

U n i v e r z i t a P a l a c k é h o v O l o m o u c i

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie

## **Stanovení velikosti částic heterocyklických API látek**

Diplomová práce

Autor:

Bc. Nicole Klegová

Školitel:

Ing. Roman Gabriel, PhD.

Studijní program:

B 1407 Chemie

Studijní obor:

Fyzikální chemie

Forma studia:

Prezenční

Olomouc 2016

P a l a c k ý U n i v e r s i t y i n O l o m o u c

Faculty of Science

Department of Physical Chemistry

## **Particle size determination of heterocyclic API substances**

Diploma thesis

Author:

Bc. Nicole Klegová

Supervisor:

Ing. Roman Gabriel, Ph.D.

Study program:

B 1407 Chemistry

Field of study:

Physical chemistry

Form of study:

Full-time study

Olomouc 2016

# PROHLÁŠENÍ

Tato diplomová práce byla vypracována na Univerzitě Palackého, Přírodovědecké fakultě v Olomouci v období září 2015 – duben 2016.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry fyzikální chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....  
Vlastnoruční podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych na tomto místě poděkovat svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Romanu Gabrielovi Ph.D., za odborné vedení, veškeré rady, připomínky, nápady a motivaci k mé práci.

Dále pak děkuji všem pracovníkům oddělení Výzkumu a Vývoje, TAPI, TCI za pomoc při měření a vyhodnocování mých výsledků k diplomové práci.

Také děkuji pracovníkům katedry fyzikální chemie za AFM měření.

A můj velký dík patří mým rodičům a sestře za jejich podporu v průběhu celého studia.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Nicole Klegová
Název práce:	Stanovení velikosti částic heterocyklických API látek
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	Ing. Roman Gabriel, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2016

### Abstrakt:

Téma diplomové práce bylo zaměřeno na stanovení velikosti částic aktivních farmaceutických substancí. Látkou, na které byly prováděny experimenty byl Nicergolin. Tento derivát námelových alkaloidů se vyrábí ve firmě Teva Czech Industries s.r.o. již dlouhá léta. Posledním krokem při přípravě této látky je krystalizace. Pomocí této operace je možné připravit materiál s různou distribucí velikosti částic.

Cílem diplomové práce bylo připravit krystalický materiál s rozdílnou distribucí velikosti částic a porovnat metody měření distribuce velikosti částic. Tyto distribuce byly měřeny jednak online metodou pomocí FBRM laserové sondy a tyto distribuce byly porovnány s offline měřením pomocí laserové difrakce.

Touto prací bylo také prokázáno, že způsob krystalizace má vliv nejenom na distribuci velikosti částic, ale i na povrchové vlastnosti krystalického materiálu. Tyto vlastnosti pak také dále ovlivňují chování krystalického materiálu při filtraci, rychlosti sušení, snadnosti síťování apod.

V průběhu práce byl sledován vliv teploty očkovaní, vliv množství očkovacího materiálu, vliv ultrazvuku a délka sonokrystalizace na konečnou distribuci velikosti částic.

Experimentálně bylo zjištěno, že ve všech případech krystalizačních experimentů byly hodnoty distribuce velikosti částic naměřené online FBRM metodou větší, než distribuce naměřené offline metodou pomocí laserové difrakce.

V případě očkované krystalizace byly naměřeny největší částice (dle parametru D90) při experimentech s množstvím 1% očkovacího materiálu a s 1 hodinovou chladicí teplotní rampou (ovšem s bimodálním rozložením distribuce velikosti částic). U experimentů s větším množstvím očkovacího materiálu byly naměřeny nižší hodnoty parametrů D90, ale zato s úzkou distribucí velikosti částic.

V druhém případě způsobu krystalizace Nicergolinu (iniciace nukleace ultrazvukovou sondou) byl parametr D90 závislý na nastavené teplotě při sonikaci a délce chladicí teplotní rampy po ukončení sonikace. Největší částice byly naměřeny při teplotě 20 °C a délce teplotní chladicí rampy 120 minut. Naopak nejmenší při teplotě 25 °C a chladicí teplotní rampa byla nastavena na 30 minut.

V poslední skupině experimentů (iniciace nukleace ultrazvukem a sonokrystalizace) byl parametr D90 závislý opět na teplotě sonikace ale i na nastavení amplitudy ultrazvuku a na délce sonokrystalizace. Částice s největší hodnotou parametru D90 byly získány nejkratší dobou sonokrystalizace. S prodloužením doby sonokrystalizace se parametr D90 zmenšoval a nejmenší hodnoty dosáhl při amplitudě ultrazvuku 50% a 120 minutové sonokrystalizaci.

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu bylo také zjištěno, že povrch krystalického materiálu se liší, byla-li nukleace ultrazvukem pouze iniciována nebo probíhala-li sonokrystalizace delší dobu.

Tato zjištění byla potvrzena pomocí mikroskopu atomárních sil, pomocí kterého byla spočítána průměrná drsnost povrchu, bylo zjištěno, že pokud sonokrystalizace probíhá po dobu 120 min. je povrch krystalického materiálu mnohem více homogenní (to platí i pro očkovanou krystalizaci), než povrch materiálu, který byl vykrystalován pomocí iniciace nukleace ultrazvukem.

Klíčová slova: krystalizace, distribuce velikosti částic, Nicergolin, FBRM  
laserová sonda, iniciace nukleace, sonokrystalizace, očkování,  
API

Počet stran: 63

Počet příloh: 1 CD ROM

Jazyk: čeština

## **Bibliographical identification:**

Author's first name and surname:	Bc. Nicole Klegová
Title:	Particle size determination of heterocyclic API substances
Type of thesis:	Diploma
Department:	Department of Physical Chemistry
Supervisor:	Ing. Roman Gabriel, Ph.D.
The year of presentation:	2016

### Abstract:

The topic of this thesis is focused on establishing particles sizes of active pharmaceutical ingredients. The material used for conducting experiments was Nicergolin. This is a derivative of ergot alkaloids that has been produced by company Teva Czech Industries s.r.o. for many years. The last step to prepare this material is crystallization. This operation allows preparation of materials with a varied distribution of particle sizes.

The goal of this thesis was to prepare crystalline material with a varied distribution of particle sizes and compare methods for measuring a distribution of particle sizes. These distributions were measured by the online method of FBRM laser probe and compared with offline measurements by laser diffraction.

This thesis also confirmed that a method of crystallization has impact not just on distribution of particle sizes but also on surface properties of crystalline material. These properties have also impact on the performance of a crystalline material during filtration, speed of drying, ease of sieving and milling.

During the work was tracked seeding temperature, impact of amount of the seed material, impact of ultrasound and length of sonocrystallization on the final distribution of particle sizes.

All cases of the crystallization experiments found that values of distribution of particle sizes measured by the online FBRM method were higher than distributions measured by the offline method of laser diffraction.

The biggest particles (according to parameter D90) were in all cases measured during experiments with 1% of the seed material and 1-hour cooling ramp (but with bimodal distribution of particle sizes). The measurements during experiments with a bigger amount of



the seed material found lower values of parameter D90 but with a narrow distribution of particle sizes.

Parameter D90 in the second crystallization method of Nicergolin (nucleation initiation by an ultrasound probe) was dependent on a temperature set during sonication and on a length of cooling ramp after completing of sonication. The biggest particles were measured with the temperature 20 °C and 120 minutes' length of a cooling ramp. The smallest particles were with the temperature 25 °C and 30 minutes' length of a cooling ramp.

Parameter D90 in the last group of experiments (nucleation initiation by an ultrasound probe and sonocrystallization) was again dependent on a temperature set during sonication as well as on a length of sonocrystallization. Particles with the highest value of parameter D90 were produced by the shortest time of sonocrystallization. Parameter D90 was decreasing with increasing time of sonocrystallization and the lowest value was achieved by 50% ultrasound amplitude and 120 minutes' length of a cooling ramp.

With scanning electron microscope has also found that surface of a crystalline material varies depending on whether ultrasound nucleation was only initiated or sonocrystallization was going for a longer time.

Those findings were proved by a microscope of atomic forces. This calculated average roughness of surface and found that if sonocrystallization lasts for 120 minutes then surface of crystalline material is much more homogeneous (this applies also for seeding crystallization) than surface of material crystalized with nucleation initiation by an ultrasound probe.

Keywords: crystallization, particle size distribution, Nicergolin, FBRM laser probe, nucleation initiation, sonocrystallization, seeding, API

Number of pages: 63

Number of appendices: 1 CD ROM

Language: Czech

# OBSAH

<b>PODĚKOVÁNÍ</b>	<b>4</b>
<b>OBSAH</b>	<b>11</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>13</b>
<b>2 TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>14</b>
2.1 Struktura farmaceutického průmyslu	14
2.2 Přehled světových farmaceutických výrobců	14
2.2.1 Inovativní firmy	14
2.2.2 Generické firmy	14
2.3 API látky	14
2.4 Krystalizace API	15
2.4.1 Teorie krystalizace	16
2.4.2 Termodynamika krystalizace	18
2.4.3 Mechanismus růstu krystalů	19
2.4.4 Tvar krystalu	19
2.4.5 Krystalizace ve farmaceutické výrobě	20
2.4.6 Krystalizace chlazením	21
2.4.7 Krystalizace s přidáním antisolventu	22
2.4.8 Krystalizace s odpařením rozpouštědla	22
2.4.9 Reakční krystalizace	22
2.4.10 Očkování	22
2.5 Velikost částic farmaceutických látek	24
2.5.1 Metody měření distribuce velikosti částic ve farmacii	26
2.5.2 Optická mikroskopie	26
2.5.3 Skenovací elektronová mikroskopie	27
2.5.4 Laserová difrakce	27
2.5.5 FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement)	28
2.5.6 Optimalizace průmyslové krystalizace sledováním velikosti částic online	29
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>30</b>
3.1 Použitá API – Nicergolin	30
3.2 Použité přístroje při charakterizaci velikosti částic	30
3.3 Příprava Nicergolinu	34
3.3.1 Krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu	34
3.3.2 Krystalizace Nicergolinu bez očkovacího materiálu	34
3.3.3 Iniciace krystalizace Nicergolinu pomocí ultrazvukové sondy	34
3.3.4 Iniciace nukleace Nicergolinu a sonokrystalizace	35
3.4 Použité chemikálie	35
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>36</b>
4.1 Křivka rozpustnosti Nicergolinu v acetonu	36
4.2 Krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu	37
4.3 Iniciace nukleace Nicergolinu ultrazvukovou sondou	42

4.4	Iniciace nukleace Nicergolinu a sonokrystalizace _____	46
4.5	Srovnání krystalického materiálu s největší a nejmenší distribucí velikosti částic _____	50
4.6	Drsnost krystalického materiálu _____	51
4.7	Statistické vyhodnocení pomocí JMP softwaru _____	53
<b>5</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK _____</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR _____</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY _____</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY _____</b>	<b>61</b>

# 1 ÚVOD

Krystalizace patří mezi nejdůležitější separační a čistící proces ve farmacii. Většina aktivních substancí je totiž vyráběna v pevné fázi. Krystalizační proces musí garantovat kvalitu produktu jako je např. výtěžek, chemická a fyzikální čistota, distribuce velikosti částic, krystalový tvar a obsah zbytkových rozpouštědel. [6,31]

Krystalizace patří mezi základní procesy a v přírodě se s ní člověk poprvé setkal při odpařování moří nebo mrznutí vody. Až později ji lidé začali využívat ve výrobě. Ačkoliv krystalizaci známe tak dlouho, stále ji v některých případech nelze řídit. Patří k nim příklady z farmaceutického průmyslu krystalizace, např. krystalizace nestabilních polymorfů a jejich možné přechody na stabilní fázi v určitých technologických stupních, jako je vlhká granulace nebo mikronizace. [9]

Aby výsledné krystaly měly požadovanou kvalitu, je třeba znát jejich faktory, které samotnou krystalizaci ovlivňují a tyto parametry kontrolovat. Základními parametry, kterými lze ovlivnit krystalizaci, jsou koncentrace, teplota a přesycení roztoku, množství nečistot, rychlost a typ míchání. V posledních letech bylo dosaženo velkého posunu při sledování a ovlivňování krystalizačních parametrů. [4,6]

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit různé distribuce velikosti částic pomocí FBRM sondy a PSD laserové difrakce různými postupy přípravy krystalizace účinné látky Nicergolinu a dokázat, že řízenou a kontrolovanou krystalizací lze získat krystalický materiál požadované distribuce velikosti částic. A že i v provozních podmínkách se nemusíme spoléhat na náhodné procesy, ale že i zde platí pravidla a zákonitosti, kterými lze řídit proces krystalizace.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 Struktura farmaceutického průmyslu**

Farmaceutický průmysl v současné době patří ve většině technicky vyspělých zemí mezi nejvýznamnější odvětví.

Do výzkumu, vývoje a výroby léčiv se zapojuje různým způsobem velké množství institucí a firem, mezi nimiž existuje řada synergických efektů, ale i tvrdý konkurenční boj.

### **2.2 Přehled světových farmaceutických výrobců**

#### **2.2.1 Inovativní firmy**

Na špici z hlediska celkového přínosu k úrovni léčby stojí tzv. inovativní firmy (research based companies). Inovativní firmy využívají nejnovější poznatky k vývoji nových originálních léčiv, které přinášejí výrazný terapeutický prospěch. [1]

#### **2.2.2 Generické firmy**

Pod tímto pojmem rozumíme společnosti, které po vypršení patentových či jiných dodatečných ochran zcela legálně vyrábějí léčiva původně zavedená firmami inovativními. Tímto dochází ke značnému snížení cen těchto léčiv. Hlavním přínosem těchto firem je zvýšení dostupnosti moderních léčiv pro širší okruh pacientů. [1]

Největší generickou firmou na světě je Teva. Byla založena již v roce 1901 ve městě Jeruzalémě v Izraeli.

Na českém trhu působí jako Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o. od roku 1997. Se současným ročním obratem se řadí na druhé místo. Korporátní dcerou Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o. je výrobní závod v Opavě Teva Czech Industries s.r.o. založena v roce 1883 a dříve známá také pod názvem Galena. Ve svém širokém portfoliu má generické léčivé přípravky – především antiastmatika, cytostatika, imunosupresiva aj. v podobě tablet, tobolek a kapalných lékových forem. Dále také volně prodejné látky (OTC), rostlinné extrakty a účinné farmaceutické látky (API).

### **2.3 API látky**

Léčivá látka je látka nebo soustava látek, která má schopnost interagovat s lidským nebo živočišným organismem a výsledkem je poznání chorob, ochrana před nimi, zmírnění příznaků onemocnění a jejich léčení.

