristala u otopini određeno je praćenjem oblika nastalih kristala tijekom procesa kristalizacije pomoću svjetlosnog mikroskopa (*BA 200*, Motic, Wetzlar, Njemačka) svakih 5 minuta, počevši od trenutka kada je sva količina otopine ceritiniba dodana u sustav, do trenutka uočavanja raspadnutih sferičnih kristala.

3.5.5. Odabir miješala i brzine miješanja

Pri odabranim optimalnim uvjetima za provedbu sferične kristalizacije, ispitan je utjecaj hidrodinamike na granulometrijska svojstva kristala. Eksperimenti su provedeni u uređaju *CrystalSCAN*. Ispitan je utjecaj brzine vrtnje tri vrste miješala: miješala sa 6 lopatica nagnutih pod kutom od 45° (RT6–45) (slika 8a) koje osigurava aksijalni tok, spiralnog propelerskog miješala, (PROP) (slika 8b) koje ostvaruje miješani tok te miješala sa 6 ravnih lopatica pod kutom od 90° (RT6–90) (slika 8c) koje ostvaruje radijalni tok.



Slika 8. Prikaz miješala a) RT6–45, b) PROP, c) RT6–90.

3.6. Određivanje kritične brzine miješanja

Minimalna brzina miješanja za odabrani sustav u *CrystalSCAN*-u određena je vizualno. Postupak vizualnog određivanja minimalne brzine miješanja proveden je uz postupno povećavanje brzine miješanja smjese antiotapala i kapljevine za premoštenje do postizanja potpune disperzije kapljevine za premoštenje u antiotapalu. Radi lakšeg praćenja miješanja, kapljevina za premoštenje obojena je jodom. Kritična brzina miješanja prilikom uvećanja procesa kristalizacije određena je vizualno na prethodno opisan način te primjenom sljedećeg izraza¹⁶:

$$N_{\min} = C_0 d_m^{a_0} \left(\frac{\mu_c}{\mu_d} \right)^{1/9} \sigma^{0.3} \Delta\rho^{0.25} \quad (1)$$

Kako bi se empirijskim pristupom odredila kritična brzina miješanja, potrebno je odrediti parametre jednadžbe 1 karakteristične za ispitivani sustav. Parametri su prikazani u tablici 6.

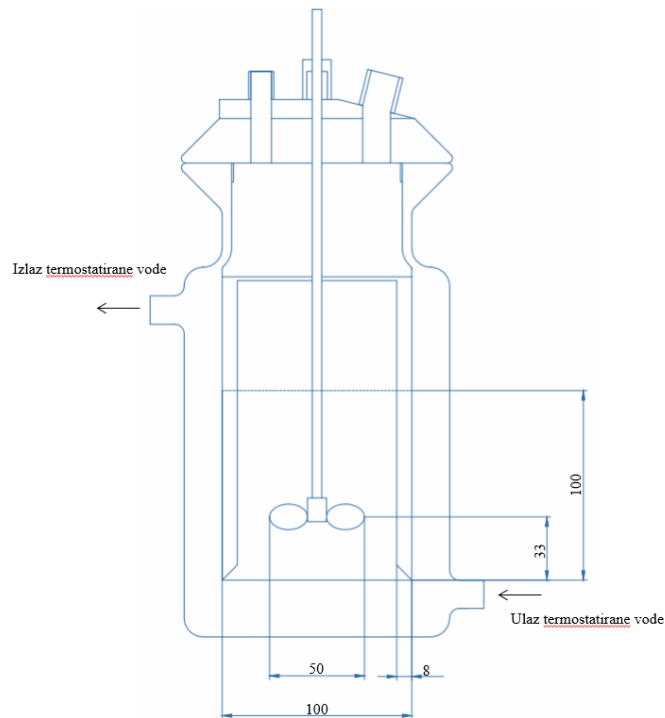
Tablica 6. Parametri potrebni za određivanje kritične brzine miješanja prema *just dispersed* kriteriju.

C_0 , konstanta za vrstu i položaj miješala	0,348148
a_0 , konstanta za vrstu i položaj miješala	-1,38272
d_m —promjer miješala, m	0,05
μ_c , dinamička viskoznost kontinuirane faze, $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$	$1,32 \cdot 10^{-3}$
μ_d , dinamička viskoznost disperzne faze, $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$	$3,89 \cdot 10^{-4}$
σ , međupovršinska napetost, N m^{-1}	0,03
ρ_c , gustoća kontinuirane faze, kg m^{-3}	1000,80
ρ_d , gustoća disperzne faze, kg m^{-3}	684,00

Međupovršinska napetost i gustoća izmjerene su pri 20 °C koristeći *DCAT-8T* tenziometar (*DataPhysics Instruments GmbH*, Filderstadt, Njemačka). Kinematička viskoznost određena je pri 20 °C na kapilarnom viskozimetru Cannon–Fenske (tip 551 03).

3.7. Uvećanje procesa sferične kristalizacije

Uvećanje procesa sferične kristalizacije provedeno je kombiniranom metodom sferične kristalizacije za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan. Uvećanje je provedeno u reaktoru sljedećih dimenzija: $D=h=100$ mm, $d_m=50$ mm, $s=33$ mm, $j=8$ mm. Korišteno je propelersko miješalo s tri lopatice nagnute pod 45°. Shema reaktor prikazana je na slici 9. Eksperimenti uvećanja provedeni su pri kritičnim brzinama miješanja određenim vizualno i primjenom izraza kojim se određuje broj okretaja potreban da se postigne stanje potpune disperzije (jednadžba 1).



Slika 9. Shema reaktora za uvećanje procesa sferične kristalizacije.

3.8. Karakterizacija sferičnih kristala

3.8.1. Vanjski oblik i veličina kristala

Vanjski oblik i veličina suhih sferičnih kristala određeni su pomoću svjetlosnog mikroskopa (*BA 200*, Motic, Wetzlar, Njemačka), a morfologija površine primjenom pretražnog elektronskog mikroskopa (*VEGA3*, TESCAN, Brno, Češka).

Snimanje mikrografija svjetlosnim mikroskopom provodi se tako da se stakalce s uzorkom postavi na stolić pod objektiv mikroskopa. Mikroskopom se upravlja ručno mijenjajući objektivne različite uvećanja (40x, 100x i 400x), a mikrografije se snimaju kamerom pomoću računalnog programa *Motic*.

Prilikom snimanja mikrografija pretražnim elektronskim mikroskopom, korištena je energija elektronskog snopa od 10 keV i radna udaljenost u rasponu od 4 do 10 mm, ovisno o snimanom uzorku. Prije snimanja mikrografija, svi uzorci su napareni sa zlatom pri jakosti struje od 17 mA u trajanju od 120 s koristeći *SC7620* neparivač (Quorum Technologies, Lewes, UK).

3.8.2. Raspodjela veličina čestica

Raspodjela veličina čestica određena je suspendiranjem sferičnih kristala u otopini vode s dodatkom neionskog surfaktanta tritona X-100. Mjerenje je provedeno korištenjem čestičnog analizatora (*SALD 3101*, Shimadzu, Kyoto, Japan), u komori za mokro mjerenje. Ultrazvuk u komori nije korišten kako ne bi došlo do raspada sferičnih kristala. Širina raspodjela veličine čestica izračunata je prema jednadžbi¹⁷:

