

# Šaržna kristalizacija fosamprenavir-kalcija

---

Šimatović, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:446478>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Valentina Šimatović**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2021.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKO INŽENJERSTVO

**Valentina Šimatović**

**ŠARŽNA KRISTALIZACIJA FOSAMPRENAVIR-KALCIJA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum, Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu

prof. dr. sc. Nenad Bolf, Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu

prof. dr. sc. Mirela Leskovic, Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, rujan 2021.

*Diplomski rad izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo, akademska godina 2020. / 2021.*

*Ovo istraživanje financira se iz europskih strukturnih i investicijskih fondova, broj potpore KK.01.1.1.07.0017 (CrystAPC - napredna kontrola procesa kristalizacije).*

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Jasni Prlić Kardum na ponuđenoj temi, predanom znanju, razumijevanju, pomoći i vodstvu, te ugodnom društvu tijekom izrade ovog rada.*

*Također, zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo na susretljivosti i pomoći u laboratoriju Zavoda.*

*Najviše hvala mojoj obitelji na ljubavi i beskrajnoj podršci koju mi pružate čitav život. Hvala što ste vjerovali u mene i bili moj "plavi telefon" u lijepim i teškim danima. Hvala vam za vjetar u leđa kada je to bilo najpotrebnije.*

*Na kraju, hvala mom dečku Josipu za podršku i strpljenje, te razumijevanje u danima kada je bilo puno učenja.*

## SAŽETAK

Većina postupaka farmaceutske proizvodnje uključuje niz procesa kristalizacije kako bi se dobio produkt željenih svojstava. Radni uvjeti procesa kristalizacije određuju fizikalna svojstva proizvoda, poput čistoće, oblika i raspodjele veličine kristala.

Nakon pretraživanja sustava i odabira pogodnog otapala i antiotapala provedena je šaržna kristalizacija fosampranavir kalcija uz dodatak antiotapala vode pri temperaturi 25°C i 30°C. U radu je ispitan utjecaj dodatka različitog volumnog udjela antiotapala na granulometrijska svojstva kristala fosamprenavir kalcija. Fosamprenavir kalcij se koristi kao predlijek amprenavira u borbi protiv virusa humane imunodeficijencije.

Utvrđeno je da povećanjem volumnog udjela antiotapala dolazi do smanjenja koncentracije otopine, koncentracija postiže vrlo niske vrijednosti na oko 30% udjela vode, iz čega bi se moglo zaključiti da je došlo do izdvajanja većine soli iz otopine. Na temelju slika dobivenih svjetlosnim mikroskopom, te raspodjele veličine kristala snimljene rendgenskom difrakcijom ustanovljen porast udjela sitnijih kristala s porastom volumnog udjela antiotapala. Također, pokazano je da su kristali dobiveni u eksperimentima provedenim na višoj temperaturi (30°C) krupniji, a udio sitnijih čestica (u području oko 1  $\mu\text{m}$ ) je znatno manji.

Kinetičke konstante: konstanta brzine rasta kristala  $k_g$  i red rasta kristala  $g$  određene su potencijalnom jednačinom, a prisutnost polimorfničkih formi u uzorcima utvrđena je analizom DSC-krivulja dobivenih tehnikom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC).

**Ključne riječi:** kristalizacija uz dodatak antiotapala, fosamprenavir kalcij, granulometrijska svojstva kristala, kinetičke konstante

## SUMMARY

Most pharmaceutical manufacturing processes include a series of crystallization processes to obtain the product of the desired properties. The operating conditions of the crystallization process determine the physical properties of the products such as the crystal purity, shape, and size distribution.

After the search and selection of suitable solvent and anti-solvent, batch crystallization of fosamprenavir calcium was performed with the addition of water at 25 ° C and 30 ° C.

The effect of the addition of a different volume fraction of antisolvents on the granulometric properties of fosamprenavir calcium crystals was investigated. Fosamprenavir calcium is used as a prodrug of amprenavir in the fight against human immunodeficiency virus.

It was found that increasing the volume fraction of anti-solvent leads to a decrease in the concentration of the solution, the concentration reaches very low values at about 30% water content, from which it could be concluded that most of the salts were separated from the solution.

Based on the images obtained by light microscopy and the crystal size distribution determined using laser diffraction method, an increase in the proportion of smaller crystals with an increase in the volume fraction of antisolvents was established. Also, it was shown that the crystals obtained in the experiments at a higher temperature (30 ° C) were larger, and the proportion of smaller particles (in the range of about 1  $\mu\text{m}$ ) was significantly smaller.

Kinetic constants: the crystal growth rate constant  $k_g$  and the crystal growth order  $g$  were determined by the potential equation, and the presence of polymorphic forms in the samples was determined by analysis of DSC-curves obtained by differential scanning calorimetry (DSC).

**Keywords:** antisolvent crystallization, fosamprenavir calcium, granulometric properties, kinetic constants

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. KRISTALIZACIJA .....	2
2.2. TOPLJIVOST .....	3
2.3. METASTABILNA ZONA .....	4
2.4. NUKLEACIJA .....	6
2.4.1. Primarna nukleacija .....	6
2.4.2. Sekundarna nukleacija .....	8
2.5. RAST KRISTALA .....	9
2.6. KRISTALI .....	11
2.6.1. Struktura kristala .....	11
2.6.2. Oblik kristala .....	12
2.6.3. Veličina i raspodjela veličina kristala .....	13
2. 7. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE KRISTALA .....	14
2.7.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija .....	14
2.7.2. Fourier-transformacijska infracrvena spektroskopija .....	15
2.7.3. Rendgenska difrakcija (x-ray diffraction – XRD) .....	15
2.8. POLIMORFIZAM .....	16
2.9. ŠARŽNI KRISTALIZATOR .....	17
2.10. KRISTALIZACIJA DODATKOM ANTIOTAPALA .....	18
2.11. PRIMJENA KRISTALIZACIJE U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI .....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	20
3.1. SVRHA RADA .....	20
3.2. MATERIJALI .....	20
3.2.1. Fosamprenavir kalcij .....	20
3.2.2. Otapala .....	22
3.3. APARATURA .....	23
3.3.1. Uređaj za određivanje topljivosti soli u različitim otapalima .....	23
3.3.2. Uređaj za provođenje kristalizacije .....	23
3.3.3. Uređaji za karakterizaciju produkta .....	25
3.4. OPIS PROCESA KRISTALIZACIJE UZ DODATAK ANTIOTAPALA .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	29
4.1. Odabir otapala i određivanje širine metastabilne zone .....	29
4.2. Ispitivanje antiotapala .....	31
4.3. Ovisnost topljivosti fosamprenavir kalcija o odjelu antiotapala .....	32
4.4. Šaržna kristalizacija uz dodatak antiotapala .....	33



4.5. Granulometrijska svojstva kristala.....	35
4.6. Određivanje kinetičkih parametara .....	39
4.7. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije .....	41
5. ZAKLJUČAK .....	43
6. POPIS SIMBOLA.....	44
7. LITERATURA.....	45
8. ŽIVOTOPIS .....	47

## 1. UVOD

Farmaceutska, kemijska i prehrambena industrija su jedne od brojnih industrija u kojima se koristi postupak kristalizacije. Provodi se u svrhu nastajanja nove faze, čišćenja kristala od nečistoća nastalih tijekom proizvodnje ili separacije smjese. Kristalizacija predstavlja bitan korak za dobivanje kemijskih i farmaceutskih proizvoda visoke kvalitete.

Djelatne tvari koje su predmet istraživanja i razvoja u farmaceutskoj industriji, složeni su organski spojevi skloni aglomeraciji, izuljivanju (oiling out) ili nastanku hidrata i/ili solvata tijekom kristalizacije [1]. Kako bi se izbjegle ove pojave, potrebno je razviti postupak kristalizacije kojim će se u kontroliranim uvjetima dobiti produkt određene čistoće, granulometrijskih svojstava i polimorfnog oblika. Granulometrijska svojstva kristala utječu na procese koji se odvijaju nakon kristalizacije (filtriranje i sušenje), a nastanak polimorfa može dovesti do različitih fizikalnih i kemijskih svojstava poput topljivosti i stabilnosti [2].

Kristalizacija se može provoditi različitim postupcima kojima se utječe na prezasićenost koja je glavni čimbenik pri nastanku kristala definiranih svojstava. Dodavanje antiotapala potencijalno je najbolja metoda za postizanje kontrolirane i unimodalne raspodjele veličine čestica.

U radu je istražena kristalizacija uz dodatak antiotapala fosamprenavir kalcija koji se koristi kao djelatna tvar za liječenje HIV-a. U preliminarnim ispitivanjima određena je širina metastabilne zone za izabranu smjesu otapala (80 mas% metanola i 20 mas % etanola), ovisnost topljivosti fosamprenavir kalcija o odjelu dodane vode. Nadalje, ispitan je utjecaj početne koncentracije zasićenosti (25 °C i 30 °C) pri određenoj brzini dodatka antiotapala u različitim volumnim udjelima na granulometrijske karakteristike nastalih kristala. Metoda laserske difrakcije korištena je kako bi se odredila raspodjela veličina kristala, dok je oblik kristala praćen upotrebom svjetlosnog mikroskopa. Kinetika procesa opisana je pomoću odgovarajućih potencijalnih jednadžbi.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KRISTALIZACIJA

Kristalizacija je toplinsko separacijski proces kojim nastaje nova čvrsta faza. Dakle, dolazi do fazne promjene i to kristalizacijom iz otopine, taline ili parne faze (slika 1). U industrijskim sustavima se najčešće provodi kristalizacija iz otopine.

Preduvjet koji treba zadovoljiti da bi do kristalizacije došlo je postojanje pokretačke sile procesa kristalizacije. Pokretačka sila je razlika koncentracije otopine i ravnotežne koncentracije, a naziva se prezasićenost. Drugim riječima, kristalizacija se javlja u otopinama kojima je koncentracija veća od ravnotežne koncentracije. Porastom stupnja prezasićenosti raste i pokretačka sila. Potrebna prezasićenost se može postići smanjenjem topljivosti otopljene tvari (npr. dodatak antiotapala, promjena temperature) ili povećanjem koncentracije otopljene tvari (npr. ispravanje otapala) [3,4]. Nakon postizanja odgovarajuće prezasićenosti, slijedi stvaranje centara nukleacije koji dalje rastu u kristale. Nukleacija i rast kristala ovise o stupnju prezasićenosti otopine i imaju važnu ulogu pri utvrđivanju čistoće, morfologije i raspodjele veličina čestica konačnog produkta [5].



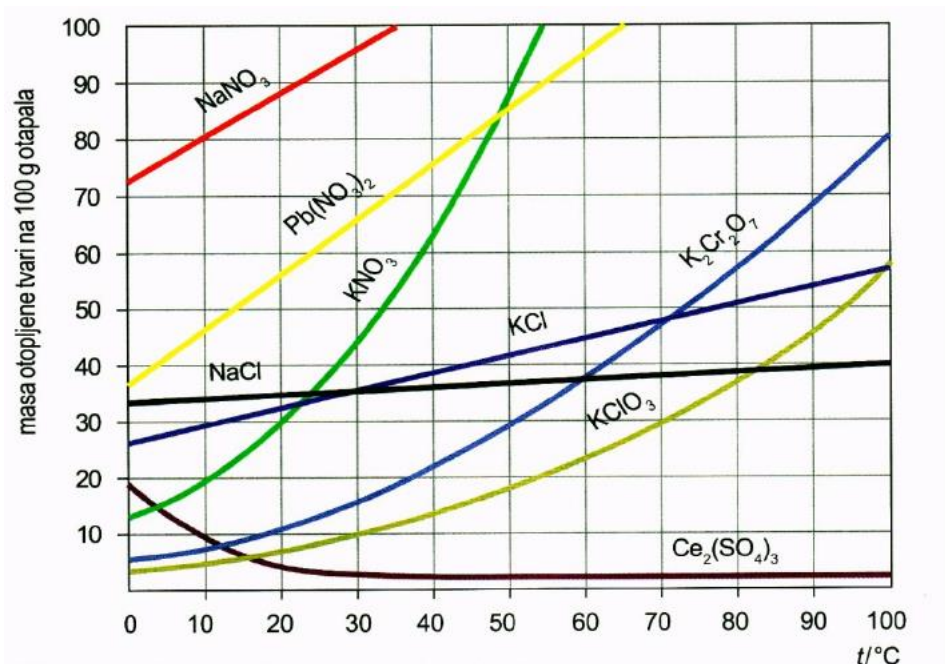
**Slika 1.** Načini provođenja procesa kristalizacije [6]

## 2.2. TOPLJIVOST

Otopina predstavlja homogenu smjesu dvije ili više komponenti. Sastoji od komponente u suvišku koja se naziva otapalo i ostalih komponenti koje se nazivaju otopljene tvari [7]. Otapalo treba biti takvo da može otopiti tvar, mora imati zadovoljavajuću čistoću, ne smije stvarati reakciju s otopljenom tvari i ne smije pokazivati svojstva toksičnosti i zapaljivosti.

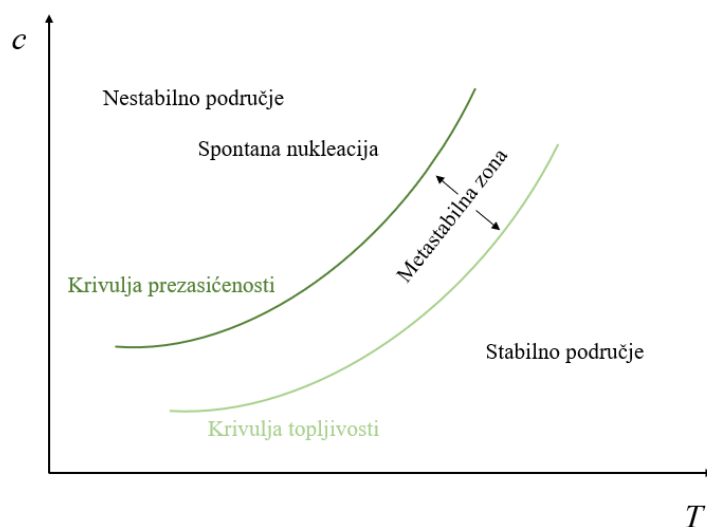
Topljivost neke komponente određuju međudjelovanja između molekula otopljene tvari i molekula otapala. Topljivost se opisuje kao maksimalna količina tvari koju je moguće otopiti u nekom otapalu pri zadanim uvjetima, te tako nastalu otopinu nazivamo zasićenom. Stanje zasićenosti (ravnoteža) je postignuto kada više nema promjene u sastavu daljnjim dodatkom tvari koja se otapa.

Za svaku tvar postoji maksimalna količina tvari koja je topljiva u određenom otapalu pri zadanoj temperaturi. Za dvokomponentni sustav topljivost jedne komponente u drugoj ovisi o temperaturi i tlaku. Za višekomponentne sustave topljivost jedne komponente ovisi također i o udjelu preostalih komponenti u sustavu. Utjecaj tlaka je u većini slučajeva zanemariv, dok temperatura ima znatan utjecaj na topljivost (slika 2).



