

RYCHLEJŠÍ VÝVOJ KRYSTALIZAČNÍHO PROCESU DÍKY PROCESNÍM ANALYTICKÝM TECHNOLOGIÍM

ADÉLA BENÝŠEK BÁRTOVÁ^{a,b} a ROMAN GABRIEL^{a,b}

^a Teva Czech Industries s.r.o., Výzkum a vývoj, Ostravská 29, 747 70 Opava, ^b Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Česká republika
Adela.Bartova@tevapharm.cz, Roman.Gabriel@tevapharm.cz

Došlo 5.2.24, přijato 4.4.24.

Vývoj procesních analytických technologií se neustále posouvá a dnes již umožňuje kombinovat několik technik do jedné měřicí sondy. V této práci jsme porovnali in-line data z FBRM sondy a sondy EasyViewer s off-line analýzami. Rekrytalizace intermediátu se ukázala být citlivá na délku domíchání, s časem docházelo k rozbíjení krystalického materiálu a k prodlužování následné filtrace. U krystalizace finální API látky jsme potvrdili správné nastavení krystalizačních parametrů, které umožnily izolaci materiálu s monomodální distribucí částic.

Klíčová slova: aktivní farmaceutická látka, procesní analytické technologie, krystalizace, technika FBRM, systém EasyViewer

Úvod

Krystalizace je významnou jednotkovou operací ve farmaceutickém průmyslu, kde slouží nejenom k izolaci a čištění finálního produktu, ale, zejména v posledních letech, také k přípravě materiálu o požadovaných fyzikálně chemických vlastnostech¹ jako např. velikost částic, tvar krystalu (např. jehlicovité krystalky se nehodí pro přípravu látek používajících se jako nosní spreje), materiál o specifické ploše povrchu či polymorfní forma². V posledních letech roste důležitost krystalizace, protože se zvyšují nároky na čistotu, fyzikálně chemické vlastnosti krystalického materiálu, syntetizují se komplikovanější molekuly a důraz je kladen také na opakovatelnost atributů izolovaného materiálu během vývoje a následné výroby³. Důležité z pohledu krystalizace jsou také jednotlivé intermediáty při syntéze aktivních farmaceutických látek (API), především jejich nečistotní profil a chování při následných operacích, jako je filtrace a sušení⁴. Se vzrůstajícími požadavky zákazníků a kontrolních úřadů na kvalitu nejen finálního materiálu se zlepšují in-line metody pro sledování krystalizace bez nutnosti odběru vzorků během procesu⁵. Rychlé porozumění, jak jednotlivé parametry ovlivňují proces krystalizace, je důležité pro rychlý a úspěšný vývoj. K tomu nám pomáhají stále více se rozvíjející procesní analytické technologie (PAT)⁵. PAT systémy slouží k analýze a monitorování procesu v reálném čase s cílem zajistit kvalitu finálního produktu. PAT nebo-li *in situ* analýzy jsou hojně používány ve farmacii⁶ od vývoje až po výrobu a patří sem například kontinuální měření pH,

in situ spektroskopie^{7,8,9}, PVM sonda¹⁰, která poskytuje mikroskopické snímky nebo FBRM sonda^{7,10}, která zaznamenává distribuci velikosti částic.

Proces krystalizace můžeme kontrolovat vizuálně, off-line nebo in-line. Vizuální kontrola průběhu krystalizace je velmi nedokonalý způsob kontroly. Jsme schopni postřehnout např. počátek nukleace (i když oko je velmi nedokonalý nástroj) a v dnešní době je to téměř nemožný způsob kontroly. Snad jedinou výhodou je, že nepotřebujeme žádné analytické přístroje. Off-line techniky nám o vývoji krystalizace prozradí více, ale je potřeba v průběhu experimentu odebrat vzorky, které musí být částečně upraveny (např. usušeny) tak, aby byly vhodné pro analýzu. Tyto operace mohou způsobit změny ve zkoumaném materiálu a poskytnout nám tak mylný výsledek¹¹. Off-line analýzy jsou také časově náročnější a vyžadují zapojení dalších kolegů. In-line monitoring poskytuje současně nejvíce informací o procesu v reálném čase bez nutnosti vzorkování. Sondy (Ramanova⁸, FTIR⁹, PVM¹⁰, FBRM^{7,10}) lze použít od laboratorních reaktorů až po výrobní měřítka. Sledování procesu krystalizace *in situ* a in-line přímo ukazuje, jak jednotlivé změny procesních parametrů ovlivňují samotnou krystalizaci. Dříve platilo, jedna sonda rovná se jedna analytická technika. Abychom získali informace o distribuci částic, jejich morfologii, polymorfní formě a měnící se koncentraci během krystalizace, bylo nutné do reaktoru umístit čtyři sondy⁹. Takovéto uspořádání by mělo velký vliv na hydrodynamické a kinetické vlastnosti krystalizačního experimentu, nemluvě o cenové náročnosti. Technologický pokrok umožňuje kombinovat více ana-

