



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Chemie a fyzika pevných léčiv

prof. RNDr. Bohumil Kratochvíl, DSc.

Ing. Lenka Seilerová

Ing. Veronika Sládková

Ing. Michal Šimek

PRAHA 2020



VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE

Chemie a fyzika pevných léčiv

prof. RNDr. Bohumil Kratochvíl, DSc.

Ing. Lenka Seilerová

Ing. Veronika Sládková

Ing. Michal Šimek

PRAHA 2020

Chemie a fyzika pevných léčiv je nově se profilující předmět, který je speciálním zaměřením chemie a fyziky pevných látek na farmaceutické materiály. Náplní předmětu je získání základních znalostí o struktuře a vlastnostech farmaceutických substancí od molekulární úrovně až po úroveň mikrostruktury pevného stavu. Vychází ze základních krystalografických pojmů, které jsou aplikovány na farmaceutické molekuly. Zabývá se především fenoménem polymorfismu chemických entit, dále problematikou rozpustnosti, krystalizace, chemickými a fyzikálními typy krystalických a amorfních substancí, degradací a stabilitou a v neposlední řadě i patentovou politikou farmaceutických firem. Kromě toho napomáhá k pochopení lékopisných pojmů a seznamuje studenty s rutinními analýzami pevné fáze.

Text odborně posoudil RNDr. Alexandr Jegorov, CSc.

© Bohumil Kratochvíl, Lenka Seilerová, Veronika Sládková,
Michal Šimek, 2014, 2020
Cover design © Dana Husníková, 2014

ISBN 978-80-7592-075-1 (pdf)

ISBN 978-80-7080-917-4 (brož.)

OBSAH

1.	ÚVOD	9
2.	CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ TYPY PEVNÝCH LÉČIVÝCH LÁTEK	11
3.	ZÁKLADY KRYSTALOGRAFIE	14
3.1	Geometrie krystalové struktury	14
3.2	Symetrie krystalové struktury	17
	Operace symetrie	17
	Rotace	17
	Zrcadlení	18
	Inverze	18
	Rotační inverze	19
	Skluzná rovina a šroubová osa	19
	Příklady aplikace operací symetrie:	22
3.3	Bravaisovy mřížky	23
3.4	Krystalografické soustavy	24
3.5	Grupy symetrie	25
	Bodové grupy	26
	Prostorové grupy	28
3.6	Krystalové struktury ve farmacii	31
4.	MOLEKULÁRNÍ KRYSTAL	35
4.1	Vznik molekulárního krystalu	35
4.2	Typy vazeb v molekulárních krystalech	37
	Kovalentní vazby	37
	Iontové vazby	37
	Interakce ion – dipól	38
	Interakce dipól – dipól	38
	Kation – π -interakce	39
	π – π Interakce	39
	Van der Waalsovy síly	40
	Vodíkové vazby	42
4.3	Analýza struktury molekulárních krystalů	48
5.	KRYSTALIZACE	50
5.1	Nukleace	50
	Homogenní nukleace	51
	Heterogenní nukleace	52
5.2	Termodynamika krystalizace	53
5.3	Mechanismus růstu krystalů	55
5.4	Kinetika krystalizace	57
	Filmová teorie růstu krystalů	57
5.5	Variace termodynamických a kinetických parametrů a jejich vliv na krystalizaci	60
5.6	Krystalizační techniky ve farmacii	61
	Krystalizace polymorfů	64