Slika 2. Krivulje topljivosti soli [8]

Na slici 3 prikazan je fazni dijagram na kojem se mogu uočiti različita stanja stabilnosti otopine. Krivulje topljivosti i prezasićenosti dijele fazni dijagram u tri područja. Ispod krivulje topljivosti nalazi se područje koje odgovara nezasićenoj (stabilnoj) otopini gdje ne dolazi do kristalizacije. Iznad krivulje prezasićenosti nalazi se prezasićeno (nestabilno) područje gdje se odvija spontana nukleacija zahvaljujući dovoljno velikoj pokretačkoj sili. Između tih krivulja se nalazi metastabilna zona [4].



**Slika 3.** Fazni dijagram

### 2.3. METASTABILNA ZONA

U dijagramu topljivosti metastabilna zona je omeđena krivuljom prezasićenosti i topljivosti te predstavlja okruženje u kojem kristali rastu. Važan parametar je širina metastabilne zone jer utječe na karakteristike dobivenog kristala (veličina i oblik kristala te njihova raspodjela). Širinu metastabilne zone definiraju razlika temperatura zasićenosti ( $T_s$ ) i nukleacije ( $T_n$ ), pri kojoj dolazi do pojave prvih vidljivih kristala. Odrediti se može labaratorijski pri različitoj koncentraciji otopljene tvari i uz različitu brzinu hlađenja. [9]

Čimbenici koji utječu na širinu metastabilne zone [10]:

#### 1. Temperatura

Širina metastabilne zone smanjuje se s povećanjem ravnotežne temperature zasićenosti otopine prema jednadžbi (1), što je potvrđeno eksperimentalnim mjerenjima nekoliko znanstvenika, koja su pokazala smanjenje maksimalne prezasićenosti,  $S_{\max}$ , s povećanjem temperature (E.J. De Jong, 1978.):

$$S_{\max} \sim \exp(\text{konst} / T^{3/2}) \quad (1)$$

#### 2. Utjecaj nečistoća

Prisutnost nečistoća dovodi do suženja širine metastabilne zone. Iz tog je razloga potrebno filtrirati otopinu neposredno prije kristalizacije, kako bi se smanjio utjecaj nečistoća na tijek procesa.

#### 3. Toplinsko tretiranje otopine

Otopine kod kojih je temperatura nekoliko sati održavana iznad temperature zasićenosti, imaju širu metastabilnu zonu u odnosu na otopine čije temperature nisu održavane znatno iznad ravnotežne.

#### 4. Brzina hlađenja

Porastom brzine hlađenja raste širina metastabilne zone. Otopina se prebrzo ohladi te je onemogućeno postizanje dobrog prijenosa tvari i topline, to jest nije osigurano dovoljno vrijeme za stvaranje stabilnih nukleusa.

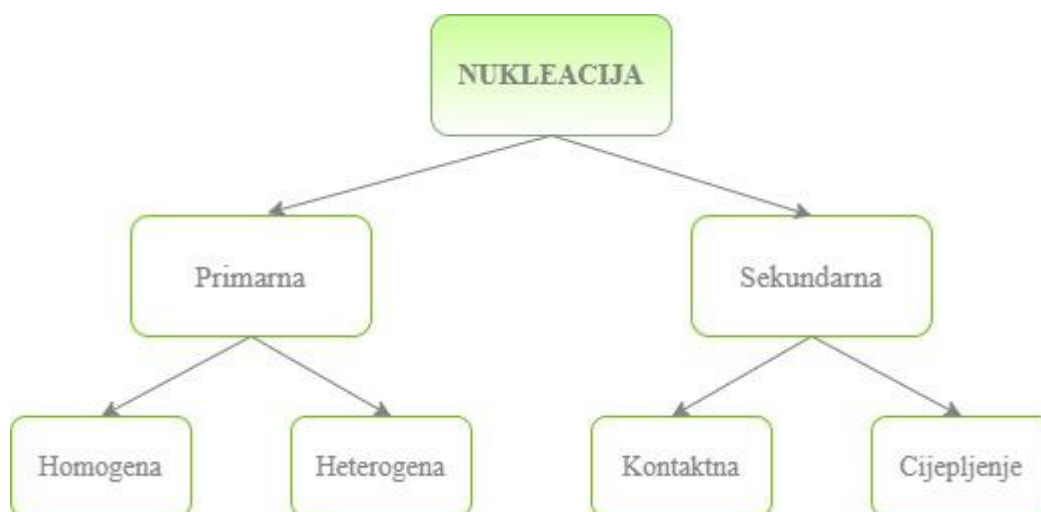
#### 5. Intenzitet miješanja

Širina metastabilne zone se smanjuje porastom brzine vrtnje miješala zbog poboljšanja hidrodinamičkih uvjeta za procese prijenosa topline i tvari. Postoji optimalna brzina vrtnje kod koje se postižu minimalni otpori prijenosu tvari (minimalna debljina graničnog sloja). Daljnjim porastom intenziteta miješanja ne očituju se povoljniji hidrodinamički uvjeti.

## 2.4. NUKLEACIJA

Nakon što se postigla potrebna prezasićenost nužna za kristalizaciju, sustav teži stanju termodinamičke ravnoteže nukleacijom i rastom nukleusa.

Nukleacija se može podijeliti na primarnu i sekundarnu. Primarna nukleacija nije ovisna o prisutnosti kristala u otopini, dok se sekundarna nukleacija javlja zbog postojanja kristala u otopini [4]. Slika 4 prikazuje mehanizme nukleacije.



**Slika 4.** Mehanizmi nukleacije

### 2.4.1. Primarna nukleacija

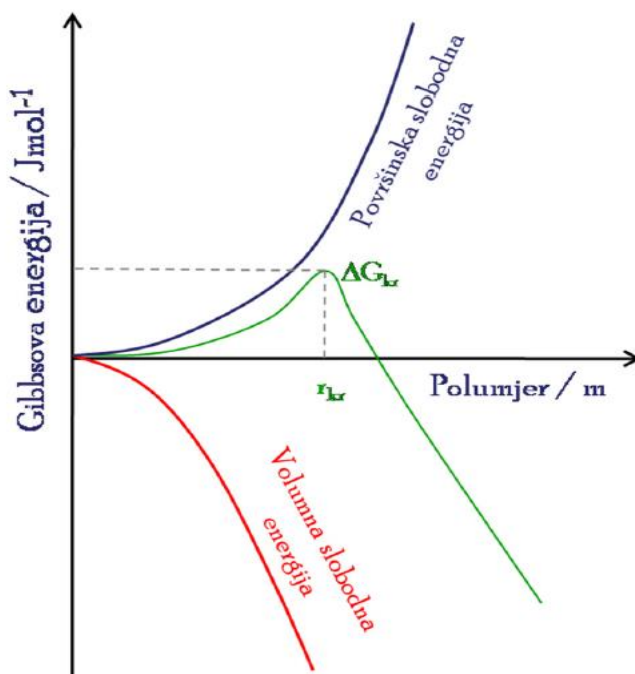
#### 2.4.1.1. Homogena nukleacija

Spontano započinje u prezasićenoj otopini, kao posljedica sudara između iona i molekula pri čemu nastaju nukleusi slučajnim orijentiranjem molekula ili iona.

Gibbs (1928), Volmer (1939) i dr. su razvili termodinamički izraz (2) za homogenu nukleaciju. Slobodna Gibbsova energija bitna za nastajanje nove faze je zbroj površinske slobodne energije (pozitivna vrijednost) i volumne slobodne energije (negativna vrijednost):

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v = 4\pi r^2 \sigma + \frac{4}{3}\pi r^3 \Delta G_v \quad (2)$$

U početnoj fazi formiranja sitnih nukleusa ( $r < r_{kr}$ ) u prezasićenoj otopini, površinska slobodna energija,  $\Delta G_s$ , dominira nad volumnom,  $\Delta G_v$ , i u tom je slučaju promjena slobodne Gibbsove energije pozitivna te dolazi do njihovog otapanja (Slika 5). Dok je god promjena Gibbsove energije pozitivna nukleusi će se otapati, tek kada iznos bude negativan će doći do nukleacije. Povećanje prezasićenosti osigurava potrebnu pokretačku silu za nadvladavanje površinske slobodne energije te tako potiče rast nukleusa. Kada nukleusi postignu kritičnu veličinu ( $r = r_{kr}$ ), ukupna Gibbsova energija posjeduje maksimalnu vrijednost ( $\Delta G_{kr}$ ) te tada nukleusi veći od kritične veličine ( $r > r_{kr}$ ) nastavljaju rast u kristale vidljivih dimenzija na temelju konstantne adsorpcije rastućih jedinica iz otopine na energetski povoljna mjesta na kristalnoj površini [7,11].



**Slika 5.** Kritični radijus nukleusa [11]



### **2.4.1.2. Heterogena nukleacija**

Heterogena nukleacija je izazvana postojanjem nečistoća. Strane čestice prisutne u prezasićenoj otopini dovode do sniženja energije potrebne za nukleaciju. Zbog toga kod heterogenih sustava dolazi do nukleacije pri nižem stupnju prezasićenosti nego kod homogenih sustava.

### **2.4.2. Sekundarna nukleacija**

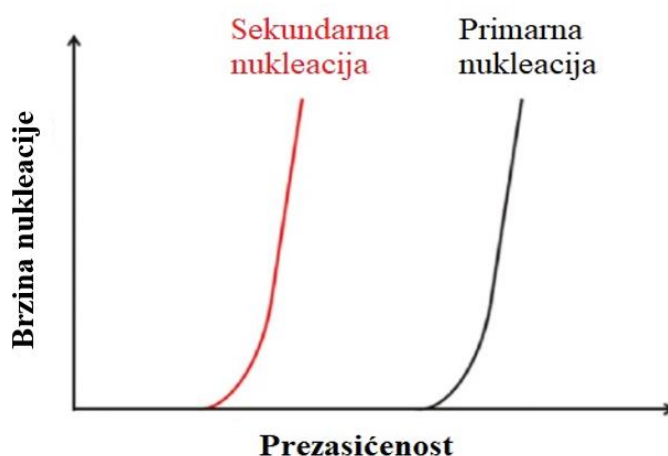
Sekundarna nukleacija se javlja u sustavima kada se u prezasićenoj otopini već nalaze kristali, pri čemu ti kristali predstavljaju centre nukleacije.

Sekundarni nukleusi nastaju različitim mehanizmima [4]:

- cijepljenjem - dodatak sitnih kristala (cjepiva) u prezasićenu otopinu
- sudarima - krhotine kristala nastale zbog sudara kristal-kristal, kristal-stjenka, kristal-miješalo
- miješanjem - smična naprezanja fluida u prisustvu kristala većih od kritičnog nukleusa

Eksperimentalno dobiveni podaci iz industrije pokazuju da upravo ovakva vrsta nukleacije uglavnom dominira procesom. U nekontroliranim procesima sekundarna nukleacija rezultira velikom količinom sitnih kristala i višemodalnim raspodjelama veličine kristala. Naime, brzina rasta kristala je manja obzirom da se koncentracija (odnosno pokretačka sila) troši osim na rast kristala i na nastajanje novih nukleusa. Sekundarnu nukleaciju moguće je izbjeći cijepljenjem sa sitnim kristalima, koji su mjesta nukleacije te je time omogućena kontrola veličina i raspodjela veličina kristala. Cijepljenjem se kristalizacija vodi unutar metastabilne zone (daleko od krivulje prezasićenosti) zbog čega nastaju veći kristali [4].

Ovisnost sekundarne nukleacije o stupnju prezasićenosti je znatno manja u odnosu na primarnu nukleaciju što je vidljivo na slici 6.



**Slika 6.** Ovisnost primarne i sekundarne nukleacije o stupnju prezasićenosti [12]

## 2.5. RAST KRISTALA

Završna faza procesa kristalizacije nakon nukleacije je rast nastalih nukleusa na način da se otopljene molekule apsorbiraju na površinu nukleusa u prezasićenoj otopini. [7]

Rast kristala, zajedno s nukleacijom, regulira krajnju raspodjelu veličina kristala u sustavu. Rast kristala se opisuje promjenom neke karakteristične dimenzije kristala s vremenom. Sve plohe kristala rastu svojom brzinom, ovisno o uvjetima provođenja procesa, pri čemu su jednaki uvjeti rasta za sve kristalne plohe [4]. Na brzinu rasta utječu temperatura, tlak, sastav otopine, stupanj prezasićenosti, uvjeti strujanja u kristalizatoru, priroda površine kristala i prisutnost pomoćnih tvari. Uvjeti i brzina rasta imaju značajnu ulogu za čistoću proizvoda i građu kristala. [13]

Porast brzine rasta kristala javlja se uslijed povećanja temperature, te porasta stupnja prezasićenosti. Također povećanjem intenziteta miješanja javljaju se povoljniji hidrodinamički uvjeti što za posljedicu ima povećanje brzine rasta kristala. Smatra se da je pri optimalnoj brzini vrtnje miješala postignuta minimalna debljina graničnog sloja koji je odgovoran za prijenos tvari [4].

Brojni procesi koji se odvijaju na samoj površini kristala kao i na nekoj udaljenosti od površine definiraju rast kristala. Pri čemu su glavni procesi [13]:

1. Prijenos tvari iz otopine do površine kristala, difuzijom, konvekcijom ili kombinacijom dvaju mehanizama
2. Ugradnja materijala u kristalnu rešetku

Najsporiji od navedenih procesa ograničava brzinu i definira brzinu kojom rastu kristali. Brzina rasta kristala se može izraziti kao linearna i masena brzina rasta, koje se uz poznati faktor oblika kristala mogu preračunati jedna u drugu [4].

Jednadžba za brzinu rasta kristala dana je sljedećim izrazom [4]:

$$R_G = \frac{1}{A} \cdot \frac{dm}{dt} = 3 \cdot \frac{\alpha}{\beta} \cdot \rho \cdot G = 3 \cdot \frac{\alpha}{\beta} \cdot \rho \cdot \frac{dL}{dt} \quad (3)$$

Jedan od češće korištenih empirijskih izraz koji povezuje ukupnu brzinu rasta kristala, izraženu smanjenjem koncentracije otopljene tvari u vremenu ( $dC/dt$ ), sa pokretačkom silom ( $c-c^*$ ) [7]:

$$\frac{dc}{dt} = k_g (c - c^*)^g \quad (4)$$

Gdje je  $dC/dt$  ukupna brzina rasta kristala,  $k_g$  je konstanta ukupne brzine rasta kristala te ovisi o parcijalnim procesima rasta, a eksponent  $g$  ukazuje na vrstu mehanizma rasta i najčešće se kreće u rasponu 1 do 2 [7].

## 2.6. KRISTALI

U ovom poglavlju razmotrit će se granulometrijska svojstva kristala, odnosno struktura, oblik, veličina i raspodjela veličina kristala. To su bitni indikatori kakvoće konačnog produkta te time utječu na procese obrade koji slijede.

### 2.6.1. Struktura kristala

Kristali su krute tvari u kojima su atomi raspoređeni na periodički ponavljajući način. Dakle, za razliku od amorfni tvari, kapljevina i plinova, kristali imaju točno definiranu trodimenzionalnu strukturu, a mehanička, električna, optička i magnetska svojstva su različita ovisno o smjeru osi u kojoj su mjerena. Obzirom da su svi kristali simetrični (simetričnost obzirom na točku, pravac, ploha), postoji ograničen broj mogućih struktura kristala odnosno kristalnih rešetki [11,14]. Postoji sedam osnovnih kristalnih rešetki prikazanih na slici 7.