Většinou léčivé látky nejsou vhodné pro přímé diagnostické nebo terapeutické použití, proto je třeba je upravit tak, aby mohly na daném místě a v daném čase plnit požadovanou funkci, proto je třeba je transformovat do podoby léku. [2]

Léčivý přípravek je produkt získaný z léčiv a pomocných farmaceutických látek určitým technologickým postupem. Léčivé přípravky mají lékovou formu, která je dána potřebou podání (užití) léku a koexistencí v ní přítomných léčiv a pomocných látek. Do tohoto pojmu zahrnujeme nejen tvar léku, ale i jeho složení a fyzikální strukturu. Lékovou formou jsou například tobolky, tablety, injekce nebo masti a krémy. [2]

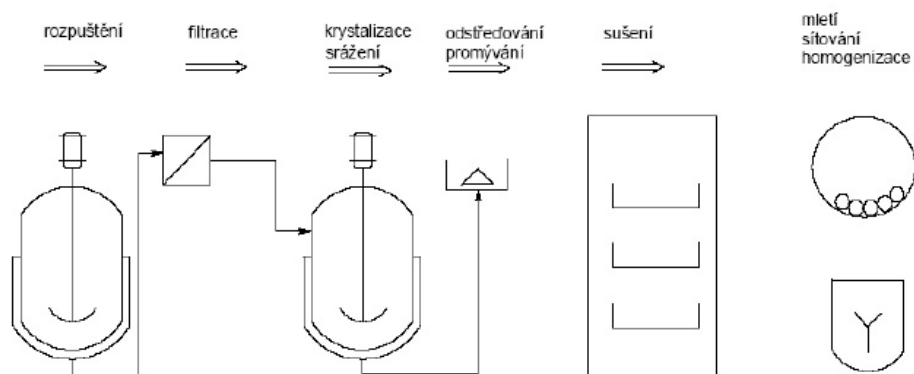
Platný Český i Evropský lékopis již neuvádějí pojem lék. Lék je pojem historicky daný, odvozuje se od něj pojem lékárna známý v Evropě již od 13. století, v Arábii již od 8. století. Pro účely farmaceutické technologie je pojem lék vhodný a výstižný. Základní kategorie léčivo zahrnuje i léčivé látky, jejichž výroba nemusí být farmaceutickou činností. Proto se můžeme setkat s pojmem lék i jako léčivý přípravek. [2]

## 2.4 Krystalizace API

Ve farmaceutickém průmyslu je klíčovým procesem při výrobě farmaceutických substancí API krystalizace. Jedná se především o separační a čistící proces při finálním stupni výroby krystalické API. Krystaly vznikají nejčastěji z kapalných fází postupy, které jsou založeny na vytvoření přesyceného roztoku API. Při krystalizaci dochází ke samouspořádacímu supramolekulárnímu procesu, při kterém se původně nahodilě orientované molekuly skládají do vnitřně uspořádaných krystalů (supramolekuly). [5, 6]

Krystalizace API substancí (**Obr. 1**) je zejména kritická pro kvalitu produktu jako je chemická čistota a správná polymorfní forma, která musí být přísně kontrolována, aby splňovala stanovené specifikace. [7] Dalšími sledovanými parametry krystalizace jsou:

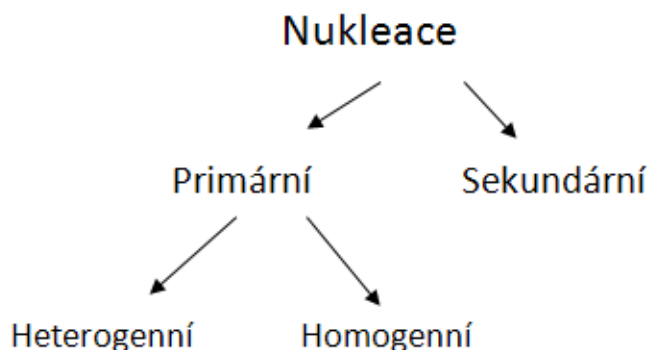
- výtěžek
- distribuce velikosti částic (DVC)
- tvar krystalu
- obsah zbytkových rozpouštědel
- flowabilita
- kvalita povrchu (drsnot, adsorpce) [13]



**Obr. 1** Krystalizační proces, od začátku po finální produkt [4]

### 2.4.1 Teorie krystalizace

Ve farmacii se jedná téměř vždy o vylučování pevné fáze z roztoku. Proces krystalizace se skládá ze dvou hlavních kroků: nukleace a růst krystalů. [8]



**Obr. 2** Rozdělení nukleace

#### Homogenní nukleace

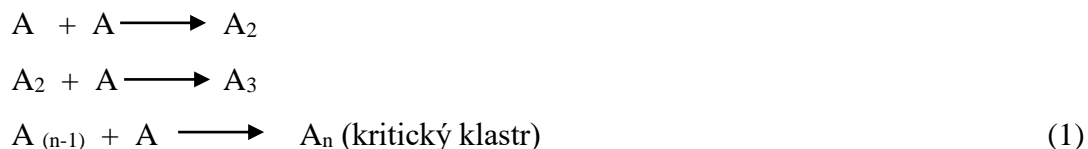
Jedná se o idelizující proces, který slouží k nastavení základního modelu. Při této nukleaci se nuklea tvoří náhodnými srážkami molekul kdekoliv v objemu krystalizujícího roztoku bez přítomnosti jiné fáze. [6]

Tato nukleace hraje roli v určení, jaká krystalická forma vznikne a má vliv i na distribuci velikosti částic. Hlavním problémem při studiu nukleace je fakt, že velikost



krystalizačního zárodku je v rozmezí 10 – 100 molekul a čas potřebný k vytvoření zárodků je v časovém rozmezí od několika sekund až po několik dní. [7]

Nukleační teorie popisuje vznik krystalizačního zárodku jako sekvenci molekulárních adicí, kdy vznikají v přesyceném roztoku molekulární agregáty neboli klastry podle schématu [9]:



Roztok pak obsahuje agregáty různých velikostí  $A_2, \dots, A_n$ . Tento model je založen na pracích Gibbse, Beckera a Döringera a Volmera. [8]

Aby v homogenní soustavě vznikla nová fáze, musí se nejprve vytvořit stabilní zárodek této nové fáze – kritické nukleum. Nuklea se tvoří náhodnými srážkami molekul kdekoliv v objemu krystalizujícího roztoku bez přítomnosti jiné fáze.

Nukleační teorie předpokládá krystalizaci v jednosložkovém systému a uvažuje kulovitý tvar agregátů, který je spojen se změnou Gibbsovy energie  $\Delta G$ , vztažený na jeden agregát:

$$\Delta G = (4\pi/3)r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma_{cl} \quad (2)$$

kde  $\Delta G_v$  je hnací síla nukleace, je záporná a značí rozdíl mezi Gibbsovými energiemi jednotkových objemů krystalické a kapalné fáze. Veličina  $\gamma$  označuje mezifázové napětí mezi krystalickou (c) a kapalnou (l) fází,  $r$  je poloměr kulovitého agregátu.

První člen  $\Delta G$  způsobuje pokles, druhý člen růst a při spontánním ději musí být  $\Delta G$  záporné. Po překonání hranice kritického poloměru  $r$  a nukleační bariéry  $\Delta G$  z nukleí rostou krystaly. [6]

### **Heterogenní nukleace**

Heterogenní nukleace probíhá přednostně na přítomné fázi systému, např. na krystalizačním přídavku nebo na stěně krystalizátoru. [6]

Tato fáze disponuje volným povrchem a neexistuje tak velká energetická bariéra pro přechod látky do nové fáze jako u nukleace homogenní. [10] Je energeticky výhodnější, protože pokud vznikají nuklea na povrchu cizích částic bude stačit k jejich vytvoření mnohem menší počet atomů (molekul), než by vyžadovala nuklea o stejné kritické velikosti při homogenní nukleaci. [8]

## Sekundární nukleace

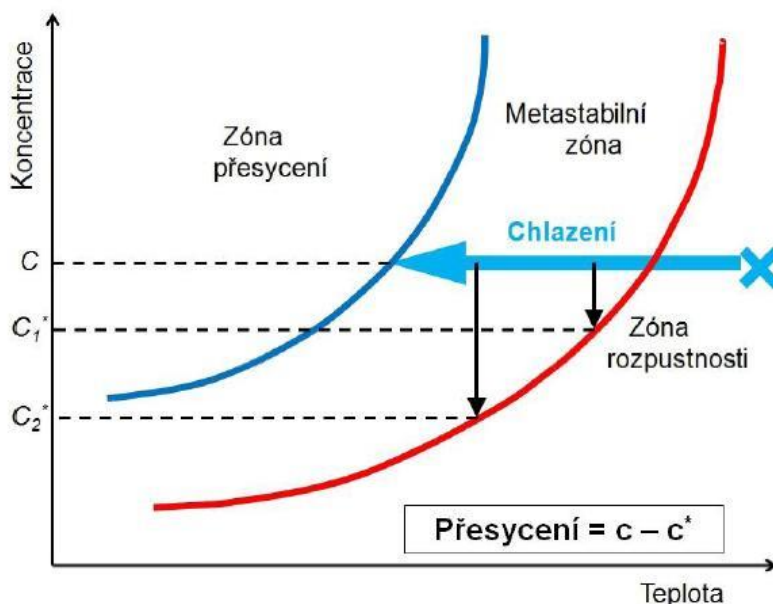
Při řízené krystalizaci ve farmaceutické výrobě se velmi často používá nukleace sekundární – očkovaná a to z důvodu, že nikdy nelze zcela vyloučit polymorfni chování systému. K výchozímu roztoku při očkování přidáváme krystalky (zárodky, očka) požadované fáze. Sekundární nukleace může být vyvolána záměrně nebo neúmyslně, kdy již přítomné krystalky v suspenzi se dělí např. vzájemným otěrem nebo dochází k jejich rozbití při střetu s míchadlem. [11]

### 2.4.2 Termodynamika krystalizace

Krystaly mohou nukleovat a růst pouze tehdy, jestliže je roztok přesycený. V termodynamické rovnováze je nasycený roztok při určité teplotě. Přesycení roztoku je vyjádřeno jako:

$$\Delta c = c_{př} - c_{rov} \quad (3)$$

kde  $c_{př}$  označuje koncentraci přesyceného roztoku a  $c_{rov}$  koncentraci nasyceného roztoku. Stav přesycení je základní požadavek pro všechny krystalizační procesy. [6]



**Obr. 3** Přesycení řídicí síla krystalizace

Na **Obr. 3** je křivka rozpustnosti, která je znázorněna červenou barvou. Jedná se o závislost koncentrace krystalizující API na teplotě pro nasycený roztok. Oblast nenasyčeného roztoku se nachází pod křivkou rozpustnosti. Pokud snižujeme

teplotu, postupně se dostáváme z nenasyceného roztoku přes roztok nasycený k modré křivce, která odpovídá maximálnímu přesycení (začátek vylučování prvních krystalů). Tyto dvě křivky vytyčují tři oblasti:

**stabilní** – (nenasycená) zóna rozpustnosti, kde je nemožná krystalizace

**metastabilní** – (přesycená) zóna rozpustnosti, nachází se mezi křivkou rozpustnosti a křivkou přesycení, kde ke krystalizaci může, ale i nemusí dojít

**nestabilní** – (labilní) zóna přesycení, kde je pravděpodobná spontánní krystalizace, ale není nevyhnutelná. [12]

Krystalizace API se musí provést v metastabilní zóně, v oblasti nenasyceného roztoku již pevná fáze neexistuje.

### 2.4.3 Mechanismus růstu krystalů

Růst krystalů znamená přirůstání dalšího materiálu k nukleím. Jedná se o komplikovaný proces, jehož detaily dosud nejsou zcela objasněny. Důvodem je, že přesycený roztok obsahuje celou škálu stavebních jednotek (atomy, ionty, molekuly). Výsledkem růstu krystalu je krystalová plocha a soubor všech krystalových ploch určuje morfologii krystalu. Podle podmínek krystalizace nemusí všechny krystalové plochy vždy stejnoměrně vyrůst, v konečném důsledku je krystalová morfologie tvořena plochami, které rostou nejpomaleji a mají tudíž nejmenší energii. Oproti tomu nejrychleji rostoucí plochy (s největší energií) většinou zarůstají. [4]

Aby krystal v přesyceném roztoku rostl, musí být rozpuštěná složka transportována objemem matečného roztoku k povrchu nuklea a tam je následně ukotvena do krystalové struktury. [9]

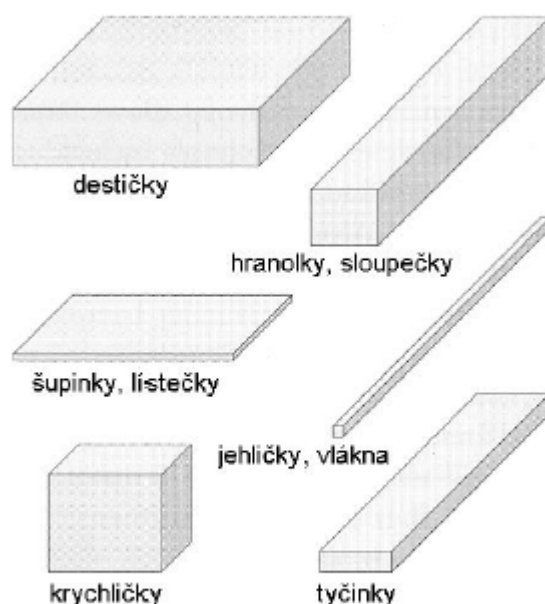
### 2.4.4 Tvar krystalu

Vnější tvar (habit) krystalu je vymezen jeho vnitřní strukturou. Krystalografové vytvořili nomenklaturu pro popsání mnoha různých forem a tvarů, které se vyskytují v každém ze sedmi krystalových systémů. Název habit má specifický význam a je používán k popisu vnějšího vzhledu krystalu a zahrnuje skupinu symetricky podobných krystalových ploch. Pro mikroskopické pozorování ve farmacii není praktické identifikovat všechny tyto

formy (tetragonální, kubická, atd.). Obzvláště to platí pro krystaly, které mají rozdílný tvar zapříčinený deformací, která byla způsobena nestejným vývojem určitých krystalových ploch během růstu. K popisu tvaru krystalu se používají mnohem jednodušší termíny, které jsou vhodné pro sledování rozdílů mezi jednotlivými šaržemi farmaceutické substance. [4,10]

Literatura uvádí šest základních tvarů a krystaly mající některý z těchto tvarů jsou zařazeny do jednoho ze sedmi krystalových systému.

Je důležité rozlišit pojmy jako **krystalová forma** (crystal form) popis vnitřní struktury- výsledek se získává práškové difrakce a **tvar** neboli habitus (crystal shape) na základě pozorování.



**Obr. 4** Šest základních tvarů krystalu [10]

#### 2.4.5 Krystalizace ve farmaceutické výrobě

Krystalizace je důležitým dělicím a čistícím procesem použitý pro širokou škálu materiálů v chemickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu.[31] Ve farmaceutické výrobě není krystalizace kontinuální proces, ale probíhá v šaržích jako výroba chemických specialit. Kontrola velikosti krystalu, tvaru a krystalové struktury je velmi důležitá, protože

může ovlivnit navazující operace jako filtrace, sušení a mletí jakož i ovlivňovat fyzikální a chemické vlastnosti pevné látky jako je disoluční rychlost a rozpustnost. [7]

Před návrhem procesu krystalizace musí být experimentálně stanovena kinetika procesu, jelikož současné techniky nejsou schopny kinetiku přesně určit a lze provést výpočet optimálních pracovních podmínek a kontrolních postupů. Jedná se o polymorfní chování a charakteristiku jednotlivých polymorfů a hydrátů (solvátů). Identifikace polymorfů se provádí pomocí vhodné analytické metody, např. RTG práškovou analýzou.

Důležitým parametrem je i rovnovážná křivka rozpustnosti zvoleného polymofru (hydrátu), kde je významná závislost koncentrace na teplotě. Velmi důležité je stanovení šířky metastabilní oblasti (resp. křivky metastabilní oblasti), ve které se vede krystalizace. Šířka metastabilní zóny je dána jako teplotní interval (podchlazení), kdy na horní hranici začnou vznikat první krystaly a pod dolní hranici se začínají první krystaly rozpouštět. Znalost šířky metastabilní zóny poskytuje informaci, kdy dojde k nechtěné spontánní nukleaci, ale i kdy zahájit očkovanou nukleaci.

Nukleace nastává v přesyceném roztoku a lze toho dosáhnout:

- odpařováním rozpouštědla,
- ochlazením roztoku,
- přidáním antisolventu (vysrážení produktu),
- změnou pH,
- přidáním látky, která chemickou reakcí vytvoří žádaný produkt (reakční krystalizace).

Typy krystalizace ve farmacii

- krystalizace chlazením [28]
- krystalizace přidáním antisolventu
- krystalizace s odpařováním rozpouštědla
- reakční krystalizace

#### **2.4.6 Krystalizace chlazením**

Krystalizace změnou teploty, zpravidla ochlazením roztoku se používá v případě, kdy je rozpouštěcí křivka API látek výrazně závislá na teplotě. Při této metodě je výhodné pokud rozpustnost leží v rozmezí 10 až 100 mg ml<sup>-1</sup>. Pokud je rozpustnost mimo toto rozmezí, získá se buď malý výtěžek (při nižší hodnotě) nebo velký výtěžek (při vyšší hodnotě). Pokud tato

hodnota v jednom rozpouštědle nevyhovuje, lze požadovaného rozmezí dosáhnout směsí rozpouštědel. [9]

#### 2.4.7 Krystalizace s přidáním antisolventu

Často se ve výrobě používá technika přidání antisolventu („srážedla“), aby se skokově snížila rozpustnost krystalizované API a tím se dosáhlo co největšího výtěžku. Přídavek vody například vysráží API z polárního organického rozpouštědla a naopak polární organické rozpouštědlo vysráží API z vodných roztoků. Lze také použít jako srážedlo kyselinu nebo zásadu v případě, že je rozpustnost API závislá na pH. [6,9]

#### 2.4.8 Krystalizace s odpařením rozpouštědla

Taková krystalizace přichází v úvahu, když není rozpouštěcí křivka právě teplotně závislá. Pro konečnou kvalitu produktu je důležitá i rychlost dosažení přesyceného roztoku. Při technice odpařování by měla být hodnota rozpustnosti API  $> 10 \text{ mg ml}^{-1}$ . [9]

#### 2.4.9 Reakční krystalizace

Když je přesycení krystalizující substance dosaženo chemickou reakcí, nazývá se tento typ operace reakční krystalizací. Může to být např. reakce neutralizační, za vzniku soli. Tyto reakce mohou být velmi rychlé a dochází při nich k velkému přesycení a krystalizace je kontrolována nukleačním krokem. Tento typ krystalizací bývá někdy nazýván precipitace [2].

Přesycení krystalizace ve farmaceutickém průmyslu bývá většinou kontrolováno nepřímou a to pomocí **očkování** nebo pomocí rychlosti chlazení.