lytických technik (mikroskopie, PSD, Ramanova spektroskopie) do jedné měřicí sondy, která poskytuje komplexní data o zkoumaném procesu⁶.

V této práci jsme porovnávali data získaná off-line analýzami, FBRM sondou, která monitoruje počet částic a jejich distribuci měřením těživové délky, a data ze sondy EasyViewer, která navíc poskytuje mikroskopické snímky o vysokém rozlišení a měří turbiditu, distribuce částic vychází z obrazové analýzy. Krystalizovanými látkami byly dvě heterocyklické sloučeniny. U látky *A*, která je intermediátem při výrobě látky *B*, byla problematická filtrace během procesu „scaling-up“ do výrobního měřítka, proto bylo nezbytné správně pochopit a optimalizovat rekrystalizaci. Látka *B* je API, proto bylo třeba během vývoje procesu krystalizace co nejlépe a nejrychleji pochopit vliv jednotlivých parametrů na izolovaný materiál.

Experimentální část

Chemikálie a přístroje

Látka *A*, látka *B*, obě látky jsou heterocyklické sloučeniny bazického charakteru, a mravenčan látky *B* byly připraveny in-house. Dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), ethanol (EtOH) a vodný roztok amoniaku (25% v/v) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Experimenty byly provedeny ve 100 ml reaktoru EasyMax 102 (Mettler Toledo) a monitorovány sondou EasyViewer 100 (Mettler Toledo) nebo FBRM sondou (Mettler Toledo). SEM snímky byly pořízeny pomocí mikroskopu TM 3030 Plus (Hitachi).

Rekrystalizace látky *A*

Látka *A* (4 g) byla rozpuštěna ve 28 ml DMF zahřátím na 55 °C, vzniklý roztok byl ochlazen na 25 °C během 30 min a naočkován suspenzí látky *A* v EtOH (3 hm.%). Suspenze byla míchána po dobu 30 min při teplotě 25 °C. Následně byl během 15 min přidán EtOH (80 ml) jako

antisolvent, vzniklá suspenze byla míchána 4 hodiny. Vykrytalovaný materiál byl odfiltrován, promyt EtOH a sušen po dobu 8 h při 45 °C pod proudem dusíku. Celkový výtěžek rekrystalizace byl 90 %.