$$S = \frac{x_{90}}{x_{10}} \quad (2)$$

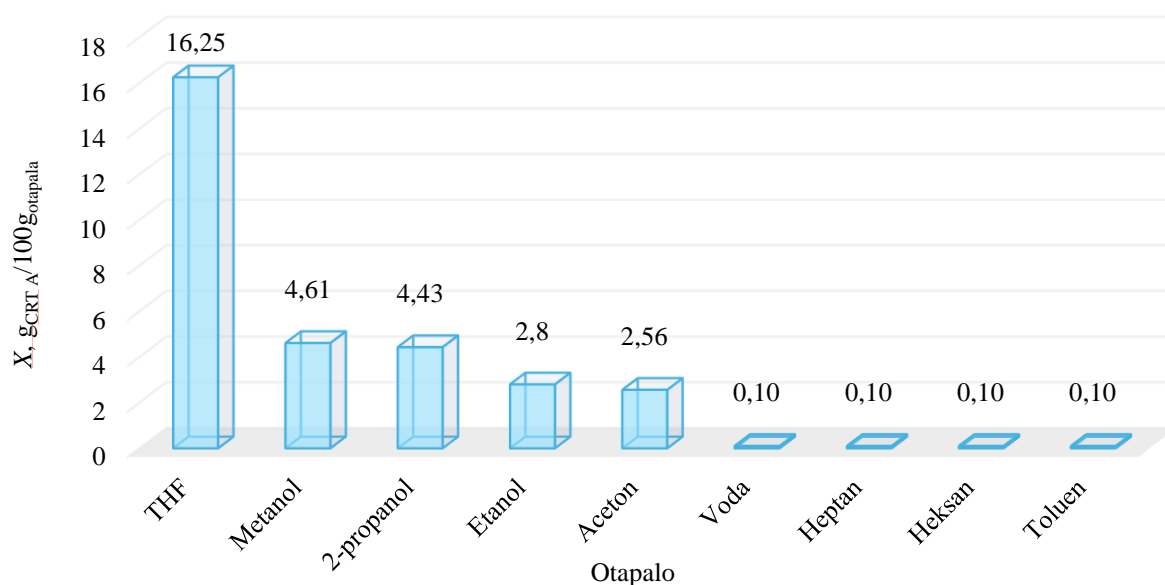
3.8.3. Utvrđivanje unutarnje strukture ceritiniba

Unutarnja struktura kristala ceritiniba određena je prije i nakon procesa sferične kristalizacije metodom rendgenske difrakcije na prahu na uređaju *XRD 6000* (Shimadzu, Kyoto, Japan). Izvor zračenja je Cu-K α valne duljine $\lambda=1,54059$ Å. Primijenjeni su jakost struje od 30 mA te napon od 40 kV, a podaci su prikupljeni u rasponu od $2\theta=5-35^\circ$ s korakom od $0,02^\circ$ i vremenom zadržavanja od 0,6 s po koraku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Topljivost i odabir sustava

Određivanje topljivosti ceritiniba dio je preliminarnog istraživanja i pripreme za provođenje prekrystalizacije djelatne tvari. Topljivost ceritiniba određena je pri 35 °C u sljedećim otapalima: THF–u, toluenu, heksanu, heptanu, acetonu, metanolu, etanolu, 2–propanolu i vodi. Rezultati ispitivanja topljivosti prikazani su na slici 10.

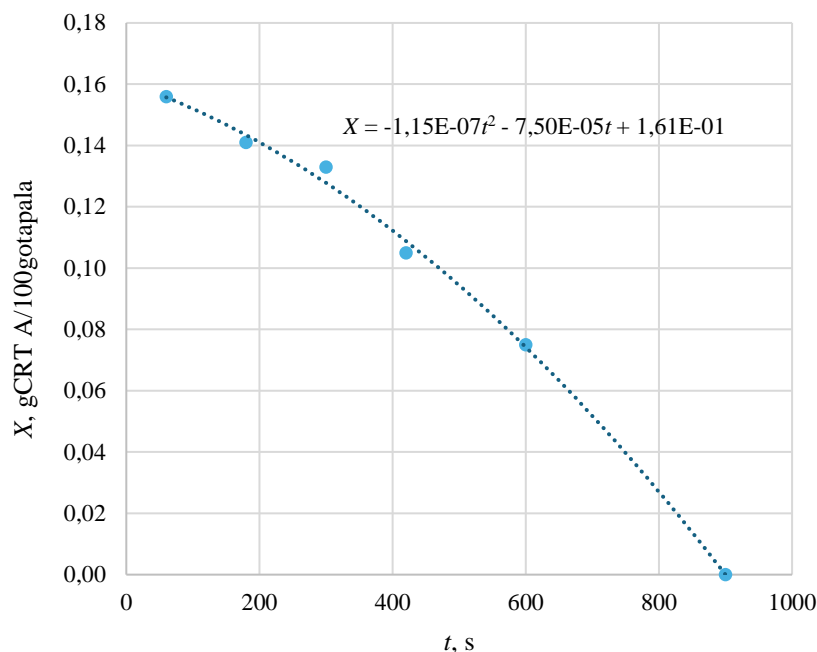


Slika 10. Topljivost ceritiniba u odabranim otapalima.

Na temelju rezultata vidljivo je da se ceritinib najbolje otapa u THF–u. Stoga je THF u većini eksperimenata korišten kao otapalo. Zbog male topljivosti u vodi ona je u svim eksperimentima korištena kao antiotapalo. Prema literaturnim podacima o mješljivosti otapala¹⁸ zaključeno je da su THF i voda međusobno mješljivi, što je dodatni uvjet da se otapalo koristi za izdvajanje iz primarne otopine. Heksan, heptan i toluen nisu mješljivi s THF–om i vodom te su korišteni kao kapljevine za premoštenje. Kako sva navedena otapala zadovoljavaju uvjete za korištenje kapljevine za premoštenje, otapalo je izabrano prema kriterijima vodiča za odabir otapala u farmaceutskoj industriji.¹⁹ Heptan je u usporedbi s heksanom, radi manje toksičnosti, istaknut kao bolji odabir.

Kako bi se odredila količina vode koju je potrebno dodati u zasićenu otopinu THF–a praćena je koncentracija ceritiniba tijekom dodavanja vode u otopinu. Slika 11 prikazuje promjenu koncentracije ceritiniba u THF–u s vremenom. Eksperiment je proveden pri temperaturi od 35 °C uz brzinu dodavanja vode 0,11 ml s⁻¹. Ceritinib je u potpunosti iskristaliziran nakon 900 sekundi te se uz poznatu brzinu

dotatka vode može odrediti da je za potpunu kristalizaciju ceritiniba iz THF–a potrebno dodati vode u minimalnom omjeru s otapalom 2:1.

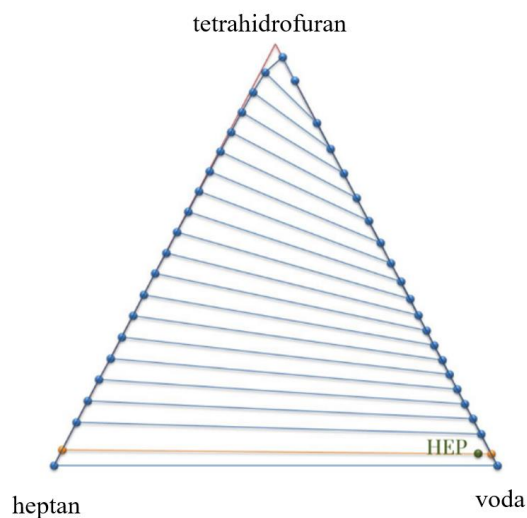


Slika 11. Kinetika kristalizacije ceritiniba otopljenog u THF–u pri brzini dodavanja vode 0,11 ml s⁻¹.

4.2. Odabir područja rada u ternarnom dijagramu

Nakon odabira sustava otapala i minimalne količine otapala za potpunu kristalizaciju ceritiniba, bilo je potrebno odabrati heterogeno područje korištenih otapala za uspješnu provedbu sferične kristalizacije. Iako je minimalni omjer otapala i antiotapala 1:2, udio antiotapala povećan je jer se na taj način osigurava prostor u kojem će se dobro raspršiti kapljevina za premoštenje te doći do okrupnjavanja kristala. Stoga su eksperimenti provedeni pri omjeru otapala i antiotapala 1:7.