#### 2.4.10 Očkování

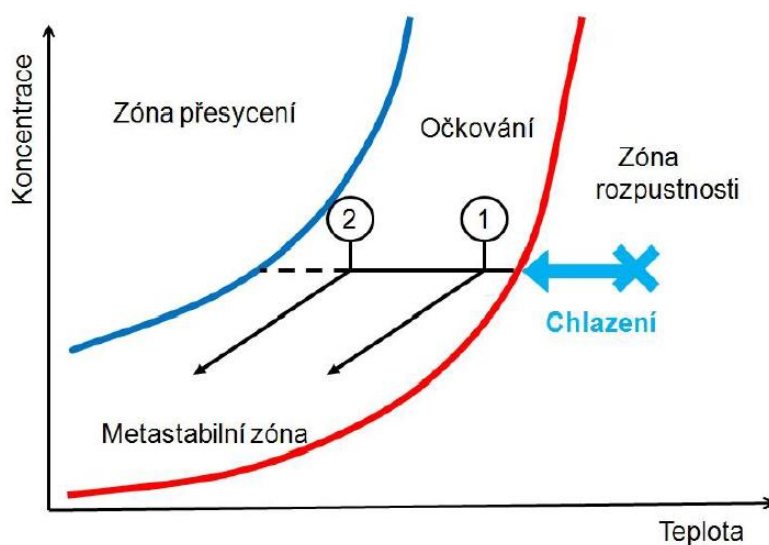
S očkovanou nukleací je spojena otázka. Jaké množství oček je potřeba k úspěšné krystalizaci a v jakém čase je očka třeba do roztoku přidat? Očkování je proces záměrného vnesení krystalků připravované látky do krystalizačního roztoku. Jejím cílem je zabránit nekontrolované nukleaci. Očkovací krystaly zavedeny v procesu v pravém čase mohou změnit špatné chování, nekonzistentní proces krystalizace na takový, který je v souladu a produkuje požadovanou specifikaci velikosti částic. Nekonzistentní výnos, rychlost filtrace, doba sušení, objemová hmotnost a také distribuce částic mohou sahat až do nekontrolovaných krystalizací s nepravidelnou nukleací nebo neoptimalizovanému očkování. Důležité parametry je třeba

vzít v úvahu při navrhování strategie jako je velikost oka nebo očkovací teplota. Pochopení očkovacích parametrů znamená méně experimentů nezbytné k optimalizaci krystalizace.

Materiál získaný krystalizací, kde rozhodujícím krokem je růst krystalů (termodynamicky řízená krystalizace), má několik výhod: získáme větší částice s úzkou distribucí velikosti částic, krystalický materiál má nižší povrchovou plochu, vyšší sytnou hmotnost a dobře se suší.

S procesem očkování jsou spojeny tyto následující kroky, které musí být optimalizovány:

- očkovací teplota
- množství očkovacího materiálu
- kvalita očkovacího materiálu
- rychlost chlazení naočkovaného materiálu [5]



**Obr. 5** Efekt očkování na krystalizaci v metastabilní oblasti [6]

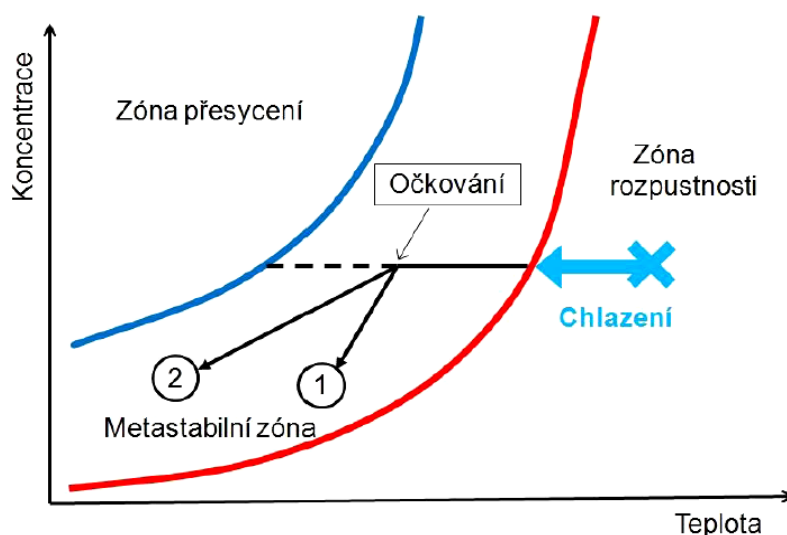
Teplota roztoku, při které je materiál naočkován: očkování blízko křivky rozpustnosti (**Obr. 5**, příklad 1) je prováděno při nízkém přesycení. Probíhá zde malá sekundární nukleace, krystal roste pomalu a výsledkem jsou velké krystaly. Očkování blízko křivky přesycení (**Obr. 5**, příklad 2) je prováděno při velkém přesycení, dochází zde k sekundární nukleaci, krystal roste rapidně rychle a vznikají malé krystaly.

*Očkovací materiál:* pokud je množství materiálu příliš malé, sekundární nukleace a růst krystalu bude nedostatečné, aby pokračovalo v přesycení. V tomhle případě může dojít

k druhé fázi nukleace, což má za následek heterogenní populaci, která na jejím konci obsahuje velké i malé částice.

Očkovacího materiálu se přidává maximálně do 10 % hmotnostního výtěžku, což v průmyslovém měřítku může být i několik desítek kilogramů požadovaného produktu. [9]

*Rychlost chlazení:* pokud očkování materiálu provádíme v metastabilní zóně, mohou nastat dva případy (viz **Obr. 6**).



**Obr. 6** Efekt rychlosti chlazení na krystalizační proces [6]

Pomalé chlazení (případ 1) umožňuje krystalovým zárodkům, které se již dále nezvětšuje a v tomto případě obdržíme velké krystaly.

U rychlého chlazení (případ 2) se přesycení zvětšuje a koncentrace roztoku se pohybuje blízko křivky přesycení. Může zde nastat sekundární nukleace a dochází k bimodálnímu rozložení velikosti částic. Jde o to, že v suspenzi se nachází dva typy krystalů, velké, způsobené očkováním a malé, získané sekundární nukleací.

Lze konstatovat, že základním požadavkem kontroly krystalizačního procesu je kontrola množství vznikajících nukleí. [6]

## 2.5 Velikost částic farmaceutických látek

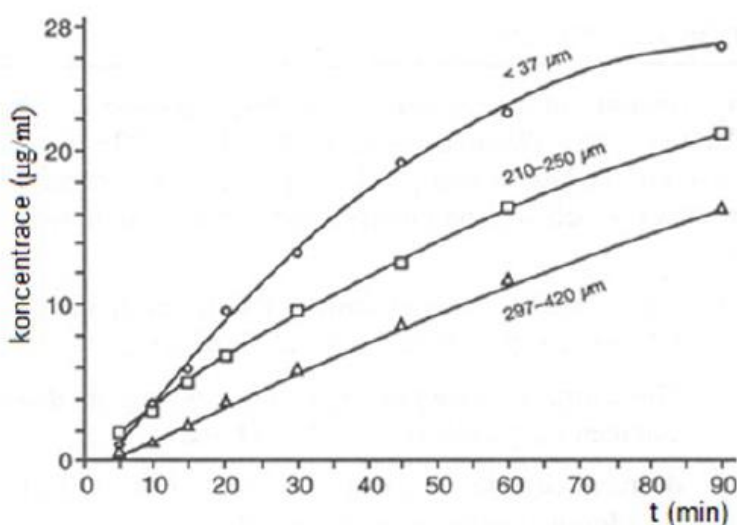
Velikost vznikajících krystalů je dalším sledovaným parametrem. Velikost částic je rozměrová vlastnost částice charakterizovaná jednotkou délky. Ideální práškový materiál obsahuje pouze částice stejné velikosti, reálný materiál se naopak skládá z částic o určitém velikostním rozpětí. Pokud jsou krystaly příliš velké, může docházet k jejich oděru



a ke vzniku mikrokrytalického prachu, na kterém může dojít k další (nežádoucí) nukleaci. Kvalitu vznikajících krystalů lze ovlivnit geometrií, typem krystalizátoru nebo operačními podmínkami. Může se jednat o způsob a rychlost míchání suspenze, tvar míchadla, umístění míchadla atd.

Velikosti API látek se pohybují v rozmezí 10 – 100  $\mu\text{m}$ , někdy mohou velikosti krystalů dosáhnout i velikosti kolem stovky  $\mu\text{m}$ , ale jen tehdy, pokud jsou speciálně požadovány pro vývoj lékové formy. V tomto případě ale musí být rozpustnost API velmi dobrá a velikost krystalů nesmí ovlivnit disoluční profil a zároveň nesmí způsobit kolísání obsahu API v tabletě. [9]

V praxi se pro popis velikosti částic používá pojem distribuce velikosti částic. Početní distribuce velikosti částic (DVC) vyjadřuje procentuální rozložení částic vzhledem k velikosti. Rozložení objemu částic je charakterizováno objemovou distribucí. Dalším důležitým parametrem při popisu částic je jejich tvar. Velikost a tvar ovlivňují chování pevných látek a jejich zpracování. [14]



**Obr. 7** Disoluční profily tablet s léčivou látkou (API) o různé velikosti částic [14]

Tvar krystalů určuje důležité mechanické vlastnosti produktu, jako jsou sypaná hustota, filtrovatelnost, schopnost mikronizace aj. Ovlivňují také tokové vlastnosti prášku, ale také procesy mletí, homogenizace, granulace a tabletování. Při homogenizaci léčivé látky s jinými léčivými látkami je vhodné, aby jejich distribuce velikosti částic nebyly příliš

rozdílné. Rozdílné hodnoty velikosti částic způsobují i rozdílné disoluční profily u konečných produktů se stejnou API látkou (viz. **Obr. 7**)

### **2.5.1 Metody měření distribuce velikosti částic ve farmacii**

Současným standardem při měření distribuce velikosti částic ve farmaceutickém průmyslu jsou obrazová analýza snímků ze světelného nebo elektronového mikroskopu (SEM) a laserová difrakce. V této době se navíc dostává do podvědomí online měření distribuce částic v daném experimentu pomocí FBRM (Focused beam reflectance measurement) sondy.

Výsledná distribuce je uváděna jako početní nebo objemová. V závislosti jakou zvolíme techniku jsou výsledné distribuce prezentovány formou histogramu nebo distribuční křivky a také percentilními d-hodnotami dolního decilu, horního decilu a mediánu –  $d(0,1)$ ,  $d(0,9)$ ,  $d(0,5)$  odečtených z kumulativní křivky, která popisuje procentuální nárůst výskytu částic s jejich narůstající velikostí. Vždy má tvar rostoucí funkce s oborem hodnot od 0 do 100 %.

[14]

### **2.5.2 Optická mikroskopie**

Jedná se o výbornou techniku, která umožňuje přímý obraz částic, ke které je potřeba navážka vzorku, řádově v miligramech. Tvar částic můžeme nejen vidět, ale také můžeme usoudit, zda bylo dosaženo dobré disperze nebo došlo k vytvoření aglomerátů částic. Výhodou je i možnost doložit výsledky analýzy fotografií preparátu, při přesné práci dává dobré výsledky. Jde o relativně levnou metodu. [30]

Distribuce velikosti částic se z mikroskopických snímků získává softwarem (např. NIS Elements). Obrazová analýza NIS Elements je založena na principu označení dostatečně velkého souboru částic (1000 a více) a také odečtení parametrů pro každou z nich. Mezi nejpoužívanější parametry řadíme minimální a maximální průmět, projekční plocha a vypočítaný objem ekvivalentní koule a kruhovitost. Na základě námi zvolených parametrů a znalosti měřítka snímku program vygeneruje histogram DVČ. Zpracovat je možné jak „živý“ i archivovaný obraz a výsledkem je objemová nebo početní distribuce velikosti částic. Výhodou obrazové analýzy je možnost korelovat výsledek distribuce se skutečným snímkem.

[14]

### 2.5.3 Skenovací elektronová mikroskopie

Elektronový mikroskop je stejně jako světelný mikroskop optický přístroj, ve kterém jsou ale fotony nahrazeny elektrony a skleněné čočky elektromagnetickými. Elektromagnetická čočka je cívka, která vytváří vhodně tvarované magnetické pole. SEM má mnohem větší rozlišovací schopnost než optický mikroskop. Rozlišení je u mikroskopů mnohem důležitější než jejich zvětšení, jde o vzdálenost dvou bodů ležících vedle sebe, které lzedaným zařízením rozeznat jako oddělené. Pokud mikroskop nemá dostatečnou rozlišovací schopnost, nevede nás pouhé zvětšování k další informaci.

Získání obrazu ve skenovacím elektronovém mikroskopu je založeno na interakci primárního svazku s povrchem prohlíženého objektu. Každý produkt této interakce přináší informaci o fyzikálních a chemických vlastnostech zkoumaného objektu. K zobrazení povrchu preparátu se v SEM využívají sekundární elektrony. Od zpětně odražených elektronů se odlišují svojí nízkou energií a rychlostí. Prohlížení preparátu v SEM je často doprovázeno rušivými jevy. K nim patří především nabíjení povrchu preparátu, na který dopadají záporně nabitě primární elektrony, v případě, kdy není dostatečně elektricky vodivý. [34] Důsledkem je odklon primárního svazku elektronů, které zahltí detektor sekundárních elektronů. Na obrazovce pak můžeme pozorovat v závislosti na intenzitě nabíjení bílé řádky až celkovou pulsaci obrazu.

### 2.5.4 Laserová difrakce

Jedná se o stále více preferovanou metodu měření velikosti částic ve farmaceutickém průmyslu, která je speciální částí elektromagnetické teorie rozptylu. [15,32] Jde o techniku hromadného měření částic, která generuje výsledek pro celý vzorek. Analýza pomocí laserové difrakce je založena na skutečnosti, že částice při kolizi s laserovým paprskem rozptylují světlo pod úhlem, který souvisí s jejich velikostí. S klesající velikostí částic se logaritmicky zvětšuje úhel odrazu, intenzita odraženého světla souvisí také s velikostí částic. Velké částice odráží světlo pod úzkým úhlem s vyšší intenzitou, zatímco malé částice odráží světlo pod širším úhlem s menší intenzitou. [16]

Laserová difrakce měří v rozsahu 0,02  $\mu\text{m}$ - 2000  $\mu\text{m}$ . Jedná se o měření pevných látek nebo kapalin suspendovaných v jiné fázi (pevná látka v kapalině, kapalina v jiné kapalině nebo pevná látka suspendována ve vzduchu). Velikost částic bez ohledu na jejich tvar jsou obvykle označeny jako objemová distribuce částic. Postup měření lze rozdělit do tří kroků:

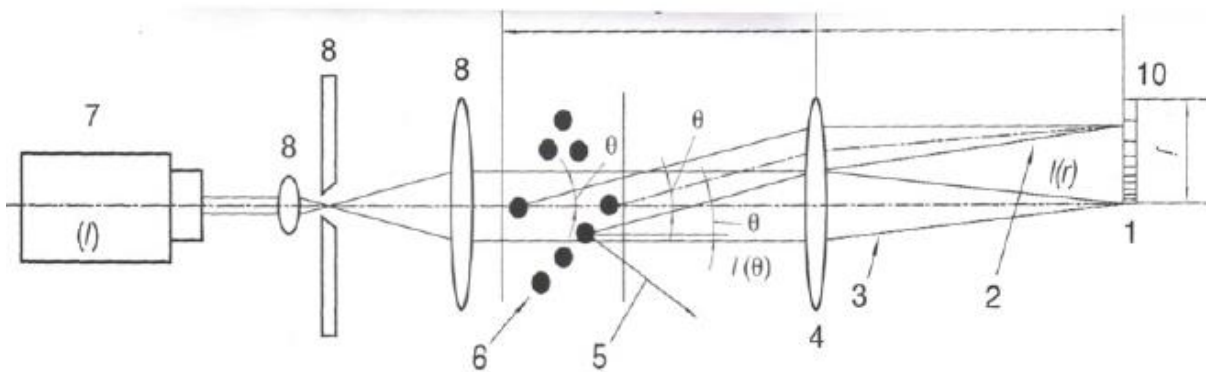
Interakce částic s laserovým paprskem a získání difrakčního obrazu.

Převod difrakčního obrazu do digitálního formátu.

Převod digitálního formátu difrakčního obrazu na distribuční a kumulativní křivku. [17]

Výsledky jsou běžně uváděny jako percentilní d-hodnoty (d 0,1; d 0,5; d 0,9). [18]

Počítač kontroluje všechny kroky měření (měření pozadí, měření vzorku), ovládá disperzní jednotku a přepočítává difrakční obrazec na distribuci velikosti částic. Přesné nastavení počítačového systému je uvedeno v každé metodě. Schéma zařízení je zobrazeno na **Obr. 6**. Přístroj se skládá z optické lavice, nedílnou součástí jsou vzorkové disperzní jednotky a počítač. [33] Metoda laserové difrakce poskytuje pouze difrakční obraz a nikoliv přímý obraz částice, je proto vhodné doplnit výsledek mikroskopickými snímky. [14]



**Obr. 8** Typické schéma přístroje pro měření velikosti částic laserovou difrakcí[10]

(1-stínítko detektoru, 2-rozptýlený paprsek, 3-přímý paprsek, 4-Fourierovy čočky, 5- rozptýlené světlo nedopadající na čočku, 6- soubor částic, 7-zdroj laserového paprsku, 8-jednotka zpracování paprsku, 9- pracovní vzdálenost čoček,10- multiprvkový detektor, 11- ohnisková vzdálenost objektivu)

### 2.5.5 FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement)

Tato sonda využívá technologie měření světla odraženého na částicích ze světelného paprsku fokusovaného do měřeného média [31]. 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). Tato tětivová délka je délka přímky mezi kterýmikoliv dvěma

body nacházejícími se na okraji částice nebo aglomerátu. Systém je schopen měřit desítky tisíc tětivových délek za sekundu [27], což poskytuje mohutný zdroj dat pro vyhodnocení distribuce tětivových délek (hodnoty naměřené v průběhu jedné sekundy se třídí podle délek tětivy lineárně do 1400 tříd).

