

## VÝZNAM A KONTROLA NUKLEAČNÍHO PROCESU PRO KRYSTALIZACI FARMACEUTICKÝCH SUBSTANCÍ

ROMAN GABRIEL<sup>a</sup>, ADÉLA BENÝŠEK  
BÁRTOVÁ<sup>a,b</sup>, DAMIR ŠAHNIČ<sup>c</sup> a BOHUMIL  
KRATOCHVÍL<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Teva Czech Industries s.r.o., Výzkum a vývoj, Ostravská 29, 747 70 Opava, <sup>b</sup>Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, <sup>c</sup>PLIVA Chorvatsko s.r.o. (člen skupiny TEVA), API Výzkum a vývoj, Prilaz baruna Filipovića 25, 10000, Záhřeb, Chorvatsko, <sup>d</sup>Ústav chemie pevných látek, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6

Roman.Gabriel@tevapharm.cz,  
Adela.Bartova@tevapharm.cz

Došlo 23.9.22, přijato 7.11.22.

**Klíčová slova:** krystalizace farmaceutických substancí, kontrola nukleačního a krystalizačního procesu, očkovaná krystalizace, sonokrystalizace, technika FBRM, systém Blaze

• <https://doi.org/10.54779/chl20220737>

### Obsah

1. Úvod
2. Proces nukleace
  - 2.1. Dvoukrokový nukleační model
3. Kontrola krystalizačního procesu ve farmacii
  - 3.1. Očkovaná krystalizace
  - 3.2. Sonokrystalizace
4. Monitorování nukleačního a krystalizačního procesu
  - 4.1. Technika FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement)
  - 4.2. Systém Blaze

### 1. Úvod

Krystalizace ve farmaceutické výrobě je velmi široké a intenzivně studované téma, protože většina vyráběných API (Active Pharmaceutical Ingredient) jsou krystalické fáze. Každoročně je pokrok v tomto oboru popsán řadou metodických a komerčních publikací, případových studií a monografií. Z poslední doby lze uvést např. práce<sup>1–3</sup>. V Chemických listech bylo toto téma naposledy zmíněno před 15 léty<sup>4</sup>, a proto jsme se rozhodli pro aktualizaci.

Z technologického hlediska je krystalizace velmi účinný separační a purifikační proces. Ve farmacii se pou-

žívá především krystalizace z roztoku, zřídka krystalizace z taveniny. Z fyzikálně-chemického hlediska můžeme krystalizaci považovat za solidifikační proces fázové transformace s následným vznikem krystalické fáze z prekurzorů ve fázi kapalné. Sledovanými parametry jakosti u finálního materiálu jsou: výtěžek, chemická a fázová (zejména polymorfní) čistota, distribuce velikostí částic a jejich rozměrová stejnorodost, krystalový tvar (morfologie), kvalita povrchu (drsnost, pórovitost), povrchová energie, tokové vlastnosti, mechanické vlastnosti (tvrdost, plasticita, elasticita), obsah zbytkových rozpouštědel, a v neposlední řadě ekonomické a ekologické aspekty. Podstatné je, že sledované parametry jakosti ovlivňuje velké množství procesních parametrů (tab. I) a navíc, že při krystalizaci určité API nemají všechny procesní parametry stejnou váhu, protože každá API se chová odlišně. Krystalizace produktu „na míru“ vyžaduje kontrolu všech těchto a možná ještě dalších (na začátku neznámých?) parametrů pro optimální výsledek. Dodržení projektovaných parametrů u krystalované API ovlivňuje jak řízení a energetickou náročnost navazujících postupů (filtraci, sušení a mletí), tak v konečném důsledku i rozhodující parametry finální lékové formy (bioekvivalenci a stabilitu). Přetrvávajícím problémem krystalizace ve farmaceutickém průmyslu je hrozba polymorfních transformací v krystalizujícím médiu a vznik nežádoucích polymorfů (fyzikálních nečistot).

Základní pojmy pro krystalizační proces zavedl Ostwald<sup>5</sup>, od něho pochází popis role přesycení roztoku při kontrole nukleace, koncept metastabilní zóny a zákon stavů, který popisuje vznik různých polymorfů v krystalizujícím polymorfním systému. Na práci Ostwalda navá-

#### Tabulka I

Procesní parametry krystalizace, které ovlivňují vlastnosti finálního produktu

Procesní parametry	
Teplota a tlak v roztoku	Doba stání produktu v matečném roztoku
Rychlost ochlazení nebo odpařování roztoku	Intenzita míchání roztoku
Stupeň přesycení roztoku a rychlost jeho dosažení	Koncentrační a teplotní gradienty
Rozpouštědlo, resp. směs rozpouštědel	Mechanické, ultrazvukové, mikrovlnné, laserové a jiné rázy,
Obsah vody v rozpouštědle	pH roztoku
Přítomnost nečistot, resp. aditiv v roztoku	Očkovací materiál a jeho kvalita
Výběr antisolventu	Vliv operátora technologie

zal Volmer<sup>6</sup>, který vytvořil kinetickou teorii popisující vztah mezi přesycením roztoku, mezifázovým napětím a rychlostí nukleace a stál tak u zrodu klasické nukleační teorie (Classical Nucleation Theory, CNT), kompletně popsané např. v novodobé práci Karthiky a spol.<sup>7</sup>

Nukleace je počátek zrodu krystalické fáze z roztoku. Jedná se o stochastický proces a současnou výzvou je pochopit nukleaci na molekulární úrovni. Podle teorie CNT je nukleace vyvolána termálními fluktuacemi a následnými agregacemi stavebního materiálu na atomové úrovni v přesyceném roztoku. Původní stav tepelné rovnováhy se přesycením stává metastabilním. Na způsobu, jakým nukleace proběhne, závisí fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného krystalického materiálu. Nukleace vede k tvorbě zárodků kritické velikosti (nukleí), jejichž velikost se pohybuje řádově mezi  $10^{-10}$ – $10^{-9}$  m (10–1000 molekul, tzv. prekurzory) a doba jejich vzniku může být od zlomků sekundy (např. při krystalizaci srážením antisolventem) až po dny (volná neboli termodynamicky řízená krystalizace). Překotné nukleace (tzv. kineticky řízený proces, i  $10^{-13}$  s) jsou časově srovnatelné s vibračními frekvencemi atomů, a proto jsou náročné na studium. Struktura nuklea a jeho schopnost dorůst do krystalu je dlouhodobě studována různými analytickými technikami, protože toto poznání je pro řízenou krystalizaci naprosto zásadní. Metodický pokrok v této oblasti je naprosto zřejmý. Jsou používány metody rozptylu RTG záření (ultrasmall angle, small angle, wide angle), mikroskopie skenovací sondou (SPM) a laserové techniky, např. FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement). Tyto techniky zachycují spíše růst krystalů, tedy stav, kdy je již krystalová struktura vytvořena. Relativně novou technikou je systém firmy BlazeMetrics, která získává data jednou sondou *in-situ* pro současné měření mikroskopie s vysokým dynamickým rozsahem a Ramanovou spektroskopií v reálném čase.