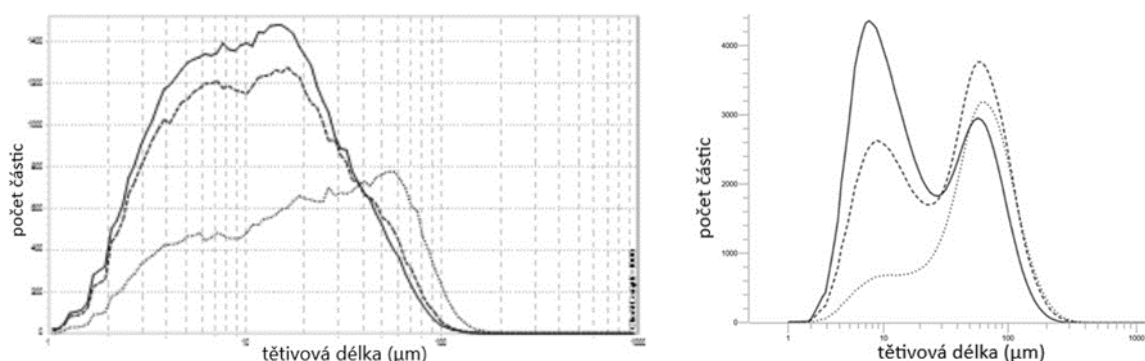
Reakční krystalizace látky *B*

Formiát látky *B* (4 g) byl suspendován v 8 ml DMSO a 8 ml EtOH, suspenze byla zahřátá na 30 °C a pak byl přidán 25% v/v vodný roztok amoniaku (1,05 eq.). Vzniklý roztok byl naočkován suspenzí látky *B* v EtOH (3 hm.%). Okamžitě po naočkování byl do suspenze přidán EtOH (70 ml) během 30 min. Vzniklá suspenze byla 30 min míchána při 30 °C a dále ochlazená na 3 °C během 2 h. Izolovaný materiál byl promyt EtOH a sušen po dobu 8 h při 45 °C pod proudem dusíku. Celkový výtěžek krystalizace byl 75 %.

Výsledky a diskuse

Rekrystalizace látky *A*

Průběh rekrystalizace látky *A* jsme sledovali pomocí FBRM sondy a sondou EasyViewer. Cílem bylo porovnat jednotlivé trendy velikostí částic snímané sondami a optimalizovat proces tak, abychom zlepšili filtrovatelnost materiálu. Doba filtrace v poloprovozním měřítku byla až 12 h a ve výrobě by se čas ještě více prodloužil. Data z FBRM sondy jsou na obr. 1. První křivka (tečkovaná) odpovídá distribuci částic v suspenzi po přidavku EtOH. V suspenzi je široká distribuce velikosti částic od řádově mikronových až po částice/aglomeráty o velikosti okolo 100 μm. Během 30 min míchání po přidavku antisolventu je vidět malý nárůst drobnějších částic v rozmezí 2–40 μm. Velká změna přichází s ochlazením suspenze na 2 °C, kdy teplotní chladicí profil trval 2 h a v suspenzi jsou převážně částice o velikosti do 50 μm. K dalšímu zvětšování drobných částic dochází po celou dobu domíchání a na konci experimentu je v suspenzi