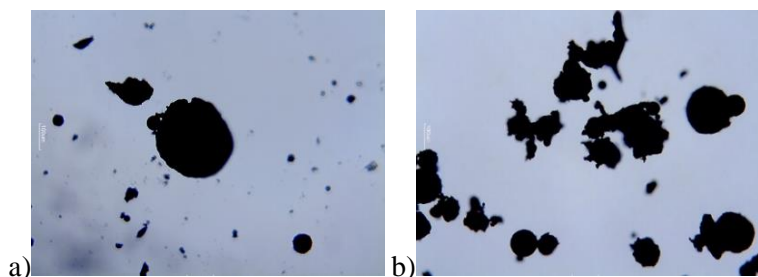
Kapljevina za premoštenje dodaje se u maloj količini, što zajedno s hidrodinamičkim uvjetima utječe na veličinu raspršenih kapljica u antiotapalu, a onda i na veličinu nastalih sfera. Kako bi se odredilo heterogeno područje u kojem je moguće provesti sferičnu kristalizaciju korišten je ternarni fazni dijagrami dobiven korištenjem programskog paketa *Dynochem* za sustav otapala: THF–voda–heptan. Sferična aglomeracija provedena je u heterogenom području, u kojem se kapljevina za premoštenje ne miješa s otapalom i antiotapalom. Kako je heterogeno područje jako široko, potrebno je suziti područje u kojem će doći do sferične kristalizacije.¹⁴ Na slici 12 prikazan je sastav smjese otapala koji je odabran za provedbu sferične kristalizacije. Omjer otapala, antiotapala i kapljevine za premoštenje iznosio je: 1:7:1.



Slika 12. Odabir područja za provedbu kristalizacije u sustavu THF–voda–heptan.

4.3. Odabir metode sferične kristalizacije

Sferična kristalizacija može se provesti na nekoliko različitih načina, a odabir metode značajno utječe na svojstva nastalih sferičnih aglomerata. Slika 13 prikazuje rezultate najuspješnijih eksperimenata provedenih metodom sferične aglomeracije. U oba slučaja dobiveni su kristali pravilnog sferičnog oblika uz prisutnost nepravilnih manjih čestica. Heptan je, budući da je prihvatljivije otapalo u farmaceutskoj industriji, odabran za daljnji rad.



Slika 13. Mikrografije kristala dobivenih metodom sferične aglomeracije pri uvećanju 40x za: a) CRT+THF–voda–heksan, $n=500 \text{ min}^{-1}$, $t=30 \text{ min}$ i b) CRT+THF–voda–heptan, $n=400 \text{ min}^{-1}$, $t=60 \text{ min}$.

Na slici 14 prikazane su mikrografije uspješnih eksperimenata provedenih metodom kvazi–emulzijske difuzije otapala. U sustavima u kojima je kao otapalo korišten THF, a kao antiotapalo voda uz dodatak 1,3 i 5 % w/w PVP-a, povećanje udjela PVP–a rezultira nastankom manjeg broja sferičnih kristala većih dimenzija. Dodatak različitog udjela PVP–a utječe na međupovršinsku napetost i viskoznost smjese, što utječe na veličinu sfera.^{15,20,21} Nastanak sitnijih kuglica poželjan je za daljnju formulaciju te je stoga, za daljnje ispitivanje, odabran pokus s 1 % w/w otopinom PVP–a.



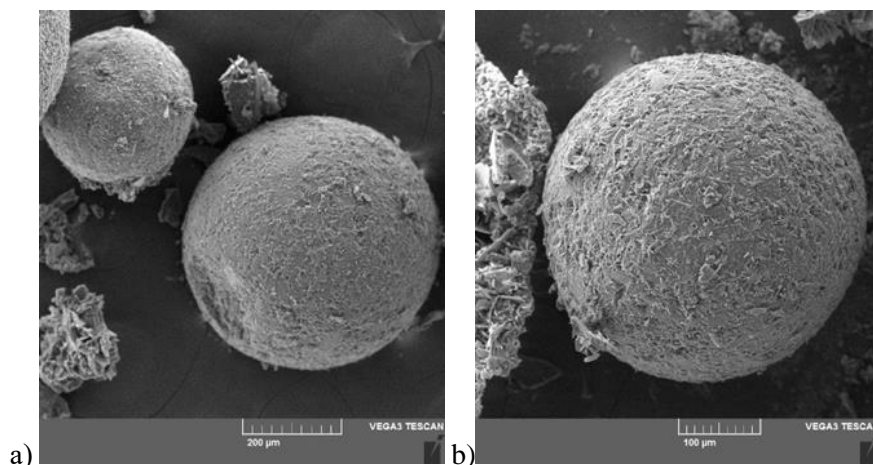
Slika 14. Mikrografije kristala dobivenih metodom kvazi–emulzijske difuzije otapala pri uvećanju 100x, $n=550 \text{ min}^{-1}$ i $t=60 \text{ min}$ za: a) CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w) b) CRT+THF–voda+PVP (3 % w/w) i c) CRT+THF–voda+PVP (5 % w/w).

Nakon provedenih eksperimenata pojedinačnim metodama, provedena je kombinirana metoda sferične aglomeracije i kvazi-emulzijske difuzije otapala za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan. Kristali dobiveni ovom metodom prikazani su na slici 15. Nastali kristali sferičnog su oblika i slične veličine.



Slika 15. Mikrografija kristala dobivenih kombiniranom metodom za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w) –heptan pri uvećanju 40x, $n=550 \text{ min}^{-1}$ i $t=60 \text{ min}$.

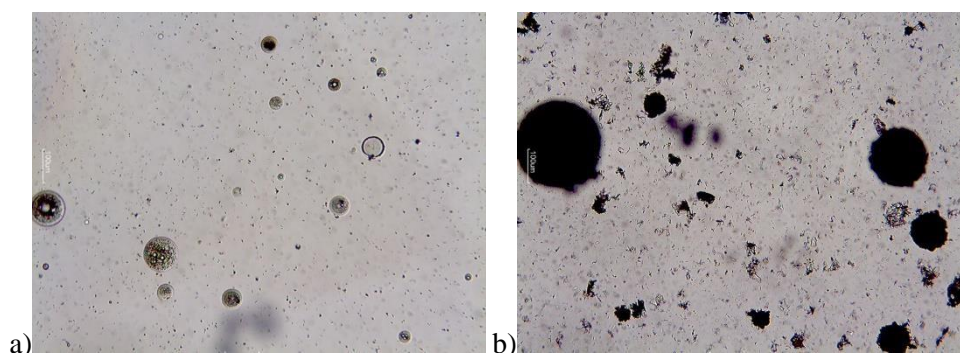
Sferični kristali dobiveni kombinacijom metoda sferične aglomeracije i kvazi–emulzijske difuzije otapala u sustavu CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan podvrgnuti su analizi na pretražnom elektronskom mikroskopu, a mikrografije su prikazane na slici 16. Vidljivo je da su nastali kristali pravilnog, sferičnog oblika, no različitih su promjera, od 300 do 600 μm . Površina kristala je homogena, stoga su ovaj sustav i metoda odabrani za daljnju optimizaciju procesa.