Systém poskytuje v reálném čase údaj o velikosti a koncentraci pevných částic ve zvoleném místě procesního proudu. Měří částice v rozsahu velikostí od 0,5  $\mu\text{m}$  – 2,5 mm a nepředpokládá sférický tvar částic. Metoda poskytuje ve dvousekundových intervalech údaj o distribuci velikosti a o počtu částic v každé velikostní kategorii a umožňuje monitorování počtu částic ve specifických oblastech velikosti (jemné, hrubé atd.). [31]

Mezi výhody této techniky patří jednoduché ovládání a velmi malá údržba nebo kalibrace přístroje. Limitována je 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. [31]

### **2.5.6 Optimalizace průmyslové krystalizace sledováním velikosti částic online**

Dnes, online technologie charakterizace částic je využívána pro velikost částic, tvar a počet měření při plném koncentračním procesu a v průhledném nebo matném kalu.

Možné pracovní překážky, kde částice hrají roli:

surovina – potencionální zdroje variability

krystalizátor - nukleace/srážky

centrifuga – pomalý průtok/ malá rychlost, nízká odstředivá rychlost

sušící pec – dlouhá doba sušení

Tradiční techniky měření velikosti částic jsou většinou v režimu offline a vyžadují odběr vzorků, přípravu vzorků a vzdálené analýzy, které jsou časově náročné. Vzorky v režimu offline jsou často připravovány a změněny prostřednictvím zředění, disperze nebo sušení, které mohou změnit nebo zničit částice. Měření v režimu offline také nemůže být aplikováno v reálně časovém procesu k optimalizaci a řízení rozhodnutí.

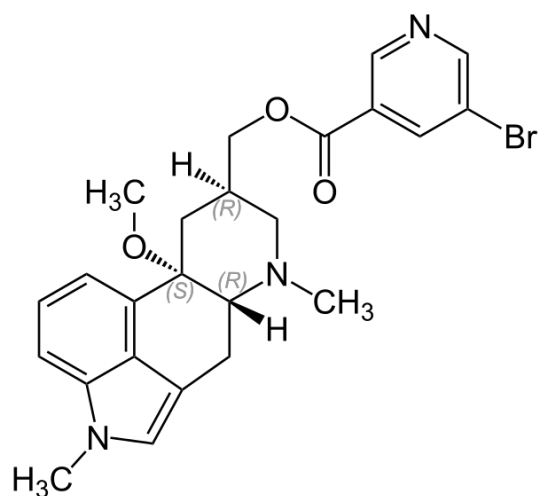
Se zavedenou technologií charakterizací částic Particle Track s FBRM technologií vědci a inženýři mohou měřit a porovnat chování krystalu bez odběru vzorku nebo rozředění a pozorovat krystalizační proces v plné koncentraci a měnit teplotu.

Umožňuje také reálně časovou zpětnou vazbu a rychlé rozhodování ke zlepšení příčiny variability v krystalizátoru a optimalizuje konzistenci velikosti částic pole finálního produktu. Kvalita produktu, jak už bylo zmíněno závisí na procesu krystalizace a velikosti částic. [29]

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použitá API – Nicergolin

Nicergolin  $C_{24}H_{26}BrN_3O_3$  s molekulovou hmotností 484,39 g/mol je téměř bílý až žlutý krystalický prášek. [19] Jedná se o derivát námelových alkaloidů a je zcela nerozpustný ve vodě. V České republice je registrován k indikaci léčby presenilních a senilních syndromů a léčbě poruch periferního prokrvení. V psychiatrii indikován k léčbě demence a Alzheimerovy choroby. Je užíváno i jako nootropikum k pomoci zlepšení funkce mozku a lepšího vnímání.



Obr. 9 Vzorec Nicergolinu

#### 3.2 Použité přístroje při charakterizaci velikosti částic

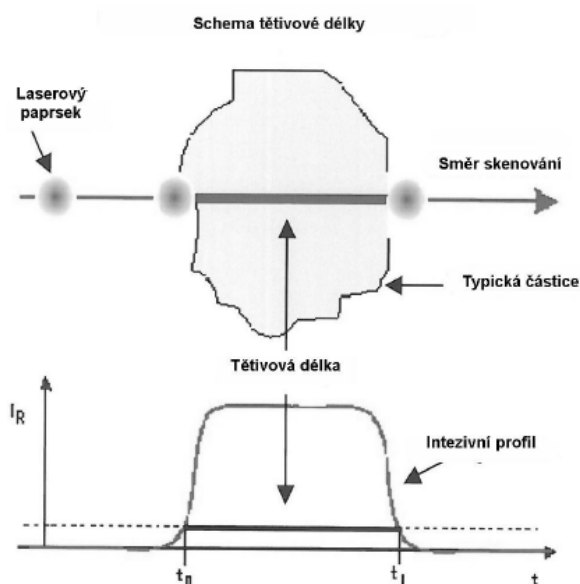
##### Crystal16 (Avantium Technologies)

Pomocí přístroje Crystal16 byla stanovena křivka rozpustnosti u nicergolinu. Přístroj Crystal16 obsahuje 4 x 4 1,5 ml magneticky míchaných bloků, každý blok má nezávislé elektrické vyhřívání a chlazení, kombinace Peltierova prvku a kryostatu, každá míchaná cela obsahuje nezávislý senzor na měření turbidity a nukleace [20, 21].

##### Laserová sonda FBRM – Lasentec S400 (Mettler toledo)

Měření počtu a velikosti částic bylo prováděno sondou FBRM-Lasentec S400 (Mettler-Toledo) [22, 23]. Tato sonda využívá technologie měření světla odraženého na částicích ze světelného paprsku fokusovaného do měřeného média. Když světelný paprsek emitovaný

laserem zasáhne krystal, senzor nahraje a zanalyzuje odražený signál (**Obr. 10**). Tato sebraná data se nazývají **tětivové délky** [24] a jsou definovány jako vzdálenost, kterou urazí paprsek během svého pohybu přes krystal z jednoho konce na druhý. Technologií FBRM je možno měřit až deset tisíc tětivových délek za sekundu a výsledkem je robustní distribuce počtu měření jednotlivých tětivových délek (je to počet změřených tětivových délek za sekundu, rozříděný podle délky do lineárních množin). Při prováděných experimentech byly použity tyto rozsahy velikostí: 0,5-10 $\mu\text{m}$ , 10-50 $\mu\text{m}$ , 50-150 $\mu\text{m}$ , 150-300 $\mu\text{m}$ , 300-1000 $\mu\text{m}$ . Je to vysoce přesní a citlivý výsledek, využívaný pro sledování změn jak velikosti částic, tak populace částic. Využívá se k dynamické kvantifikaci vlivu procesních proměnných, jako jsou: reakční rychlost, teplota a rychlost chlazení, rychlost přidávání antisolventu, rychlost míchání apod. [6]



**Obr. 10** Princip měření tětivové délky [6]

Výsledky měření pomocí laserové FBRM sondy mohou být prezentovány v grafické podobě jako distribuční křivky a to jako vážená nebo nevážená distribuce. Vážená distribuce klade důraz na větší částice (růst krystalů) a nevážená distribuce na menší částice (proces nukleace).

Výsledky mohou být dále prezentovány pomocí statistických dat jako např.:

střední hodnota velikosti částice – pro váženou i neváženou distribuci

medián – hodnota, která rozděluje soubor na dvě části

modus – hodnota, která má nejvyšší četnost v daném souboru. [6]

### EasyMax TM 102 Standard Set (Mettler toledo)

Krystalizační experimenty byly prováděny ve 100 ml mechanicky míchaných reaktorech EasyMax™ 102. Tyto teplotní reaktory pracují v teplotním rozmezí (-30) – 150°C. (viz Obr. 11)



Obr. 11 EasyMax™ 102 set s FBRM sondou S400 Lasentec

### Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

SEM snímky byly získány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Hitachi TM3030 Plus (Obr. 12). Vzorky pro SEM byly připraveny následovně: práškový materiál byl pomocí oboustranné uhlíkové lepicí pásky připevněn na hliníkovou podložku.

Vzorek nebyl nijak upravován ani pokovován.



Obr. 12 Skenovací elektronový mikroskop Hitachi TM3030 Plus



### **Malvern Mastersizer 2000**

Distribuce velikosti částic krystalického materiálu byla měřena přístrojem Malvern Mastersizer 2000 vybaveným měřicí celou Hydro 2000S . Jako ředící médium byla použita destilovaná voda.

### **Ultrazvuková sonda (SONICS vibra cell VCX 750)**

Pomocí ultrazvukové sondy byla u experimentů iniciována nukleace krystalizace Nicergolinu a následně sonokrystalizace vzniklé suspenze. Ultrazvukové kmity umožňují řízení růstu krystalů a zabraňují tvoření shluků a srůstů. [25] Sonda umožňuje nastavit ultrazvukové vibrace na špičku sondy v libovolné amplitudě od 10 – 100 % a umožňuje nastavení sonikace od 1 s do 10 hodin a délku cyklu od 1 s do 59 s.

V provedených experimentech byly nastaveny parametry 5 s puls, 3 s pauza a 5 s puls, 1s pauza, amplituda od 30 – 80 %.



**Obr. 13** Ultrazvuková sonda (Sonics vibra cell VC 505 – VC 750)

### **Mikroskop atomárních sil (AFM)**

AFM snímky byly získány pomocí mikroskopu AFM: NTEGRA (NT-MDT). Měření bylo prováděno v semi-contact režimu. Byly použity hroty NSG10 s poloměrem hrotu 10nm. Mikroskop atomárních sil byl použit k charakterizaci povrchu částic.

### **3.3 Příprava Nicergolinu**

Krystalický Nicergolin byl připraven v laboratoři těmito 4 způsoby k dosažení různých distribucí velikosti částic.

#### **3.3.1 Krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu**

Navážka 17 g Nicergolinu byla spolu s 68 ml acetonu převedena do 100 ml skleněného reaktoru EasyMax, opatřeného vrtulovým míchadlem a suspenze byla vyhřátá na 55°C během 20 minut do rozpuštění pevné látky. Rozpuštěný roztok byl ochlazen během 20 minut na teplotu 40°C a po dosažení této teploty byl roztok naočkován 1-10 % Nicergolinu. Krystal vykristaloval během několika sekund po naočkování. Po naočkování byla suspenze míchána po dobu 30 minut při teplotě 40°C. Krystalická suspenze se ochladila na 0°C během 1-4 hodiny podle nastavení chladicí rampy a poté při 0°C míchaná 1-2 hodiny. Po ukončení krystalizace byly krystaly odfiltrovány vychlazeným acetonem a sušeny pod inertní atmosférou po dobu 10 hodin při teplotě 45°C.

#### **3.3.2 Krystalizace Nicergolinu bez očkovacího materiálu**

Navážka 17 g Nicergolinu byla spolu s 68 ml acetonu převedena do 100 ml skleněného reaktoru EasyMax, opatřeného vrtulovým míchadlem a suspenze byla vyhřátá na 55°C během 20 minut do rozpuštění pevné látky. Rozpuštěný roztok byl ochlazen na 20°C během 30 minut. Krystaly vypadly v teplotním rozmezí 23 – 25 °C. Suspenze byla ochlazená na 0°C během 2 hodin. Po ukončení krystalizace byly krystaly odfiltrovány vychlazeným acetonem a sušeny pod inertní atmosférou po dobu 10 hodin při teplotě 45°C.

#### **3.3.3 Iniciační krystalizace Nicergolinu pomocí ultrazvukové sondy**

Navážka 17 g Nicergolinu byla spolu s 68 ml acetonu převedena do 100 ml skleněného reaktoru EasyMax, opatřeného vrtulovým míchadlem a suspenze byla vyhřátá na 55°C během 20 minut do rozpuštění pevné látky. Roztok byl ochlazen na 25°C během 20 minut a při této teplotě přesunut na ultrazvukovou sondu. Podmínky byly nastaveny jako 5s puls, 3s pauza v časovém intervalu 20 minut. Krystalky vypadly po 1,5 minutě. Na ultrazvuku suspenze nechána 10 min. Po ukončení sonikace, suspenze dána zpět do reaktoru a nastavena chladicí rampa na 0°C během 60 minut a míchání při této teplotě během dalších 60 minut. Po ukončení krystalizace byly krystaly promyty vychlazeným acetonem a sušeny v teplovzdušné sušárně po dobu 10 hodin při teplotě 45°C.

### **3.3.4 Iniciace nukleace Nicergolinu a sonokrystalizace**

Tento experiment je identický viz. 3.3.3 Iniciace krystalizace Nicergolinu pomocí ultrazvukové sondy, ale doba sonikace v těchto případech až 120 minut.

### **3.4 Použité chemikálie**

Nicergolin

Aceton p.a.

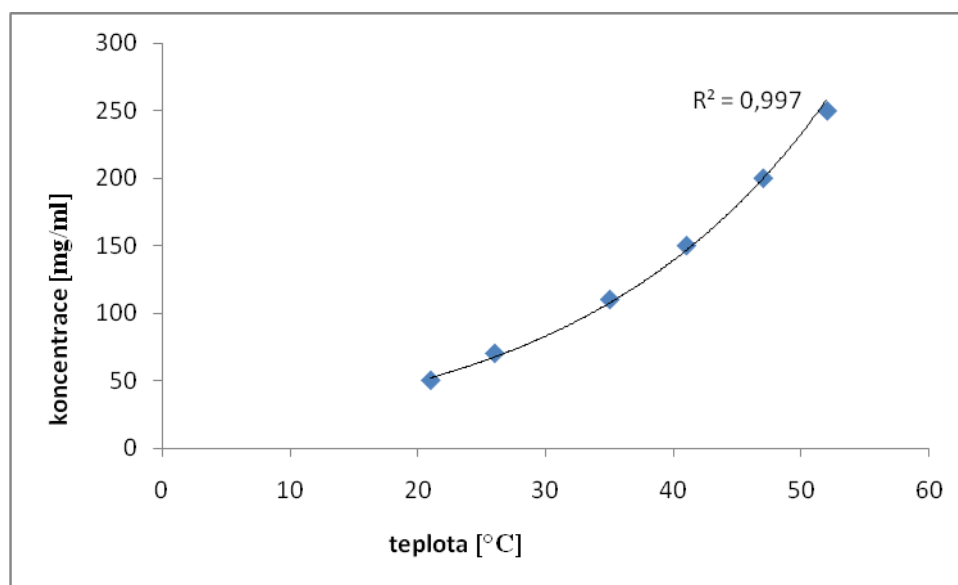
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Křivka rozpustnosti Nicergolinu v acetonu

Byla stanovena křivka rozpustnosti Nicergolinu v acetonu pomocí přístroje Crystal 16 za těchto podmínek viz. (Tabulka 1). Všech 6 navážek bylo rozpouštěno ve skleněných vialkách s objemem acetonu 1 ml při dané teplotě. (Obr.14)

Nicergolin	
teplota [°C]	koncentrace [mg/ml]
21	50
26	70
35	110
41	150
47	200
52	250