Ukazuje se, že co nejpřesnější popis procesu nukleace a pochopení jeho důsledků vede k cílenému řízení krystalizace, a to je cílem dokonale zvládnuté technologie.

## 2. Proces nukleace

Teorie CNT byla vytvořena na základě studia krystalizace jednoduchých anorganických látek z roztoku, kovů

z tavenin a keramiky v pevné fázi. Mullin<sup>8</sup> dělí nukleační proces následovně:

- nukleace primární homogenní,
- nukleace primární heterogenní,
- nukleace sekundární.

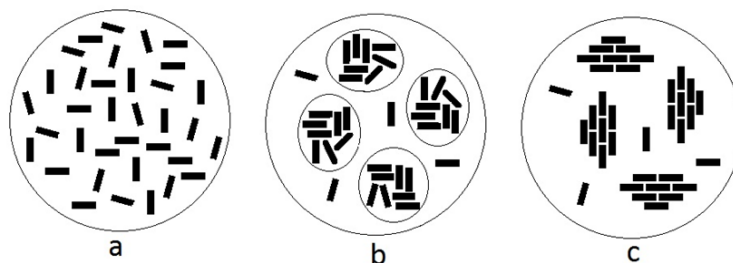
Výchozím předpokladem je vznik kulovitého nuklea kritické velikosti  $r^*$ , po překonání homogenní nukleační bariéry  $\Delta G^*_{\text{homo}}$  (blíže viz<sup>4</sup>). Mechanismus primární homogenní nukleace je ovšem idealizací procesu, kdy předpokládáme, že cizí povrchy v něm nehrají žádnou roli. To však nerespektuje realitu krystalizace v praxi, která je omezena stěnami krystalizátoru, míchadlem, prachovými částicemi atd. Uvádí se<sup>9</sup>, že primární nukleace se uplatní pouze do objemu 100  $\mu\text{l}$  roztoku. Blíže realitě je proto primární nukleace heterogenní, která přednostně probíhá na cizím povrchu (tj. energeticky výhodném místě, tzv. aktivním centru, kde je větší pravděpodobnost vzniku nuklea), a tak může vznikat i při nižších přesyceních roztoku než nukleace homogenní. Pro nukleační bariéry platí totiž  $\Delta G^*_{\text{homo}} > \Delta G^*_{\text{hetero}}$ . Příkladem primární heterogenní nukleace je krystalizace pomocí antisolventu. V tomto případě lze rychlostí přidávání antisolventu do roztoku řídit distribuci velikosti částic krystalizující fáze, resp. výsledného produktu.

Sekundární nukleace je proces, ke kterému dochází po primární heterogenní nukleaci, kdy vznikající nuklea do sebe naráží navzájem nebo do stěn krystalizátoru či míchadla a vzniklé úlomky působí jako iniciační materiál pro další vývin krystalického materiálu. Tento proces můžeme nazvat jako nezáměrné očkování. Naproti tomu záměrná očkovaná krystalizace je postup, který se používá např. při cílené krystalizaci vybraného polymorfu, pokud krystalovaná API vykazuje polymorfní chování.

### 2.1. Dvoukroková nukleační model

Postupem času se ukázalo, že model CNT nevyhovuje pro popis nukleace u všech kategorií chemických sloučenin. Hlavními omezeními modelu CNT je, že předpokládáme ideálně kulovitý tvar nuklea, zatímco jeho povrch popisujeme jako rovinný se zanedbáním závislosti povrchového napětí na zakřivení.

Na základě studia krystalizace bílkovin byl Vekilovem<sup>10</sup> formulován dvoukrokový (two-step, 2S) nukleační



Obr. 1. Dvoukroková nukleace. a) roztok před nukleací; b) 1. krok nukleace: vytváření kapalných oblastí („krupějí“) s velkým přesycením; c) 2. krok nukleace: strukturalizace „krupějí“ do vnitřně uspořádaných nukleí

model tak, aby byla vysvětlena pozorovaná nukleační rychlost. Podle dvoukrokového nukleačního modelu se nejdříve molekuly rozpuštěné látky rychle shlukují do metastabilních klastrů (agregátů) o velikosti stovek nanometrů. Tyto metastabilní agregáty jsou suspendované oblasti vysoce přesyceného roztoku neboli husté kapaliny (pro tyto oblasti lze v češtině použít přiléhavý termín „krůpěje“). Ve druhém kroku se „krůpěje“ reorganizují do uspořádaných struktur – nukleí (obr. 1). Tento druhý krok je řídicím dějem celého procesu a jeho rychlost zřejmě roste s velikostí molekuly. Galkin a spol.<sup>11</sup> monitorovali separaci kapalina–kapalina a nukleaci roztoku hemoglobinu mikroskopem v módu diferenčně interferenčního kontrastního zobrazení. Pozorovali vznik husté kapalné fáze při vysoké koncentraci hemoglobinu, ve které došlo k nukleaci polymeru deoxyhemoglobinu S. Dřívější experimentální studie, jako např. dynamický a statický rozptyl světla<sup>12</sup>, diferenční skenovací kalorimetrie<sup>13</sup> a nízkouhlový RTG rozptyl<sup>14,15</sup> potvrdily, že dvoukrokovou nukleaci dochází nejenom k nukleaci bílkovin, ale i koloidních částic a hlavně malých organických molekul (farmaceutik). Dvoukrokový nukleační model byl potvrzen i počítačovou simulací<sup>16</sup> a především byla korelována rychlost nukleace s rychlostí krystalizace a šířkou metastabilní zóny pro velkoobjemové krystalizátory v průmyslu<sup>17</sup>. Rychlost nukleace je definovaná jako počet nukleí vytvořených za jednotku času v jednotce objemu.

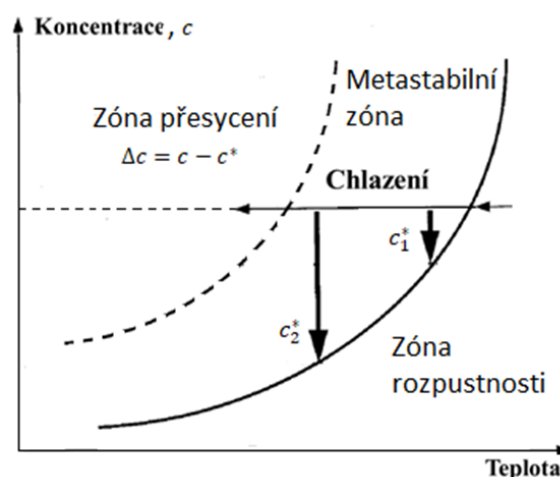
### 3. Kontrola krystalizačního procesu ve farmacii

Krystalizace je dvoustupňový proces, kdy po nukleaci obvykle následuje růst krystalů. Tyto dva kroky však mohou probíhat i paralelně a který dominuje<sup>18</sup>, závisí na přesycení roztoku. Nukleace dominuje, když přesycení roztoku je blízko nebo větší než horní limit metastabilní zóny (vysoké přesycení). Růst krystalů naopak dominuje při nízkém přesycení. To proto, že při nukleaci je kinetika funkcí přesycení  $\Delta c^n$ , kde  $c$  je koncentrace a  $n = 3-6$  (při krystalizaci je  $n = 1$ ). To znamená, že nukleace závisí na přesycení výrazněji než růst krystalů.