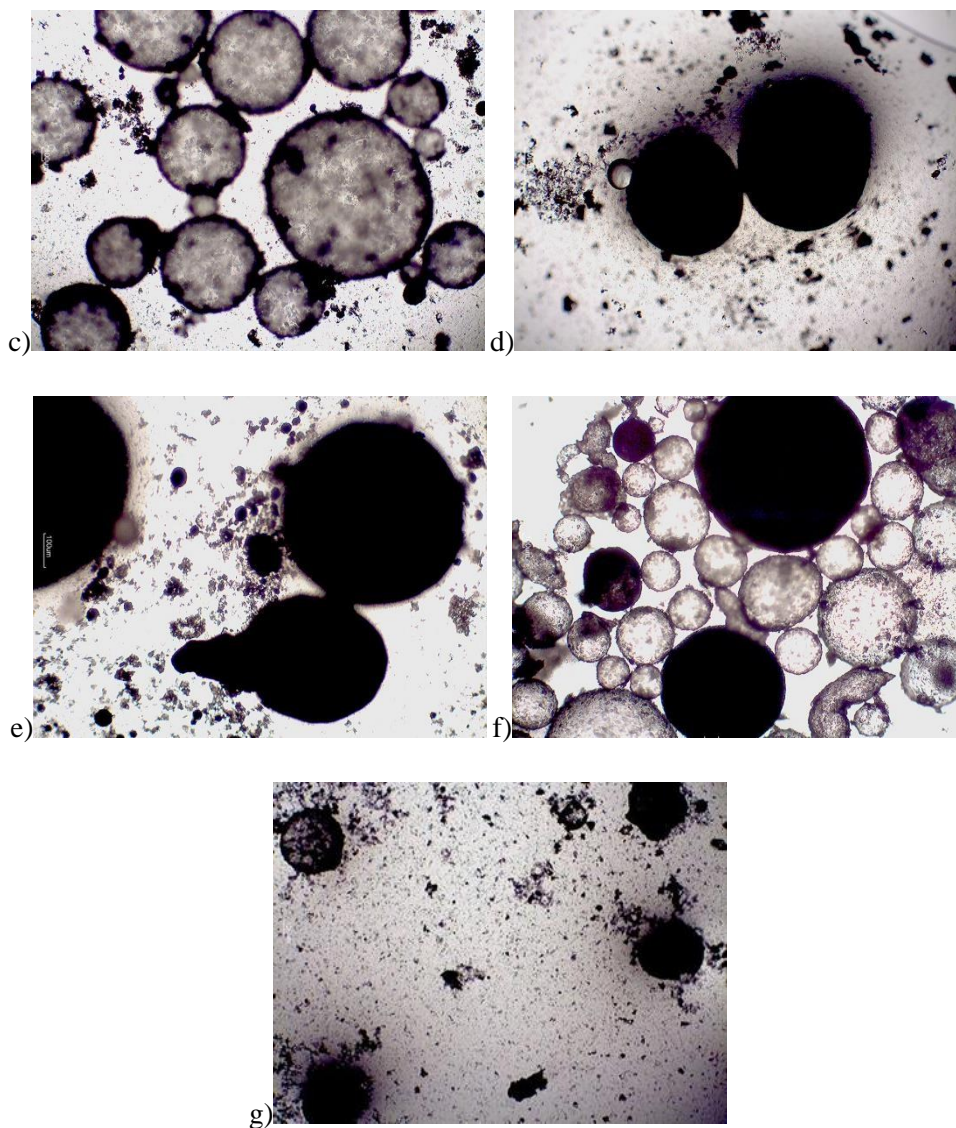


Slika 16. Mikrografije sferičnih kristala dobivenih kombinacijom metoda sferične aglomeracije i kvazi-emulzijske difuzije otapala u sustavu CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan.

4.4. Odabir optimalnog vremena zadržavanja

Vrijeme zadržavanja je važan parametar koji u velikoj mjeri utječe na rezultate eksperimenta. Potrebno je odrediti optimalno vrijeme zadržavanja. Ukoliko je vrijeme zadržavanja premalo, prijenos kristala iz smjese otapala i antiotapala, gdje nastaju kristali, u sfere neće se odviti do kraja te će kapljice kapljevine za premoštenje ostati prazne, a kristali neće formirati pravilne sfere. S druge strane, ukoliko je vrijeme zadržavanja predugo dolazi do raspada sferičnih kristala. Sferični kristali će se zbog predugog zadržavanja u smjesi otapala raskvasiti te može doći do raspada nastalih sfera ili nastanka većih nepravilnih aglomerata.²² Slika 17 prikazuje kristale slikane svjetlosnim mikroskopom u određenim vremenskim intervalima tijekom provođenja eksperimenta za sustav otapala CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan. Tijekom provedbe kristalizacije praćen je oblik kristala od nastanka do raspada.





Slika 17. Mikrografije dobivene svjetlosnim mikroskopom tijekom izvođenja eksperimenta za sustav otapala CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan u vremenu: a) 1min (uvećanje 40x) b) 10min (uvećanje 40x) c) 20min (uvećanje 100x) d) 30min (uvećanje 40x) e) 40min (uvećanje 40x) f) 50min (uvećanje 100x) i g) 60min (uvećanje 400x).

Na slici 17 vidljiv je nastanak kristala nakon 10 minuta, međutim tijekom cijelog procesa dio kapljica heptana ostaje neispunjen. Na slikama je vidljivo kako do raspada kristala dolazi nakon 50 minuta te je određeno optimalno vrijeme provedbe kristalizacije od 40 minuta.

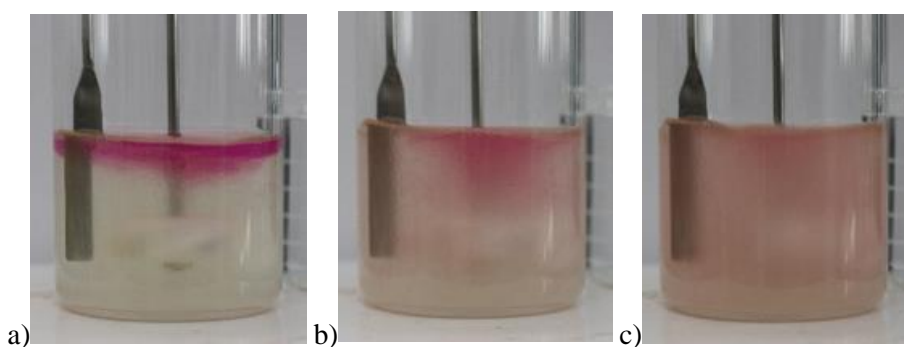
4.5. Odabir hidrodinamičkih uvjeta

Nakon odabranog sustava otapala, metode provedbe i vremena zadržavanja sfera u otopini, ispitan je utjecaj hidrodinamičkih uvjeta na granulometrijska svojstva kristala. Korištena su tri različita miješala, turbinsko miješalo sa šest lopatica nagnutih pod kutom od 45° (RT6–45) koje uzrokuje aksijalni tok u

posudi, propelersko miješalo (PROP) koje uzrokuje miješani tok te turbinsko miješalo sa šest lopatica nagnutih pod kutom od 90° koje uzrokuje radijalni tok miješala (RT6–90) (slika 8).²³

U procesu sferične kristalizacije miješanje je složeno zbog promjena u sustavu do kojeg dolazi tijekom vremena. U početku, kada se dodaje kapljevina za premoštenje, potrebno je postići stanje njezine potpune raspršenosti u antiotapalu, a nakon dodatka zasićene otopine te nastanka i rasta kristala, potrebno je adekvatnim miješanjem postići stanje potpune suspenzije. Zbog različitih tokova koje korištena miješala izazivaju u kristalizatoru, vizualnom metodom određena je kritična brzina, brzina vrtnje miješala koja osigurava raspršenje kapljica kapljevine za premoštenje u antiotapalu i postizanje stanje potpune suspenzije nakon nastanka kristala.

Kritična brzina vrtnje miješala za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan određena je uz pomoć dodatka joda u organsku fazu. Na slici 18 prikazan je primjer određivanja kritične brzine vrtnje miješala za propelersko miješalo. U posudi za miješanje vidljivo je razbijalo koje sprječava nastanak vrtloga jer on negativno utječe na izmiješanost sustava.



Slika 18. Postupak vizualnog određivanja kritične brzine miješanja za PROP pri brzinama miješanja:

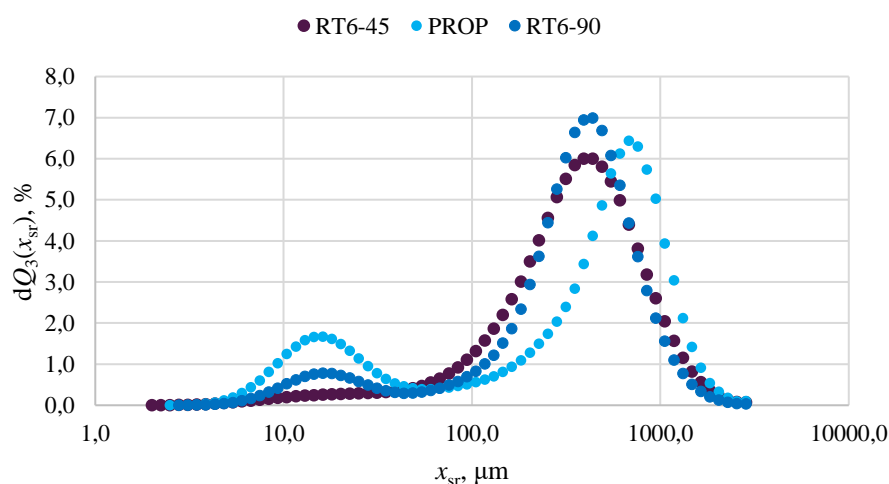
a) 300 min^{-1} b) 500 min^{-1} i c) 700 min^{-1} .