Tabulka 1 *Rozpustnost Nicergolinu v acetonu*



Obr. 14 *Křivka rozpustnosti Nicergolinu v acetonu*

## 4.2 Krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu

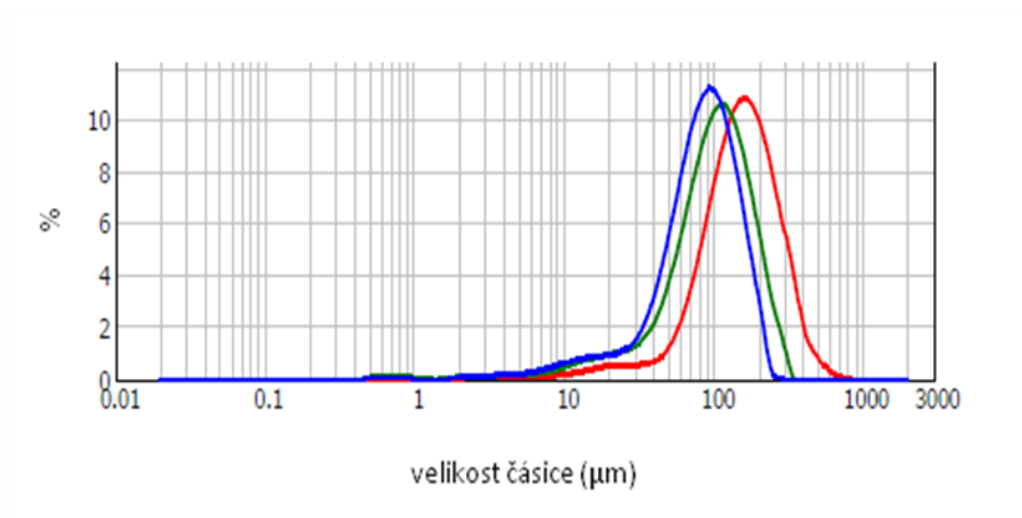
Nicergolin-očkování					
Šarže	Množství očkovacího materiálu (t=40°C)	FBRM D (90) μm	PSD D (90) μm	Teplotní chladicí rampa	Poznámka
NK150917/01	3%	188	232	z t 40°C na 0°C 3h	
NK150929/01	1%	410	301	z t 40°C na 0°C 1h	
NK151020/01	3%	310	290	z t 40°C na 0°C 1h	
NK151103/01	bez očkování	290	218	z t 55°C na 20°C 30 min, z t 20°C na 0°C 2h	NCG vykrytalizoval v rozmezí 23-25°C
NK151109/01	10%	280	216	z t 40°C na 0°C 2h	
NK151110/01	10%	260	199	z t 40°C na 0°C 2h	
NK151119/01	10%	288	189	z t 40°C na 0°C 4h	
NK160114/01	10%	170	160	z t 45°C na 0°C 4h	sonikace 30 min
NK160119/01	10%	220	199	z t 45°C na 0°C 2h	sonikace 30 min

**Tabulka 2** Přehled výsledků parametrů D 90 (μm) z FBRM sondy a laserové difrakce

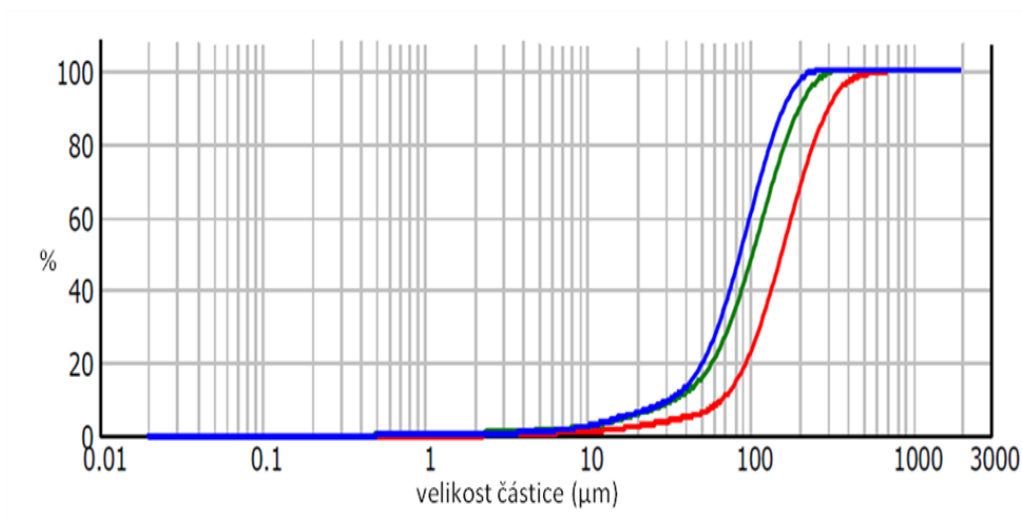
Experimenty v tabulce (**Tabulka 2**) jsou očkované kromě experimentu š.NK151103/01. Množství očkovacího materiálu bylo zvoleno v rozmezí 1 – 10 %, vztaženo na vstupní materiál. Z tabulky je zřejmé, že největší distribuci velikosti částic (měřeno parametrem D90) bylo dosaženo u šarže NK150929/01. U tohoto experimentu bylo množství očkovacího materiálu 1 % a délka teplotní chladicí rampy ze 40 °C na 0 °C 1 hodinu. Nejmenší distribuce velikosti částic byla dosažena u šarže NK160114/01 (opět měřeno parametrem D90), u tohoto experimentu bylo množství očkovacího materiálu 10 %, následně byla krystalická suspenze sonikována po dobu 30 minut, délka teplotní chladicí rampy ze 45 °C na 0 °C byla 4 hodiny.

Z experimentů uvedených v **Tabulce 2** je zřejmé, že nejsme schopni připravit materiál s distribucí velikosti částic menší než 160 μm (měřeno parametrem D90) a to ani očkovanou nebo neočkovanou krystalizací.

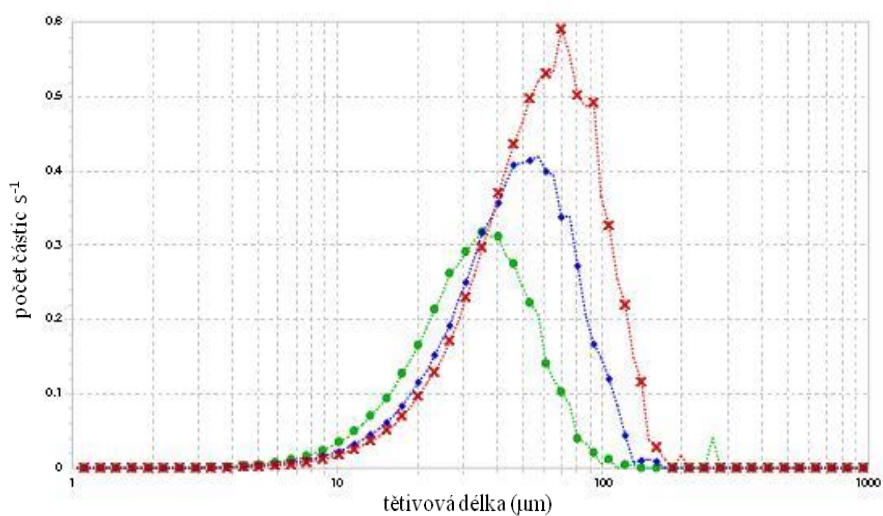
Pro získání materiálu s menší distribucí velikosti částic bude proto muset zvolit jiný způsob krystalizace.



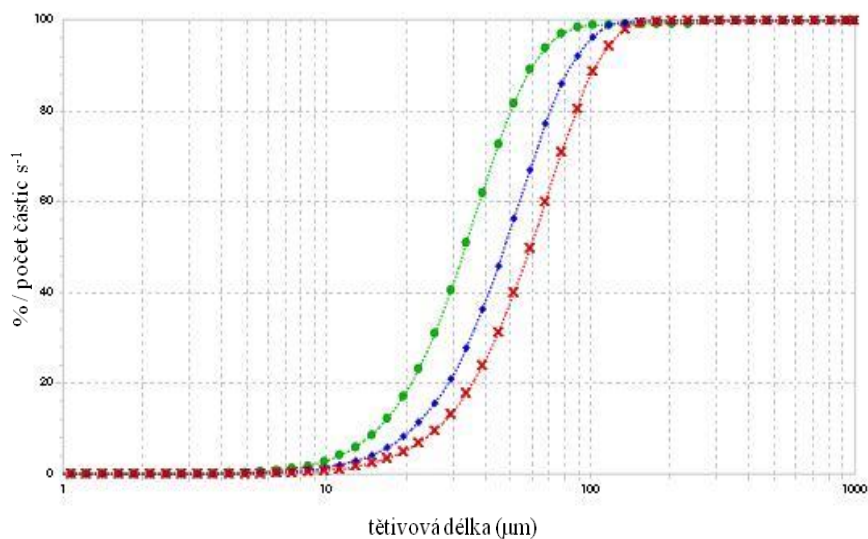
**Obr. 15** Objemová distribuce velikosti částic z laserové difrakce. Porovnání distribučních křivek, š. NK150929/01 (červená), š. NK15111/01 (modrá), š. NK160114/01 (zelená)



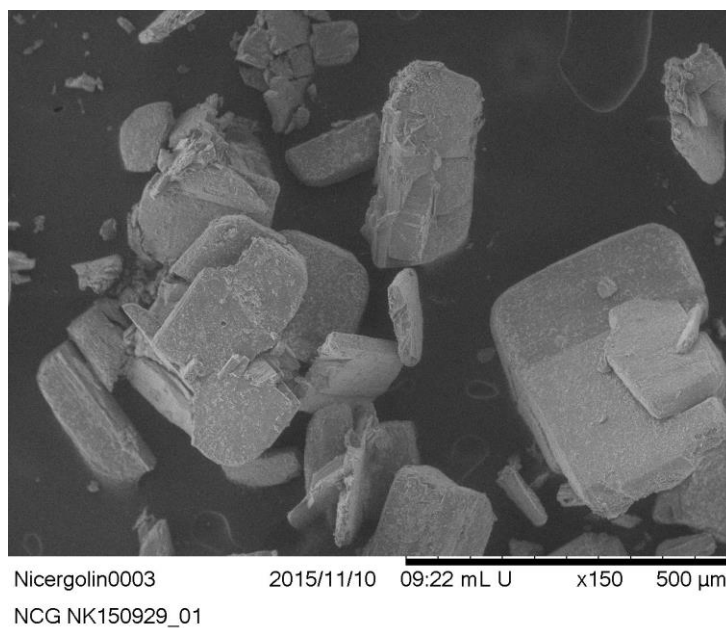
**Obr. 16** Objemová distribuce velikosti částic z laserové difrakce. Porovnání kumulativních křivek, š. NK150929/01 (červená), š. NK15111/01 (modrá), š. NK160114/01 (zelená)



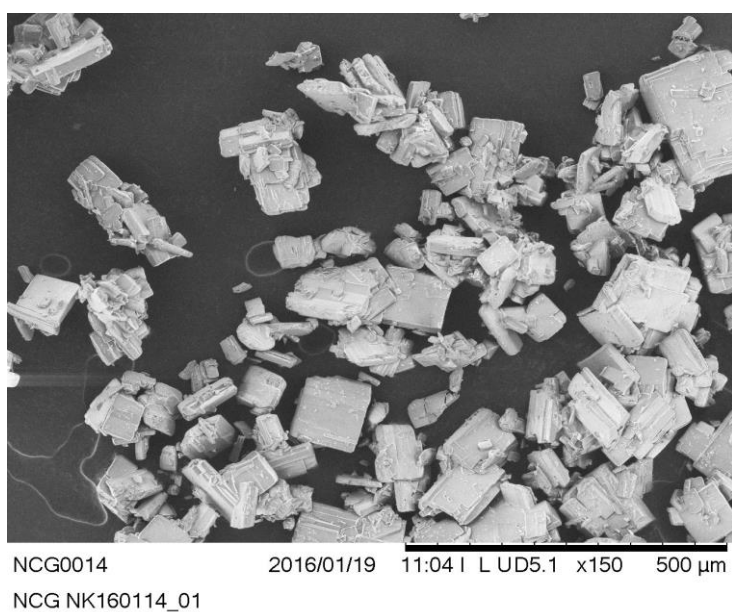
**Obr. 17** Porovnání distribuce tětivových délek u krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu pomocí FBRM sondy, š. NK150929/01 (červená), š. NK15111/01 (modrá), š. NK160114/01 (zelená)



**Obr. 18** Porovnání distribuce kumulativních (relativních) křivek souboru částic o určité velikosti, š. NK150929/01 (červená), š. NK15111/01 (modrá), š. NK160114/01 (zelená)



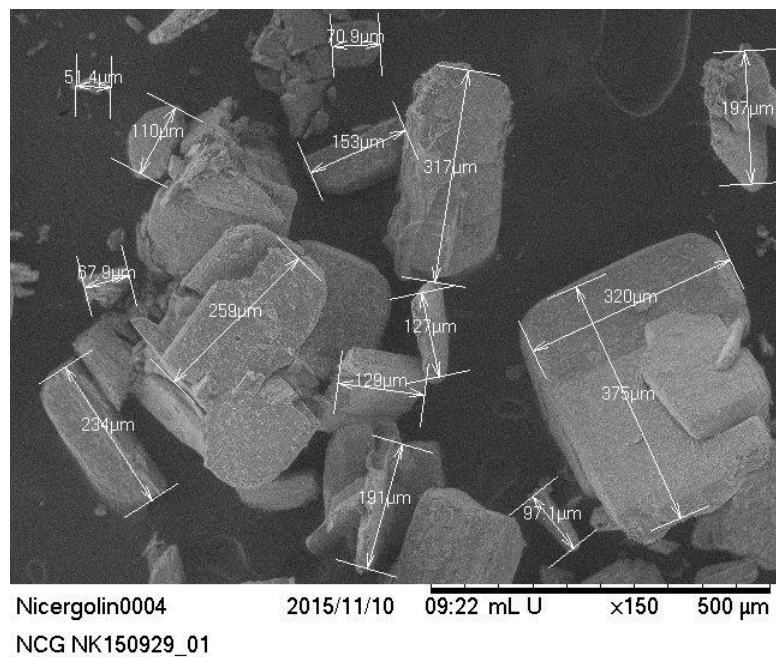
**Obr. 19** Záznam SEM, š. NK150929/01, největší částice při přidavku očkovacího materiálu



**Obr. 20** Záznam SEM, š. NK160114/01, nejmenší částice při přidavku očkovacího materiálu

Ve všech případech krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu vyšly distribuce velikosti částic vždy u FBRM sondy větší v porovnání s laserovou difrakcí.





**Obr. 21** Záznam SEM, š.NK150929/01 velikost částic získaná pomocí softwaru TM3030Plus, verze 01-04-02

Velikost částic byla naměřena i pomocí elektronového mikroskopu Hitachi (**Obr. 21**), v tomto případě však byly měřeny pouze lineární rozměry krystalického materiálu (délka, šířka). Výsledky měření nejsou kompatibilní s výsledky naměřenými pomocí laserové sondy FBRM a pomocí laserové difrakce. Z tohoto důvodu nejsou tyto výsledky v dalším textu uváděny.

### 4.3 Iniciační nukleace Nicergolinu ultrazvukovou sondou

Nicergolin-iniciační nukleace ultrazvukovou sondou					
Šarže	Doba sonikace	FBRM D (90) $\mu\text{m}$	PSD D (90) $\mu\text{m}$	Podmínky sonikace	Poznámka
NK151022/01	10 min	136	91	t=40°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	krystal při t 40°C nevykrytalizoval, při ochlazení na 25°C zpět na ultrazvuk
NK160202/01	2 min	150	102	t=20°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	teplotní chladicí rampa z t 20°C na 0°C 2h
NK160203/01	2 min	106	84	t=15°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	teplotní chladicí rampa z t 15°C na 3°C 1h
NK160204/01	2 min	100	62	t=15°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	zfiltrováno při 40°C, teplotní chladicí rampa z t 15°C na 3°C 1h
NK160210/01	2 min	102	57	t=10°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	teplotní chladicí rampa z t 10°C na 3°C 1h
NK160225/01	4 min	118	57	t=40°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	zfiltrováno při 40°C, teplotní chladicí rampa z t 20°C na 3°C 10 min
NK160317/01	2 min	84	57	t=25°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	teplotní chladicí rampa z t 25°C na 3°C 30minut

**Tabulka 3** Přehled výsledků parametrů D 90 ( $\mu\text{m}$ ) z FBRM sondy a laserové difrakce

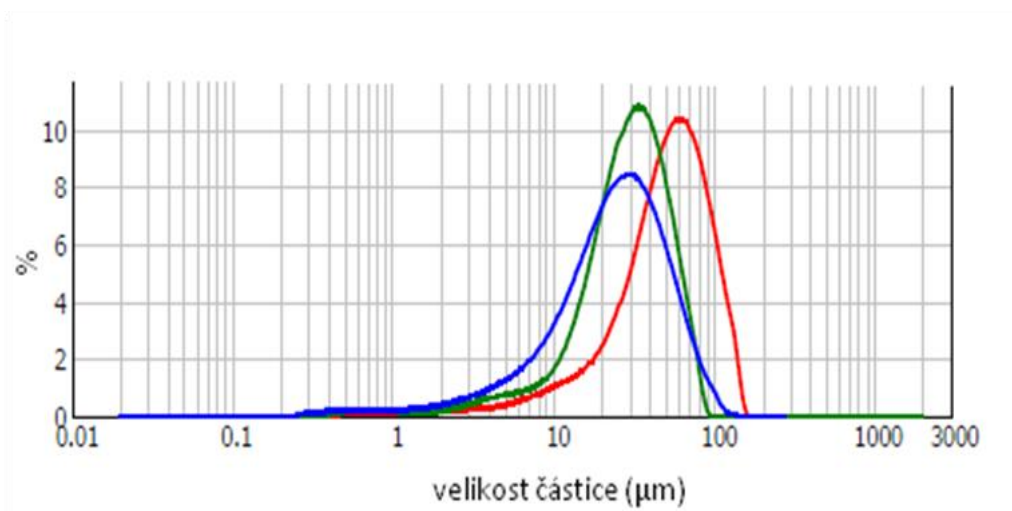
U experimentů z tabulky (**Tabulka 3**) byla iniciována nukleace pomocí ultrazvukové sondy.