6. POLYMORFISMUS	67
6.1 Problémy s polymorfismem, které musí řešit farmaceutické firmy	69
Frekvence výskytu polymorfů	69
Predikce polymorfismu	71
Polymorfni přechody a cílená výroba zvoleného polymorfu	73
Vlastnosti polymorfů	74
Analytické techniky pro identifikaci a stanovení polymorfů	76
6.2 Polymorfy v lékových formách	79
6.3 Příklady polymorfních a solvatomorfních systémů	80
Námelové alkaloidy	80
Nepetidický námelový alkaloid tergurid	80
7. ANHYDRÁTY (ANSOLVÁTY), HYDRÁTY (SOLVÁTY), SOLI, KOKRYSTALY, AMORFNÍ FORMY	83
7.1 Anhydráty (ansolváty)	84
7.2 Solváty (hydráty)	86
7.3 Soli	90
7.4 Kokrystaly	95
Screening kokrystalů a solí, kokrystalizační metody	96
Odpárování rozpouštědla, rušená kokrystalizace, přídavek antisolventu	97
Společné tavení	98
Mletí	98
Mletí s přikapáváním rozpouštědla	99
Kokrystalizace v suspenzi	99
Kokrystalizace ultrazvukem	99
7.5 Amorfni formy (amorfáty)	100
7.6 Amorfni hydráty	103
7.7 Příprava amorfni fází	103
Rychlé ochlazení taveniny	104
Mikronizace krystalické fáze	105
Lyofilizace a sprejové sušení	106
Ostatní metody	107
8. VELIKOST A TVAR ČÁSTIC, MIKROSTRUKTURA PEVNÝCH LÉKOVÝCH FOREM	109
8.1 Velikost a tvar částic	111
Vznik částic a úprava jejich velikosti	111
Popis velikosti a tvaru částic	113
Početní distribuce velikosti částic	114
Objemová distribuce velikosti částic	115
Percentilní <i>d</i> -hodnoty	115
Důležitost velikosti a tvaru	115
Zpracovatelnost	115
Chování	116
8.2 Metody měření velikosti částic	117
Sedimentační metoda	117
Sítová analýza	118
Obrazová analýza mikroskopických snímků	119
Metoda laserová difrakce	120

9.	ROZPOUŠTĚNÍ A ROZPUSTNOST	122
9.1	Rozpouštění	123
9.2	Rozpustnost	124
	Zvyšování rozpustnosti	125
9.3	Rozpouštěcí rychlost	126
9.4	Disoluce pevných lékových forem.....	127
	Disoluční aparáty a média.....	128
	Disoluční profil.....	129
9.5	Mechanismus rozpouštění.....	131
9.6	Absorpce léčiv	133
10.	STABILITA A DEGRADACE.....	137
10.1	Stabilitní studie	137
	Chemická stabilita.....	137
10.2	Degradační reakce	138
	Mechanismus reakcí v pevné fázi	139
10.3	Kategorizace degračních reakcí	142
	Oxidační degradace.....	142
	Hydrolytická degradace	143
	Dehydratace a desolvatace.....	143
	Dehalogenace a dehydrohalogenace	144
	Dekarboxylace, deamidace, denitrogenace	144
	Fotodegradace	144
10.4	Hygroscopicita	145
	Adsorpce vody	146
	Klasifikace hygroscopického chování substancí	146
11.	PATENTOVÁ OCHRANA LÉČIV	149
11.1	Co je to patent?	149
	Význam patentových informací	150
	Originální vs. generické léčivé přípravky	150
	Co lze patentovat u léčiv?	151
	Další formy legislativní ochrany léčiv	152
	Dodatkové ochranné osvědčení.....	152
	Ochrana (exkluzivita) klinických dat	152
	Jak patent vypadá.....	153
	Náležitosti patentu	153
	„Evergreening“ a „lifecycle management“	154
11.2	Patentové spory	155
	Příklady patentových sporů	155
11.3	Patenty a věda	156

PŘEDMLUVA

Látka probíraná v těchto skriptech je prvním kompletním zpracováním problematiky pevných léčiv v češtině. Výklad vychází z elementů chemie a fyziky pevných látek. Důraz je kladen na znalost všech úrovní vnitřní struktury substancí (molekulová a krystalová struktura, resp. amorfní stav) a pevných formulací (mikrostruktura), z kterých vychází fyzikální a chemické vlastnosti pevné fáze. Zvláštní pozornost je věnována fenoménu polymorfismu a neočekávaným polymorfním přechodům, ke kterým může dojít v různých fázích výroby léčiv nebo dokonce v léčivých přípravcích při nevhodném skladování. Do skript je zařazena i kapitola pojednávající o duševním vlastnictví (patentech) vztahující se k pevným léčivům, což je problematika nanejvýš aktuální.

Důležitost předmětu Chemie a fyzika pevných léčiv dokladuje jeho zařazení mezi zkušební okruhy bakalářské státní závěrečné zkoušky studijního programu Syntéza a výroba léčiv na VŠCHT Praha. Z tohoto důvodu je velmi užitečné, aby studenti měli k dispozici, kromě prezentací z přednášek, solidní učební oporu ve formě klasických skript.