Provedbom eksperimenata određene su kritične brzine vrtnje za navedena miješala. Za miješalo RT6–45, kritična brzina vrtnje miješala iznosi 450 min^{-1} , za miješalo PROP 700 min^{-1} , te za miješalo RT6–90 400 min^{-1} . Miješalo koje izaziva radijalni tok u posudi (RT6–90) postiže dobro raspršenje kapljevine za premoštenje pri najmanjem broju okretaja. Radijalni tok koji ima oblik krila leptira dobro raspršuje heptan, koji se zbog manje gustoće od vode, zadržava na vrhu posude. U tablici 7 prikazani su rezultati nastalih sferičnih kristala za miješala RT6–45, PROP i RT6–90 pri njihovim kritičnim brzinama miješanja. Iznos širine raspodjele veličina čestica za miješalo RT6–45 je najmanji te iznosi 9,0 što nam ukazuje na najužu raspodjelu od tri miješala pri kritičnoj brzini. Također, navedeno miješalo jedino ima monomodalnu raspodjelu veličina čestica (slika 19). Najučestalija veličina kristala za navedeno miješalo je na $420 \mu\text{m}$. Propelersko miješalo ima najveći iznos S (88,7), raspodjela je bimodalna, a najučestalija veličina kristala je $760 \mu\text{m}$. Miješalo RT6–90 također ima bimodalnu raspodjelu veličine čestica čija širina iznosi 13,8, a najučestalija veličina čestica je slična kao i kod miješala RT6–45, $420 \mu\text{m}$. Iz

eksperimentalnih podataka može se zaključiti kako miješalo RT6–45 pri kritičnoj brzini daje najbolje rezultate s obzirom na raspodjelu veličine čestica i oblik krivulje.

Tablica 7. Usporedba kvantila x_{10} , x_{50} , x_{90} i širina raspodjele veličina čestica za miješala RT6–45, PROP i RT6–90 pri kritičnim brzinama miješanja.

Miješalo	n (min^{-1})	x_{10} , μm	x_{50} , μm	x_{90} , μm	S
RT6–45	450	98,7	365,9	884,8	9,0
PROP	700	12,2	492,7	1078,9	88,7
RT6–90	400	57,5	368,1	793,1	13,8



Slika 19. Usporedbe raspodjela veličina čestica za miješala RT6–45, PROP i RT6–90 pri kritičnim brzinama miješanja.

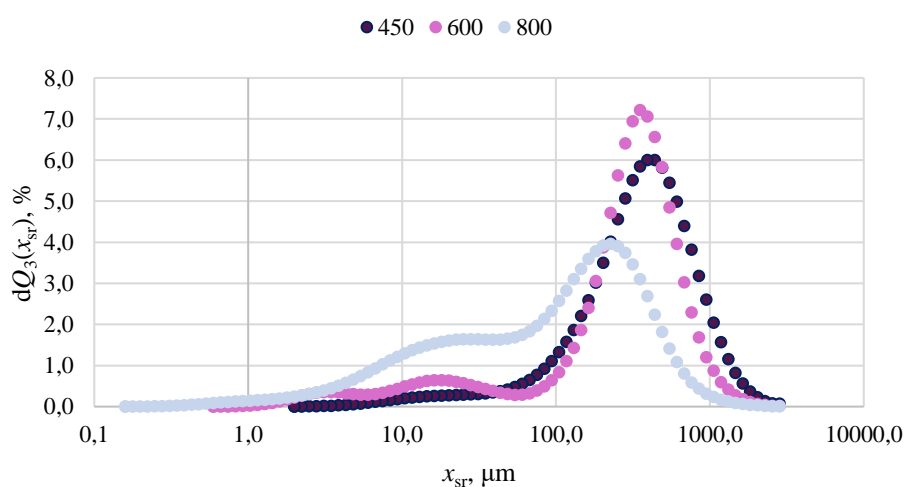
Svako od tri navedena miješala uzrokuje različiti tok miješanja suspenzije, stoga je i optimalna brzina miješanja različita za svako miješalo. Prilikom vizualnog određivanja optimalna brzine miješanja potrebno je uzeti u obzir je li kapljevina za premoštenje dobro dispergirana u sustavu. Dodatkom otopine ceritiniba dolazi do brzog nastanka kristala, koji se zbog velikog afiniteta prema kapljevini za premoštenje počinju nakupljati u kapljicama heptana.²² Budući da su se uvjeti u kristalizatoru promijenili, važno je odrediti hidrodinamičke uvjete koji će osigurati postizanje potpune suspenzije. Potpuna suspenzija se postiže kada su sve čestice u gibanju i niti jedna ne zaostaje na dnu dulje od jedne sekunde.²⁴

U tablici 8 i na slici 20 prikazani su rezultati raspodjele veličina čestica za miješalo RT6–45 te se može zaključiti sljedeće: najmanji iznos širine raspodjele veličina čestica je 9,0 pri kritičnoj brzini miješanja od 450 min^{-1} , a najučestalija veličina kristala iznosi $420 \mu\text{m}$. S povećanjem brzine vrtnje miješala uočljivo je smanjenje najučestalije veličine kristala ($390 \mu\text{m}$ pri 600 min^{-1} , odnosno $250 \mu\text{m}$ pri 800 min^{-1}) te su raspodjele veličina čestica bimodalne. Ovakvo ponašanje sustava može se objasniti lomom

kristala zbog međusobnog sudaranja čestica te sudaranja sa stijenkama reaktora i miješalom zbog veće brzine miješanja sustava. Iz tog se razloga pojavljuje drugi maksimum učestalosti pri manjim iznosima veličina kristala.

Tablica 8. Usporedba kvantila x_{10} , x_{50} , x_{90} i širina raspodjele veličina čestica za miješalo RT6–45 pri različitim brzinama vrtnje miješala.

n (min^{-1})	x_{10} , μm	x_{50} , μm	x_{90} , μm	S
450	98,7	365,9	884,8	9,0
600	23,	311,3	660,0	28,0
800	8,3	114,4	408,3	49,1

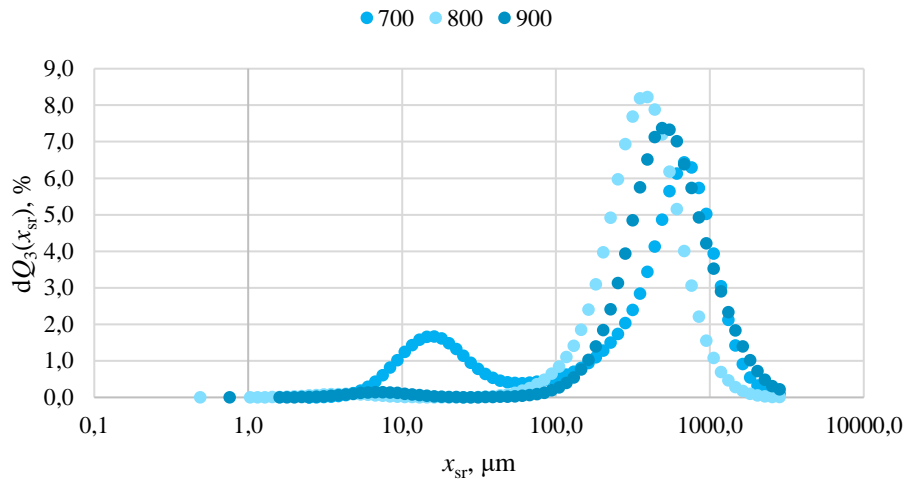


Slika 20. Raspodjele veličina čestica za miješalo RT6–45 pri brzinama od 450, 600 i 800 min^{-1} .

U tablici 9 i na slici 21 prikazani su rezultati raspodjele veličina čestica za miješalo PROP pri različitim brzinama vrtnje miješala. Najuža raspodjela veličina čestica vidljiva je pri 800 min^{-1} i njena širina iznosi 4,3 što ukazuje na usku širinu raspodjele, a najučestalija veličina kristala je na 390 μm . Raspodjela je monomodalna. Pri brzini vrtnje miješala od 900 min^{-1} mogu se uočiti veći kristali s najučestalijom veličinom od 545 μm . Iznos širine raspodjele nešto je veći ($S=5,1$), što je također uska širina raspodjele veličina kristala. Najlošiji rezultati dobiveni su pri najmanjoj brzini vrtnje miješala od 700 min^{-1} , raspodjela je bimodalna i jako široka s iznosom od 88,7, a najučestalija veličina kristala je 680 μm .