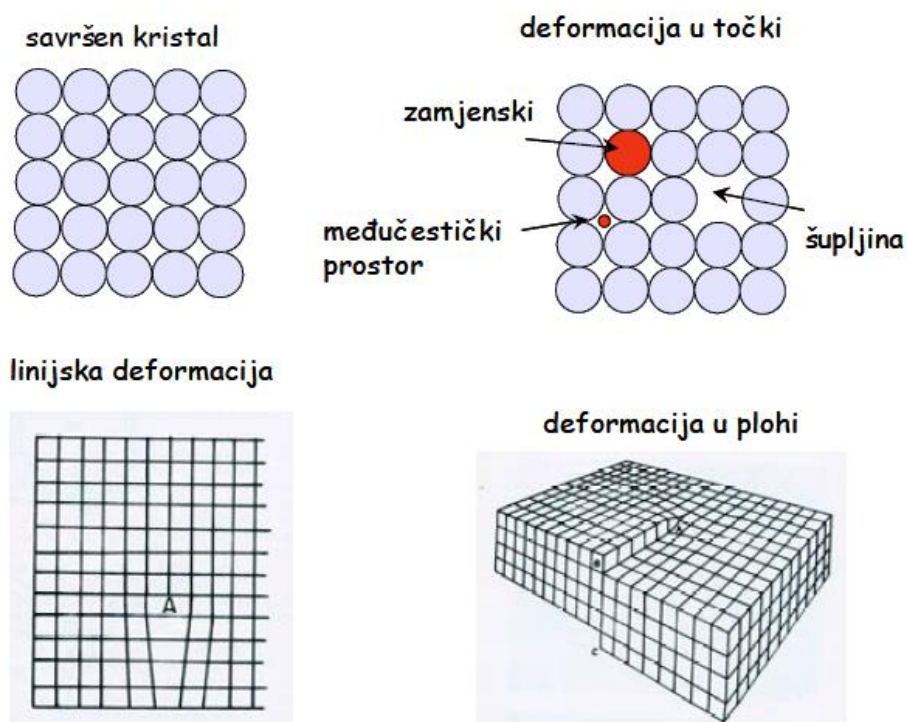
**Slika 7.** Vrste osnovnih kristalnih rešetki [4]

## 2.6.2. Oblik kristala

Vanjski oblik kristala odgovara kristalnoj rešetki u kojoj dana tvar kristalizira.

Građa kristala se može definirati kao vrsta vanjskog oblika koje je rezultat različitih brzina rasta pojedinačnih površina. Prilikom rasta kristala sve plohe kristala ne rastu istom brzinom, odnosno neke površine mogu rasti brže, a rast drugih dijelova kristala može biti usporen. To za posljedicu ima pojavljivanje kristala u potpuno drugačijem obliku (iglica, dendriti, pločica) [15].

Kristali su rijetko savršenog oblika, iako su simetrični. Do poremećaja u vanjskom obliku kristala dolazi u točki, linijski te plošno (slika 8). Deformacije su najčešće uvjetovane prisutnošću nečistoća [4].



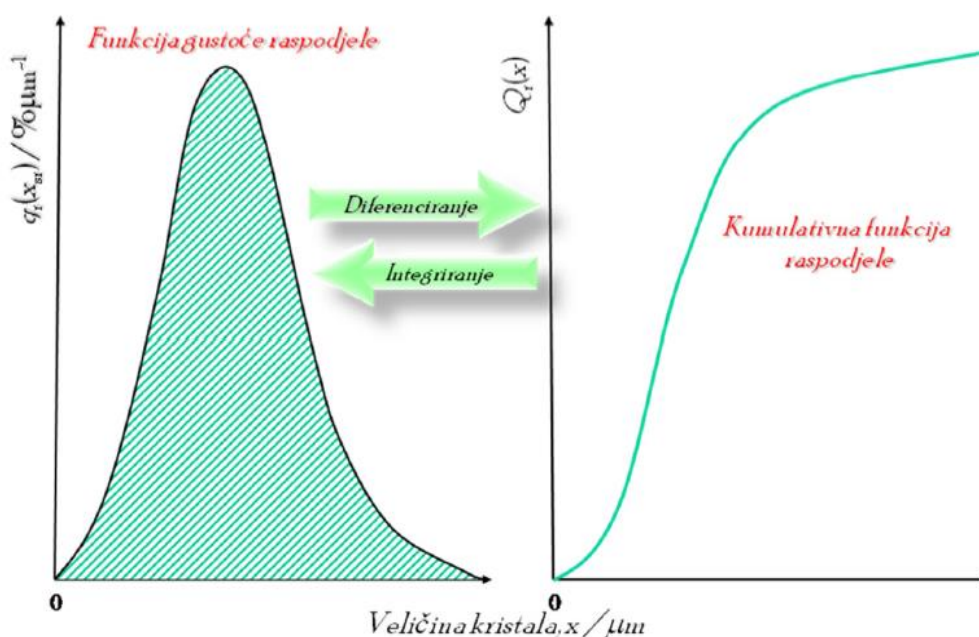
**Slika 8.** Poremećaji vanjskog oblika kristala [4]

Zbog važnosti građe i oblika kristala u industrijskoj proizvodnji se provode brojna ispitivanja različitih utjecaja u laboratorijskom mjerilu. Određeni oblici kristala nisu poželjni, neki daju kristaliničnu masu, drugi se lijepe, nemaju dobra svojstva tečenja ili nisu pogodni za pakiranje i rukovanje.

### 2.6.3. Veličina i raspodjela veličina kristala

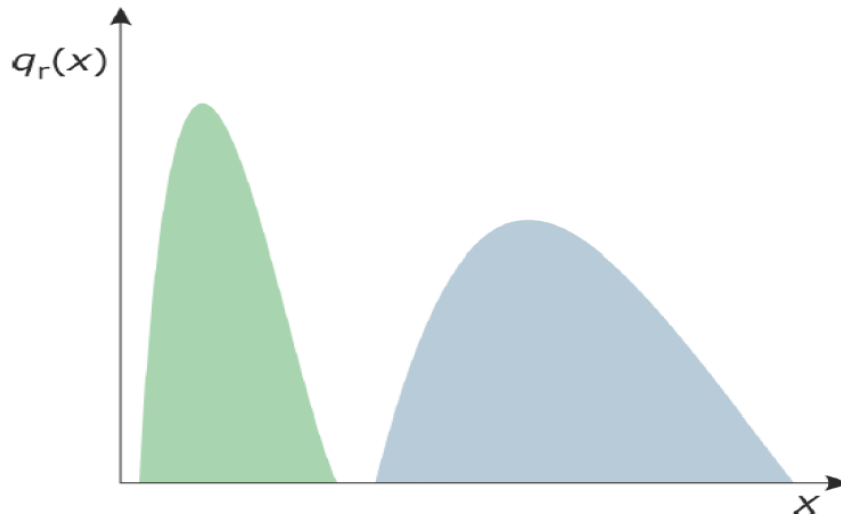
Za vrijeme kristalizacije nije moguće osigurati konstantne uvjete rasta, nastali produkt je smjesa kristala različitih veličina, pri čemu se veličina kristala izražava uglavnom srednjim promjerom kristala. Taj produkt se mora karakterizirati granulometrijskim sastavom, odnosno raspodjelom veličina čestica. Raspodjela veličina kristala je bitna iz mnogo razloga: tok u kristalizadoru, miješanje, aglomeracija, brzine otapanja, filtracija, sušenje [3,7].

Uobičajeno je raspodjelu prikazati kumulativnom funkcijom raspodjele  $Q_r(x)$  ili funkcijom gustoće raspodjele,  $q_r(x_{sr})$  (slika 9). Funkcija gustoće raspodjele pokazuje udio čestica veličine  $x_{sr}$ , dok kumulativna funkcija pokazuje udio čestica manjih od veličine  $x$ . Pojedine funkcije prevode se jedna u drugu integriranjem ili diferenciranjem. Indeks  $r$  ukazuje na način izražavanja raspodjele (brojčana  $r = 0$ , duljinska  $r = 1$ , površinska  $r = 2$ , te masena i volumna  $n = 3$ ) [16].



**Slika 9.** Funkcija gustoće raspodjele ( $q_r$ ) i kumulativna funkcija raspodjele ( $Q_r$ ) [11]

Često je potrebno proizvesti vrlo usku unimodalnu raspodjelu veličina kristala koja odgovara industrijskim zahtjevima. To je gotovo nemoguće ostvariti kristalizacijom iz otopine. Jedan od razloga je taj što svi kristali ne rastu istom brzinom. Slika 10 prikazuje usku i široku raspodjelu veličine kristala.



**Slika 10.** Prikaz različite širine raspodjele [17]

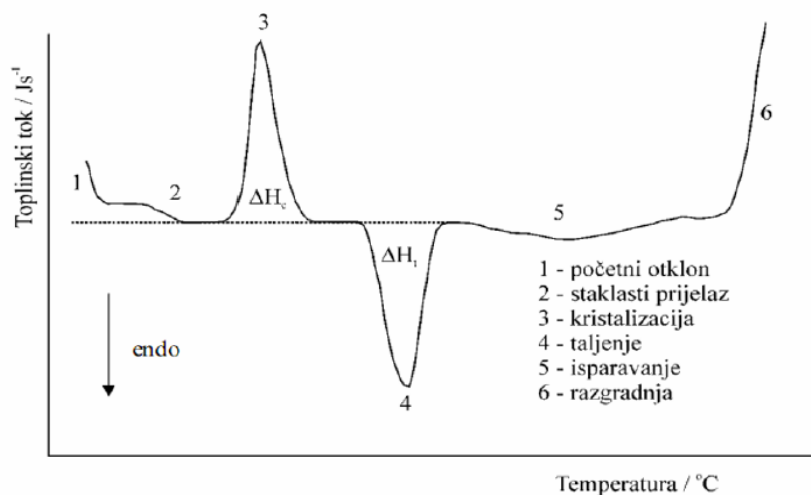
## **2. 7. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE KRISTALA**

### **2.7.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija**

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) kao instrumentalna tehnika daje kvantitativne i kvalitativne informacije o fizikalnim i kemijskim promjenama koje uključuju endotermne i egzotermne procese ili promjene toplinskog kapaciteta.

Tijekom DSC mjerenja cilj je održati konstantnu razliku temperature između ispitivanog i referentnog uzorka. U tu se svrhu uzorak zagrijava ili hladi, odnosno dovodi mu se ili odvodi određena količina topline programiranom brzinom. Ta količina topline se na DCS krivulji registrira kao pik, pri čemu je površina ispod egzoternog/endoternog pika proporcionalna količini utrošene/oslobođene toplinske energije.

Metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije moguće je odrediti (slika 11) temperature faznih prijelaza (talište,  $T_t$ ; staklište,  $T_g$ ; kristalište,  $T_c$ ), topline faznih prijelaza (toplina kristalizacije,  $\Delta H_c$ ; toplina taljenja,  $\Delta H_t$ ), te podatke o kemijskim reakcijama (polimerizaciji, oksidaciji, razgradnji) [18].



Slika 11. Zbirna DSC krivulja [18]

### 2.7.2. Fourier-transformacijska infracrvena spektroskopija

Fourier- transformacijska infracrvena (IR) spektroskopija je instrumentalna metoda koja mjeri infracrveno područje spektra elektromagnetskog zračenja, veće valne duljine i niže frekvencije od vidljive svjetlosti. Koristi se za detekciju, odnosno identifikaciju funkcionalnih skupina prisutnih u molekuli, jer veze između različitih elemenata apsorbiraju svjetlo na različitim frekvencijama. Apsorbira se samo svjetlo čija se frekvencija podudara s frekvencijom vibracija veze u molekuli, odnosno frekvencije radijacije i vibracije moraju biti iste da bi došlo do apsorpcije [19].

### 2.7.3. Rendgenska difrakcija (x-ray diffraction – XRD)

Rendgenska difrakcija je analitička tehnika koja pruža informacije o kristalnoj strukturi i kemijskom sastavu, te fizikalnim osobinama materijala, pri čemu materijal ostaje nepromijenjen.



Metoda se temelji na raspršivanju rendgenskih zraka na elektronskim oblacima atoma kristala prilikom prolaska rendgenskih zraka kroz kristal. Rasute zrake međusobno interferiraju pri čemu se neki valovi pojačavaju a neki slabe ili se poništavaju. Ta pojava se naziva difrakcija. Primarni uvjet koji treba biti zadovoljen kako bi došlo do difrakcije elektromagnetnog zračenja je da valna duljina zračenja i dimenzije rešetke budu bliske [20].

## 2.8. POLIMORFIZAM

Postoje molekule koje kristaliziraju u više od jedne kristalne strukture, što je posljedica razlike u konformaciji molekule. Taj fenomen se naziva polimorfizam, a karakteristični kristalni oblici nazivaju se polimorfi [4].

Za razvoj polimorfizma zaslužan je Ostwald (1897.). On je proučavao relativne stabilnosti različitih polimorfa i razloge njihove veće ili manje stabilnosti s termodinamičkog pogleda. Poznavanje termodinamičke stabilnosti i veze između različitih polimorfa uvjet za razumijevanje samog procesa kristalizacije i skladištenje konačnog produkta [21].

Poznavanje polimorfne strukture tvari koja kristalizira je posebno važno jer različite polimorfne strukture, iako kemijski identične, posjeduju različita fizikalna i kemijska svojstva (temperatura vrelišta, gustoća, tvrdoća, topljivost, brzina otapanja i dr.). Topljivost i brzina otapanja su od izuzetnog značaja pri proizvodnji lijekova jer utječu na biovaljanost i stabilnost lijekova [22].

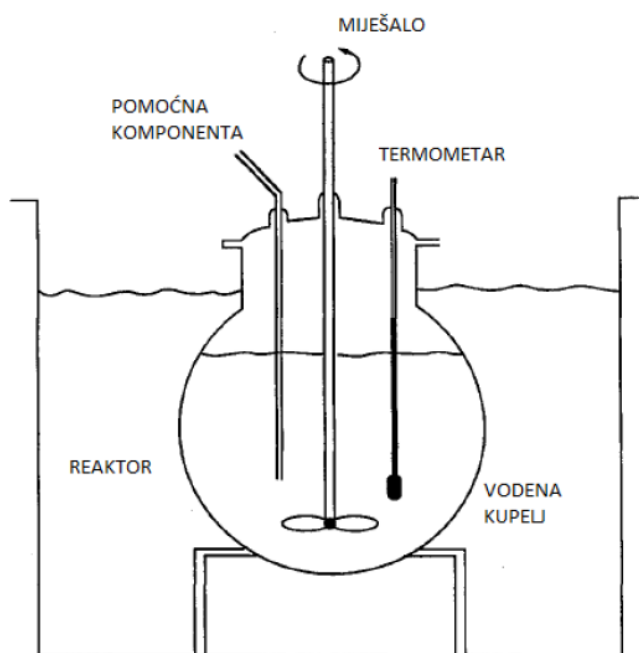
Različiti su polimorfi stabilni pri različitim uvjetima. Zato je bitan izbor otapala jer se molekule otapala mogu ugraditi u rešetku kristala što utječe na krajnji kristalni oblik produkta. Također na polimorfni oblik ima utjecaj i temperatura. Ako se tijekom procesa promijeni temperatura, tvar može promijeniti kristalni oblik iz termodinamički nestabilnog u stabilni, što se označava kao polimorfni prijelaz [21].