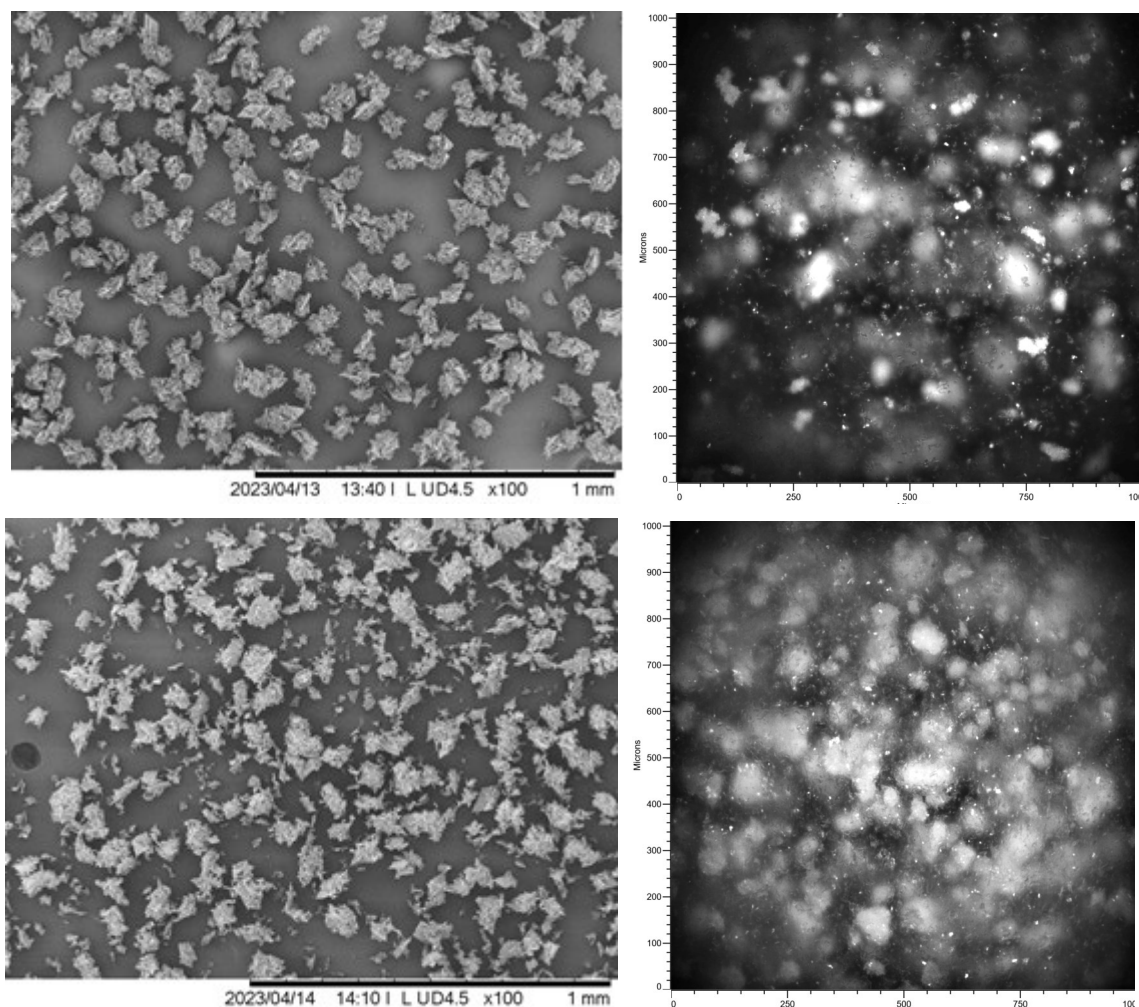


Obr. 1. Distribuce velikostí částic během rekrystalizace látky *A*; po přidavku antisolventu – tečkovaná, po vychlazení na 2 °C – čárkovaná, před filtrací – plná čára, z FBRM sondy (vlevo) a ze sondy EasyViewer (vpravo)

ještě významně větší podíl částic do 50 μm . Na základě těchto dat můžeme usuzovat, že během přidavku EtOH dochází jak k růstu krystalujícího materiálu, tak k jeho aglomeraci. Během chlazení dochází k rozbíjení dříve vzniklých aglomerátů mícháním, otěrem, nárazy o stěny krystalizátoru a vzájemnou kolizí aglomerátů.

Stejná rekrystalizace byla monitorována sondou EasyViewer, která má v sobě navíc mikroskop s vysokým rozlišením. Po přidání EtOH jsou distribuční křivky jak u FBRM, tak u sondy EasyViewer prakticky totožné (obr. 1). První odlišnost sledujeme u distribuční křivky po domíchání (tečkovaně). V případě sondy EasyViewer vidíme velký nárůst větších částic 40–100 μm . Během chladicího teplotního profilu jsou trendy zaznamenané sondami podobnější. Vidíme bimodální distribuci velikosti částic a v suspenzi je značný podíl malých částic (v jednotkách mikrometrů). S časem se tento trend ještě více umocňuje a klesá zastoupení větších částic stejně jako u FBRM son-

dy. Díky tomu, že máme k dispozici po celou dobu experimentu mikroskopické snímky o vysokém rozlišení, vidíme, že na začátku rekrystalizace jsou v suspenzi aglomeráty o velikosti okolo 100 μm (obr. 2). S chlazením a prodlužující se dobou míchání dochází k jejich rozbíjení na drobné krystalky, které v další fázi zpomalují filtraci (obr. 2). Jak je vidět z obr. 1, střední velikost částic ve sledované suspenzi se začíná zmenšovat po přidavku EtOH, podobný trend vykazují i částice větší než 300 μm . Naopak celkový počet částic v systému roste. Z informací, které nám poskytlo jedno měření sondou EasyViewer, víme, že suspenzi je třeba zfiltrovat co nejdříve po přidání antisolventu. Zabráníme tím následnému rozbití aglomerátů a tím urychlíme celý krystalizační proces. Ten byl na konec zkrácen z původní délky 24 hodin na 8 hodin, byl vynechán teplotní chladicí profil a domíchání krystalického materiálu při nižší teplotě. Významně se zkrátil také čas samotné filtrace z 12 hodin na 30 minut. Z měření