Tablica 9. Usporedba kvantila x_{10} , x_{50} , x_{90} i širina raspodjele veličina čestica za miješalo PROP pri različitim brzinama vrtnje miješala.

n (min^{-1})	x_{10} , μm	x_{50} , μm	x_{90} , μm	S
700	12,2	492,7	1078,9	88,7
800	167,1	362,6	711,3	4,3
900	230,2	520,6	1170,9	5,1

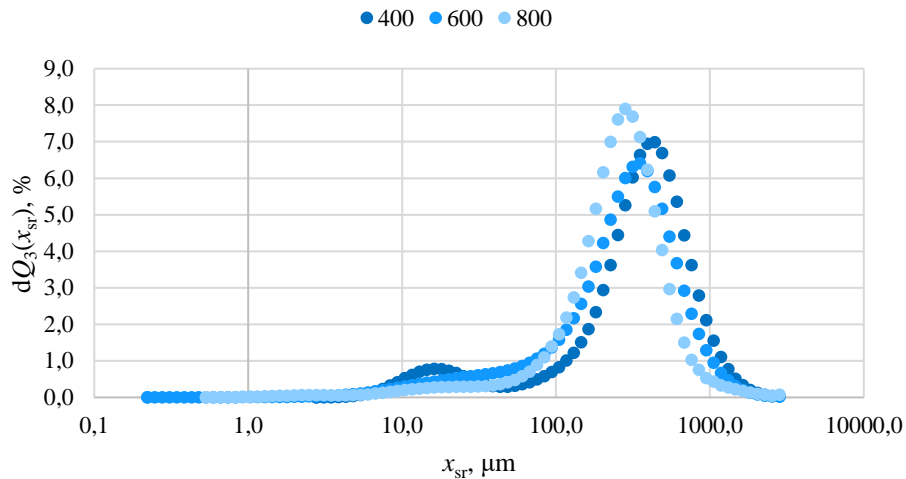


Slika 21. Raspodjele veličina čestica za miješalo PROP pri brzinama od 700, 800 i 900 min⁻¹.

U tablici 10 i na slici 22 prikazani su rezultati raspodjele veličina čestica za miješalo RT6–90 pri različitim brzinama okretaja miješala. Pri najvećoj brzini od 800 min⁻¹ širina raspodjele veličina čestica je najmanja te iznosi 5,7. Raspodjela je monomodalna, a najučestalija veličina kristala je 315 μm. Smanjenjem brzine na 600 min⁻¹ primjećuje se povećanje širine raspodjele veličina kristala s iznosom od 11,8, najučestalija veličina čestica je pri 390 μm i raspodjela je također monomodalna. Najveći kristali dobiveni su pri najmanjoj brzini okretaja od 400 min⁻¹, veličina im iznosi 430 μm, a iznos širine raspodjele veličina čestica je najveći od tri provedena eksperimenta (S=13,8). Raspodjela je u ovom slučaju bimodalna. Pri manjem broju okretaja nastaju krupnije kapljice heptana u vodi, što onda utječe na povećanje sfera, međutim u tim uvjetima raste širina raspodjele veličine čestica. Šira raspodjela nastaje jer dio kristala raste izvan kapljica kapljevine za premoštenje te ostaje neaglomeriran.

Tablica 10. Usporedba kvantila x_{10} , x_{50} , x_{90} i širina raspodjele veličina čestica za miješalo RT6–90 pri različitim brzinama vrtnje miješala.

n (min ⁻¹)	x_{10} , μm	x_{50} , μm	x_{90} , μm	S
400	57,5	368,1	793,1	13,8
600	56,8	293,2	674,5	11,8
800	92,9	262,7	531,7	5,7

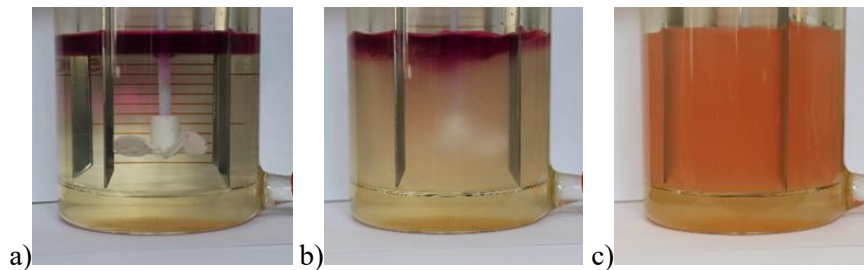


Slika 22. Raspodjele veličina čestica za miješalo RT6-90 pri brzinama od 400, 600 i 800 min⁻¹.

4.6. Uvećanje procesa sferične kristalizacije

Nakon optimiziranja procesa sferične kristalizacije ceritiniba u sustavu CRT+THF-voda+PVP (1 % w/w)-heptan u kristalizatoru manjih dimenzija (slika 4), kristalizacija je provedena u kristalizatoru većih dimenzija (slika 9). Kako bi se uvećanje uspješno provelo, određena je kritična brzina miješanja na dva načina: vizualno i *just dispersed* kriterijem, prema jednadžbi 1.

Na slici 23 prikazan je postupak vizualnog određivanja kritične brzine miješanja koja iznosi 580 min⁻¹.



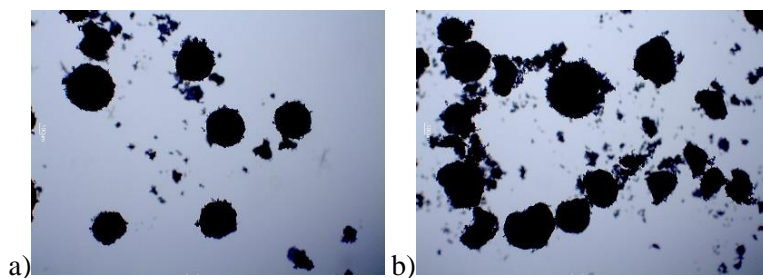
Slika 23. Postupak vizualnog određivanja kritične brzine miješanja za uvećanje procesa.

Empirijski određena kritična brzina miješanja prema *just dispersed* kriteriju iznosi 747 min⁻¹. Slika 24 prikazuje stanje sustava pri toj brzini.



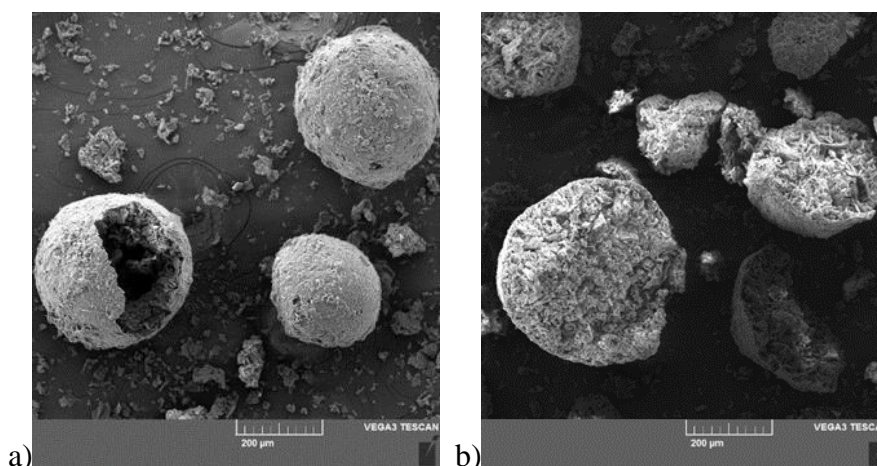
Slika 24. Sustav heptan-voda pri kritičnoj brzini miješanja određenoj *just dispersed* kriterijem.