Proces, kde dominuje nukleační krok (kineticky řízená krystalizace) bývá uplatňován tam, kde je zapotřebí připravit jemnější částice. Materiál získaný při dominujícím kroku růstu krystalů se nazývá termodynamicky řízená krystalizace. Krystaly získané termodynamicky řízenou krystalizací vykazují úzkou distribuci velikosti částic, nižší povrchovou plochu, dobrou sypanou hmotnost a dobře se suší.

Základní hnací silou krystalizace je přesycení roztoku, které je definováno jako rozdíl ( $\Delta c$ ) aktuální koncentrace v čase ( $c$ ) a koncentrace rovnovážné ( $c^*$ ) (obr. 2), a vzniká následujícími způsoby:

- chlazením,
  - přidávkem antisolventu,
  - odpařováním rozpouštědla,
  - reakční krystalizací,
  - kombinací dvou (případně tří) výše uvedených metod.
- Po dosažení přesycení může ovšem dojít



Obr. 2. Graf závislosti koncentrace roztoku na teplotě. Přesycení roztoku, je definováno jako rozdíl ( $\Delta c$ ) koncentrace aktuální ( $c$ ) a koncentrace rovnovážné ( $c^*$ ). Rozdíl  $c-c_1^*$  představuje malé přesycení (vznik „termodynamického“ krystalu), rozdíl  $c-c_2^*$  představuje velké přesycení (vznik „kinetického“ krystalu)

k nekontrolované nukleaci (primární heterogeni), a tím i k potlačení růstu krystalů. Výsledkem potom bývají malé částice mnohdy pospojované do aglomerátů, které zachycují matečné louhy se zbytkovým rozpouštědlem a nečistoty ve vzniklém materiálu. Tak dochází k redukci efektivního povrchu krystalů, což snižuje rychlost filtrace a prodlužuje dobu sušení (downstream processing). V neposlední řadě může dojít i k tomu, že získaný materiál je amorfní nebo olejovitě fáze (oiling out).

Velmi slibnou technikou pro řízenou krystalizaci je využití upravených povrchů jako heteronukleantů. Heteronukleanty nutí proces krystalizace probíhat nekonvenčními cestami s cílem optimalizovat technologii a výsledné vlastnosti produktu. Např. Eral a spol.<sup>19</sup> studovali biokompatibilní alginátové hydrogely jako heteronukleanty pro řízení krystalizace a současně jako nosiče hydrofobních a hydrofilních API.

#### 3.1. Očkovaná krystalizace

Nejnámější a nejpoužívanější metodou kontroly krystalizačního procesu je záměrná sekundární nukleace neboli očkovaná krystalizace. Jde o proces záměrného vnesení krystalků – oček (*de facto* nukleí) vyráběné API do krystalizačního roztoku. Alternativní metodou je vnesení určitého množství energie (ultrazvuku) do roztoku (metoda sonokrystalizace). V obou případech je cílem od počátku kontrolovat nukleační proces a zabránit jeho nekontrolovatelnému průběhu.

Při očkované krystalizaci je nezbytné znát parametry očkovacího materiálu (distribuci velikosti částic, polymorfni formu, povrchovou energii), dále techniku očkování (práškový materiál nebo očkování v suspenzi) a průběh

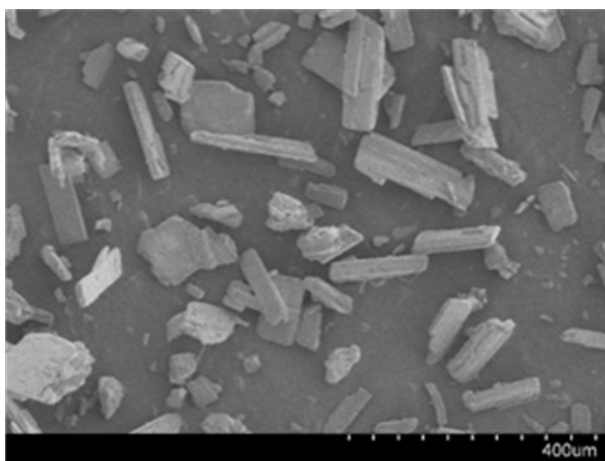
krystalizace po očkování (typ a délku chladicí teplotní rampy)<sup>20</sup>. Rovněž je třeba brát ohled na teplotu roztoku, při které je vnášen očkovací materiál. Očkování blízko křivky rozpustnosti je prováděno při nízkém přesycení (do cca 1/3 šířky metastabilní zóny, viz obr. 2, zde vyjádřeno jako  $\Delta c = c - c_1^*$ ). V této oblasti dochází k malé sekundární nukleaci, růst krystalů je pomalý a výsledkem jsou velké krystaly<sup>21</sup> (viz obr. 3 vlevo). Očkování blízko křivky přesycení je prováděno při velkém přesycení, vyjádřeno jako  $\Delta c = c - c_2^*$  (obr. 2), růst krystalů je rychlý a výsledkem jsou malé krystaly (obr. 3 vpravo).

Množství očkovacího materiálu vnášeného do roztoku s krystalizující látkou se může velmi lišit a opět závisí na důvodu očkování a může být rozděleno následovně:

- špetka, toto množství se přidává hlavně z důvodu, abychom se vyhnuli nežádoucím fázím (např. olejové fázi) a nekontrolované nukleaci. Používá se především v laboratoři, při přenosu do výroby nebývá účinné.
- malé množství (< 1 % hmotnosti produktu), nukleace je kontrolována více než v předchozím případě, většinou ale dominuje nukleační krok nad růstem krystalů, dochází k bimodální (dvouvrcholové) distribuci velikosti částic.
- velké množství (5–10 % hmotnosti produktu), toto množství již zaručuje ve většině případů růst krystalů, je zabráněno bimodální distribuci a sekundární nukleaci.
- masivní množství (> 10 % hmotnosti produktu), toto množství spolehlivě zaručí růst krystalů.

I když jako očkovací materiál lze použít produkt vyrobený v předchozí šarži, velmi pravděpodobně se šarže budou lišit velikostí distribuce částic a ve specifickém povrchu (obr. 4, tab. II).

Pokud produkt vykazuje polymorfni chování, je nutné provést analýzu polymorfni čistoty. Kromě toho je třeba vzít v úvahu tendenci některých roztoků nekrytalovat a vytvářet olejovitou fázi.