Obr. 2. Porovnání snímků SEM (vlevo) a snímků ze sondy EasyViewer (vpravo) z rekrystalizace látky *A* po přidavku antisolventu (nahore) a před izolací (dole)

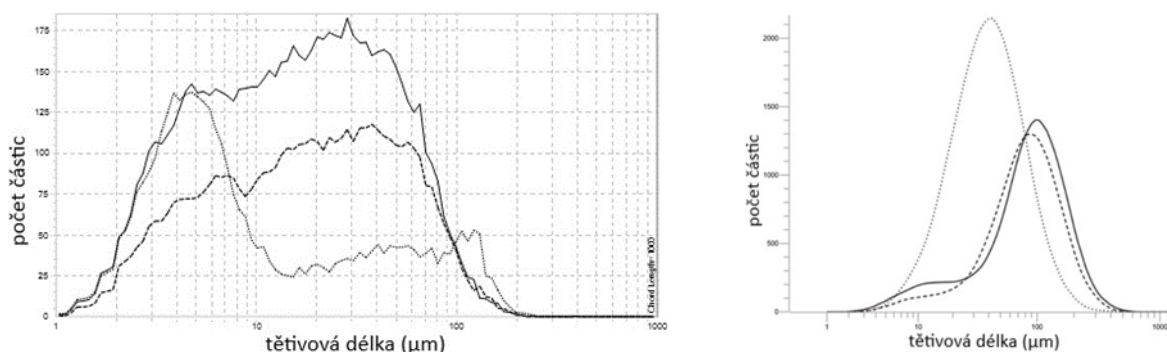
turbidity vyplývá, že chlazení dále nesnižuje rozpustnost, tudíž ani neovlivňuje výtěžek.

Reakční krystalizace látky B

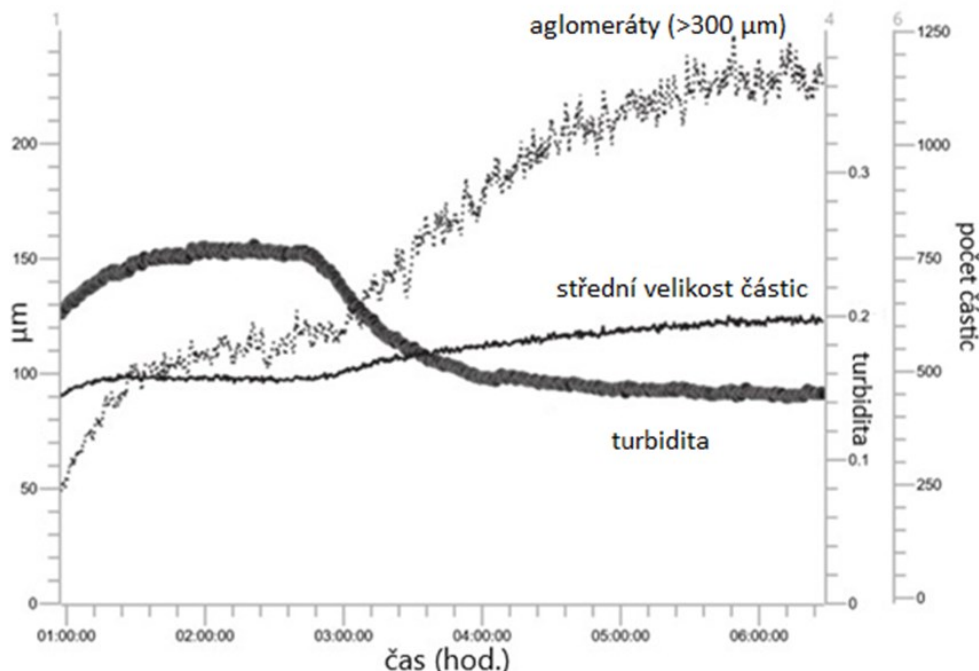
Ve druhém případě byla sledována reakční krystalizace látky B. Krystalizace byla monitorována jak FBRM sondou, tak také sondou EasyViewer. Cílem bylo zjistit, zda je proces správně nastaven nebo je možné ho dále optimalizovat. Z měření sondou FBRM vidíme, že po naočkování jsou v suspenzi částice do 10 μm a nepatrný podíl větších částic/aglomerátů. Na změně distribuce po

přidávku antisolventu se buď uplatňuje růst krystalů nebo dochází k aglomeraci a sekundární nukleaci. Na konci experimentu před filtrací má systém podle FBRM sondy široké PSD od jednotek mikrometrů až po 100 μm (obr. 3).