Za provedbu kristalizacije u većem mjerilu odabran je sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan s PROP miješalom. Dimenzije kristalizatora i miješala uvećane su dva puta, a oblik kristalizatora i vrsta miješala zadržali su sličnost s malim kristalizatorom i miješalom. Mikrografije kristala dobivenih uvećanjem procesa kristalizacije kombiniranom metodom za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan prikazane su na slici 25. Vidljivo je kako su pri manjoj brzini miješanja od 580 min^{-1} , koja je određena vizualnom metodom, nastali kristali sferičnog oblika. Pri brzini miješanja od 747 min^{-1} , određenoj jednadžbom 1, dolazi do loma nastalih sferičnih kristala zbog sudara kristala s miješalom i stijenkama reaktora te nastanka većeg broja čestica nepravilnog oblika.



Slika 25. Mikrografije kristala dobivenih uvećanjem procesa sferične kristalizacije ceritiniba kombiniranom metodom za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan pri $t=40 \text{ min}$, uvećanju mikroskopa 40x i brzini miješanja: a) 580 min^{-1} i b) 747 min^{-1} .

Slika 26 prikazuje sferične kristale nastale pri kritičnim brzinama miješanja snimljene pretražnim elektronskim mikroskopom. Može se uočiti kako su dobiveni kristali sferičnog oblika, glatke površine i šuplje unutrašnjosti (slika 26a), te je potvrđeno kako se pri kritičnoj brzini određenom *just dispersed* kriterijem sferični kristali lome (slika 26b).

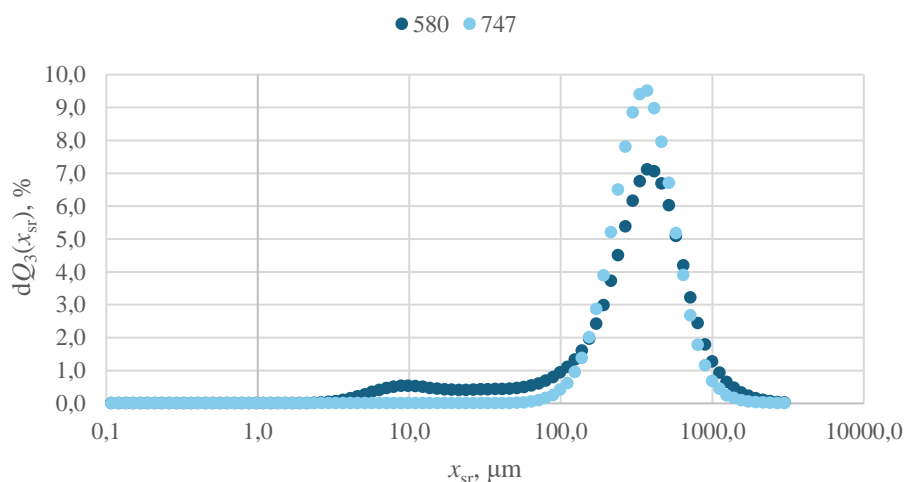


Slika 26. Mikrografije sferičnih kristala dobivenih uvećanjem procesa sferične kristalizacije kombiniranom metodom u sustavu CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan pri brzinama miješanja a) 580 min^{-1} i b) 747 min^{-1} .

Nakon provedbe uvećanja procesa sferične kristalizacije ceritiniba pri različitim kritičnim brzinama okretaja miješala, snimljene su raspodjele veličina kristala koje su prikazane na slici 27. U tablici 11 dani su rezultati raspodjele veličina kristala te se može doći do zaključka kako je raspodjela veličina kristala kod *just dispersed* kriterija monomodalna i uža, dok je pri vizualnom kriteriju raspodjela bimodalna i šira. Najučestalija veličina kristala bliska je kod oba kriterija te se nalaze u rasponu od 370 μm do 415 μm . Iako su dobivene raspodjele veličina kristala slične, analiza mikrografija pokazuje da su bolji uvjeti postignuti na manjoj brzini vrtnje miješala. Veći broj okretaja miješala dovodi nastanka krupnijih kristala, ali uzrokuje i velik broj sudara sa stijenkom i kristalima međusobno što je uzrok nastanka nepravilnih sfera.

Tablica 11. Usporedba kvantila x_{10} , x_{50} , x_{90} i širina raspodjele veličina čestica prilikom uvećanja procesa pri određenim kritičnim brzinama miješanja.

n (min^{-1})	x_{10} , μm	x_{50} , μm	x_{90} , μm	S
580	48,5	320,9	688,3	14,2
747	175,1	330,7	601,5	3,4



Slika 27. Raspodjele veličina čestica dobivenih uvećanjem procesa sferične kristalizacije kombiniranom metodom za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan pri brzinama miješanja od 580 min^{-1} i 747 min^{-1} .

Iako je raspodjela veličina čestica uža pri kritičnoj brzini određenoj *just dispersed* kriterijem, potrebno je uzeti u obzir oblik kristala. Pri većoj brzini miješanja dolazi do loma nastalih sferičnih kristala, dok pri manjoj brzini miješanja nastaju pravilni sferični kristali.

5. ZAKLJUČCI

Pri odabiru sustava otapala za provedbu eksperimenta, THF je odabran kao optimalno otapalo zbog visoke topljivosti ceritiniba u njemu. Voda se pokazala kao dobar odabir za antiotapalo zbog niske topljivosti ceritiniba, mješljivosti sa THF-om te njenom čestom primjenom u farmaceutskoj industriji. Heptan i heksan su korišteni u sustavu kao kapljevina za premoštenje, pošto su nemješljivi s antiotapalom, no preferira se korištenje heptana zbog manje toksičnosti. Prilikom odabira područja koncentracija, omjer otapala i antiotapala iznosi 1:7, što omogućuje da se kapljevina za premoštenje dobro rasprši u zadanom sustavu. Ispitane su tri metode provedbe sferične kristalizacije. Za sferičnu aglomeraciju, optimalni sustav je CRT+THF–voda–heptan pri uvjetima $n=400 \text{ min}^{-1}$, $t=60 \text{ min}$, dok je za kvazi–emulzijsku difuziju otapala optimalan sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w) pri uvjetima $n=550 \text{ min}^{-1}$ i $t=60 \text{ min}$. Također, provedena je i kombinacija zadanih metoda za sustav CRT+THF–voda+PVP (1 % w/w)–heptan, $n=550 \text{ min}^{-1}$ i $t=60 \text{ min}$ te su njome dobivene do sad najsfiričnije čestice sličnih veličina. Za navedenu metodu određeno je optimalno vrijeme zadržavanja koje iznosi 40 minuta. Pri kraćem vremenu provođenja eksperimenta kapljevina za premoštenje ostaje neispunjena, dok pri dužem vremenu dolazi do raspada sferičnih kristala. Hidrodinamički uvjeti eksperimenta ispitani su pomoću tri vrste miješala, RT6–45, RT6–90 i PROP, te pri različitim brzinama miješanja. Najbolji rezultati dobiveni su uporabom PROP miješala pri brzini miješanja koja iznosi 800 min^{-1} . Uvećanje procesa provedeno je za kombiniranu metodu sferične aglomeracije i kvazi–emulzijske difuzije otapala pri različitim brzinama miješanja te je dokazano da su pri brzini od 580 min^{-1} dobiveni bolji rezultati, dok pri brzini od 747 min^{-1} dolazi do loma sferičnih kristala u manje, nepravilne oblike.

6. ZAHVALE

Hvala mentorici prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na nesebičnom prenošenju znanja, brojnim savjetima i velikom strpljenju prilikom pisanja ovoga rada. Hvala Vam što vjerujete u nas.

Hvala asistentici Ivi Zokić, mag. ing. oecoing. na velikoj pomoći, uputama i ohrabrivanju tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Također, hvala svim djelatnicima Zavoda za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo na uvijek ugodnoj i vedroj atmosferi.