Zbog svega navedenog neophodna su opsežna laboratorijska istraživanja, pogotovo vezana uz stabilnost pojedinog polimorfa, kako ne bi došlo do neželjene transformacije čime bi se promijenila uporabna svojstva konačnog produkta.

## 2.9. ŠARŽNI KRISTALIZATOR

Šaržni kristalizator se koristi u različitim industrijama za dobivanje kristaličnog produkta. Ima nekoliko prednosti: oprema je relativno jednostavna, prilagodljiva i jednostavno se održava. Posebno je dobar za kemijske sustave velike viskoznosti i sustave koji sadržavaju toksične tvari. Sustavi koji su skupi i složeni za izvođenje u kontinuiranom kristalizatoru, mogu se prethodno ispitati uz minimalne investicije i u kratkom vremenu u šaržnom kristalizatoru. U šaržnom se kristalizatoru dobivaju uže raspodijele kristala nego u kontinuiranom, zato je šaržni kristalizator dobar izbor ako se želi dobiti monodisperzna raspodjela kristala [7].

Problem koji se javlja tijekom provođenja šaržne kristalizacije je otežano održavanje konstantne prezasićenosti, koja kao pokretačka sila znatno utječe na nukleaciju, kristalni rast i raspodjelu veličina kristala.



**Slika 12.** Jednostavni šaržni reaktor [17]

Na slici 12 je prikazan jednostavni šaržni kristalizator. Unutar kristalizatora se često nalaze razbijala koja poboljšavaju miješanje otopine čime se postižu bolji uvjeti prijenosa tvari i topline. Vodena kupelj u koju je uronjen reaktor pomaže pri regulaciji temperature, što je važno zbog osjetljivosti kristalizacijskog procesa. Jedan od problema šaržnog kristalizatora je prljanje. Zaostale nečistoće ili kristali iz prethodne šarže imaju negativan utjecaj na prijenos topline kao i na samu kristalizaciju. Zato je važno očistiti kristalizator nakon svakog korištenja [7].

## **2.10. KRISTALIZACIJA DODATKOM ANTIOTAPALA**

Kod ovog tipa kristalizacije, sekundarno otapalo (tzv. antiotapalo) se uvodi u primarno otapalo s ciljem smanjenja topljivosti otopljene komponente u primarnom otapalu što za posljedicu ima postizanje pokretačke sile procesa kristalizacije. Naime, antiotapalo i otapalo su mješljivi, dok je čvrsta komponenta relativno netopljiva u antiotapalu. Time se dolazi do visokih stupnjeva prezasićenosti što rezultira primarnom nukleacijom. Pri tome je vrlo važno da se antiotapalo doda tik uz lopatice reaktorskog miješala, kako bi se postiglo dobro miješanje koje smanjuje lokalnu prezasićenost i brzinu nukleacije. Loše miješanje može uzrokovati široku raspodjelu veličina kristala, što često nije poželjno [1,23].

Prednost kristalizacije dodatkom antiotapala je mogućnost provođenja procesa na sobnoj temperaturi, što je važno pri radu s tvarima koje su osjetljive na temperaturu. Time se poboljšava i ekonomičnost procesa jer je smanjena uložena energija. Također, ovakav način kristalizacije dovodi do promjene sastava otapala što uzrokuje potencijalnu promjenu morfologije kristala i konačnog polimornog oblika kristala. Stoga se ovakva metoda kristalizacije koristi u farmaceutskoj industriji čiji su proizvodi često osjetljivi na degradaciju pri visokoj temperaturi ili su skloni poliformizmu. Nedostatak ovakve kristalizacije je potreba razdvajanja otapala i antiotapala na kraju procesa kako bi se otapala mogla pročistiti te ponovno upotrijebiti [1,23].

## 2.11. PRIMJENA KRISTALIZACIJE U FARMACEUTSKOJ INDUSTRIJI

Kristalizacija je ključan proces i važan korak u preradi i razvoju unutar farmaceutske industrije. Koristi se za stvaranje, separaciju i pročišćavanje intermedijarnih spojeva i aktivnih farmaceutskih sastojaka (API, eng. *Active pharmaceutical ingredient*). Kao metoda za separaciju, nudi dodatnu uštedu energije, jer je u usporedbi s destilacijom potrebno manje energije za hlađenje nego za zagrijavanje [7].

Preko 80% procesa proizvodnje lijekova uključuje barem jedan korak kristalizacije. Najčešće se lijekovi proizvode u obliku čvrstih tableta zbog jednostavnosti konzumacije te preciznosti doziranja lijeka [24]. Kvaliteta lijeka u takvom obliku ovisi ponajprije o karakteristikama kristala. Zbog toga se velika važnost posvećuje nastajanju kristala željene raspodjele veličina i željenog kristalnog oblika. Postojanje različitih kristalnih formi, koje imaju ista kemijska svojstva, može dovesti do različitih fizikalnih svojstava poput stabilnosti lijeka i različite brzine otpuštanja istog u organizmu [2]. Stoga farmaceutske kompanije ulažu brojne resurse u unapređenje vođenja procesa kristalizacije kako bi se smanjilo vrijeme trajanja procesa i poboljšala kvaliteta produkta koji mora zadovoljiti potrebna svojstva.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. SVRHA RADA**

U eksperimentalnom dijelu rada provedena je šaržna kristalizacija djelatne tvari fosamprenavir kalcija, uz dodatak antiotapala, u laboratorijskom šaržnom kristalizadoru.

Izvršena su preliminarna istraživanja koja obuhvaćaju pronalazak pogodnog sustava otapala i antiotapala, određivanje širine metastabilne zone za izabranu smjesu otapala te ovisnost topljivosti fosamprenavir kalcija uz dodatak različitog udjela antiotapala. Također, ispitan je utjecaj početne koncentracije zasićenja (25 °C i 30 °C) pri određenoj brzini dodatka antiotapala u različitim volumnim udjelima na granulometrijska svojstva dobivenih kristala. Za sve provedene eksperimente određen je oblik i raspodjela veličina kristala.

#### **3.2. MATERIJALI**

Za provedbu eksperimenta korištena je sol fosamprenavir kalcij. Otapalo u procesu šaržne kristalizacije bila je smjesa otapala (80 mas% metanola i 20 mas % etanola). Smjesa metanol-etanol korištena je jer se u preliminarnim istraživanjima pokazala kao najdjelotvornije otapalo. Demineralizirana voda dodavana u različitim volumnim udjelima korištena je kao antiotapalo. Na kraju procesa hladna demineralizirana voda korištena je za ispiranje dobivenih kristala.

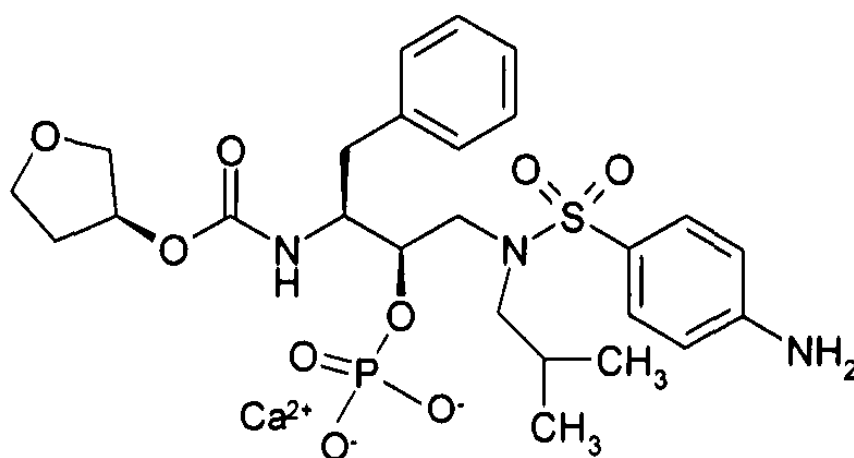
##### **3.2.1. Fosamprenavir kalcij**

Fosamprenavir kalcij je kalcijeva sol fosamprenavira, predlijek amprenavira koji se koristi kao lijek protiv virusa humane imunodeficijencije, (HIV, eng. *Human Immunodeficiency Virus*) koji smanjuje količinu virusa u tijelu. Lijekovi protiv HIV-a, poput fosamprenavira, usporavaju ili sprječavaju oštećenje imunološkog sustava i smanjuju rizik od razvoja bolesti povezanih sa sindromom stečene imunodeficijencije (AIDS, eng. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*).

Fosamprenavir je inhibitor proteaze. Proteaza je enzim koji HIV koristi za razbijanje velikih virusnih proteina kako bi se mogle stvoriti nove čestice HIV -a. Fosamprenavir se u epitelnim

stanicama crijeva pretvara u farmakološki aktivan amprenavir. Amprenavir se veže na aktivno mjesto HIV-1 proteaze, čime se sprječava proteolitičko cijepanje virusnog polipeptida na pojedinačne funkcionalne proteine, što dovodi do stvaranja nezrelih nezazirnih virusnih čestica [25].

Na tržištu se može naći u obliku filmom obloženih tableta. U Europskoj uniji je odobren u srpnju 2004. pod imenom *Telzir* za uporabu u kombinaciji s niskim dozama *Ritonavira* u odraslih osoba zaraženih HIV-om [26]. Na slici 13 je prikazana kemijska struktura fosamprenavir kalcija, dok su u tablici 1 dana neka njegova svojstva.



**Slika 13.** Kemijska struktura fosamprenavir kalcija

**Tablica 1.** Svojstva fosamprenavir kalcija

Molekulska formula	$C_{25}H_{34}CaN_3O_9PS$
Molarna masa, g/mol	623,7
Opis	Bijeli prah
Polimorfni oblici	5
Piktorgami	



### 3.2.2. Otapala

Metanol je alkohol s jednim ugljikovim atomom. Bezbojan je, zapaljiv i dosta hlapljiv. Ima neugodan miris i vrlo je otrovan. Miješa se u svim omjerima s vodom, etanolom, eterom i mnogim drugim organskim otapalima. Koristi se kao organsko otapalo, a može se proizvesti iz različitih sirovina: drvo, ugljen, prirodni plin.

Etanol je primarni alkohol sa dva ugljikova atoma. Pri sobnoj temperaturi je bezbojna, hlapljiva i lako zapaljiva tekućina. Upotrebljava se kao reagens i otapalo. Reagira neutralno i higroskopan je. Miješa se s vodom u svakom omjeru, pri čemu s vodom stvara azeotropnu smjesu.

U tablici 2 su navedeni podaci o prethodno navedenim kemikalijama.

**Tablica 2.** Svojstva metanola i etanola

OTAPALO	METANOL	ETANOL
Molekulska formula	CH <sub>3</sub> OH	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH
Strukturna formula	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\   \quad   \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\   \quad   \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$
Molarna masa, g/mol	32,0	46,1
Gustoća, g/cm <sup>3</sup>	0,791	0,789
Temperatura vrelišta, °C	64,7	78,2
Piktorgami		

### 3.3. APARATURA

#### 3.3.1. Uređaj za određivanje topljivosti soli u različitim otapalima

Uređaj *Crystal 16* (slika 14) poslužio je za ispitivanje topljivosti fosamprenavir kalcija u različitim otapalima. Također njime su određene kivilje topljivosti i prezasićenosti, odnosno širina metastabilne zone. Paralelni kristalizator *Crystal 16* ima četiri bloka reaktora zapremine 1 ml sa kojima se može provoditi 16 paralelnih eksperimenata, pri čemu se zamućenje otopine prati turbidimetrijskom metodom. Dobiveni podaci se algoritmima ugrađenim u računalni program *CrystalClear* prevode u grafičke podatke.



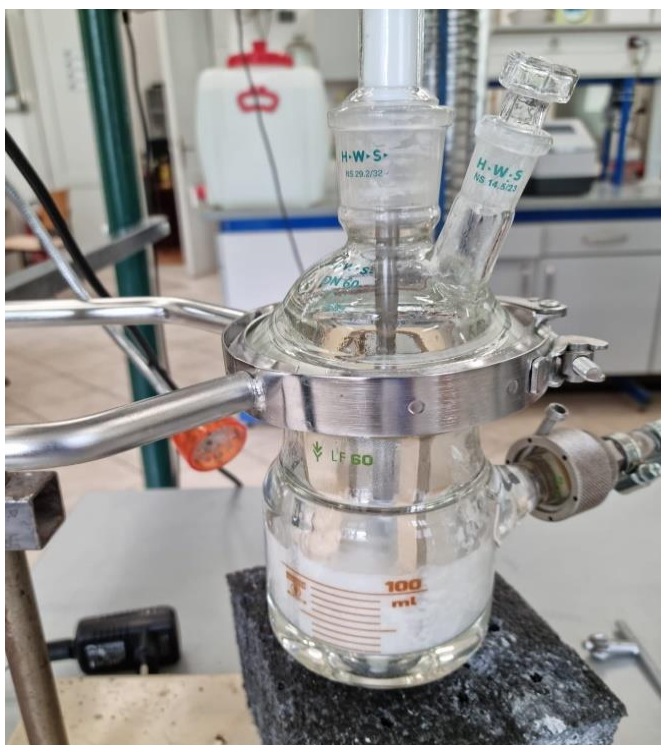
**Slika 14.** Uređaju Crystal 16

#### 3.3.2. Uređaj za provođenje kristalizacije

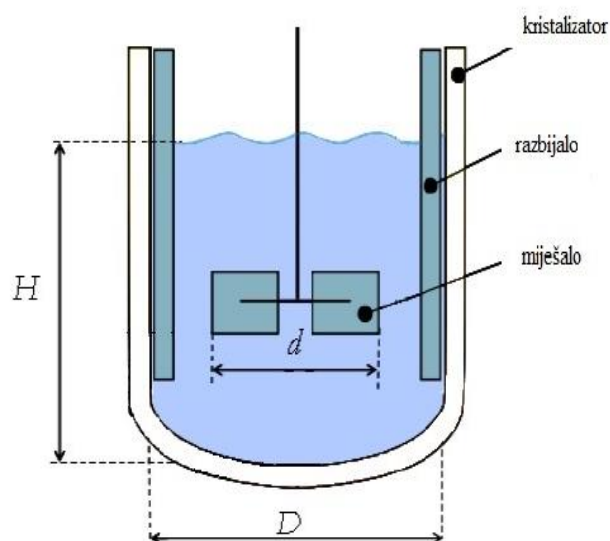
Na slici 15 je prikazan šaržni kristalizator s dvostrukom stijenkom u kojemu se provodila kristalizacija uz dodatak antiotapala. Shema kristalizatora prikazana je na slici 16, a dimenzije su dane u tablici 3. Kroz dvostruku stijenku kristalizatora prolazi voda iz termostata *Julabo CF41* (slika 17) koji je spojen na računalo i omogućuje namještanje željenog temperaturnog profila. Kristalizator je napravljen od stakla da je moguće vidjeti unutrašnjost reaktora. Unutar kristalizatora se nalaze četiri razbijala za sprječavanje nastanka vrtoga. Homogenost otopine se postiže miješanjem pomoću mješalice s digitanim prikazom broja okretaja. Korišteno miješalo (slika 18) je turbinsko miješalo sa 4 ravne lopatice nagnute pod kutom od 45°, koje uzrokuje



aksijalnog tok u posudi. Upotrebom peristaltičke pumpe osiguran je dotok antiotapala kroz otvor na staklenom poklopcu kristalizatora.