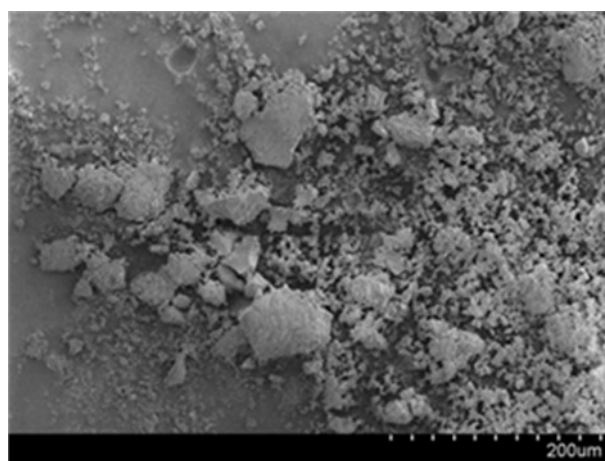
### 3.2. Sonokrystalizace

Jak již bylo zmíněno, další možností, jak kontrolovat nukleaci, je kontrolované vnesení ultrazvukové energie do přesyceného roztoku neboli sonokrystalizace. Sonokrystalizace využívá energie ultrazvuku o frekvenci vyšší než 20 kHz a jevu zvaného kavitace<sup>22</sup>. Kavitace je definována jako vznik, růst a kolaps bublin (dutin) v sonifikované kapalině. Při krystalizačních experimentech se používají ultrazvuková zařízení s frekvencí 20–100 kHz (při vyšších frekvencích by mohlo dojít k tzv. kavitační bariéře). Kavitační bariéra je jev, při kterém cyklus komprese a dekomprese způsobený ultrazvukovými vlnami je tak krátký, že molekuly v kapalině nemohou být odseparovány a vytvořit bubliny, čímž je zabráněno efektu kavitace<sup>23</sup>. Aplikace ultrazvuku má pozitivní efekt na nukleační rychlost, šířku metastabilní zóny, zabraňuje vzniku fází olejovité a amorfni. Vhodně nastavenými vstupními parametry vstupujícího ultrazvuku (výkon, amplituda vlnění) lze připravit žádanou distribuci velikosti částic a povrchové vlastnosti krystalů. Rovněž je možné použít sonokrystalizaci pro tzv.

Tabulka II

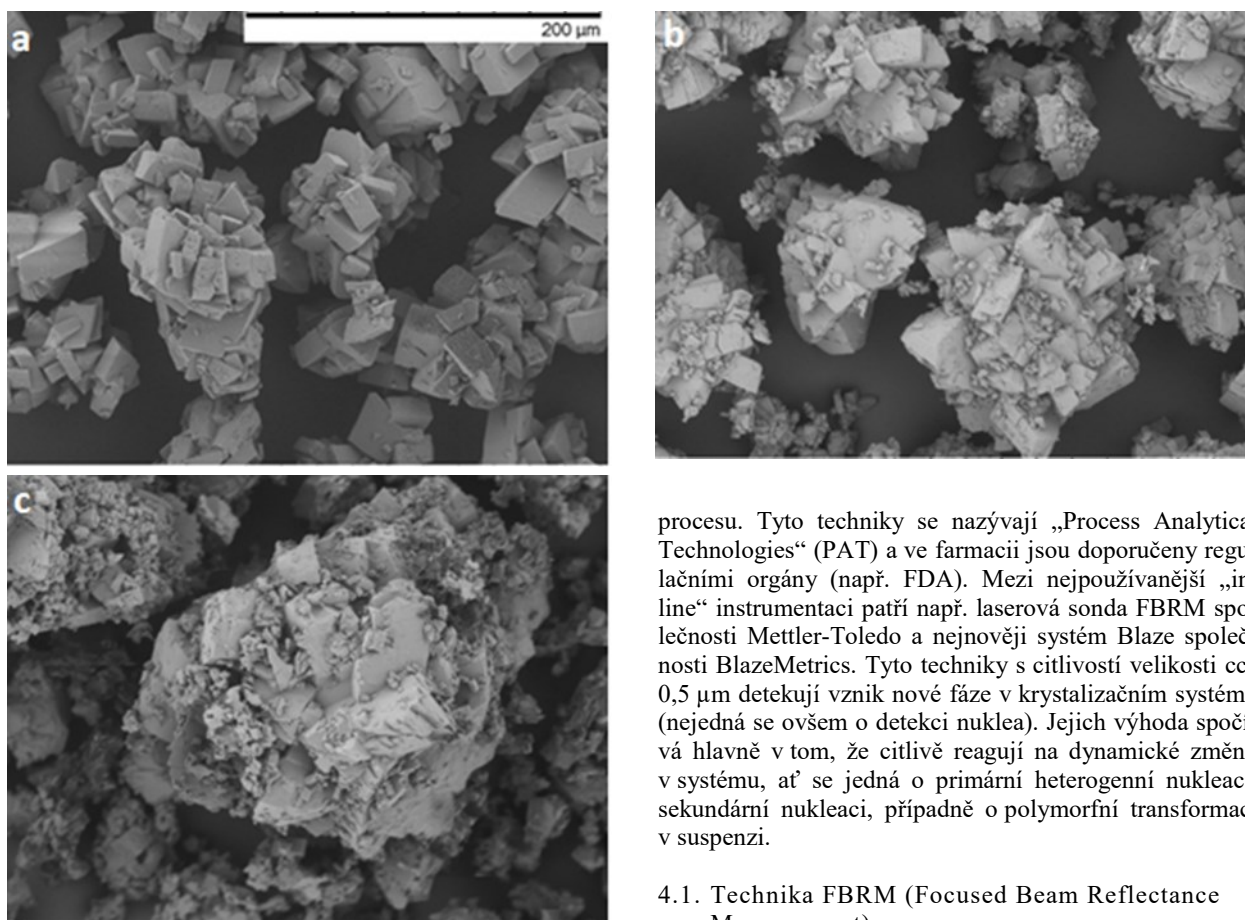
Vliv očkovacího materiálu na finální krystalický produkt. Hodnocené parametry: distribuce velikosti částic – PSD<sub>D90</sub>, kde D90 odpovídá 90% částic, které jsou menší než zmíněná hodnota; specifická plocha povrchu – SSA a výtěžek

Exp.	PSD <sub>D90</sub> [μm]	SSA [m <sup>2</sup> /g]	Výtěžek [%]
1	42	1,7	90
2	88	1,0	82
3	102	0,75	70



Obr. 3. Vlevo: SEM snímek materiálu nazývaného „termodynamický krystal“, získaný při relativním přesycení  $\Delta c = 2$ . Vpravo: SEM snímek materiálu nazývaného „kinetický krystal“, získaný při relativním přesycení  $\Delta c = 20$





Obr. 4. SEM snímky krystalických API monitorující vliv očkovacího materiálu na finální krystal. a) API očkovaná síťovaným materiálem, parametr  $D_{90} = 42 \mu\text{m}$ ; b) API očkovaná materiálem na obr. a), parametr  $D_{90} = 88 \mu\text{m}$ ; c) API očkovaná materiálem na obr. b), parametr  $D_{90} = 102 \mu\text{m}$

„sonomilling“ – tj. redukcí velikosti částic bez nutnosti jejich izolace. Přitom se pomocí ultrazvukového generátoru do krystalovaného systému zavádí energie o intenzitě 10–100 W (optimálně v rozmezí 20–80 W). Ultrazvukové vlnění je možné zavádět do systému buď kontinuálně, nebo pulzně. Variací intenzity zaváděného vlnění a pomocí chladicí teplotní rampy je možné připravit různé typy krystalického materiálu (obr. 5). V tab. III jsou uvedeny tři stejné krystalizační experimenty, které se liší pouze intenzitou zaváděného vlnění. Z obr. 5 a z tab. III je zřejmý vliv intenzity vlnění na design finálního krystalického materiálu.