7. POPIS LITERATURE

- (1) Thati, J.; Chinta, S. A Review on Spherical Crystallization Mechanisms and Characterization. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **2018**, *11* (1), 421–417.
- (2) Ghenge, G. R.; Pande, S. D.; Birari, T. K.; Jejurkar, L. S.; Ahmad, A. An Overview to Spherical Crystallization and Its Evaluation. *International Journal of Applied Pharmaceutics* **2011**, *3* (3), 1–6.
- (3) Dhondale, M. R.; Nambiar, A. G.; Singh, M.; Mali, A. R.; Agrawal, A. K.; Shastri, N. R.; Kumar, P.; Kumar, D. Current Trends in API Co-Processing: Spherical Crystallization and Co-Precipitation Techniques. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2023**, *112* (8), 2010–2028.
- (4) Kalepu, S.; Nekkanti, V. Insoluble Drug Delivery Strategies: Review of Recent Advances and Business Prospects. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, *5* (5), 442–453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>.
- (5) Lennernäs, H.; Abrahamsson, B. The Biopharmaceutics Classification System. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*; Elsevier, 2007; Vol. 5, pp 971–988.
- (6) Javadzadeh, Y.; Vazifehasl, Z.; Dizaj, S. M.; Mokhtarpour, M. Spherical Crystallization of Drugs. In *Advanced Topics in Crystallization*; IntechOpen, 2015.
- (7) Sander, A.; Gelemanović, A.; Hrkovac, M.; Šimić, N. Uvećanje Šaržnog Kristalizatora. *Kem. Ind.* **2009**, *58* (7–8), 307–313.
- (8) Awasthi, A.; Dheeraj, M. D.; Birangal, S.; Pai, A.; Pai, G.; Badamane Sathyanarayana, M. Fabrication of Ceritinib Cocrystals with Improved Solubility: Preparation, Solid-State Characterization, Solubility Studies and Molecular Docking Studies. *Rasayan J. Chem.* **2021**, *14* (2), 905–913.
- (9) Grebenar, I.; Ratkaj, M.; Mundofer, T.; Nežić, I. Solid State Forms of Ceritinib and Salts Thereof, 2016.
- (10) *Ceritinib: MedlinePlus Drug Information*. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a614027.html> (accessed 2024-06-26).
- (11) Putta, S. K.; Srikumar, P. Spherical Crystallization and Its Process Optimization. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2016**, *8* (7), 611–623.
- (12) Schmidt, B.; Patel, J.; Ricard, F. X.; Brechtelsbauer, C. M.; Lewis, N. Application of Process Modelling Tools in the Scale-Up of Pharmaceutical Crystallisation Processes. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8* (6), 998–1008. <https://doi.org/10.1021/op040013n>.
- (13) Zokić, I.; Prlić Kardum, J. Crystallization Behavior of Ceritinib: Characterization and Optimization Strategies. *ChemEngineering* **2023**, *7* (5), 84.
- (14) Jiktar, S.; Thipparaboina, R.; Chavan, R. B.; Shastri, N. R. Spherical Agglomeration of Platy Crystals: Curious Case of Etodolac. *Cryst. Growth Des.* **2016**, *16*, 4034–4042.

- (15) Hansen, J.; Kleinebudde, P. Towards a Better Understanding of the Role of Stabilizers in QESD Crystallizations. *Pharm Res* **2022**, *39* (12), 3123–3136. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03212-2>.
- (16) Kamil, M.; Bushra, A.; Ahmad, A. Minimum Agitation Speed for Liquid-Liquid-Gas Dispersion in Mechanically Agitated Vessels. *Chemical Engineering and Processing* **2001**, *40* (1), 49–57.
- (17) Matijašić, G. *Uvod u mehaničko procesno inženjerstvo*, 1st ed.; HDKI: Zagreb, 2022.
- (18) *Solvent Miscibility Table*. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/purification/solvent-miscibility-table> (accessed 2024-08-04).
- (19) Prat, D.; Pardigon, O.; Flemming, H.-W.; Letestu, S.; Ducandas, V.; Isnard, P.; Guntrum, E.; Senac, T.; Ruisseau, S.; Cruciani, P.; Hosek, P. Sanofi's Solvent Selection Guide: A Step Toward More Sustainable Processes. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17* (12), 1517–1525. <https://doi.org/10.1021/op4002565>.
- (20) Maghsoodi, M. Effect of Process Variables on Physicomechanical Properties of the Agglomerates Obtained by Spherical Crystallization Technique. *Pharmaceutical Development and Technology* **2011**, *16* (5), 474–482. <https://doi.org/10.3109/10837450.2010.492218>.
- (21) Hansen, J.; Kleinebudde, P. Increasing the Batch Size of a QESD Crystallization by Using a MSMR Crystallizer. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (6), 1227. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061227>.
- (22) M. Chen; X. Liu; C. Yu; M. Yao; S. Xu; W. Tang; X. Song; W. Dong; G. Wang; J. Gong. Strategy of Selecting Solvent Systems for Spherical Agglomeration by the Lifshitz-van Der Waals Acid-Base Approach. *Chemical Engineering Science* **2020**, 220.
- (23) Chen, C. W.; Lee, H. L.; Yeh, K. L.; Lee, T. Effects of Scale-Up and Impeller Types on Spherical Agglomeration of Dimethyl Fumarate. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2021**, *60* (30), 11555–11567. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c02006>.
- (24) Baldi, G.; Conti, R.; Alaria, E. Complete Suspension of Particles in Mechanically Agitated Vessels. *Chemical Engineering Science* **1978**, *33* (1), 21–25. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(78\)85063-5](https://doi.org/10.1016/0009-2509(78)85063-5).

SAŽETAK

Proces formulacije nekih lijekova može biti vrlo zahtjevan zbog nepoželjnih fizikalnih i mehaničkih svojstava te loše topljivosti djelatne tvari u vodi. Sferične čestice preferiraju se u odnosu na druge oblike zbog svoje velike nasipne gustoće, smanjene zaprašenosti, bolje tecivosti, slabog sljepljivanja i boljeg mehaničkog djelovanja tijekom tabletiranja.

Ovo istraživanje ispituje mogućnost dobivanja sferičnih kristala ceritiniba, lijeka koji se koristi za liječenje uznapredovalog raka pluća nemalih stanica, koji pripada razredu IV BCS-a. Sferični kristali ceritiniba pripremljeni su metodom sferične aglomeracije u ternarnom sustavu i metodom kvazi-emulzijske difuzije otapala uz dodatak PVP-a, kao i kombinacijom ove dvije metode. Kombiniranom metodom sferične kristalizacije dobiveni su kristali s najpovoljnijom morfologijom i najužom raspodjelom veličine čestica, što je bio razlog za daljnju optimizaciju.

Ispitan je utjecaj različitih vrsta miješala i brzina miješanja na morfologiju dobivenih sferičnih kristala te su odabrani optimalni uvjeti za proces. Korištenjem empirijskih korelacija i vizualnog kriterija, određena je kritična brzina miješanja potrebna za uvećanje procesa. Dobiveni kristali karakterizirani su svjetlosnim i pretražnim elektronskim mikroskopom. Struktura ceritiniba određena je rendgenskom difrakcijskom analizom, te je utvrđeno kako otapala i prisutnost dodataka potrebnih za provedbu sferične kristalizacije ne utječu na strukturu ceritiniba.

Ključne riječi: *ceritinib, djelatna tvar, sferična kristalizacija, uvećanje procesa*

SUMMARY

The formulation process of some drugs can be very demanding due to undesirable physical and mechanical properties and poor solubility of the active pharmaceutical ingredient in water. Spherical particles are preferred over other shapes due to their high bulk density, reduced dustiness, better flowability, anti-caking properties and better mechanical performance during tableting.

This research examines the possibility of obtaining spherical crystals of ceritinib, a drug used to treat advanced non-small cell lung cancer, which belongs to BCS class IV. Spherical crystals of ceritinib were prepared by the spherical agglomeration method in a ternary system and by the quasi-emulsion diffusion method with the addition of PVP, as well as by a combination of these two methods. The combined method of spherical crystallization resulted in crystals with the most favorable morphology and the narrowest particle size distribution, which was the reason for further optimization.

The influence of different types of impellers and mixing rates on the morphology of the obtained spherical crystals was examined, and the optimal conditions for the process were selected. Using empirical correlations and a visual criterion, the critical mixing rate required to scale-up the process was determined. The obtained crystals were characterized by light and scanning electron microscopy. The structure of ceritinib was determined by X-ray diffraction analysis, and it was determined that solvents and the presence of additives required for spherical crystallization do not affect the structure of ceritinib.

Keywords: *active pharmaceutical ingredient, ceritinib, scale-up, spherical crystallization*