Nastavená délka sonikace byla v rozmezí 2 – 10 minut, teplota při sonikaci od 10 – 40 °C a teplotní chladicí rampa od 10 minut do 2 hodin.

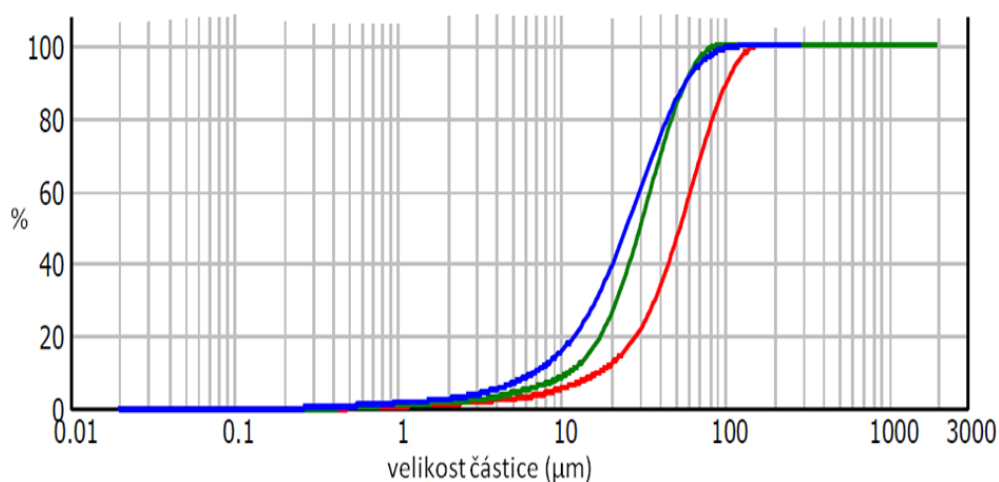
Z naměřených hodnot je zřejmé, že největší distribuce velikosti částic (měřeno parametrem D90) byla dosažena u experimentu š.NK160202/01, kde byla teplota při sonikaci 20 °C, délka sonikace 2 minuty a délka teplotní chladicí rampy z 20 °C na 0 °C 2 hodiny.

Nejmenší distribuce velikosti částic (měřeno parametrem D90) bylo dosaženo u experimentu š.NK160317/01. Teplota při sonikaci byla 25 °C, délka sonikace opět 2 minuty a délka teplotní chladicí rampy 30 minut.

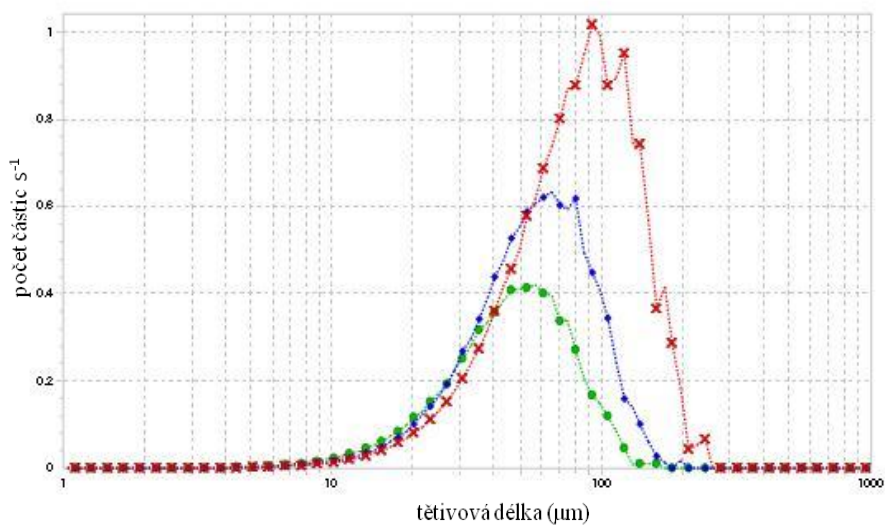
Z experimentů uvedených v tabulce (**Tabulka 3**) je zřejmé, že distribuce velikosti částic je závislá jak na době sonikace, ale zároveň je zřejmé, že po iniciaci nukleace dochází během teplotní chladicí rampy i k růstu krystalů, tedy konečná distribuce je závislá hlavně na délce teplotní chladicí rampy.



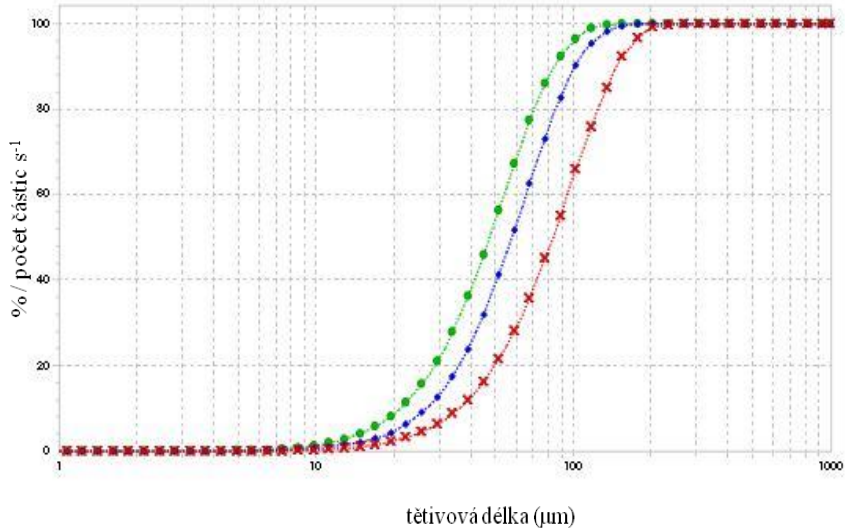
**Obr. 22** Objemová distribuce velikosti částic z laserové difrakce. Porovnání distribučních křivek š.NK160202/01 (červená), š.NK160210/01 (modrá), š.NK1603117/01 (zelená)



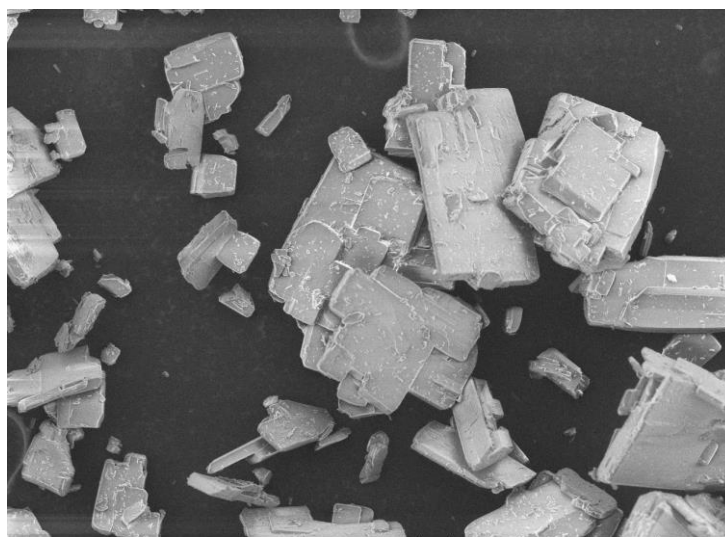
**Obr. 23** Objemová distribuce velikosti částic z laserové difrakce. Porovnání kumulativních křivek š. NK160202/01 (červená), š.NK160210/01 (modrá), š.NK1603117/01 (zelená)



**Obr. 24** Porovnání distribuce tětivových délek iniciace nukleace ultrazvukovou sondou pomocí FBRM sondy, š. NK160202/01 (červená), š. NK160210/01 (modrá), š. NK1603117/01 (zelená)

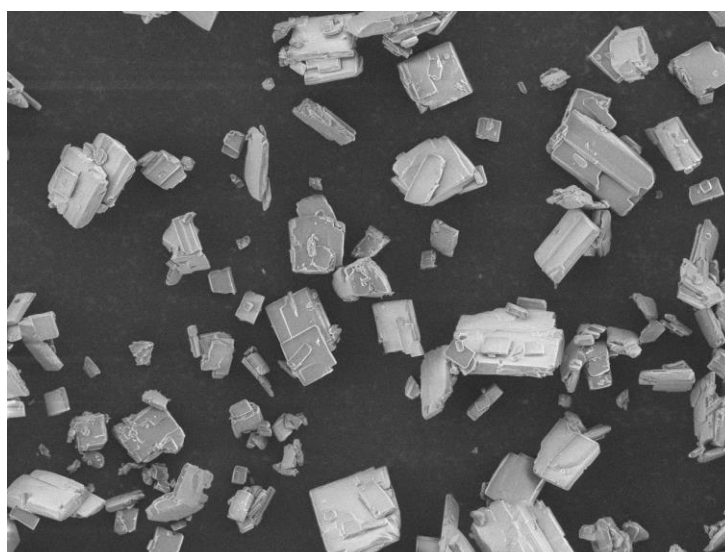


**Obr. 25** Porovnání distribuce kumulativních (relativních) křivek souboru částic o určité velikosti (%), š. NK160202/01 (červená), š. NK160210/01 (modrá), š. NK1603117/01 (zelená)



Nicergolin0009 2016/02/25 08:32 mL UD5.0 x400 200  $\mu$ m  
NCG NK160202/01

**Obr. 26** Záznam SEM, š. NK160202/01, největší částice při iniciaci nukleace



NCG0009 2016/03/21 17:50 mL U x400 200  $\mu$ m  
NCG NK160317\_01

**Obr. 27** Záznam SEM, š. NK160317/01, nejmenší částice při iniciaci nukleace

Jako u krystalizace pomocí očkovacího materiálu, i u těchto experimentů vyšly výsledky distribucí velikosti částic větší u FBRM sondy než u distribucí laserové difrakce.

#### 4.4 Iniciační nukleace Nicergolinu a sonokystalizace

Nicergolin-iničiační nukleace + sonokystalizace					
Šarže	Doba sonikace	FBRM D (90) $\mu\text{m}$	PSD D (90) $\mu\text{m}$	Podmínky sonikace	Poznámka
NK151221/01	20 min	105	74	t=45°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	NCG vykryštalizoval po 1,5 min
NK160301/02	60 min	105	212	t=11°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	na FBRM při 5°C mícháno 30 min
NK160308/01	30 min	87	52	t=10°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	NCG zfiltrován při 40°C, NCG vykryštalizoval po 3 min, teplotní chladicí rampa z t 10°C na 3°C 10 min
NK160310/01	120 min	63	144	t=5°C, amplituda 30% interval (5s puls, 3s pauza)	na FBRM při 5°C mícháno 30 min
NK160322/01	60 min	72	49	t=25°C, amplituda 20% interval (5s puls, 1s pauza)	teplotní chladicí rampa z t=25°C na 0°C 60 min
NK160323/01	60 min	74	48	t=25°C, amplituda 80% interval (5s puls, 1s pauza)	teplotní chladicí rampa z t=25°C na 0°C 60 min
NK160324/01	120 min	60	33	t=25°C, amplituda 50% interval (5s puls, 1s pauza)	teplotní chladicí rampa z t=25°C na 0°C 60 min

**Tabulka 4** Přehled výsledků parametrů D 90 ( $\mu\text{m}$ ) z FBRM sondy a laserové difrakce

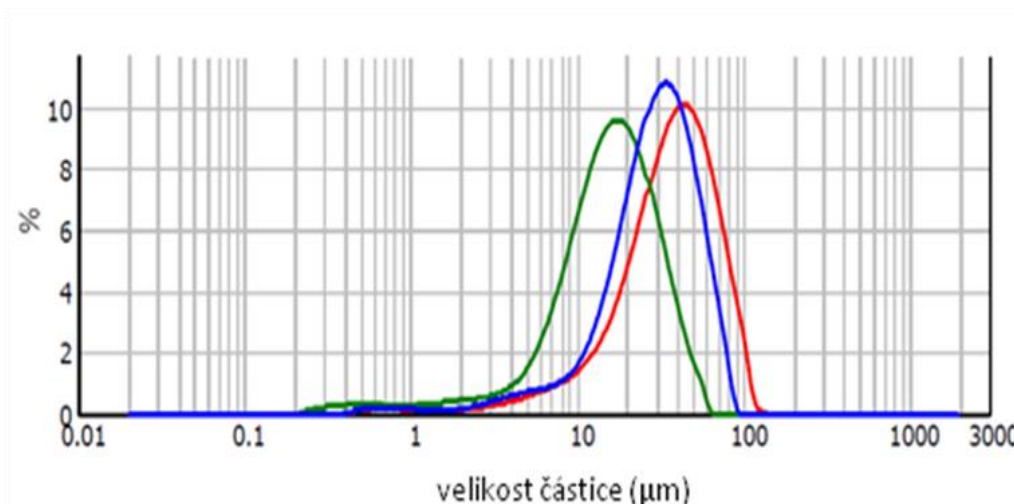
V poslední skupině experimentů (**Tabulka 4**) u kystalizace Nicergolinu byla nejen inicována nukleace, ale navíc nastavena sonokystalizace. V průběhu experimentů byly různě nastavovány teploty (od 5 – 45 °C), délky sonikace (20 – 120 minut), parametry amplitudy (5 s puls, 3 s pauza; 5 s puls, 1 s pauza) a délka teplotní chladicí rampy.

Největší distribuce velikosti částic (měřeno parametrem D90) byla dosažena u experimentu š.NK151221/01. U tohoto experimentu byla teplota při sonikaci 45 °C, amplituda 30 %, parametry 5s puls, 3 s pauza, délka sonikace 20 minut a délka teplotní chladicí rampy z 25 °C na 0 °C 60 minut.

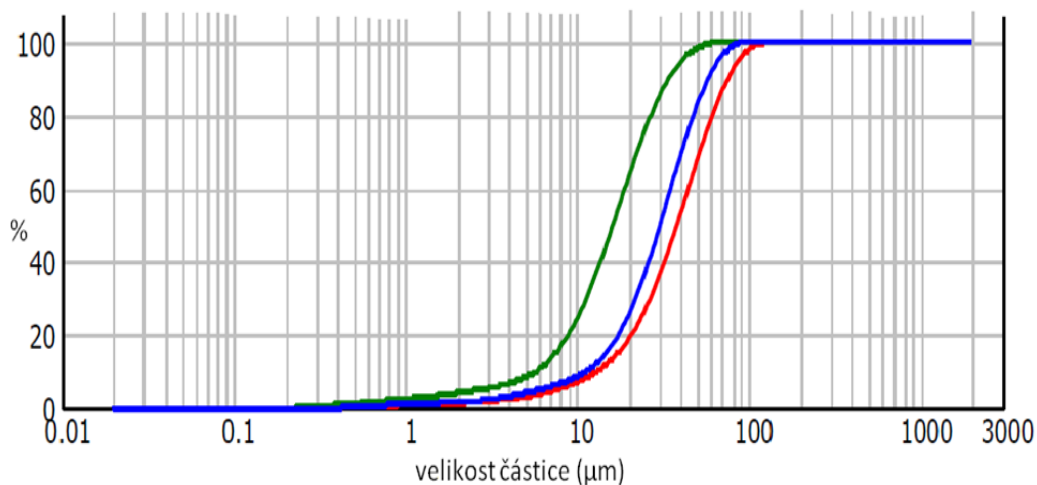
Nejmenší distribuce velikosti částic (měřeno parametrem D90) byla zároveň nejmenší distribucí ze všech naměřených experimentů. Byla dosažena u š.NK160324/01 při teplotě

sonikace 25 °C, amplitudě 50 %, parametrech 5s puls, 1s pauza, délce sonikace 120 minut a délce teplotní chladicí rampy z 25 °C na 0°C 60 minut.

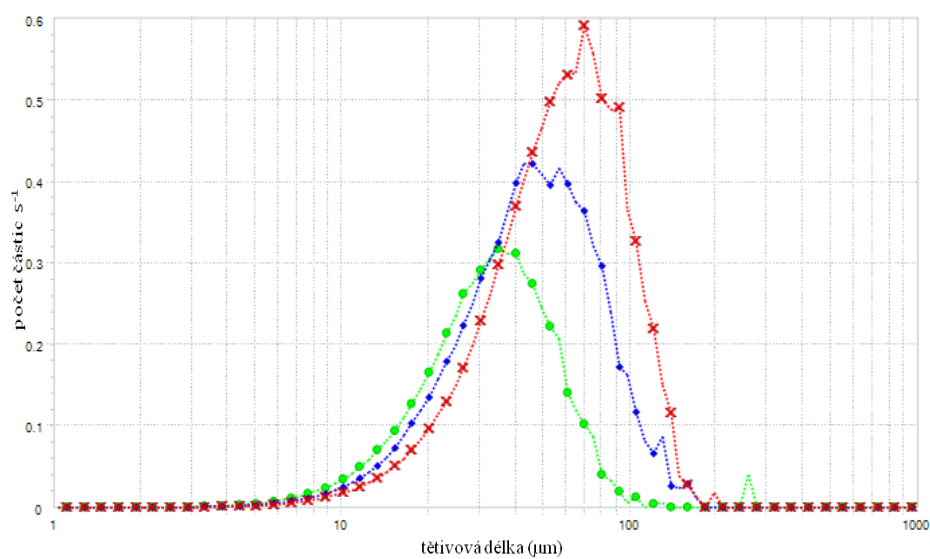
U experimentů uvedených v tabulce 4 je zřejmé, že zásadní vliv na konečnou distribuci velikosti částic má doba sonokrystalizace, s prodlužující se dobou sonokrystalizace dochází i k poklesu distribuce velikosti částic.