#### 4. Monitorování nukleačního a krystalizačního procesu

Pokrok v „in-line“ měřicích technikách dává možnost monitorovat a kontrolovat průběh krystalizačního

procesu. Tyto techniky se nazývají „Process Analytical Technologies“ (PAT) a ve farmacii jsou doporučeny regulačními orgány (např. FDA). Mezi nepoužívanější „in-line“ instrumentaci patří např. laserová sonda FBRM společnosti Mettler-Toledo a nejnověji systém Blaze společnosti BlazeMetrics. Tyto techniky s citlivostí velikosti cca  $0,5 \mu\text{m}$  detekují vznik nové fáze v krystalizačním systému (nejedná se ovšem o detekci nuklea). Jejich výhodou spočívá hlavně v tom, že citlivě reagují na dynamické změny v systému, ať se jedná o primární heterogenní nukleaci, sekundární nukleaci, případně o polymorfni transformaci v suspenzi.

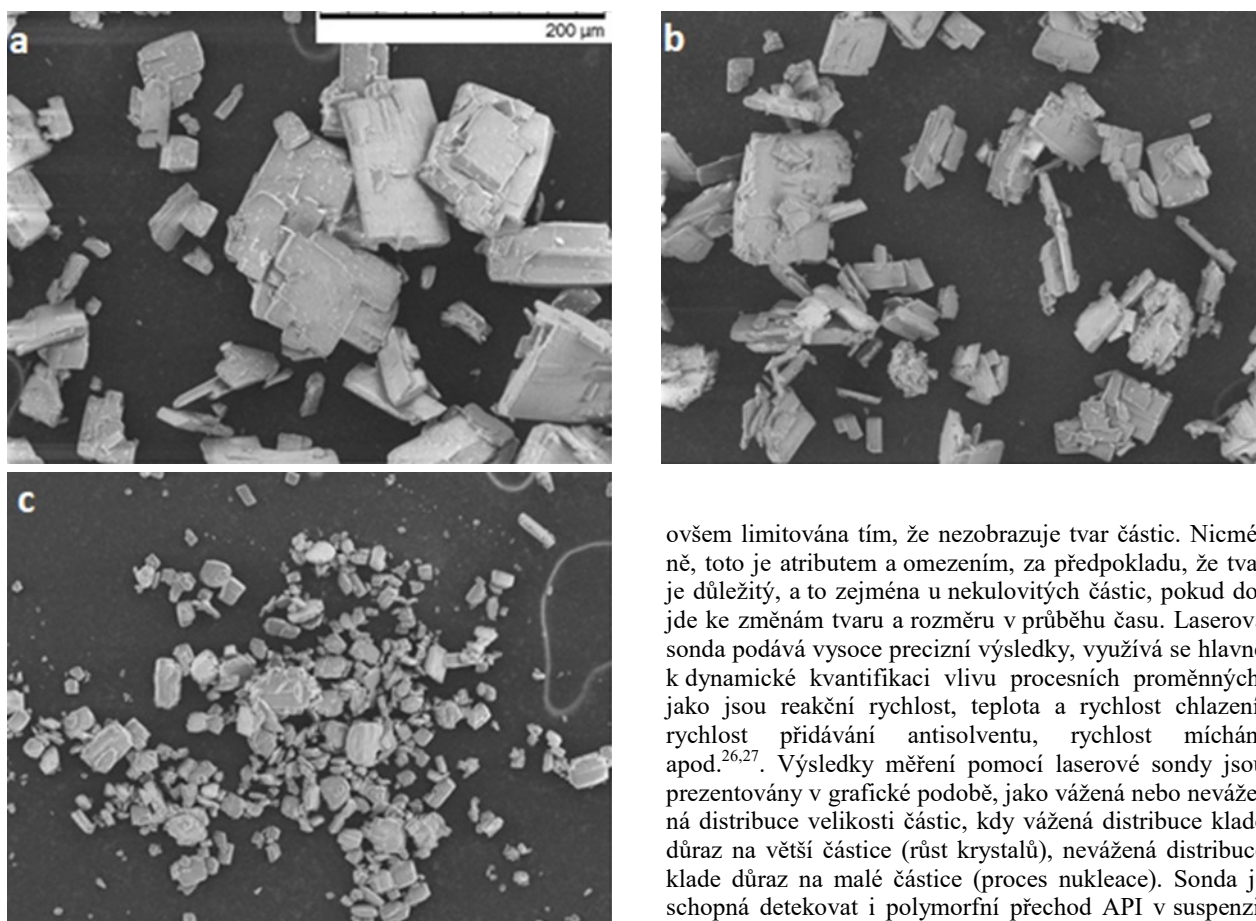
#### 4.1. Technika FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement)

Jedná se o laserovou sondu, která využívá technologie měření světla odraženého na částicích ze světelného paprsku fokusovaného do měřeného média. Když světelný paprsek emitovaný laserem zasáhne krystal, senzor nahraje a analyzuje odražený signál. Metoda FBRM využívá unikátní diskriminační obvod, který umožňuje hodnotit časový interval trvání zpětného odrazu v průběhu pohybu paprsku od jednoho konce částice k protilehlému. Tento časový interval se násobí skenovací rychlostí a výsledkem je délka. Délka měřená touto metodou se nazývá tětivová délka (chord length). Ta je rovna délce přímky mezi který-

Tabulka III

Vliv intenzity ultrazvuku na výslednou distribuci velikosti částic –  $\text{PSD}_{D_{90}}$ , kde  $D_{90}$  odpovídá 90% částic, které jsou menší než zmíněná hodnota

Exp.	$\text{PSD}_{D_{90}}$ [ $\mu\text{m}$ ]	Intenzita ultrazvuku [%]
1	102	20
2	74	40
3	33	60



Obr. 5. SEM snímky krystalické API získané sonokrystalizací za stejných podmínek, lišila se pouze amplituda ultrazvukového vlnění. a) 20 % intenzity ultrazvukového vlnění, parametr  $D_{90} = 102 \mu\text{m}$ ; b) 40 % intenzity ultrazvukového vlnění, parametr  $D_{90} = 74 \mu\text{m}$ ; c) 60 % intenzity ultrazvukového vlnění, parametr  $D_{90} = 33 \mu\text{m}$ . Na ultrazvukové sondě lze nastavit intenzitu (intenzita je úměrná amplitudě), terminologie v literatuře není jednoznačná (viz cit.<sup>24</sup>)

mikoliv dvěma body nacházejícími se na okraji částice nebo aglomerátu. Systém je schopen měřit desítky tisíc těživových délek za sekundu, což poskytuje mohutný zdroj dat pro vyhodnocení jejich distribuce (hodnoty naměřené v průběhu jedné sekundy se třídí podle délky tětivy lineárně do 1400 tříd).