Slika 15. Šaržni kristalizator



Slika 16. Shema šaržnog kristalizatora

Tablica 3. Dimenzije aparature za kristalizaciju

Širina kristalizatora ( $D$ ), mm	65
Visina punjenja otopine ( $H$ ), mm	ovisi o volumenu otopine max=60 min=36
Promjer miješala ( $d$ ), mm	35



**Slika 17.** Termostat Julabo CF41



**Slika 18.** Turbinsko miješalo sa 4 ravne lopatice nagnute pod kutem od 45°

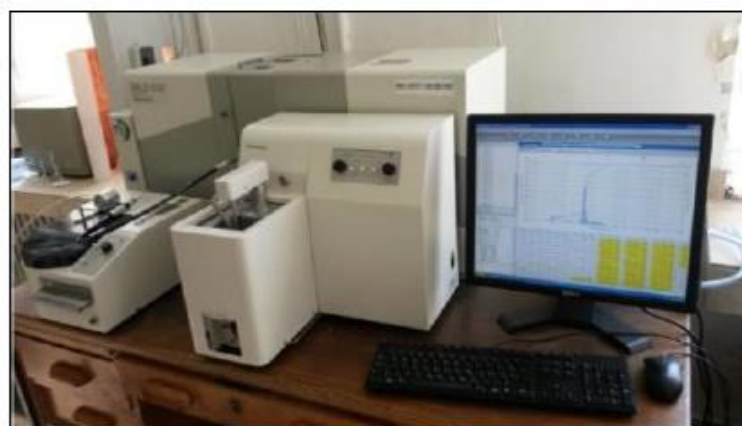
### 3.3.3. Uređaji za karakterizaciju produkta

Oblik i veličina kristala određeni su uz pomoć svjetlosnog mikroskopa *Motic BA200* (Slika 19) i odgovarajućeg software-a pod nazivom *Motic Images Plus*.



**Slika 19.** Svjetlosni mikroskop *Motic BA200*

Raspodjela veličina kristala određena je metodom laserske difrakcije na uređaju Shimadzu Sald 3101 prikazanom na slici 20. Prolaskom čestica kroz izvor svjetlosti dolazi do raspšenja svjetlosti pod kutom koji je izravno ovisan o veličini čestica. Metoda se temelji na računanju kuta, koji logaritamski raste što je veličina čestica manja.



**Slika 20.** Uređaj Shimadzu Sald 3101 za određivanje RVK

### **3.4. OPIS PROCESA KRISTALIZACIJE UZ DODATAK ANTIOTAPALA**

Postupak kristalizacije proveden je u šaržnom kristalizatoru u smjesi otapala metanol-etanol. Pripremljena je zasićena otopina fosamprenavir kalcija u smjesi metanol-etanol (80 mas% metanola i 20 mas % etanola) na temperaturi od 25°C i 30°C. Topljivost FPV-Ca je određena iz krivulje topljivosti (slika 22).

Otopinu je potrebno zagrijati iznad temperature zasićenosti kako bi se otopila sva dodana količina soli. Otopina se zagrijava vodom iz termostata koja prolazi dvostrukom stijenkom kristalizatora, a zagrijana je do 30°C / 35°C. Kada je sva sol otopljena, otopina se profiltrira kako bi se uklonile nečistoće te se ponovno vraća u kristalizator. Slijedi termostatiranje otopine na 25 °C odnosno 30°C. Uz kontinuirano miješanje unutar kristalizatora, dovodi se voda kao antiotapalo na površinu kapljevine uz pomoć peristaltičke pumpe. Volumni protok dodatka antiotapala iznosio je 6 mL/min.

Za određivanje koncentracije otopine korištena je gravimetrijska metoda. Uzorci otopine fosamprenavir kalcija uzimani su u redovitim vremenskim intervalima prateći količinu dodanog antiotapala. Za uzimanje uzorka je korištena laboratorijska igla na koju je bio učvršćen filter te laboratorijska šprica. Uzorak iz šprice se ispuštao u laboratorijsku bočicu kojoj je određena masa prije i poslije uzorkovanja. Potom je uzorak stavljen u sušionik na temperaturu od 105 °C kako bi se postigla konačna masa te je mu ponovno određena masa. Iz razlike masa određena je koncentracija izdvojene otopine.

Na kraju procesa kristalizacije, kristali su profiltrirani, isprani hladom demineraliziranom vodom te sušeni na zraku do konačne mase.

Pregled procesnih uvjeta u svim eksperimentima dan je u tablici 4.

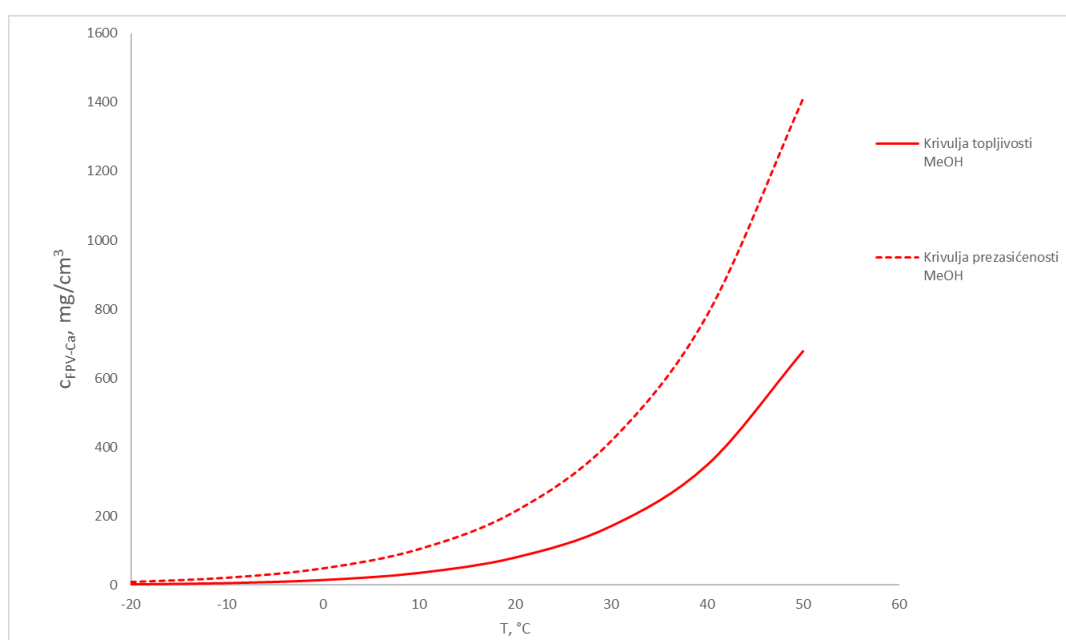
**Tablica 4.** Procesni uvjeti šaržne kristalizacije

NAZIV EKSPERIMENTA	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Masa soli, g	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	12,6	12,6	12,6
Otapalo	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)	MetOH- EtOH (80:20)
Volumen otapala, mL	100	100	100	100	100	100	100	100
Volumen antiotapala, mL	20	25	30	50	100	20	30	50
Volumni udio antiotapala, %	16	20	23	33	50	16	23	33
T, °C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	30°C	30°C	30°C
Broj okretaja mješala, okr/ min	500	500	500	500	500	500	500	500
Trajanje procesa	3 min 30 sec	4 min 10 sec	5 min	8 min 20 sec	16min 40sec	3min 30 sec	5 min	8min 20 sec

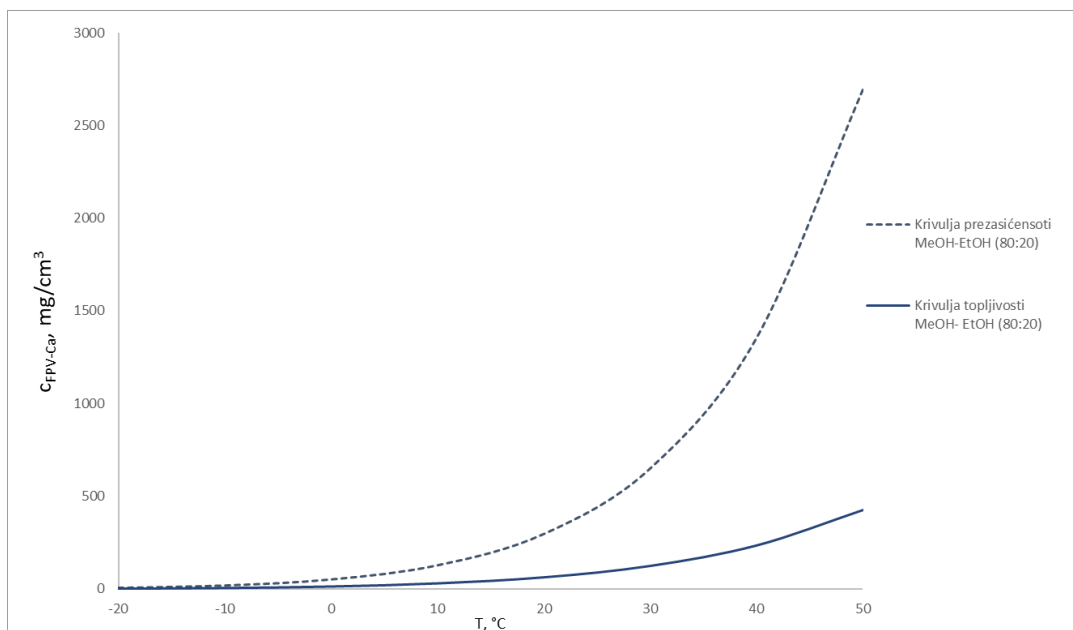
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Odabir otapala i određivanje širine metastabilne zone

Osnovni korak procesa kristalizacije je određivanje topljivosti fosamprenavir kalcija u pojedinim otapalima. Krivulje topljivosti i prezasićenosti, odnosno širina metastabilne zone fosamprenavir kalcija u metanolu i smjesi otapala metanol-etanol (80:20) određena je uređajem Crystal 16.



**Slika 21.** Krivulja topljivosti i prezasićenosti fosamprenavir kalcija u metanolu



**Slika 22.** Krivulja topljivosti i prezasićenosti fosamprenavir kalcija u smjesi otapala metanol-etanol (80:20)

Na slikama 21 i 22 se može uočiti da topljivost soli ovisi o odabiru otapala. Tako je topljivost soli veća u čistom metanolu nego u smjesi metanol-etanol, pri istoj temperaturi. Za izvedbu procesa bitna je i širina metastabilne zone jer ona utječe na veličinu, oblik i raspodjelu kristala. Slike pokazuju širenje metastabilne zone pri višim temperaturama, čime se postižu optimalni uvjeti za provođenje kristalizacije.

Prevelika topljivost djelatne tvari nije poželjna pri provedbi kristalizacije iz otopine, bez obzira na način vođenja, jer se pri tome, prvo tope, a zatim i kristaliziraju velike količine kristala što nepovoljno utječe na provedbu procesa, ali i granulometrijska svojstva nastalih kristala. Osim toga, u literaturi [17] je pronađeno da primjena čistog metanola kao otapala rezultira lošijim vođenjem procesa i granulometrijskim svojstvima kristala. Također pokazalo se da dodatak etanola može smanjiti pojavu aglomeracije i tako poboljšati granulometrijska svojstva. Stoga je kao otapalo u istraživanjima korištena smjesa metanola i etanola.

## 4.2. Ispitivanje antiotapala

U svrhu pronalaska pogodnog antiotapala provedeno je preliminarno ispitivanje. Otopina fosamprenavir kalcija pripravljena je u šaržnom kristalizatoru otapanjem 9,6 g soli u 100 mL otapala metanol-etanol (80:20). Nakon otapanja, dobivena otopina je razdijeljena na 5 jednakih dijelova stavljenih u laboratorijske čaše volumena 20 mL. U svaku čašu dodano je po 1 ml određenog antiotapala u vremenskom razmaku od 30 sekundi, uz miješanje na magnetskoj miješalici. Ukupno je utrošeno 13 mL istraživanih antiotapala.

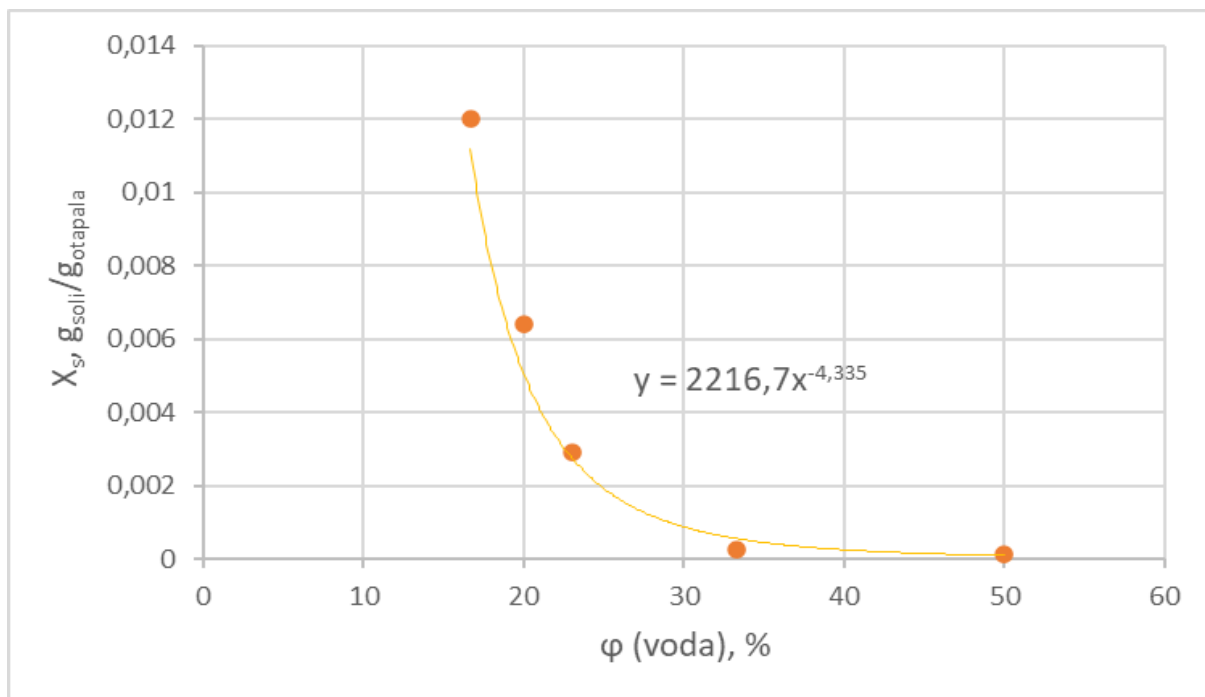
**Tablica 5.** Rezultati ispitivanja odabira pogodnog antiotapala

ČAŠA	1	2	3	4	5
ANTIOTAPALO	Voda	2-propanol	Etil-acetat	Diklormetan	Acetonitril
OPIS	Razvili su se kristali	Nisu se razvili kristali	Nisu se razvili kristali	Nisu se razvili kristali	Nisu se razvili kristali

Jedino antiotapalo koje je dovelo do pojave kristala je voda. Također prednost vode je njezina laka dostupnost i mala cijena u odnosu na ostala istraživana antiotapala. Stoga je voda izabrana za korištenje kao antiotapalo u daljnjem istraživanju.