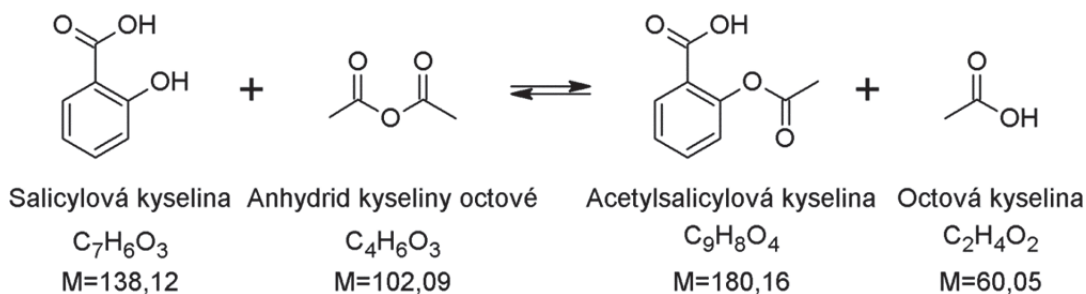
Text skript se opírá o anglicky psané monografie oboru - *Bernstein: Polymorphism in Molecular Crystals; Hilfiker: Polymorphism in the Pharmaceutical Industry; Byrn, Pfeiffer, Stowell: Solid-State Chemistry of Drugs; Stahl & Wermuth, Eds: Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, selection and use* a jiné. Dále o vlastní vědeckou práci v oboru a zkušenosti z dlouholetého přednášení tohoto předmětu na VŠCHT Praha i v zahraničí. V neposlední řadě také o pomoc svých doktorandů: ing. Lenky Seilerové, ing. Veroniky Sládkové a ing. Michala Šimka, bez kterých bych svůj dlouho rozepsaný rukopis jen těžko dokončil. Můj dík patří také kolegům Ing. Petrovi Holému, CSc. a doc. Dr. Ing. Michalu Hušákovi, kteří se na textu podíleli. Ke zlepšení úrovně bezesporu přispěl i Ing. Jan Čejka, PhD., přednášející paralelního předmětu Analýza pevných léčiv, a recenzent - odborník z praxe, RNDr. Alexandr Jegorov, CSc. z firmy Teva.

Praha, prosinec 2014

Bohumil Kratochvíl

1. ÚVOD

Organická syntéza léčivé látky končí zápisem chemické rovnice finálního syntetického kroku (Obr. 1).



Obr. 1: Chemická rovnice syntézy kyseliny acetylsalicylové (aspirinu)

Je-li produktem pevná fáze, je třeba řešit následující otázky:

- Jak pevnou fázi izolovat z roztoku?
- Jedná se o fázi krystalickou, amorfni nebo semikrystalickou?
- Jaký je krystalový tvar, velikost krystalů (částic)?
- Jaký je obsah zbytkového rozpouštědla uzavřený v krystalech (částicích)?
- Nejedná se o solvát (hydrát) uvedené substance?
- V čem a jak rychle se bude pevná fáze rozpouštět?
- Jaká je stabilita připravené substance z chemického hlediska?
- Je krystalová forma stabilní nebo může přecházet na jiné formy?
- Je krystalová forma nová nebo byla již popsána v literatuře nebo patentu?
- Má krystalová forma nějaké praktické výhody oproti dosud popsaným formám?
- Je obsah zbytkových rozpouštědel toxikologicky akceptovatelný pro použití v lékové formě?

Těmito a dalšími otázkami se zabývá předmět Chemie a fyzika pevných léčiv, který je speciálním zaměřením Chemie a fyziky pevných látek na farmaceutické materiály. Chemie a fyzika pevných látek je dlouho existující a dobře strukturovaný vědní obor, ale tradičně aplikovaný především na anorganické pevné látky, resp. anorganické materiály, jejich strukturu, fyzikální vlastnosti a reaktivitu (kovy, slitiny, keramika, polovodiče aj.). Nový obor, chemie a fyzika pevných léčiv, pojednává o malých organických, biologicky aktivních molekulách s farmaceutickou aplikací. Malé organické molekuly obsahují zhruba do sta nevodíkových atomů v molekule a tím se liší od biomakromolekul, které jsou podstatou bioléciv (viz předmět Bioléciva, zajišťovaný Ústavem biochemie a mikrobiologie VŠCHT Praha).

Důležitost chemie a fyziky pevných léčiv vyplývá z faktu, že asi 80 % produkce farmaceutických firem tvoří pevné léčivé přípravky (tablety a tobolky) obsahující pevnou, kapalnou nebo polotuhou léčivou látku.