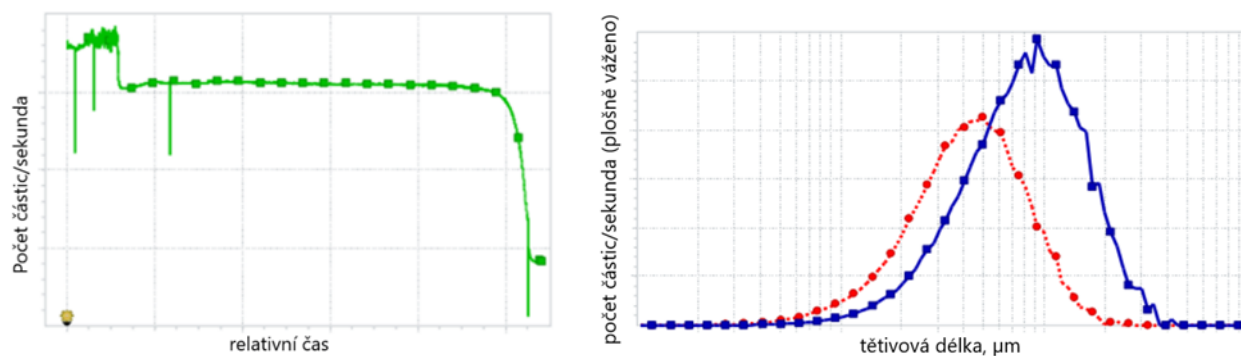
Systém poskytuje v reálném čase údaj o velikosti a koncentraci pevných částic ve zvoleném místě procesního proudu. Měří se částice v rozsahu velikostí od  $0,5 \mu\text{m}$  do  $2,5 \text{ mm}$  a nepředpokládá se jejich sférický tvar. Metoda poskytuje ve dvousekundových intervalech údaj o distribuci velikosti a o počtu částic ve zvolené velikostní kategorii a umožňuje monitorování počtu částic ve specifických oblastech zrnitosti (jemné, hrubé atd.).

Mezi výhody této techniky patří jednoduché ovládání a velmi snadná údržba nebo kalibrace přístroje. Metoda je

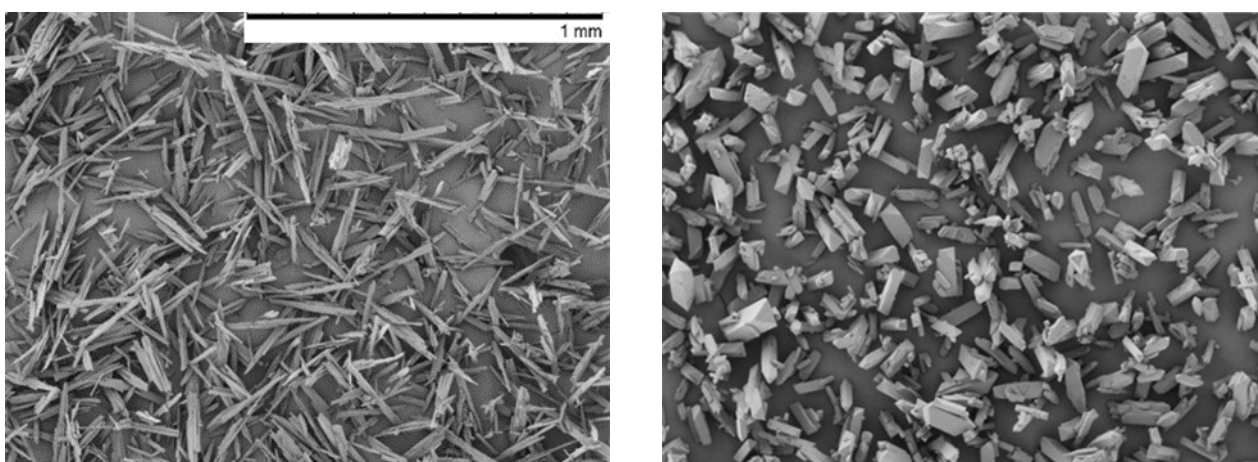
ovšem limitována tím, že nezobrazuje tvar částic. Nicméně, toto je atributem a omezením, za předpokladu, že tvar je důležitý, a to zejména u nekulovitých částic, pokud dojde ke změnám tvaru a rozměru v průběhu času. Laserová sonda podává vysoce precizní výsledky, využívá se hlavně k dynamické kvantifikaci vlivu procesních proměnných, jako jsou reakční rychlost, teplota a rychlost chlazení, rychlost přidávání antisolventu, rychlost míchání apod.<sup>26,27</sup>. Výsledky měření pomocí laserové sondy jsou prezentovány v grafické podobě, jako vážená nebo nevážená distribuce velikosti částic, kdy vážená distribuce klade důraz na větší částice (růst krystalů), nevážená distribuce klade důraz na malé částice (proces nukleace). Sonda je schopná detekovat i polymorfni přechod API v suspenzi, který bývá provázen skokovou změnou velikosti částic, obr. 6 a 7.

#### 4.2. Systém Blaze

Další laserovou technikou je systém Blaze od firmy BlazeMetrics, který sbírá data v reálném čase<sup>24</sup>. Sonda v sobě kombinuje několik technik (podobně jako např. systém Particle Track od firmy Mettler Toledo), čímž poskytuje kompletní kontrolu nad krystalizačním procesem, nenarušuje hydrodynamiku a míchání krystalizátoru, šetří čas a snižuje náklady. Ve srovnání s dříve vyráběnými sondami (FBRM, PVM, atd.) je sonda Blaze o stupeň výše právě díky kombinaci různých technik v jednom zařízení. Stejně jako u FBRM, také sonda Blaze monitoruje distribuci velikosti částic pomocí parametrů  $D_{10}$ ,  $D_{50}$ ,  $D_{90}$ , což znamená, že 10 %; 50 % a 90 % částic je menších než zvolená velikost). Na rozdíl od FBRM, Blaze získává údaje o velikosti z obrazové analýzy. Sonda získává snímky o vysokém rozlišení z celého procesu, které jsou srovnatelné se snímky z optického či elektronového mikroskopu (obr. 8). Počátek krystalizace lze detekovat také pomocí turbidity roztoku. Turbidita charakterizuje zeslabení intenzity primárního paprsku způsobené rozptylem při průchodu disperzní soustavou. Fázovou transformaci lze detekovat Ramanovou spektroskopií, která používá koherentní laser. Protože sbírá data v těsné blízkosti sondy a z většího