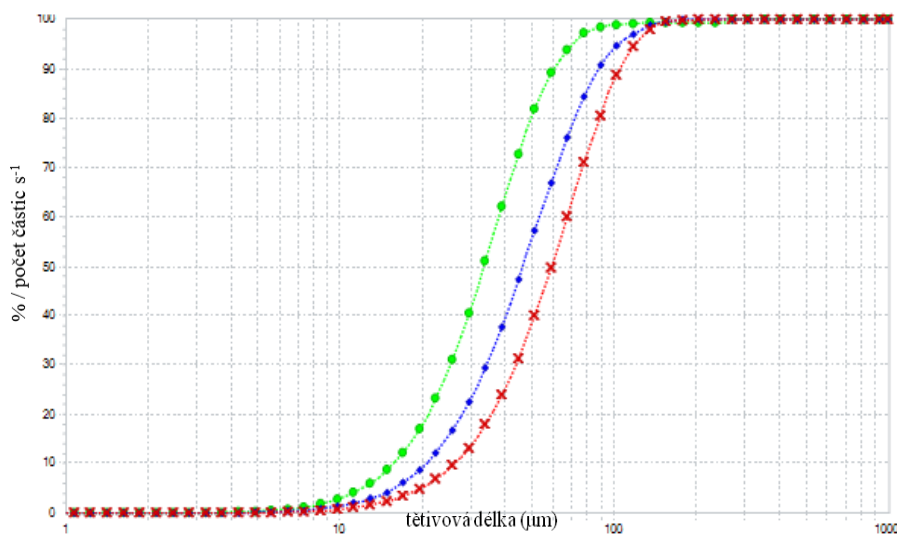
**Obr. 28** Objemová distribuce velikosti částic z laserové difrakce. Porovnání distribučních křivek, š. NK151221/01 (červená), š. NK160308/01 (modrá), š. NK160324/01 (zelená)



**Obr. 29** Objemová distribuce velikosti částic z laserové difrakce. Porovnání kumulativních křivek, š. NK151221/01 (červená), š. NK160308/01 (modrá), š. NK160324/01 (zelená)

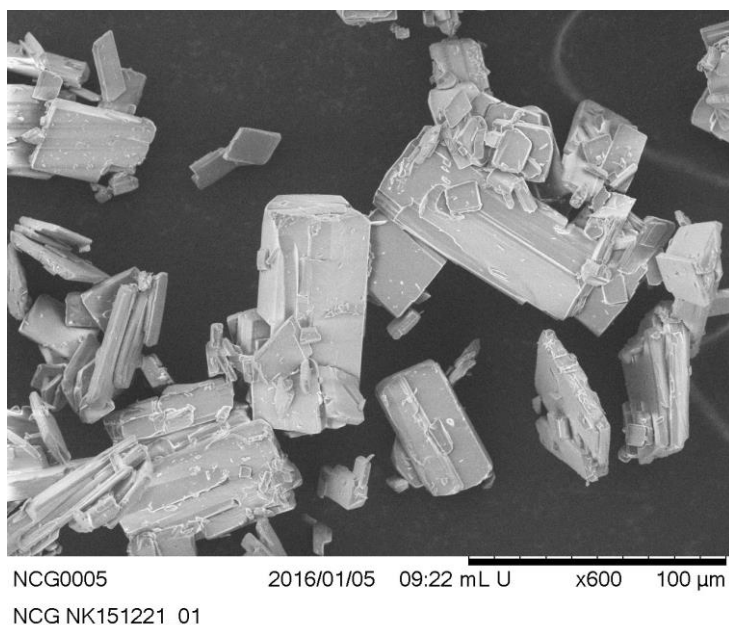


**Obr. 30** Porovnání distribuce tětivových délek u iniciace nukleace a sonokrystalizace pomocí FBRM sondy, š. NK151221/01 (červená), š. NK160308/01 (modrá), š. NK160324/01 (zelená)

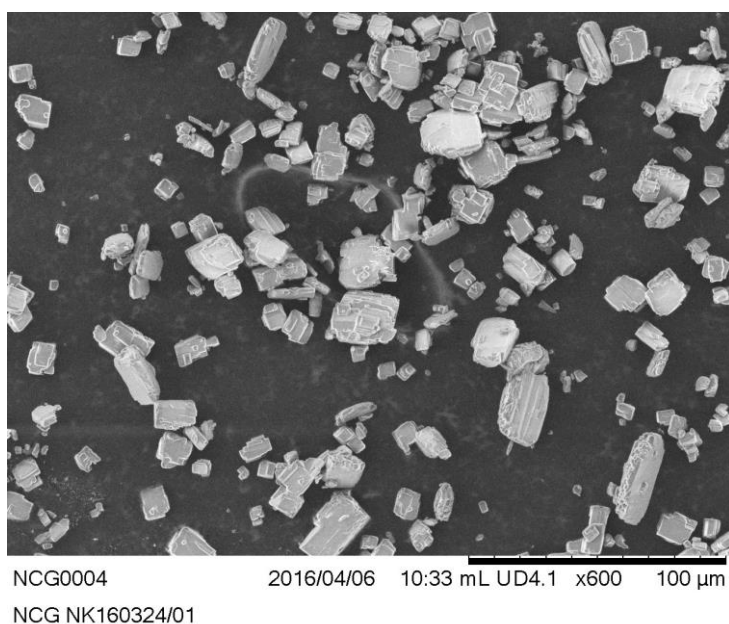


**Obr. 31** Porovnání distribuce kumulativních (relativních) křivek souboru částic o určité velikosti (%), š. NK151221/01 (červená), š. NK160308/01 (modrá), š. NK160324/01 (zelená)





**Obr. 32** Záznam SEM, š. NK151221/01, největší částice při iniciaci nukleace + sonokrystalizace



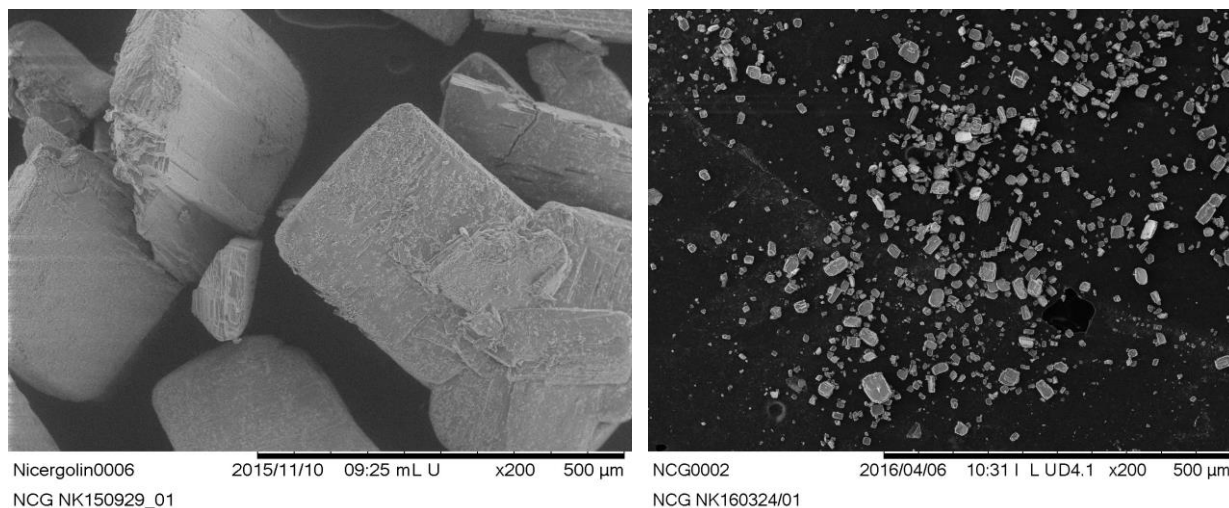
**Obr. 33** Záznam SEM, š. NK160324/01, nejmenší částice při iniciaci nukleace + sonokrystalizace

Tak jako v předchozích dvou skupinách experimentů byly distribuce velikosti částic u FBRM sondy větší než u distribucí pomocí laserové difrakce.

V přehledu výsledků (**Tabulka 4**), můžeme vidět u šarží NK160301/02 a NK160310/01 větší distribuce částic u laserové difrakce než u FBRM sondy. Tyto šarže byly smíchány z předchozích experimentů s největšími velikostmi částic. V obou případech se jednalo o velmi hustou suspenzi, která se při sonikaci dostatečně nerozmíchala a největší částice

se usadily na dně reaktoru. Tyto částice se poté nezachytily na FBRM sondě, ale až po ukončení experimentu pomocí laserové difrakce.

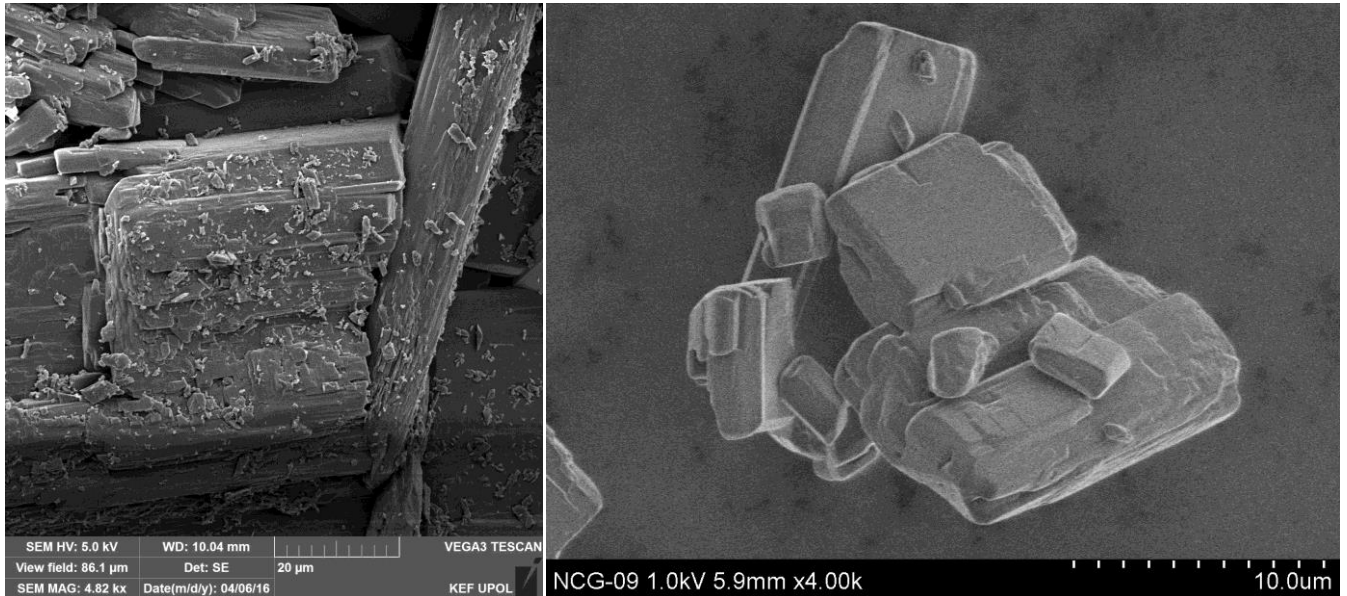
#### 4.5 Srovnání krystalického materiálu s největší a nejmenší distribucí velikosti částic



**Obr. 34** Záznam SEM, š. NK150929/01 ( $D_{90} 300\mu\text{m}$ ) a š. NK160324/01 ( $D_{90} 30\mu\text{m}$ )

Dle **Obr. 34** a z výsledků uvedených v tabulce (Tabulka) je zřejmé, že je možné připravit materiál s různými distribucemi velikosti částic (měřeno parametrem  $D_{90}$ ). Největší distribuce velikosti částic u š. NK150929/01 je parametr  $D_{90} 300\ \mu\text{m}$ , nejmenší distribuce velikosti částic u š. NK160324/01 je parametr  $D_{90} 30\ \mu\text{m}$ .

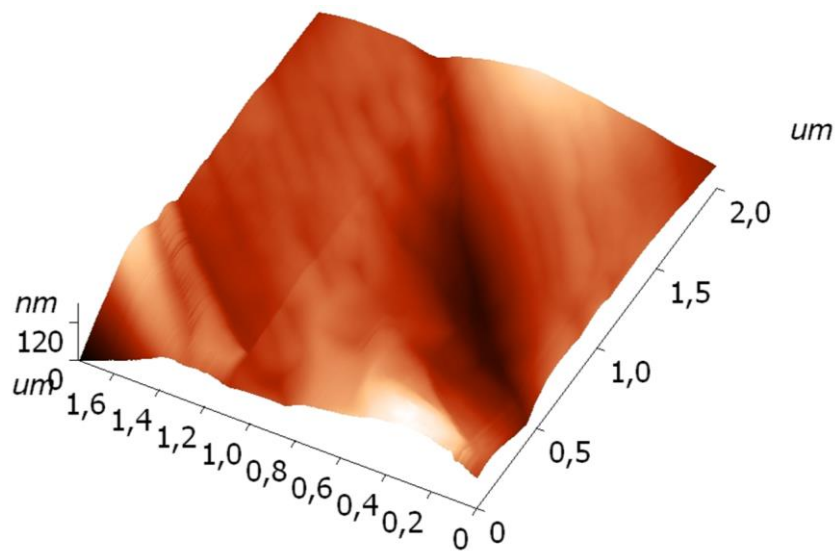
## 4.6 Drsnost krystalického materiálu



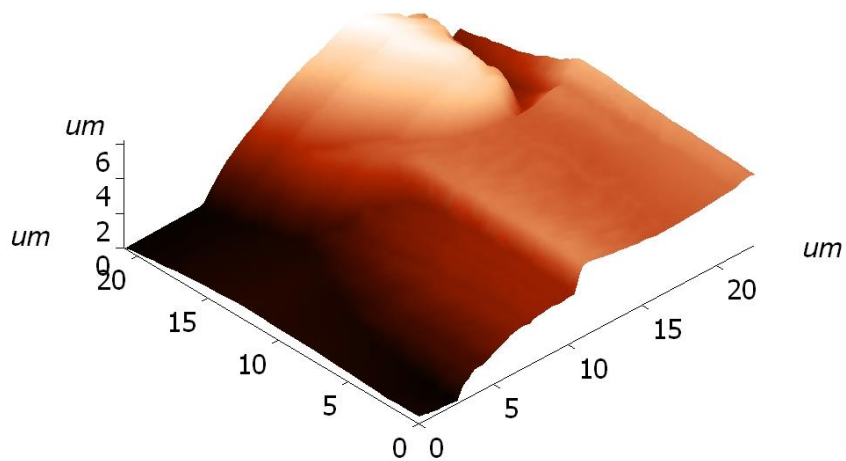
**Obr. 35** SEM záznam, porovnání povrchových vlastností krystalického materiálu, š.NK160317/01 (iniciace nukleace-levý obrázek), š.NK160324/01 (sonokrystalizace-pravý obrázek)

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu byly zjištěny jiné povrchové vlastnosti u krystalického materiálu získaného iniciací nukleace ultrazvukem (š.NK160317/01) oproti iniciaci nukleace ultrazvukem a následné sonokrystalizace (š.NK160324/01). Povrch se v případě následné sonokrystalizace jevil více homogenní. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí mikroskopu atomárních sil, pomocí kterého byla spočítána relativní drsnost jednotlivých povrchů krystalických materiálu. Průměrná drsnost povrchu u sonokrystalizace byla naměřena 90 nm (**Obr. 36**) a u iniciace nukleace 270 nm (**Obr. 37**).

Tato skutečnost má vliv na filtraci, délku sušení a sítování, případně mletí takto připravovaných materiálů.



**Obr. 36** Záznam AFM, drsnost povrchu sonokrystalizace, š.NK160324/01



**Obr. 37** Záznam AFM, drsnost povrchu iniciace nukleace, š.NK160317/01

## 4.7 Statistické vyhodnocení pomocí JMP softwaru

### I. Stanovení záměru / cíl

Korelace PSD D90 s FBRM D90

### II. Nastavené parametry vs. odezvy

Data získána online pomocí FBRM D90 sondy z krystalizace statisticky srovnána s PSD D90 analýzou.