Léčivé látky obsahující malé organické, biologicky aktivní molekuly, se ve farmaceutickém průmyslu získávají:

- biotechnologickými procesy nebo extrakcí z biologického materiálu (houby, rostliny, plísně atd.)
- semisyntetickou úpravou produktů z biologického materiálu (např. kyselinu lysergovou získanou z námele je možné semisynteticky upravit na námellový alkaloid lisurid)
- totální chemickou syntézou

Způsob produkce, který si farmaceutická firma zvolí, záleží na aspektech ekonomických, logistických, ekologických apod.

Léčivá látka je pojem definovaný Českým lékopisem. Ekvivalentní užívané pojmy jsou: léčivo, účinná látka, aktivní substance nebo API (Active Pharmaceutical Ingredient). Pevná léčivá látka je spolu s pomocnými látkami neboli excipienty formulována do výsledné **pevné lékové formy** (léku neboli pevného léčivého přípravku). I když má pevná fáze řadu problémů, její výhody převažují nad nedostatky. Léčivé látky lze formulovat i do kapalných lékových forem (roztoky), které ovšem mají ve srovnání s pevnými formami zásadní nevýhody:

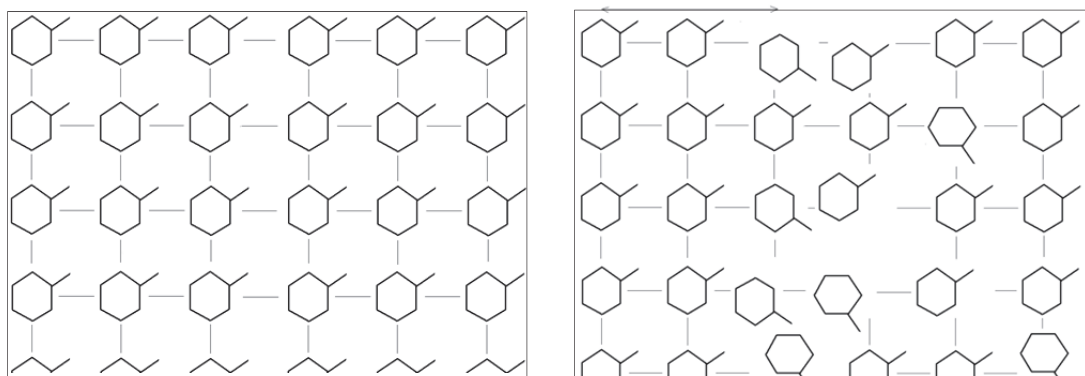
- stabilita v roztoku (fyzikální nebo chemická) je horší než v pevné fázi, do kapalných forem nelze formulovat nestabilní emulze
- kapalně formulované léky mohou krystalovat a vyžadují složitější manipulaci
- kapalně formulované léky nelze ochránit před kyselým prostředím žaludku (disociace) a před hydrolázami (trypsin, pepsin), dříve než vstoupí do střeva
- u kapalných forem nelze řídit uvolnění a absorpci léčiva na specifickém místě
- u kapalných forem nelze modifikovat farmakokinetický profil (koncentrace léčivé látky v krvi vs. čas) a dosáhnout pozvolnější a déletrvající plató v terapeutickém okně
- užívání kapalných forem je pro pacienta méně komfortní (horší určení dávky, kontrola užití) a nelze předpokládat dobrou úroveň jeho spolupráce (pacienti trpící např. Parkinsonovou chorobou, Alzheimerovou chorobou aj.)

Na druhé straně však výroba pevných léčivých látek vyžaduje sledování a řízení celé řady technologických parametrů pevné fáze, které ovlivňují kvalitu výsledného produktu. Především se jedná o řízenou produkci určitého polymorfu při krystalizaci léčivé látky, která vykazuje komplikované polymorfní chování. **Polymorfy jsou pevné látky určitého chemického složení, ale liší se svojí krystalovou strukturou neboli uspořádáním v prostoru** (viz kap. 2.). Problémem je, že polymorfy mohou nechtěně přecházet z jednoho na druhý, proto udržet všechny provozní parametry výroby pevné fáze pod kontrolou a zabránit nechtěným polymorfním přechodům, může být komplikované. Příkladem mohou být problémy spojené s udržení fyzikální stability (polymorfismem) ritonaviru (inhibitor HIV-proteasy). Nežádoucí a neřízené přechody mezi dvěma polymorfy ritonaviru donutily firmu Abbott Laboratories přeformulovat v roce 1999 léčivý přípravek Norvir[®] z tablet na měkké želatinové kapsle uzavírající kapalnou fázi.

2. CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ TYPY PEVNÝCH LÉČIVÝCH LÁTEK

Malá organická molekula může vytvářet až sto pevných fází (forem). Příkladem je sulfathiazol, který je znám ve formě 5 polymorfů a okolo 100 solvátů (solváty jsou pevné fáze se zabudovanými molekulami rozpouštědla, většinou vody – takové krystalické fáze se pak označují jako hydráty). Pro farmaceutický vývoj to znamená, že od jedné, terapeuticky použitelné molekuly, je pro její pevnou formulaci k dispozici velká škála chemických a fyzikálních typů pevných léčivých látek, které musí být ovšem farmaceuticky akceptovatelné (neboli dostupné ve směrnici GRAS – Generally Recognized as Safe, což je direktiva vydaná Národním regulačním úřadem USA Food and Drug Administration, zkráceně FDA).

Základní dělení pevných léčivých látek je na fáze **krystalické a amorfní** (Obr. 2). To proto, že makroskopické vlastnosti pevné fáze jsou determinovány její vnitřní strukturou, což vyjadřuje vztah: struktura – vlastnosti – funkce.



Obr. 2: Schématické uspořádání molekul krystalické látky (vlevo) a amorfní látky (vpravo)

Rozdíl mezi oběma kategoriemi spočívá v jejich uspořádání neboli v periodicitě opakování základního strukturního motivu (molekula nebo několik molekul). Hranicí je hodnota zhruba 50 Å ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$). Pod touto hodnotou leží látky amorfní, nad ní krystalické. Hranice mezi látkami krystalickými a amorfními není a ani nemůže být ostrá. Existují totiž polymery (např. celulóza), u nichž interval periodicity kolísá kolem střední hodnoty. Takové látky nazýváme parakrystalické. Někdy se též setkáme s pojmem semikrystal, což jsou látky nedokonale krystalizující. Dokonale amorfní pevné látky neexistují, stejně jako dokonalé, ideální krystaly. V obou případech se jedná pouze o teoretické přiblížení.

Krystalická fáze je charakterizována přesným bodem tání, T_t , a trojrozměrně periodickou, na dlouhou vzdálenost uspořádanou krystalovou strukturou, která má určitou geometrii a symetrii. Geometrii krystalové struktury popisujeme základními pojmy, jako je prostorová mřížka, elementární buňka, pozice atomů v elementární buňce, počet molekul v elementární buňce atd. Symetrii krystalové struktury vyjadřujeme termíny: operace symetrie, krystalografická soustava, prostorová grupa atd.

Projevem symetrie krystalové struktury je vnější tvar krystalu neboli jeho habitus či design.

Struktura látek amorfních je neuspořádaná a tudíž neperiodická, resp. periodická jen na krátkou vzdálenost. Pojmy geometrie, symetrie struktury a krystalový tvar zde nemají význam.

Látky krystalické mají ostrý bod tání a vykazují anizotropii vlastností, což znamená, že hodnota vlastnosti závisí na směru, ve kterém ji v krystalu měříme (platí pro měření na monokrystalových vzorcích neboli krystalových jedincích). Amorfní pevné látky jsou izotropní a jejich bod tání není ostrý. Důležitou charakteristikou amorfních pevných látek je teplota jejich skelného přechodu T_g , tzn. teplota transformace kapalná fáze → amorfni fáze nebo krystalická fáze → amorfni fáze. Při zahřívání amorfni látky dochází k jejímu postupnému měknutí, způsobenému zvýšením mobility molekul, protože nejslabší vazby se přerušují při nižší teplotě než vazby ostatní. To proto, že v nekrystalických pevných látkách neexistuje uspořádání na dlouhou vzdálenost, a proto je pevnost vazeb mezi stavebními jednotkami (molekulami) různá. Naproti tomu je neuspořádanost amorfni látky ve všech směrech stejná. Amorfní forma pevné látky je vždy nestabilním nebo metastabilním stavem (nese v sobě energii (ΔG), která má tendenci projevit se navenek). To znamená, že např. při zvýšení teploty může dojít k přechodu ze stavu amorfniho do krystalického. K opačnému přechodu krystalická fáze → amorfni fáze nikdy nedojde samovolně. K tomu je zapotřebí dodat krystalické fázi energii, např. mletím. Je však třeba rozlišovat mezi stálostí a stabilitou. I amorfni pevná látka může být velmi stálá, pokud nedojde k razantní změně okolních podmínek (např. teploty). Mobilitu amorfni fáze mohou ovlivnit některé látky nazývané plastifikátory, typicky je to však vlhkost, která způsobuje snížení T_g a snadný přechod amorfů na krystalické fáze. Naopak přídavek makromolekulárních látek brání krystalizaci amorfů a je to velmi častý způsob, jak zabezpečit dlouhodobou stabilitu amorfni látek v lékové formě.