Obr. 6. Záznam FBRM. Na obrázku vlevo lze pozorovat prudký pokles celkového počtu částic v krystalizující suspenzi v čase, na obrázku vpravo lze pozorovat posun distribuce tětivových délek směrem k větším částicím (dimorfni transformace dvou krystalových forem)



Obr. 7. Záznam SEM. Dimorfni transformace jedné krystalové modifikace (vlevo) na druhou (vpravo). Snímky pořízené elektronovým mikroskopem potvrzují záznam z laserové sondy, viz obr. 6 vpravo

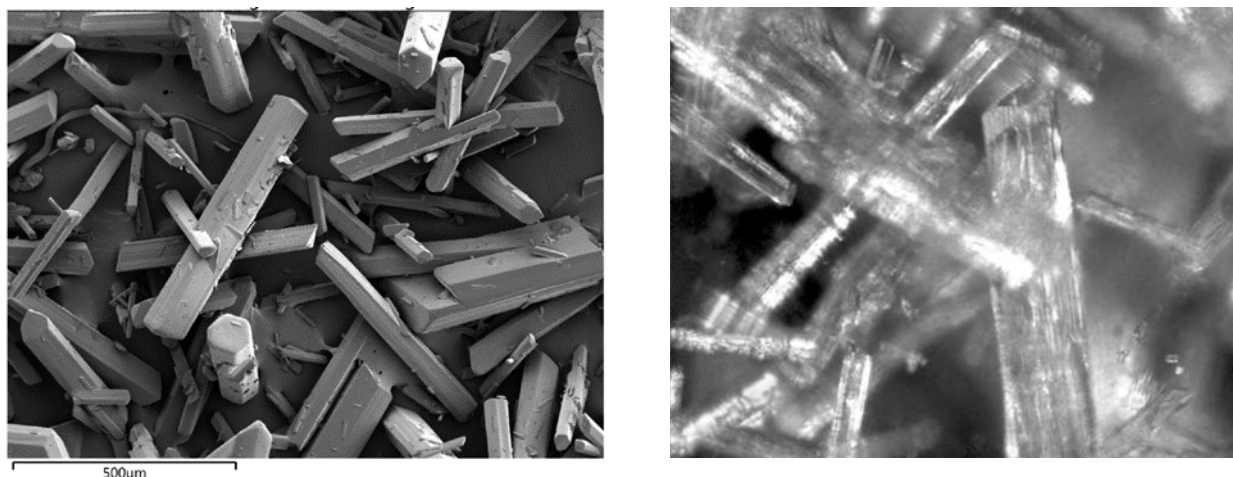
prostoru, má daleko lepší signál v porovnání se standardní Ramanovou sondou.

Nejběžnějším typem krystalizace je krystalizace chlazením. Ideálním výsledkem je potom správná krystalická forma, unimodální (jednovrcholová) distribuce velikosti částic a vysoký výtěžek. Pokud je ovšem zvoleno např. příliš rychlé chlazení, materiál krystalizuje nekontrolovatelně a může docházet k ulpívání částic na sklíčku sondy. Aby byla získána aktuální a nezkrácená data o procesu, tak se sonda musí čistit. Pro dosažení maximálního možného výtěžku je systém často ochlazován k teplotám blízkým 0 °C. Na základě měření turbidity se ukáže, zda má další chlazení smysl, zda dochází k růstu krystalů nebo sekundární nukleaci. Pokud je turbidita roztoku konstantní s klesající teplotou, je zbytečné pokračovat v chlazení, a tím se zkrátí délka procesu. Pokud turbidita roste i při konstantní teplotě a systém není možné dále chladit (např. z technologických nebo polymorfních důvodů), hledá se optimální poměr mezi dobou domíchání a výtěžkem. Čím déle je suspenze míchána, tím je větší šance, že se budou

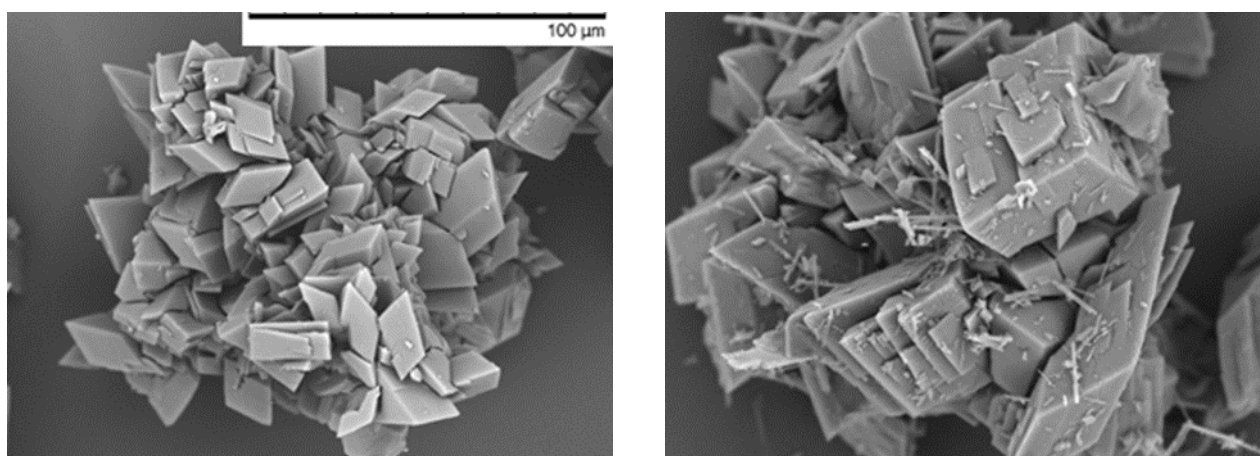
krystaly rozbíjet o sebe nebo díky nárazům o stěny krystalizátoru. Všechny změny se okamžitě promítnou do distribuce velikosti částic. V porovnání s dříve získanými distribucemi a v kombinaci s mikroskopickými snímky lze okamžitě vyhodnotit, jak bude proces dále pokračovat. Podobně lze vidět i vznik agregátů. Velice cenné informace poskytuje sonda i během Ostwaldova zrání. Porovnání krystalických materiálů po jednotlivých cyklech ukáže, zda má Ostwaldovo zrání významný vliv na distribuci a kolik cyklů je potřeba udělat.

Podobná situace je také u očkované krystalizace. Tady už je jistá kontrola nad krystalizací, a to přidáváním očkovacího materiálu o definovaných vlastnostech. Je ale zvolený očkovací materiál dostatečně vhodný a přidávaný v dostatečném množství nebo je ho přidáváno zbytečně malé množství oček způsobí sekundární nukleaci, která se projeví bimodální distribucí. Podobného výsledku je dosaženo i s očky o malém specifickém povrchu, v tomto případě není zaručen ani vznik stejného polymorfu, jako má očkovací materiál (obr. 9). Někdy se dá jiný





Obr. 8. Porovnání SEM snímku (vlevo) a mikroskopického snímku stejné API získaného pomocí systému Blaze (vpravo)



Obr. 9. Porovnání SEM snímků krystalické API získaných očkováním materiálem o různé specifické ploše povrchu – SSA (polymorfni forma 1, SSA = 2 m<sup>2</sup>/g – vlevo; směs polymorfniích forem 1 a 2, SSA < 1 m<sup>2</sup>/g – vpravo)

polymorf poznat pouhým mikroskopem na základě rozdílné morfologie částic. Identifikace pomocí Ramanovy spektroskopie je ale daleko spolehlivější, a pokud jsou k dispozici spektra (standards) čistých polymorfů, je evidentní, který polymorf vykrytalizoval<sup>25</sup>.