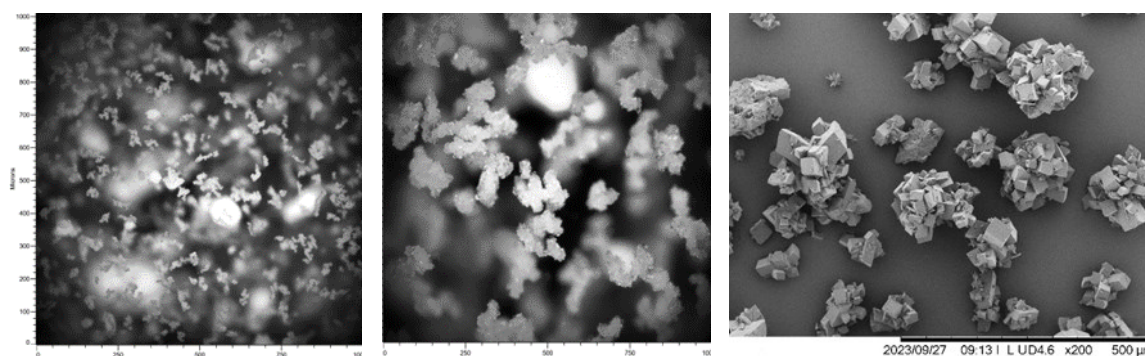
Více informací poskytlo měření sondou EasyViewer. Na začátku experimentu po naočkování máme monomodální distribuci částic (obr. 3). Během chlazení a následného domíchání se distribuce posouvá doprava k větším částicím, systém začíná aglomerovat. V malé míře dochází k sekundární nukleaci. Krystaly vzniklé sekundární nukleací se lépe projeví na inverzně vážených distribucích, kte-



Obr. 3. Distribuce velikosti částic během krystalizace látky B; po naočkování – tečkovaně, po přidávku antisolventu – čárkovaně, před filtrací – plná čára, z FBRM sondy (vlevo) a ze sondy EasyViewer (vpravo)



Obr. 4. Záznam trendů během krystalizace látky B ze sondy EasyViewer



Obr. 5. Porovnání mikroskopických snímků ze sondy EasyViewer po naočkování (vlevo), před izolací (uprostřed) a SEM snímkem izolované látky B (vpravo)

ré dávají větší váhu menším částicím. Sledované trendy jako turbidita, částice větší než 300 μm , částice menší než 25 μm a střední velikost částic, se začínají významně měnit zhruba v polovině chlazení při teplotě cca 15 $^{\circ}\text{C}$ (obr. 4). Turbidita začíná klesat, v systému roste počet aglomerátů (částice větší než 300 μm), zároveň klesá počet částic menších než 25 μm a střední velikost částic mírně roste. Z tohoto je jasné, že primárně vzniklé krystaly aglomerují a tvoří agregáty o velikosti okolo 100 μm (obr. 5). Během samotného domíchání velmi mírně klesá celkový počet částic a také turbidita. V systému dochází převážně k aglomeraci a sekundární nukleace je prakticky nulová. Izolace by tak měla proběhnout co nejrychleji po vychlazení. Domíchání nemá vliv na výtěžek a potlačíme další agregaci, která by mohla vést k bimodální distribuci částic a komplikovat následnou mikronizaci.