Nekrystalická pevná léčiva se nejčastěji označují jako amorfni fáze nebo amorfy. Z hlediska vlastností jsou krystalická léčiva sice stabilnější, ale pomaleji rozpustná než amorfy. U amorfni léčiv je problémem jejich fyzikální i chemická stabilita, což má obecně za následek jejich kratší expiraci (dobu použitelnosti). Právě z důvodu stability volí originální firmy pro pevné lékové formulace přednostně krystalická léčiva. Amorfní léčiva formulují např. originální firmy, když má krystalická fáze nevyhovující vlastnosti (především nízkou rozpustnost) nebo generické firmy, když potřebují obejít patentovou ochranu krystalického originálu.

Tab. 1: Přehled hierarchie vnitřního uspořádání pevné fáze

Uspořádání pevné fáze	Úroveň [m]
struktura atomového jádra (viz radiofarmaka)	10^{-15}
elektronová struktura (pásový model pevných látek)	10^{-10}
molekulová struktura	$10^{-10} - 10^{-9}$
krystalová struktura nebo amorfni uspořádání molekul	$10^{-8} - 10^{-6}$
nanostruktura	$10^{-9} - 10^{-7}$
mikrostruktura	$10^{-6} - 10^{-5}$
charakteristika práškového „bulku“	$10^{-5} - 10^{-4}$

Pod pojmem vnitřní struktura rozumíme celou hierarchii vnitřního uspořádání pevné fáze (Tab. 1).

Kromě nejdůležitější strukturní úrovně - krystalové struktury, resp. amorfního uspořádání ovlivňují i další úrovně struktury vlastnosti farmaceutických prášků. Tím je ve výsledném efektu určena funkce prášku v tabletě, resp. biodostupnost přítomné léčivé látky. Elektronová struktura ovlivňuje elektrostatické nabíjení prášků, což způsobuje jejich nepříjemnou lepkavost. U struktury a složení molekuly je např. důležité jestli obsahuje ionizovatelné skupiny a jak jsou v molekule orientované, protože jejich přítomnost je nutnou podmínkou pro tvorbu solí. Soli jsou obecně rozpustnější než neutrální molekuly. Rozmělnění částic na úroveň nanočástic výrazně zvýší rozpustnost prášku, protože se významně zvětší povrch. Na úrovni mikrostruktury (i po procesu mletí prášku) je důležitý optimální tvar a velikost částic pro lisování (tabletači). Daleko lépe se totiž lisují krystalky sférického tvaru, krychličky, resp. hranolky než nepříjemné lístečky, šupinky nebo jehličky, které se lámou a vytváří krystalický prach. Důležitý je rovněž aerodynamický tvar částic pro inhalační spreje. Povrch a jeho struktura zahrnuje póry a krátery, což ovlivňuje schopnost prášku adsorbovat molekuly plynu, např. vodní páru (viz hygroskopicitu nebo rychlost rozpouštění).

Pro porozumění dalšímu výkladu je nutné utřídit uvedené pojmy do krátkého přehledu elementů krystalografie a na něm zdůraznit význam struktury pevné fáze pro farmacii.

Otázky:

Jaké jsou výhody pevných léčivých přípravků oproti kapalným fázím?

Může konkrétní účinná látka existovat v krystalické i amorfní formě?

Jaký je rozdíl ve vlastnostech krystalické a amorfní látky?

Vysvětlete pojem „monokrystal“.