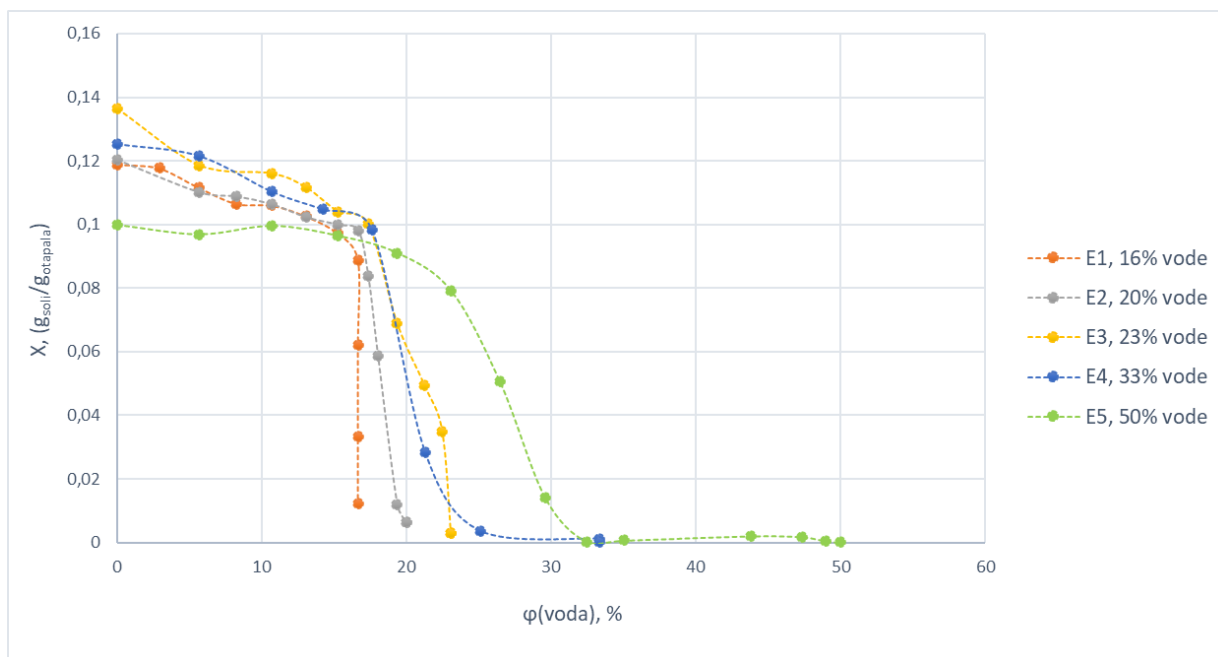
### 4.3. Ovisnost topljivosti fosamprenavir kalcija o udjelu antiotapala



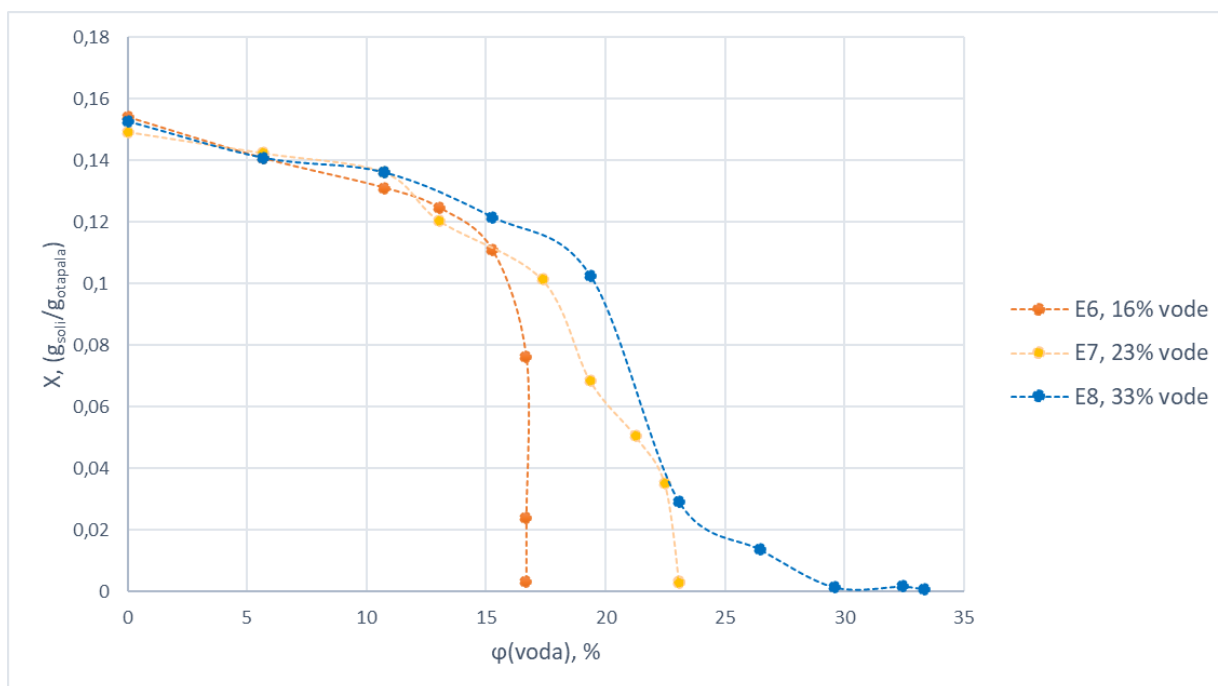
**Slika 23.** Topljivost fosamprenavir kalcija pri dodatku različitog volumnog udjela vode

Dodatak antiotapala (vode) u smjesu otapala metanol-etanol (primarno otapalo), dovodi do smanjenja topljivosti fosamprenavir kalcija u primarnom otapalu. Eksperimentalni podaci vidljivi na slici 23 su aproksimirani su potencijskaom jednadžbom koja opisuje odnos između koncentracije otopine i volumnog udjela vode. Tako se može primjetiti da povećanjem volumnog udjela vode, koncentracija otopine soli dostiže sve niže vrijednosti, na što upućuje i negativan eksponent jednadžbe. Konačno pri volumnom udjelu vode od 50%, koncentracija otopine dostiže vrijednost blisku nuli, te je to pokazatelj da se većina soli izdvojila iz otopine.

#### 4.4. Šaržna kristalizacija uz dodatak antiotapala



Slika 24. Koncentracijski profili fosamprenavir kalcija pri temperaturi 25°C



Slika 25. Koncentracijski profili fosamprenavir kalcija pri temperaturi 30°C

Slike 24 i 25 prikazuju koncentracijske profile fosamprenavir kalcija u smjesi otapala metanol-etanol (80:20) pri različitim volumnim udjelima vode i različitim temperaturama. Svi eksperimenti su izvedeni u šaržnom kristalizatoru na isti način opisan u poglavlju 3.4.

Može se primjetiti da sve krivulje promjene koncentracija prikazane na slikama 24 i 25 pokazuju sličan trend, bez obzira na temperaturu pri kojoj je vođena kristalizacija. Iz toga se može zaključiti da temperatura nema znatan utjecaj na oblik dobivenih koncentracijskih krivulja. Ali je važno napomenuti da je pri višoj temperaturi, zbog veće topljivosti, dodana veća količina soli, što je uzrok viših početnih koncentracija pri 30°C nego pri 25°C.

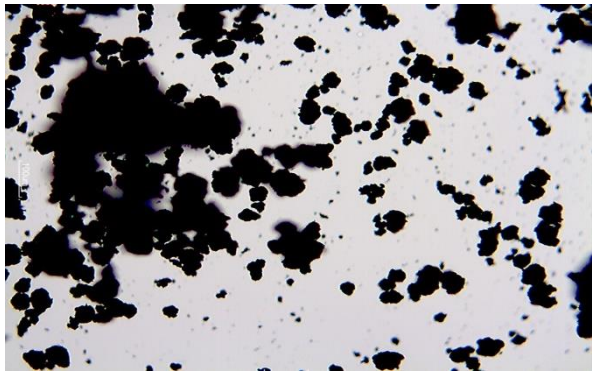
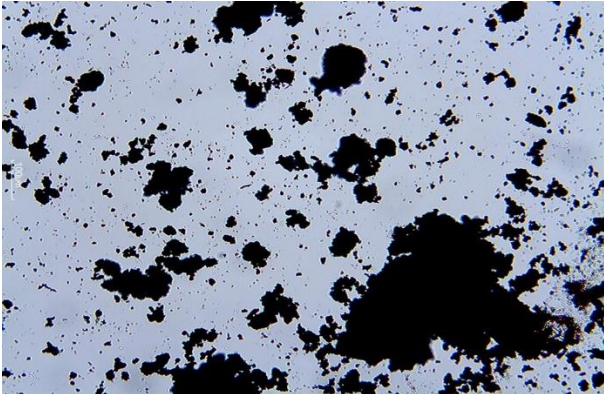
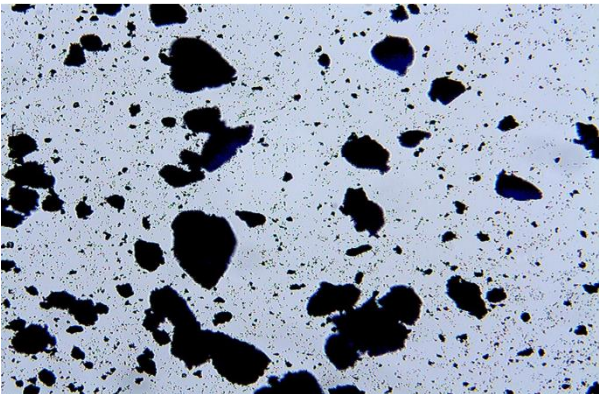
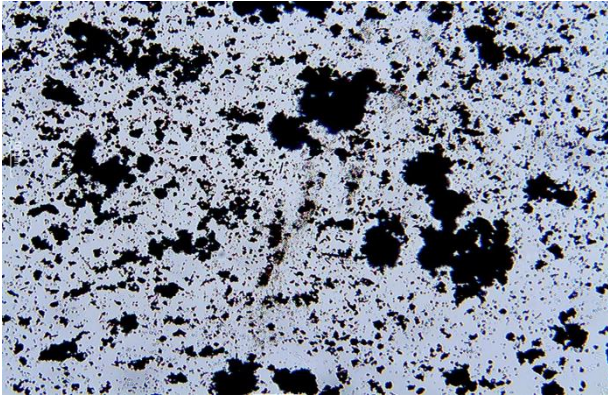
Krivulje dobivene kristalizacijom pokazuju naglo smanjenje koncentracije pri 16% volumnog udjela vode. Time je označen početak nukleacije. U prilog tome ide činjenica da je prilikom provođenja eksperimenata baš pri dodatku 16% vode uočeno stvaranje prvih kristala na mjestu gdje je antiotapalo dodavano, ali bi ubrzo zbog miješanja te izjednačavanja prezasićenosti u cijeloj otopini i “nestajali”.

Povećanjem udjela vode, dolazi do sve većeg smanjenja koncentracija. Tako se na slikama može vidjeti da koncentracija postiže vrlo niske vrijednosti na oko 30% udjela vode, iz čega bi se moglo zaključiti da je došlo do izdvajanja većine soli iz otopine.

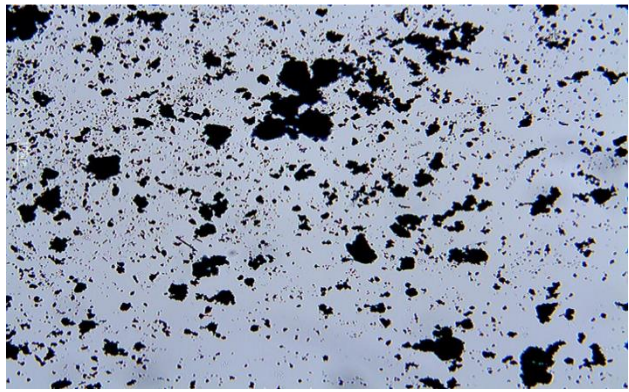
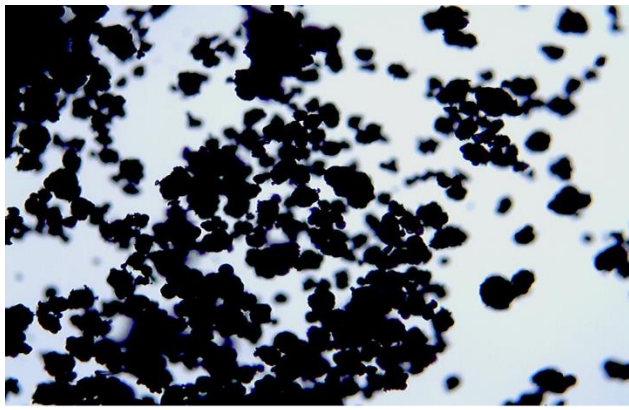
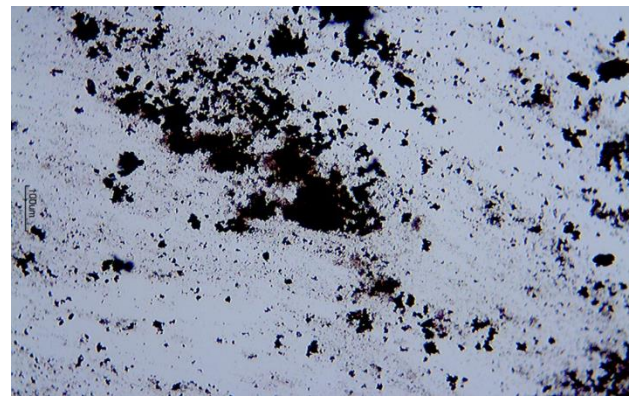
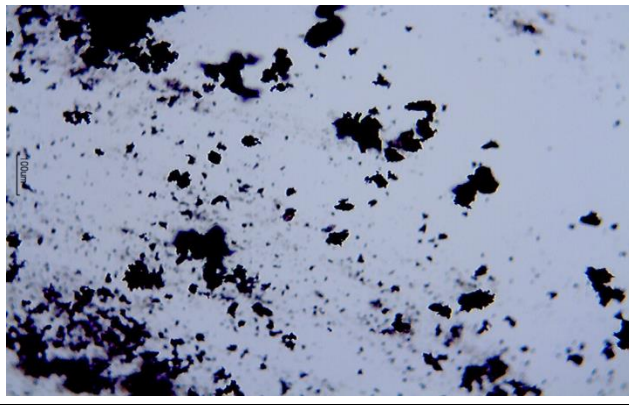
Vidljiva su odstupanja točaka na nekim krivuljama, a mogući razlog su pogreške prilikom uzimanja uzorka ili vaganja laboratorijskih bočica. To se najbolje očituje kod krivulje eksperimenta 5 (E5) kojemu je početna koncentracija puno niža u odnosu na ostatak krivulja dobivenih pri temperaturi 25°C.