Velmi podobné je to také u krystalizace s antisolventem. Na základě měření turbidity lze poznat, kdy je systém plně desupersaturován a jaké minimální množství antisolventu musí být přidáno. Pomalým přidáváním antisolventu se připravují velké, pěkně vyvinuté krystaly. Pokud je rychlost vhodně zvolena, celá distribuce částic se bude posouvat doprava k větším velikostem a zůstane unimodální.

Sonda se dá také využít k porovnání materiálů před filtrací a po sušení. Během filtrace a sušení může docházet k aglomeraci, spékání krystalků, mohou vznikat defekty na povrchu u solvátů nebo může docházet k úplné transformaci na jinou polymorfni formu.

Vývoj procesu krystalizace a jeho optimalizace se použitím systému Blaze stává rychlejší, efektivnější a jednodušší, protože je možné redukovat množství experimentů a není třeba postupně odebírat vzorky a čekat na jejich analýzu.

#### Seznam zkratk

API	Active Pharmaceutical Ingredient
CNT	Classical Nucleation Theory
FDA	Food and Drug Administration
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
PAT	Process Analytical Technologies
PVM	Particle Vision and Measurement
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPM	Scanning Probe Microscopy
SSA	Specific Surface Area
2S	two step



## LITERATURA

1. <https://www.vaisala.com/system/files/documents/Pharmaceutical-Crystallization-application-note-B211937EN.pdf>, staženo 20. 5. 2022.
2. Bártová A., Gabriel R., Blahová Prudilová B., Otyepková E., Malina L., Otyepka M.: *Powder Technology* 402, 117334 (2022).
3. Black S. N., v knize: *Handbook of Industrial Crystallization, Chapter 13 – Crystallization in the Pharmaceutical Industry*. 3. vyd. (Myerson A. S., Erdemir D., Lee A. Y., ed.), str. 380. Cambridge University Press, Cambridge 2019.
4. Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 101, 3 (2007).
5. Ostwald W.: *Z. Phys. Chem.* 22, 289 (1897).
6. Volmer M., Weber A. Z.: *Phys. Chem.* 119, 277 (1926).
7. Karthika S., Radhakrishnan T. K., Kalaichelvi P.: *Cryst. Growth Des.* 16, 6663 (2016).
8. Mullin J. W.: *Crystallization*. 4. vyd. Butterworth-Heinemann, Ltd., Oxford 2001.
9. Hilfiker R.: *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*. Wiley-VCH, Weinheim 2006
10. Vekilov P. G.: *Cryst. Growth Des.* 10, 5007 (2010).
11. Galkin O., Chen K., Nagel R. L., Hirsch R. E., Vekilov P. G.: *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8479 (2002).
12. Georgalis Y., Umbach P., Raptis J., Saenger W.: *Acta Crystallogr.* 53, 691 (1997).
13. Igarashi K., Azuma M., Kato J., Ooshima H.: *J. Cryst. Growth* 204, 191 (1999).
14. Pontoni D., Narayanan T., Rennie A. R.: *Prog. Coll. Polym. Sci.* 123, 227 (2004).
15. Chattopadhyay A. S., Erdemir D., Evans J. M., Ilavski J., Amenitsch H., Segre C. U., Myerson S.: *Cryst. Growth Des.* 5, 523 (2005).
16. Wolde P. R., Frenkel D.: *Design Science* 227, 1975 (1997).
17. Devos C., Van Gerven T., Kuhn S.: *Cryst. Growth Des.* 21, 2541 (2021).
18. Tung H.-H., Edward L. Paul, Midler M., Mc Cauley J.: *Crystallization of Organic Compounds: An Industrial Perspective*. Wiley, New Jersey 2009.
19. Eral H. B., López-Mejías V., O'Mahony M., Trout B. L., Myerson A. S., Doyle P. S.: *Cryst. Growth Des.* 14, 2073 (2014).
20. Zhang F., Shan B., Wang Y., Zhu Z., Yu Z.-Q., Ma C. Y.: *Org. Process Res. Dev.* 25, 1496 (2021).
21. Yu Z.-Q., Yeoh A., Chow P. S., Tan R. B. H.: *Org. Process Res. Dev.* 20, 2100 (2016).
22. Lee J., Yasui K., Ashokkumar M., Kentish S. E.: *Cryst. Growth Des.* 18, 5108 (2018).
23. Capelo-Martínez J. L. (ed.): *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*. Wiley-VCH, Weinheim 2009.
24. <https://www.blazemetrics.com/>, staženo 19. 7. 2022.
25. Nicoud L., Licordari F., Myerson A. S.: *CrystEngComm* 21, 2105 (2019).
26. Leyssens T., Baudry C., Escudero Hernandez M. L.: *Org. Process Res. Dev.* 15, 413 (2011).
27. Ramisetty K. A., Kumar K. V., Rasmuson A. C.: *Org. Process Res. Dev.* 23, 935 (2019).

**R. Gabriel<sup>a</sup>, A. Bártová<sup>a,b</sup>, D. Šahnić<sup>c</sup>, and B. Kratochvíl<sup>d</sup>** (<sup>a</sup> *Teva Czech Industries, Research and Development, Opava*, <sup>b</sup> *Department of Physical Chemistry, Palacký University Olomouc*, <sup>c</sup> *PLIVA Croatia Ltd. (member of TEVA group), API Research & Development, Zagreb, Croatia*, <sup>d</sup> *Department of Solid State Chemistry, University of Chemistry and Technology Prague*): **The Importance and Control of the Nucleation Process for the Crystallization of Pharmaceutical Substances**

The text is a contemporary continuation of an earlier publication, Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 101, 3 (2007). It describes mainly the nucleation process (two-step nucleation of active substances in pharmacy) and crystallization control processes (seeded crystallization and sonocrystallization). The focus of the work is the description of the nucleation process monitoring by modern analytical technologies, i.e., Focused Beam Reflectance Measurement (FBRM) and the BlazeMetrics system. Both methods presently provide the best available information for a deeper understanding of the nucleation process mechanism in crystallizing active substances. The work is documented by high quality and original photographic attachments of the crystallizing material.

Full text English translation is available in the on-line version.

Keywords: crystallization of pharmaceutical substances, nucleation and crystallization process control, seeded crystallization, sonocrystallization, FBRM technique, Blaze system

● Gabriel R., Bártová A., Šahnić D., Kratochvíl B.: *Chem. Listy* 116, 737–745 (2022).

● <https://doi.org/10.54779/chl20220737>