3. ZÁKLADY KRYSTALOGRAFIE

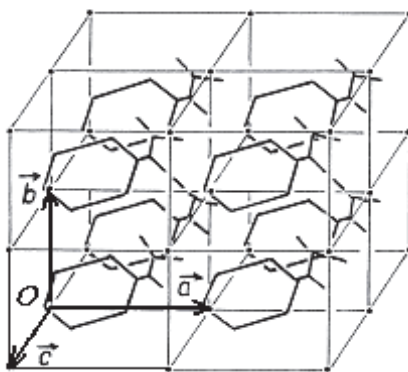
3.1 Geometrie krystalové struktury

V nultém přiblížení hovoříme o tzv. ideální krystalové struktuře neboli o **ideálním krystalu**, který je dokonalý (neporušený) a nekonečně periodický. Myšlenkovou abstrakcí můžeme v ideálním krystalu vybrat nejjednodušší motiv - **hmotnou bázi** (atom, skupinu atomů, molekulu, několik molekul apod.). Pravidelným opakováním hmotné báze o konstantní posun - translaci, jejíž velikost je ve třech směrech X,Y,Z obecně různá, vybudujeme trojrozměrný periodický vzor – **ideální krystalovou strukturu**. Tato aproximace je pro krystalové struktury farmaceutických substancí naprosto vyhovující a příliš se neliší od reality.

Při popisu geometrie ideální krystalové struktury aproximujeme hmotnou bázi jedním **mřížkovým bodem** neboli **uzlem**. Vzniklá množina, ve které každý bod (uzel) má stejné a stejně orientované okolí, se nazývá **prostorová mřížka**. Myšlenkovou abstrakcí lze tedy ideální krystalovou strukturu rozložit na prostorovou mřížku, kde každý uzel reprezentuje jednu hmotnou bázi, vždy stejně orientovanou (Obr. 3):

$$\text{ideální krystalová struktura} = \text{prostorová mřížka} + \text{hmotná báze} \quad (1)$$

V mřížce jsou všechny uzly ekvivalentní a z každého můžeme vést množinu translačních vektorů $\{T_i\}$. Z této množiny stačí, pro jednoznačný popis mřížky a tudíž i ideální krystalové struktury, vybrat tři nekomplanární základní vektory **a, b, c**, tzv. základní translace, které určují tvar základního rovnoběžnostěnu - **elementární buňky**. Rozměry elementární buňky, délky hran *a, b, c* a jimi sevřené úhly α, β, γ , se také nazývají **mřížkové parametry**.



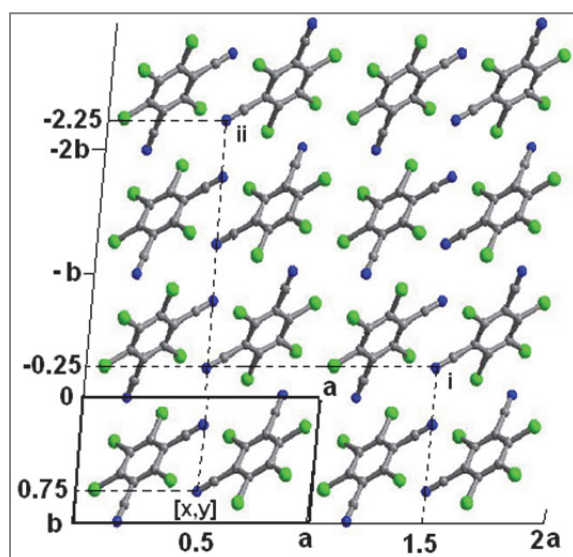
Obr. 3: Krystalová struktura (trojrozměrné uspořádání molekul) a přes ni přeložená prostorová mřížka (abstraktní množina bodů)
Každý uzel reprezentuje jednu molekulu (hmotná báze).

Lze shrnout, že ideální krystalová struktura je vybudována translačním trojrozměrným opakováním elementární buňky, při zachování jejího hmotného obsahu a vnitřního uspořádání. Pro farmaceutické aplikace můžeme ideální krystalovou strukturu

považovat za dostatečné přiblížení skutečnosti, tzn. že neuvažujeme reálné defekty, které se uplatní především pro vysvětlení vlastností konkrétních materiálů.

V dané mřížce můžeme vybrat rozmanité elementární buňky, nebo krátce buňky. Buňky dělíme podle toho, kolik uzlů připadá na jejich objem - na **primitivní a centrované**. Na primitivní buňku (symbol P, u romboedru R) připadá pouze jeden uzel, na bočně centrovanou (symbol C podle orientace centrace protilehlých stěn) dva, na tělesně centrovanou (symbol I) rovněž dva a plošně centrovanou (symbol F) čtyři. Jiné typy centrace je zbytečné zavádět, neboť je lze vždy převést na buňku primitivní nebo na centrace výše uvedené. V každé mřížce lze zvolit buňku primitivní, buňce centrované dáme přednost v případě, že získáme výhodu ortogonalitu (pravoúhlosti) jejich hran.