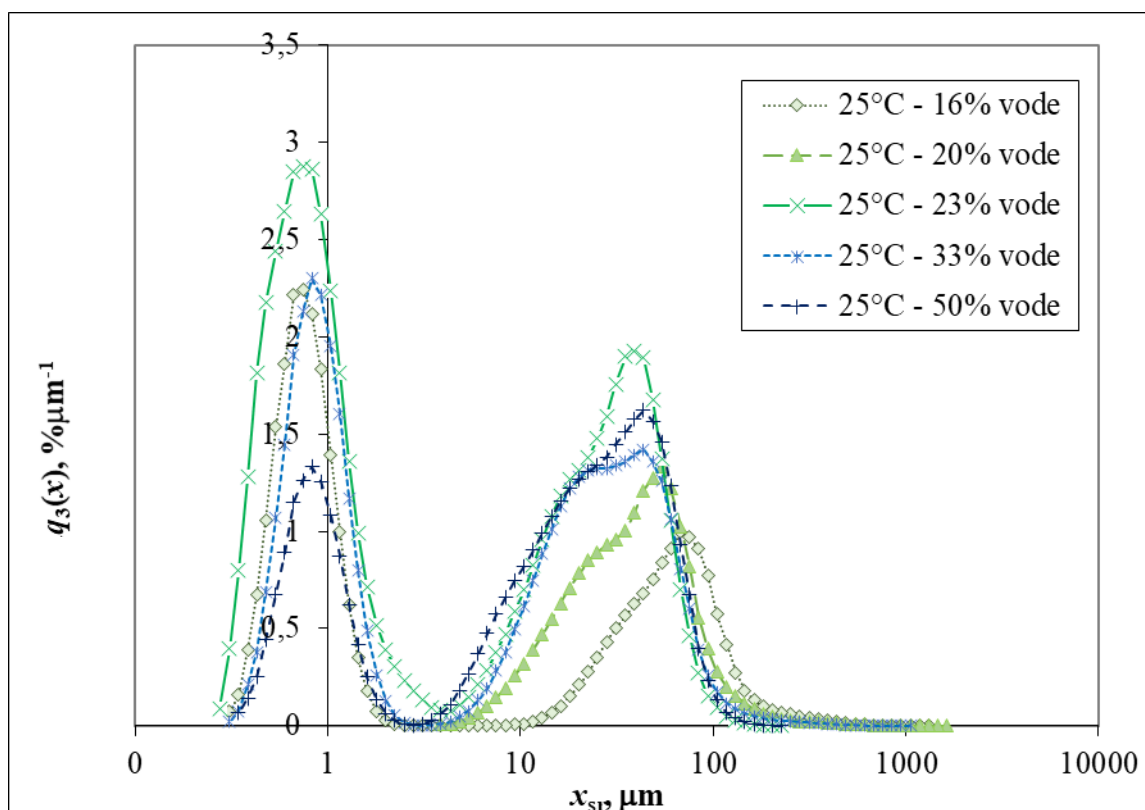
#### 4.5. Granulometrijska svojstva kristala

Tablica 6. Slike suhih kristala (uvećanje 100x)

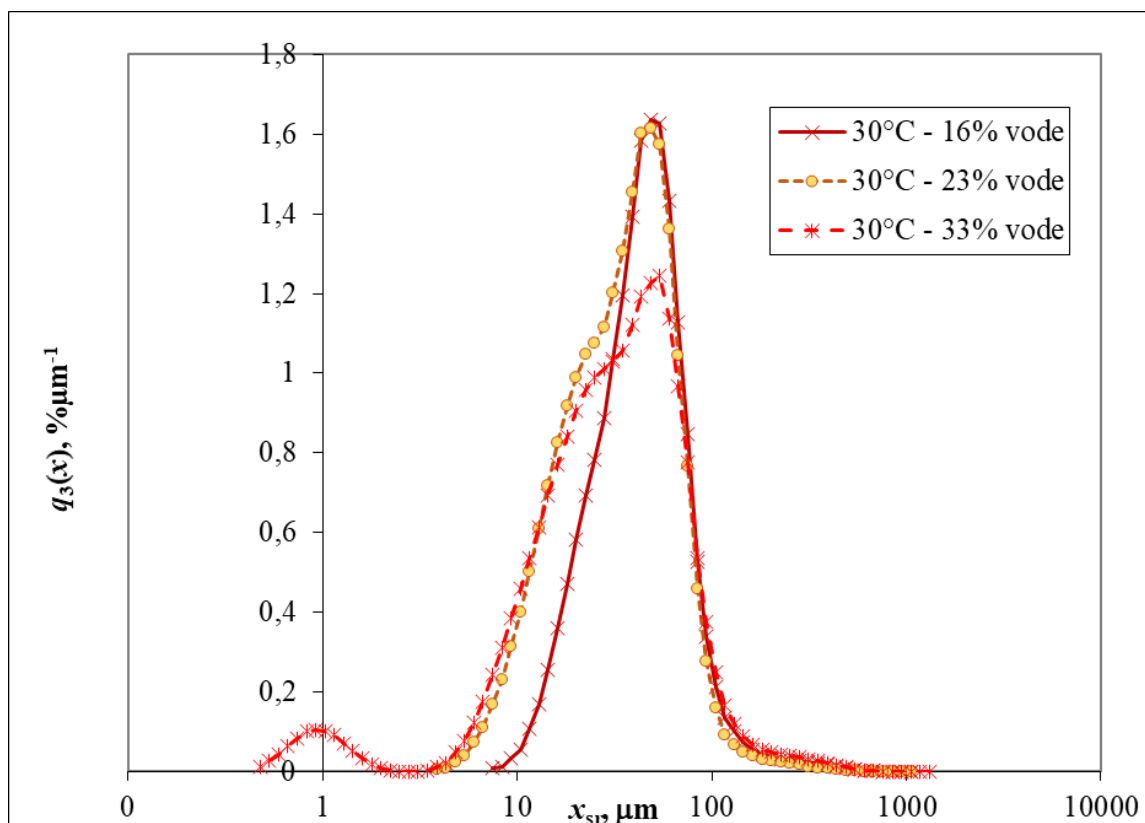
 Micrograph showing dark, irregularly shaped crystals of varying sizes against a light background. The crystals are densely packed in some areas and more sparse in others.	E1 16% vode 25 °C
 Micrograph showing dark, irregularly shaped crystals of varying sizes against a light background. The crystals are more dispersed than in E1.	E2 20% vode 25 °C
 Micrograph showing dark, irregularly shaped crystals of varying sizes against a light background. The crystals are more dispersed than in E2.	E3 23% vode 25 °C
 Micrograph showing dark, irregularly shaped crystals of varying sizes against a light background. The crystals are more dispersed than in E3.	E4 33% vode 25 °C



	<p>E5 50% vode 25 °C</p>
	<p>E6 16 % vode 30 °C</p>
	<p>E7 23% vode 30 °C</p>
	<p>E8 33% vode 30 °C</p>



Slika 26. Raspodjela veličina kristala pri temperaturi 25°C za različite volumne udjele vode



Slika 27. Raspodjela veličina kristala pri temperaturi 30°C za različite volumne udjele vode

U tablici 6 su prikazane slike suhих kristala snimljene svjetlosnim mikroskopom *Motic BA200*, a raspodjele veličina kristala snimljene na uređaju *Shimadzu Sald* prikazane su na slikama 26 i 27.

Promatrajući mikrografije kristala (tablica 6) može se uočiti povećanje udjela sitnijih kristala s porastom volumnog udjela vode. Dokaz tome su raspodjele veličina kristala (slika 26 i 27), gdje se može uočiti pomak krivulja prema manjim veličinama kristala kada je u eksperimentima korišteno više vode. Do smanjenja kristala s povećanjem udjela antiotapala dolazi zbog nukleacije koja je intenzivnija pri većem dodatku vode. Naime, pri manjim količinama dodanog antiotapala nukleacija je manje intenzivna jer prestankom dokapavanja antiotapla stvaranje novih nukleusa prestaje te je preferiran rast kristala na već nastalim nukleusima.

Kod raspodjela veličina kristala dobivenim u eksperimentima provedenim na 25 °C vidljiv je pomak najvećeg udjela čestica (kod drugog pika) u finija područja za veće udjele vode. Prvi pik smješten je u području veličinskih frakcija ispod 1  $\mu\text{m}$  i izraženiji je od 2. pika.

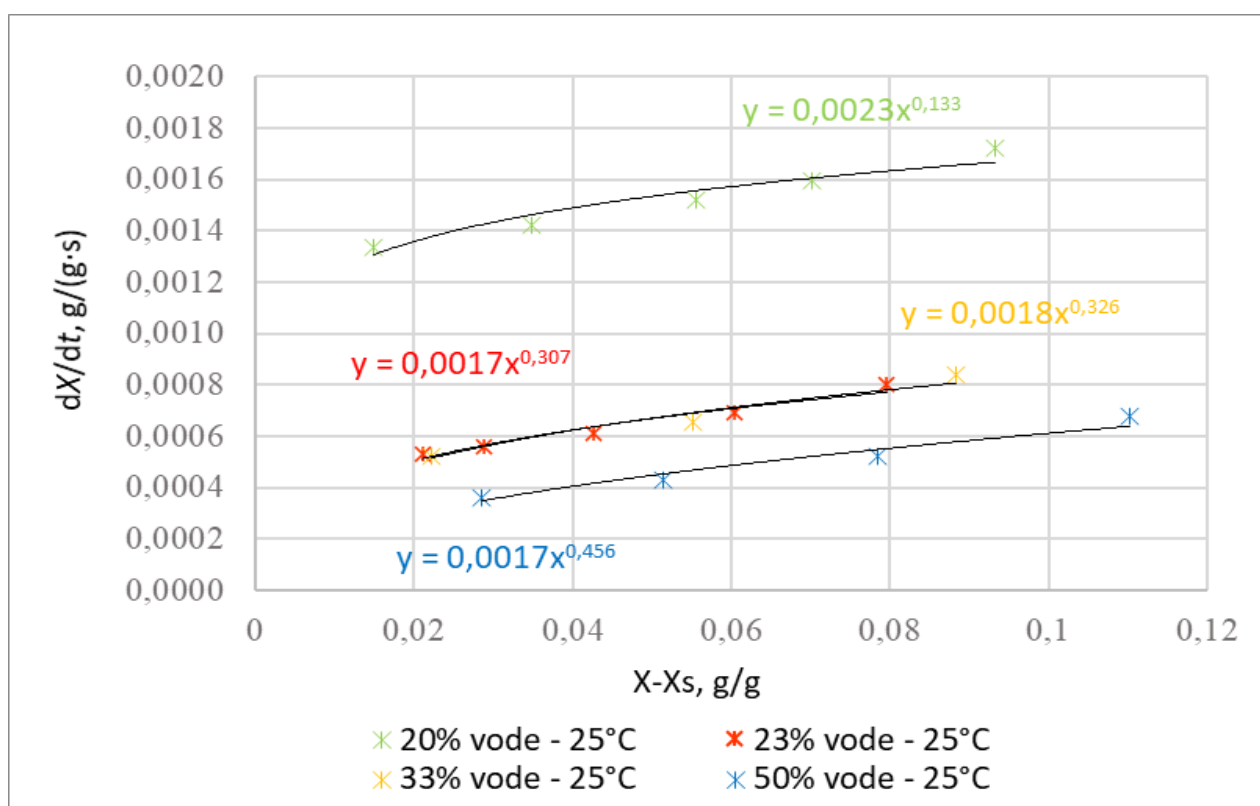
Usporedi li se izgled krivulja, za dvije temperature, raspodjela veličina kristala, mogu se uočiti razlike. Tako kristalizacijom pri 30°C uz dodatak 16% vode nastaju kristali jednolike veličine (slika eksperimenta E6 u tablici 6) koji pokazuju unimodalnu raspodjelu.

Ostali eksperimenti provedeni pri 25°C i 30°C imaju bimodalnu raspodjelu, što može biti pokazatelj sekundarne nukleacije. Također pogledaju li se mikrografije kristala, vidljiva je sklonost aglomeraciji, što može biti uzrok nastale bimodalne raspodjele. Ipak, kristali dobiveni u eksperimentima provedenim na višoj temperaturi krupniji su, a udio sitnijih čestica (u području oko 1  $\mu\text{m}$ ) je znatno manji u odnosu na raspodjele veličina kristala dobivene u pokusima provedenim na nižoj temperaturi. Za detaljniju raspravu i objašnjenje bilo bi bitno pogledati uzorke na elektronskom mikroskopu, pod većim povećanjem.

Može se zaključiti da je povišenje temperature zasićenosti otopine pogodovalo granulometrijskim svojstvima nastalih kristala jer se smanjio udio sitnijih kristala. To može ukazivati na manji lom kristala ili smanjenju sekundarnu nukleaciju. Osim toga, povećana je prezasićenost tijekom provedbe kristalizacije na višoj temperaturi, što pri provedbi kristalizacije uz dodatak antiotapala može pozitivno utjecati na formiranje nukleusa, smanjiti sekundarnu nukleaciju, a posljedica je nastanak većih kristala.

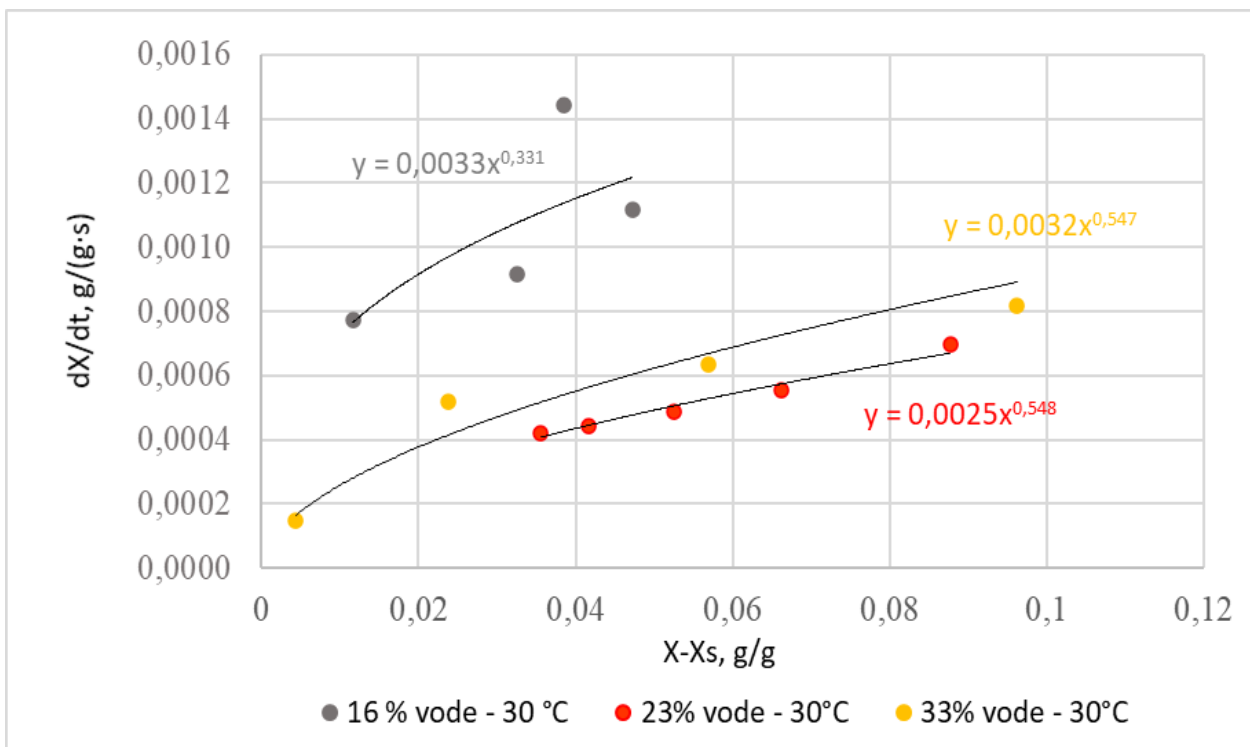
#### 4.6. Određivanje kinetičkih parametara

U području pada koncentracije otopine, prema jednadžbi (4), su iz brzine pada koncentracije u ovisnosti o promjeni pokretačke sile procesa određene kinetičke konstante: konstanta brzine rasta kristala  $k_g$  i red rasta kristala  $g$ . Točke dobivene eksperimentalnim mjerenjima su aproksimirane potencijском jednadžbom (slika 28 i 29). Koeficijent smjera u jednadžbi predstavlja konstantu brzine rasta,  $k_g$ , a eksponent predstavlja red reakcije rasta  $g$ . Njihove vrijednosti dane su u tablici 7.