Typ	Název	Zkratka	Jednotka
Parametr	FBRM D90	FBRM D90	μm
Odezva	PSD D90	PSD D90	μm

### III. Všechny provedené experimenty

Veškeré údaje byly získány pomocí laboratorních experimentů.

	Parametr	Odezva
Šarže	FBRM D90	PSD D90
NK150917/01	188	232
NK150929/01	410	301
NK151020/01	310	290
NK151022/01	136	91
NK151103/01	290	218
NK151109/01	280	216
NK151110/01	260	199
NK151119/01	288	189
NK151221/01	105	74
NK160114/01	170	160
NK160119/01	220	199
NK160202/01	150	102
NK160203/01	106	84
NK160204/01	100	62
NK160210/01	102	57
NK160225/01	118	57
NK160301/02	105	212
NK160308/01	87	52
NK160310/02	63	144
NK160317/01	84	57
NK160322/01	72	49
NK160323/01	74	48
NK160324/01	60	33

Tabulka 5 Všechna naměřená data

Zvýrazněné provedené experimenty byly odstraněny z vyhodnocení extrémních hodnot. V těchto případech jsou hodnoty odezvy větší než parametru.

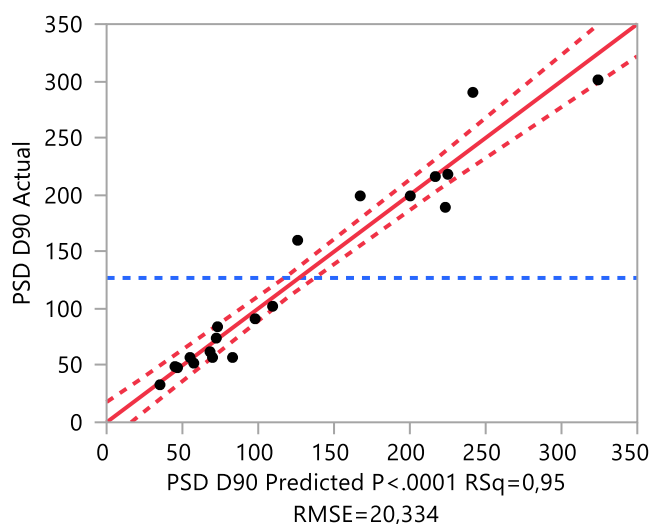
#### IV. Použitý software

Závislost byla vyhodnocena pomocí softwaru JMP, verze 12.0.1.

#### V. Model rovnice

Model PSD D90 je popsán následující rovnicí:

$$\text{PSD D90} = -14,32455 + 0,8253919 * \text{FBRM D90} \quad (4)$$



**Obr. 38** Naměřené hodnoty v závislosti vypočtené hodnoty

#### Summary of fit:

Square	0,94708
RSquare Adj	0,94414
Root Mean Square Error	20,33401
Mean of Response	126,9
Observations (or Sum Wgts)	20

#### Analysis of Variance:

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	1	133195,30	133195	322,1386
Error	18	7442,50	413	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	19	140637,80		<,0001*

### Parameter estimates:

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-14,32455	9,087685	-1,58	0,1324
FBRM D90	0,8253919	0,045987	17,95	<,0001*

### VI. Hlavní závěry, doporučení, postřehy a komentáře

Všech 24 vztahů mezi PSD D90 a FBRM D90 byly hodnoceny pomocí JMP softwaru. Tři body byly odstraněny z vyhodnocení extrémních hodnot (odezvy jsou vyšší než parametry). Existuje lineární závislost mezi PSD D90 a FBRM D90 s předpokládaným modelem rovnice PSD D90: **PSD D90 = - 14,32455 + 0,8253919\*FBRM D90**. Tento model je statisticky významný a z 95 % je tento model proložený daty.

## **5 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

FBRM – Focused beam reflectance measurement

PSD – Particle size distribution

NCG – Nicergolin

SEM – Scanning electron microscopy

AFM – Atomic force measurement

API – Active Pharmaceutical Ingredient



## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovení velikosti částic aktivních heterocyklických farmaceutických substancí, testovanou farmaceutickou substancí byl Nicergolin, derivát námelových alkaloidů. Úkolem bylo připravit krystalický materiál s různou distribucí velikosti částic a porovnat distribuce získané online pomocí laserové sondy FBRM s distribucemi naměřenými offline metodou laserové difrakce.

Krystalický Nicergolin byl připraven v laboratoři čtyřmi různými způsoby a to jako krystalizace Nicergolinu s přidavkem očkovacího materiálu, krystalizace bez očkování, krystalizace s iniciací nukleace pomocí ultrazvukové sondy a iniciace nukleace Nicergolinu pomocí ultrazvukové sondy se sonokrystalizací.

Největší distribuce velikosti částic (měřeno parametrem D90) bylo dosaženo u š.NK150929/01. U tohoto experimentu bylo množství očkovacího materiálu 1 % a teplotní chladicí rampa byla ze 40 °C na 0 °C během 60 minut. S prodloužením teplotní chladicí rampy se distribuce velikosti částic zmenšovala (š.NK151110/01) a nejmenší distribuce velikosti částic bylo dosaženo po očkované krystalizaci (10 % očkovacího materiálu), následované 30 minutovou sonikací a 4 hodinovou teplotní chladicí rampou (š.NK160114/01).

Ve druhé skupině experimentů u iniciace nukleace Nicergolinu ultrazvukovou sondou byla nastavena amplituda ve všech případech 30 %, parametry 5 s puls, 3 s pauza a doba sonikace 2 minuty. Největší distribuce velikosti částic bylo dosaženo u šarže NK160202/01, kde byla teplota při sonikaci 20 °C a teplotní chladicí rampa z t 20 °C na 0 °C 120 minut. Nejmenší distribuce velikosti částic bylo dosaženo u š.NK160317/01, při teplotě sonikace 20 °C a teplotní chladicí rampě 30 min.

V poslední skupině experimentů byla nejen iniciována nukleace Nicergolinu pomocí ultrazvukové sondy, ale navíc délka sonikace byla v rozmezí 20 – 120 minut. U šarže NK151221/01 byly naměřeny největší distribuce velikosti částic. V tomto případě byla délka sonikace nejkratší a to 20 minut, teplota sonikace 45 °C, amplituda 30 %, nastavené parametry 5 s puls a 3 s pauza a teplotní chladicí rampa z t 25 °C na 0 °C 60 minut. Nejmenší distribuci velikosti částic v této skupině experimentů a nejmenší distribuci ze všech experimentů, byla u šarže NK160324/01. U tohoto experimentu byla teplota sonikace 25 °C, amplituda 50 % a parametry 5 s puls a 1 s pauza. Doba sonikace byla nejdelší, a to 120 minut a teplotní chladicí rampa z t 25 °C na 0 °C 60 minut.

Po vyhodnocení všech čtyř druhů experimentů bylo zjištěno, že distribuce velikosti částic pomocí FBRM sondy (parametrem D90), vyšly hodnoty vždy vyšší než distribuce pomocí laserové difrakce (parametr D90). Toto tvrzení bylo potvrzeno i statistickým vyhodnocením v JMP softwaru, kde byla potvrzena lineární závislost mezi naměřenou a vypočítanou hodnotou PSD D90. Tímto statistickým vyhodnocením bylo také zjištěno, že online metodu měření distribuce částic lze s úspěchem použít k odhadu konečné distribuce částic získané offline metodou laserové difrakce. Je třeba dodat, že toto zjištění lze aplikovat pouze na daný tvar krystalického materiálu a nelze ho použít u materiálu s jiným krystalovým habitem, např. u částic ve tvaru jehlic.

U krystalického materiálu získaného iniciací nukleace ultrazvukem a následné sonokrystalizaci byly zjištěny pomocí záznamů ze skenovacího elektronového mikroskopu jiné povrchové vlastnosti (povrch se jevil více homogenní) než u materiálu, kde proběhla pouze iniciace nukleace ultrazvukem. Tato skutečnost byla potvrzena pomocí mikroskopu atomárních sil, pomocí kterého byla spočítána relativní drsnost povrchu. Povrch materiálů připravených sonokrystalizací byl více homogenní, než povrchy krystalických materiálů získaných iniciací nukleace ultrazvukem. Tato skutečnost má vliv na filtraci, délku sušení a sítování, případně mletí takto připravených materiálů.

## 7 SUMMARY

Aim of this masters thesis was assessing the definition of particle size of active heterocyclic farmaceutical substances, the tested farmaceutical substance was Nicergolin, a derivative of ergot alkaloids. The task was to prepare crystalline material with a different particle size distribution of particle sizes and to compare the distributions of obtained from online laser probe FBRM with distributions measured offline using the laser diffraction method.

Crystalline Nicergolin was prepared in the laboratory using four different methods which were crystallization of Nicergolin with the addition of seeding material, crystallization without seeding, crystallization with initiation of nucleation using an ultrasound probe and initiation of nucleation of Nicergolin using and ultrasound probe with sonocrystallization.

The widest particle size distribution of particlesizes (measured by parameter D90) was achieved in b.NK150929/01. In this experiment, the amount of seeding material was 1 % and the temperature cooling ramp was from 40°C to 0°C in 60 minutes. With the extension of the cooling time on the cooling ramp, the distribution of particle sizes was decreasing (b.NK151110/01), and the smallest distribution of particle sizes was achieved after seeded crystallization (10 % seeding material), following 30 minutes of sonication and a 4 hour cooling on a cooling ramp (b.NK160114/01).

In the second group of experiments for the initiation of nucleation of Nicergolin with an ultrasound probe the amplitude was set on 30 % in all cases, parameters of 5 s pulses, 3 s pauses and 2 minutes of sonication. The widest distribution of particle sizes was achieved with b.NK160202/01, where the temperature during sonication was 20 °C and the temperature cooling ramp from 20 °C to 0 °C was 20 minutes. Smallest distribution of particle sizes was achieved with b.NK160317/01, where the temperature during sonication was 20 °C and the cooling lasted for 30 minutes.

In the last group of experiments, nucleation initiation of Nicergoline was done using an ultrasound probe and also the length of sonication was within the range of 20 – 120 minutes. In the case of b.NK151221/01, we measured the widest distribution of particle size. The leghth of sonication was the shortest, which was 20 minutes, temperature of sonication was 45 °C, amplitude 30 %, set parameters of 5 s pulses and 3 s pauses, cooling on a ramp from 25 °C to 0 °C in 60 minutes. The smallest distribution of particle size in this set of experiments and the smallest distribution in all experiments was for b.NK160324/01. In this experiment the temperature of sonication was 25 °C, amplitude 50 % and parameters of 5 s pulses and 1

s pauses. Length of sonication was the longest, which was 120 minutes and the cooling from 25 °C to 0 °C was 60 minutes.

After assessing all four types of experiments was found that distribution of particle size using the FBRM probe (parameter D90) had higher figures than distribution using laser diffraction (parameter D90). This statement was confirmed with a statistical assessment in JMP software, where a linear correlation was confirmed between the measured and the calculated figure PSD D90. With this statistical assessment we also discovered, that the online method of measuring distribution of particles can be successfully used to approximate the final distribution of particles obtained using the offline method of laser diffraction.

It must be said that these findings may be applied only for a given crystalline structure and cannot be used for a material with a different crystalline structure, e.g. particles in the needle shape crystals. Crystalline material which was obtained using initiation of nucleation with ultrasound and following sonocrystallization showed different surface characteristics, which was detected using scanning electron microscope, than in materials where nucleation was initiated with ultrasound. This fact was confirmed using atomic force microscopy, where relative roughness of the surface was calculated. The surface of materials which were prepared using sonocrystallization were more homogenous than the surfaces of crystalline materials obtained using initiation of nucleation with ultrasound. These properties have also impact on the performance of a crystalline material during filtration, speed of drying, ease of sieving and milling.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Rádl, S. (2004) *Jak se rodí lék, aneb vybrané aspekty výzkumu a vývoje chemických léčiv*. Chemické listy 98, 1073-1084.
- [2] Komárek P.; Rabišková, M.; et. al. (2006) *Technologie léků (Třetí, přepracované a doplněné vydání)*, Galén, Praha.
- [3] Gabriel, R.; Jegorov, A.; Šafářová, K. (2012) *Optimalizace krystalizace vinanu ergotaminu pomocí laserové sondy*. Chemické listy 106, 765-768.
- [4] Novák, D. (2007) *Studium polymorfie a optimalizace krystalizace farmaceuticky aktivních látek*. Diplomová práce, Brno.
- [5] Stahl, H.P.; Wermuth, G.C. (2002) *Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection and Use*. Wiley-VCH, Weinheim.
- [6] Gabriel, R. (2012) *Termodynamická a kinetická krystalizace heterocyklických sloučenin*. Katedra fyzikální chemie, UP Olomouc.
- [7] Chen, J.; Sarma, B.; Evans, J.M.B.; Myerson A.S. (2011) *Pharmaceutical Crystallization*. Crystal Growth and design 10, 1021.
- [8] Sear, R. P. (2006) *Journal of Physical Chemistry*. 110 (43), 21944.
- [9] Kratochvíl B. (2007) *Krystalizace farmaceutických substancí*. Chemické listy 101, 3-12.
- [10] Hilfiker, R. (2006) *Polymorphism in Pharmaceutical Industry*. Wiley, New Jersey.
- [11] Tung Hsien-Hsin; Edward L. Paul; Midler M.; Mc Cauley J.,A. (2009) *Crystallization of organic compounds: An Industrial perspective*. Wiley, New Jersey.
- [12] Mulin, J. W. (2001) *Crystallization*. 4.vydání Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford.
- [13] Roberty F. Michael (2008) *From form to function: Crystallization of Active Pharmaceutical Ingredients*. AIChE Journal Vol. 54, No.7, 1682-1688
- [14] Šimek M. ; Grünwaldová V. ; Kratochvíl, B. (2014) *Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek a jejich omezení*. Chemické listy 108, 50-55.
- [15] Pabst W. ; Gregorová E. (2007) *Charakterizace částic a částicových soustav*. VŠCHT Praha.

- [16] <http://www.malvern.com/en/products/technology/laser-diffraction/default.aspx> ,  
staženo 15.2.2016
- [17] Zakrzewski, A.; Zakrzewski, M.; (2006) *Solid State Characterisation of Pharmaceuticals*. Analytics Inc., Danbury.
- [18] Tinke A.P. ; Vanhoutte, K.; Vanhoutte, F.; De Smet, M.; De Winter, H. (2005) *Laser diffraction and image analysis as a supportive analytical tool in the pharmaceutical development of a immediate release direct compression formulations*. International Journal of Pharmaceutics 297, 80-88.
- [19] Český lékopis (2005) Grada, Praha.
- [20] Birch, M.; Fussel, S.J.; Higginson P.D. Mc Dowal N.; Marziano, N. (2004) *Org.Process Dev.* 9 (3), 360.
- [21] Jiang, S.; Horst, J.H. (2011) *Crystal Growth Des.* 11, 256.
- [22] O'Sullivan, B., Barret, P., Hsiao, G., Carr A., Glennon, B. (2003) *Org. Process Res. Dev.*, 997.
- [23] Liu, W., Wei, H., Black, S. (2009) *Org. Process Res. Dev.* , 494.
- [24] Mettler Toledo: General FBRM Training – Theory and Background.
- [25] Štengl, V.; Šubrt, J. (2004) *Výkonný ultrazvuk a jeho aplikace*. Chemické listy 98, 324-327.
- [26] Soojin, K.; Lotz, B.; Lindrud, M.; Girard, K.; Moore, T.; Nagarajan, K.; Alvarez M.; Lee, T.; Faranak, N.; Davidovich, M.; Srivastava, S.; Kiang, S. (2005) *Control of the Particle Properties of a drug substance by Crystallization Engineering and the Effect on Drug Product Formulation*. Organic Process Research & Development 9, 894 – 901.
- [27] Barrett, P. (2003) *Selecting In-Process Particle-Size Analysers*. CEP Magazine, August 2003, 26-32.
- [28] Abu Bakar, M., R., Nagy, Z., K., Rielly Ch., D. (2010) *Cryst. Growth Des.*, 10, 3892.
- [29] Smith, B.; O'Sullivan, B. (2013) *Optimize Industrial Crystallization by Tracking Particle Size Inline*. Mettler-Toledo AutoChem, Inc.
- [30] Rawle, A. *Basic principles of particle size analysis*. Malvern Instruments Limited.

- [31] Leysens, T.; Baudry, C.; Hernandez E.L.M. (2011) *Optimization of a Crystallization by Online FBRM Analysis of Needle-Shaped Crystals*. *Org. Process Res. Dev.* 15, 413-426.
- [32] Iacocca, G.R.; Burcham, L.CH.; Hilden, R.L. (2010) *Particle Engineering: A Strategy for Establishing Drug Substance Physical Property Specifications During Small Molecule Development*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99 51-75
- [33] Malvern Instruments Ltd. (2012) *Přetrvávající zájem o laserovou difrakci*. *Chemagazín č.4, Ročník XXII*.
- [34] Carlton, A.R. (2011) *Pharmaceutical Microscopy*. Springer New York, 85-88.