Závěr

V této práci jsme ukázali výhody in-line PAT systémů, konkrétně FBRM sondy a sondy EasyViewer, kterými jsme monitorovali dvě krystalizace heterocyklických látek. Z měření jednotlivých trendů jako PSD, počet částic, aglomerátů či turbidity jsme byli schopni rychle a efektivně upravit krystalizační podmínky. V prvním případě jsme zkrátali celý krystalizační krok a významně urychlili čas filtrace materiálu díky optimalizaci tvaru krystalické látky. U druhé krystalizace jsme potvrdili správné nastavení krystalizačních podmínek. Izolovaný materiál má monomodální PSD, které je vhodné pro následnou mikronizaci. Stále ale platí, že je vhodné ověřit výsledky také off-line analýzami, které nám potvrdí závěry z in-line měření.

A. Benýšek Bártová děkuje Interní studentské grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2024_017). Autoři také děkují společnosti Mettler Toledo a Teva Czech Industries za technickou podporu tohoto projektu.

Seznam zkratk

API	Active Pharmaceutical Ingredient
FBRM	Focused Beam Reflectance Measurement
PAT	Process Analytical Technologies
PSD	Particle Size Distribution
PVM	Particle Vision and Measurement
SEM	Scanning Electron Microscopy

LITERATURA

- Gabriel R., Benýšek Bártová A., Sahníc D., Kratochvíl B.: Chem. Listy 116, 737 (2022).
- Durak L., Kennedy M., Langston M., Mitchell C., Morris G., Perlman M. E., Wendl K., Hicks F., Papageorgiou C. D.: Org. Process Res. Dev. 22, 296 (2018).
- Q7 Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients: Guidance for Industry (2021), doi: 10.1201/9781003189145-16.
- Murphy N. S., O'Connor D. C., Gavins G. C., James L., Lockett J. P., McManus J. A., Packer G., Lopez-Rodríguez R., Webb S. J., Burns M. J.: Org. Process Res. Dev. 27, 1812 (2023).
- Chanda A., Daly A. M., Foley D. A., LaPack M. A., Mukherjee S., Orr J. D., Reid G. L., Thompson D. R., Ward H. W.: Org. Process Res. Dev. 19, 63 (2015).
- Sirota E., Kwok T., Varsolona R., Whittaker A., Andreani T., Quirie S., Margelefsky E., Lamberto D. J.: Org. Process Res. Dev. 25, 308 (2021).
- Kim E. J., Kim J. H., Kim M. S., Jeong S. H., Choi D. H.: Pharmaceutics 13, 919 (2021).
- Nagy B., Farkas A., Borbás E., Vass P., Nagy Z. K., Marosi G.: AAPS PharmSciTech 20, 1 (2019).
- Powell K. A., Croker D. M., Rielly C. D., Nagy Z. K.: Chem. Eng. Sci. 152, 95 (2016).
- Kutluay S., Ceyhan A. A., Sahin Ö., Izgi M. S.: Ind. Eng. Chem. Res. 59, 9198 (2020).
- Liu F., Bagi S. D., Su Q., Chakrabarti R., Barral R., Gamekkanda J. C., Hu C., Mascia S.: Org. Process Res. Dev. 26, 3190 (2022).

A. Benýšek Bártová^{a,b} and R. Gabriel^{a,b} (^a *Teva Czech Industries s.r.o., Research & Development, Opava, Czech Republic,* ^b *Department of Physical Chemistry, Palacký University in Olomouc, Czech Republic*): **Faster Development of the Crystallization Process Thanks to Process Analytical Technologies**

The development of process analytical technologies is continuously advancing and today allows us to combine several techniques into a single measurement probe. In this work, we compared in-line data from the Focused Beam Reflectance Measurement probe and the EasyViewer probe with off-line analyses. The recrystallization of the intermediate appeared to be sensitive to the length of mixing. With time, the crystalline material was breaking down, which prolonged the subsequent filtration. For the crystallization of the final active pharmaceutical substance, we confirmed the correct setting of the crystallization parameters, which enabled us to isolate a material with a monomodal distribution of particles.

Keywords: active pharmaceutical ingredient, process analytical technology, crystallization, FBRM technique, EasyViewer system

Acknowledgements

A. Benýšek Bártová thanks the Internal Student Grant Agency of the Palacký University in Olomouc, Czech Republic (IGA_PrF_2024_017). The authors also acknowledge the Mettler Toledo and Teva Czech Industries for technical support of this project.



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.