Slika 28. Brzina smanjenja koncentracije u ovisnosti o pokretačkoj sili pri temperaturi 25°C





**Slika 29.** Brzina smanjenja koncentracije u ovisnosti o pokretačkoj sili pri temperaturi 30°C

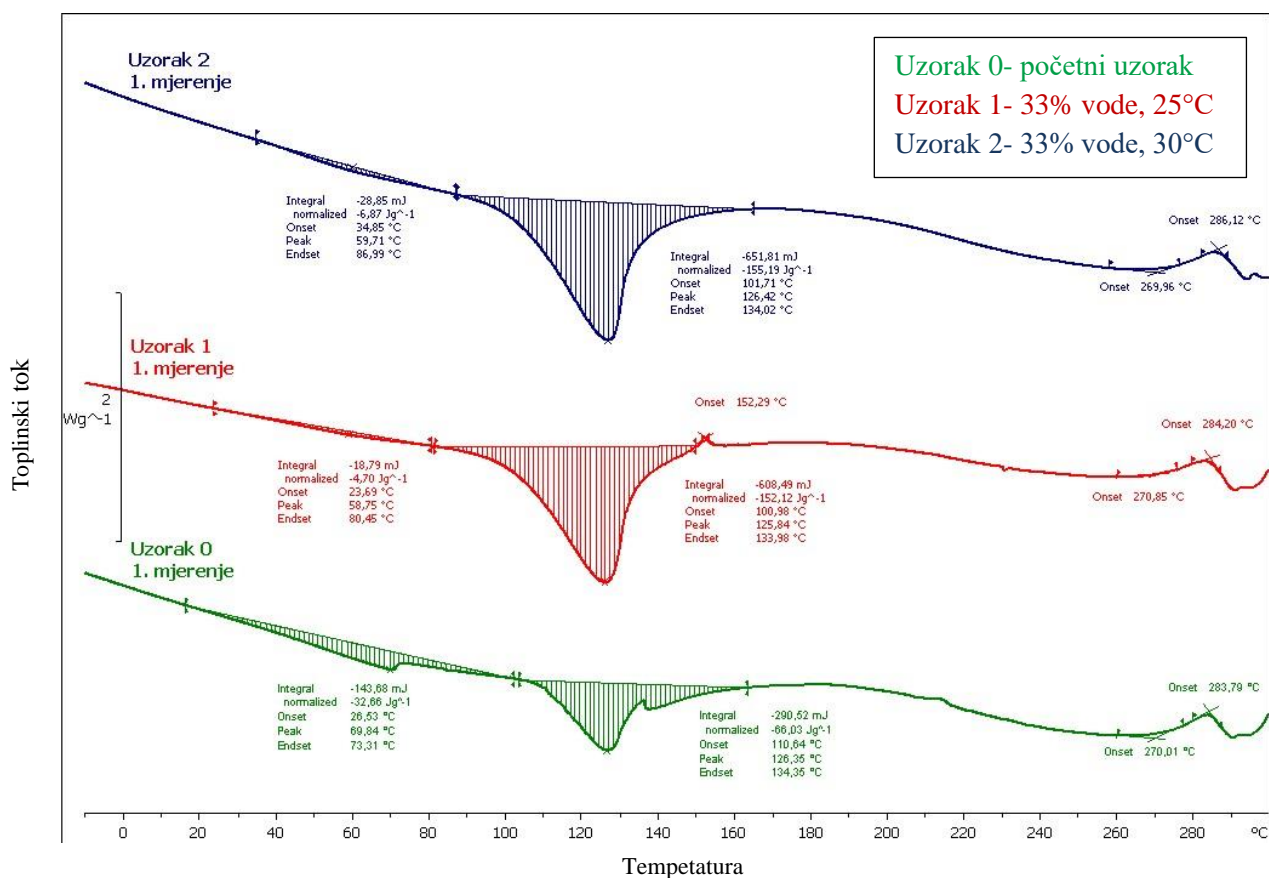
**Tablica 7.** Konstanta brzine rasta  $k_g$  i red reakcije  $g$  za različite volumne udjele vode pri temperature 25°C i 35°C

$\varphi$ , %	$k_g$ ( 25°C)	$g$ ( 25°C)	$k_g$ ( 30°C)	$g$ ( 30°C)
0,16			0,0033	0,331
0,2	0,0023	0,133		
0,23	0,0017	0,307	0,0025	0,548
0,33	0,0018	0,326		
0,5	0,0017	0,456	0,0032	0,547

Vrijednosti reda reakcije,  $g$  govori o kontrolirajućem mehanizmu rasta kristala. Što su njegove vrijednosti manje to je veća prezasićenost otopine tijekom rasta kristala [27]. U slučaju precipitacije koju karakterizira trenutna nukleacija i nagli rast kristala u uvjetima visoke prezasićenosti barem na početku procesa, ne čudi da je red rasta kristala manji od 1 (tablica 7).

Ovo može ukazivati da je mehanizam koji kontrolira rast kristala difuzijski prijenos tvari iz otopine na površinu rastućeg kristala. Vrijednosti  $g$  veće od jedan, upućuju da je kontrolirajući mehanizam proces ugradnje u kristalnu rešetku. Bez obzira na prevladavajući mehanizam rasta, konstanta,  $k_g$ , proporcionalna je koncentraciji otopljene tvari, tj. topljivi spojevi rastu sporije od slabo topljivih [27].

#### 4.7. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije



Slika 30. Prikaz DSC krivulja za tri uzorka fosamprenavir kalcija

Na DSC krivuljama, prikazanim na slici 30, za tri uzorka fosamprenavir kalcija mogu se uočiti tri pika. Dva su endotermna, a treći je egzoterman. Također su vidljive veće razlike za početni uzorak u odnosu na dva uzorka dobivena prekrizacijom. Prema literaturi [28] prvi endotermni rašireni pik predstavlja gubitak mase zbog isparavanja vezane vode. Naime, fosamprenavir kalcij ima više polimorfni formi te se može pretpostaviti da se uzorci (u većoj ili manjoj mjeri) sastoje od više polimorfa [29]. Kako se forma I javlja kao pentahidrat, a uzorak 0 ima široki pik u području ispod 100 °C, može se pretpostaviti da je sastavljen većinom od smjese forme I i forme II. I druga dva uzorka su smjesa barem dviju formi, ali s manjim udjelom forme I, što se može zaključiti iz vrijednosti specifičnih entalpija koje su niže za prekrizirane uzorke. Drugi endotermni pik na temperaturi od 125 do 135 °C odnosi se na raspad forme II. Kod početnog uzorka (na slici 30 označeno s 0) vidljivo je da je ovaj pik manji, kao i energija koja se troši za ovaj fazni prijelaz što ukazuje na manji udio forme II. Uzrok nastanka trećeg, egzotermnog pika je taljenje fosamprenavir kalcija koji se prema literaturi događa u intervalu od 282 do 284 °C [30].

## 5. ZAKLJUČAK

- ✓ Kao otapalo za proces kristalizacije izabrana je smjesa metanol-etanol (80:20), jer dodatak etanola dovodi do boljeg vođenja procesa i granulometrijskih svojstava kristala.
- ✓ Jedino istraženo antiotapalo koje je dovelo do pojave kristala je voda
- ✓ Dodatak antiotapala (vode) u smjesu otapala metanol-etanol (primarno otapalo), dovodi do smanjenja topljivosti fosamprenavir kalcija u primarnom otapalu.
- ✓ Koncentracijske krivulje pokazuju naglo smanjenje koncentracije pri 16% volumnog udjela vode, što označava početak nukleacije.
- ✓ Koncentracija otopine postiže vrlo niske vrijednosti na oko 30% udjela vode, pri čemu dolazi do izdvajanja većine soli iz otopine.
- ✓ Promatranjem mikrografija kristala uočeno je smanjenje veličine kristala s povećanjem volumnog udjela antiotapala.
- ✓ Kristali dobiveni u eksperimentima provedenim na višoj temperaturi su krupniji, pa je povišenje temperature zasićenosti otopine pogodovalo granulometrijskim svojstvima nastalih kristala.
- ✓ Dobivene raspodjele veličina kristala za većinu eksperimenata pokazuju bimodalan oblik uzrokovan sekundarnom nukleacijom ili aglomeracijom kristala.
- ✓ Vrijednosti reda reakcije,  $g$ , manja je od 1, što može ukazivati da je mehanizam koji kontrolira rast kristala difuzijski.
- ✓ Analiza DSC-krivulja ukazuje da endotermni pikovi uzoraka fosamprenavir kalcija odgovaraju prisustvu polimorfnih formi: forme I i forme II. Treći, egzotermni pik predstavlja taljenje fosamprenavir kalcija.

## 6. POPIS SIMBOLA

$A$	- površina, $m^2$
$c$	- koncentracija, $mol/dm^3$
$FPV-Ca$	- Fosamprenavir kalcij
$G$	- linearna brzina rasta kristala, $ms^{-1}$
$g$	- red rasta kristala
$k_g$	- konstanta brzine rasta kristala
$L$	- linearna dimenzija kristala, $m$
$m$	- masa, $g$
$R_G$	- maseni fluks, $kg\ m^{-2}\ s^{-1}$
$RVK$	- raspodjela veličina kristala
$t$	- vrijeme, $s$
$T$	- temperatura, $^{\circ}C$
$X$	- koncentracija otopine, $g_{soli}/g_{otapala}$
$x_{sr}$	- srednja veličina čestica, $\mu m$
$q_3(x)$	- funkcija gustoće raspodjele, $\% \mu m^{-1}$

### Grčka slova

$\alpha$	- volumenski faktor oblika
$\beta$	- površinski faktor oblika
$\varphi$	- volumni udio, $\%$
$\rho$	- gustoća, $kg\ m^{-3}$

## 7. LITERATURA

1. Tung, H., Paul, E.L., Midler, M., McCauley, J. A., *Crystallization of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2009.
2. Fujiwara, M., Nagy, Z.K., Chew, J.W., Braatz, R.D., 2005. First-principles and direct design approaches for the control of pharmaceutical crystallization, *Journal of Process Control*, 15 (2005) 493–504.
3. A. G. Jones, *Crystallization Technology Handbook*, Second edition, vol. 80, no. 5, 2002.
4. A. Sander, *Jedinične operacije u ekoinženjerstvu*, nastavni tekst, FKIT, Zagreb.
5. Vollmer, U., Raisch, J., Control of batch cooling crystallizers based on orbital flatness, *International Journal of Control*, 76 (16) (2003) 1635–1643.
6. Vrban, I., *Analiza i simulacija procesa kristalizacije*, Diplomski rad, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, 2019.
7. Myerson, A. S., *Handbook of Industrial Crystallization*, Butterworth & Heinemann, Oxford, 2. izdanje, 2002.
8. <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/86f1fc06-2ff6-4615-ad1b-dbaa72f50497/kemija-2/m02/j02/index.html> (pristup 28. srpnja 2021.).
9. Nyvlt, J., Kinetics of nucleation in solutions, *Journal of Crystal Growth*, 3 (1968) 377-383.
10. Prlić Kardum, J., *Studij kinetike kristalizacije pomoću modelnih eksperimenata*, Doktorska disertacija, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, 2005.
11. Hrkovac, M., *Utjecaj pomoćne komponente na termodinamiku i kinetiku kristalizacije glicina*, Doktorska disertacija, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, 2012.
12. Linse, S., Mechanism of amyloid protein aggregation and the role of inhibitors. *Pure Appl. Chem.*, 91 (2019), 211–229.
13. Čavlina, A., *Utjecaj procesnih parametara na granulometrijska svojstva memantin hidrogen sulfata u procesu šaržne kristalizacije*, Diplomski rad, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, 2015.
14. Jones, A. G., *Crystallization Process Systems*, Butterworth & Heinemann, Oxford, 2002.
15. Mulin, J.W., *Crystallisation*, Butterworth & Co., London, 1997.
16. Hraste, M., *Mehaničko procesno inženjerstvo*, Hinus, Zagreb, 2003.
17. Đuran, L., *Optimizacija procesa kristalizacije fosamprenavir-kalcija*, Diplomski rad, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, 2020.

18. Kovačić, T., Andričić, B., *Struktura i svojstva polimera*, nastavni tekst, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split.
19. Škorić, I., *Molekulska spektroskopija*, nastavni tekst, FKIT, Zagreb.
20. Modrić, S., *Rendgenska difrakcija u polikristalu*, Diplomski rad, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
21. Bernstein, J., *Polymorphism in Molecular Crystals*, International Union of Crystallography, Oxford, 2002.
22. Hilfiker, R., *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Njemačka, 2006.
23. Nagy, Z. K., Fujiwara, M., Braatz, R.D., *Modelling and control of combined cooling and antisolvent crystallization processes*, *Journal of Process Control* 18 (2008) 856-864.
24. Wening, K., Breitzkreutz, J., *Oral drug delivery in personalized medicine: unmet needs and novel approaches*, *International journal of pharmaceutics*, 404(1) (2011) 1-9.
25. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fosamprenavir-calcium> (pristup 3. kolovoz 2021.).
26. <https://www.aidsmap.com/about-hiv/arv-background-information/fosamprenavir-telzir-lexiva> (pristup 3. kolovoz 2021.).
27. Giulietti, M., Seckler, M.M., Derenzo, S., Ré, M.I., Cekinski, E., *Industrial crystallization and precipitation from solutions: state of the technique*, *Braz. J. Chem. Eng.*, 18 (2001) 423-440.
28. Cordeiro, F.C., Bettio, I., Trevisan, M.G., *Studies on the characterization and polymorphic stability of Fosamprenavir*, *An Acad Bras Cienc*, 92 (2020).
29. <https://patents.justia.com/patent/20120208787> (pristup 27. kolovoz 2021.).
30. [https://www.chemsrc.com/en/cas/226700-81-8\\_443316.html](https://www.chemsrc.com/en/cas/226700-81-8_443316.html) (pristup 27. kolovoz 2021.).