K vyjádření polohy atomu resp. libovolného bodu v buňce se v krystalografii používají tzv. **frakční (zlomkové) souřadnice** x, y, z (malá písmena), které představují zlomky hran buňky (Obr. 4). Např. poloha 0,5;0,25;0,3 znamená, že atom má souřadnici x polovinu a , souřadnici y čtvrtinu b a souřadnici z skoro třetinu c .



Obr. 4: Pozici atomu v plošné buňce udávají bezrozměrná čísla $[x,y]$.

Pozice zvoleného atomu v buňce je: $x=0.5, y=0.75$; translačně symetrické pozice dalších ekvivalentních atomů jsou: $i = x+1, y-1$; $ii = x, y-3$ atd.

Trojrozměrně periodická výstavba ideální krystalové struktury se promítne i do trojrozměrné periodicity fyzikálních vlastností krystalů. Hodnota fyzikálních vlastností $V(\mathbf{r})$, např. elektronové hustoty, se nezmění vzhledem k mřížkové translaci \mathbf{T} :

$$V(\mathbf{r}) = V(\mathbf{r} + \mathbf{T}), \quad (2)$$

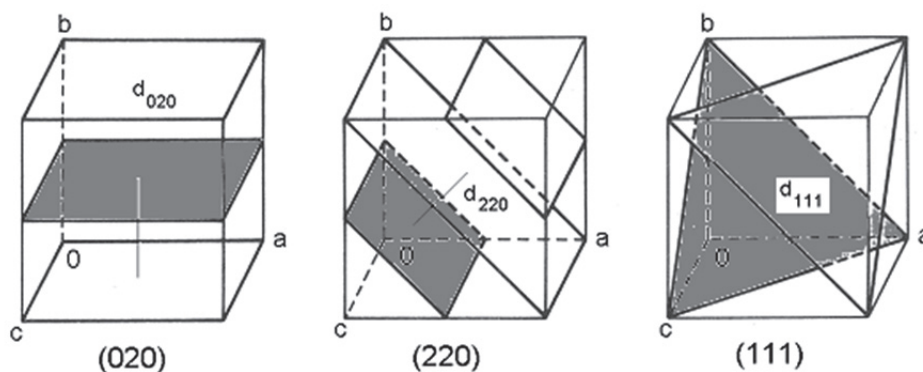
kde \mathbf{r} je polohový vektor (radiusvektor), který spojuje zvolený počátek souřadného systému v buňce s libovolným bodem o souřadnicích x,y,z . Pro translační vektor \mathbf{T} platí:

$$\mathbf{T} = u\mathbf{a} + v\mathbf{b} + w\mathbf{c}, \quad (3)$$

kde u, v, w jsou celá čísla, popisují-li a, b, c primitivní buňku. Pokud je buňka centrovaná, pak u, v, w nabývají racionálních hodnot.

Rovnice (2) a (3) vyjadřují tzv. **mřížkovou definici krystalu**, která nám říká, že např. hodnota elektronové hustoty v krystalu je stejná v bodě x, y, z , jako v bodech $x+1, y+1, z+1$; $x, y+3, z$; $x+2, y, z+5$ atd., tzn. obecně v bodech posunutých vůči x, y, z o celočíselné translace.

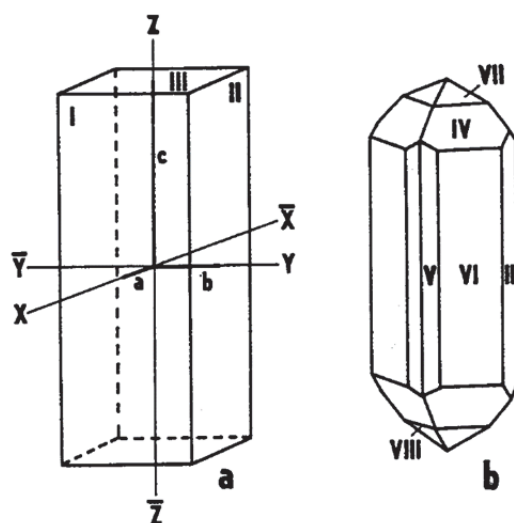
Vzhledem k periodičnosti mřížky lze uzly prokládat i **soubory rovnoběžných rovin** (Obr. 5). Všechny roviny v souboru jsou stejnocenné a celý soubor popisujeme v trojrozměrném případě třemi indexy v kulaté závorce (hkl). Číselné hodnoty těchto indexů jsou počty úseků, které soubor vytíná na hranách vybrané elementární buňky.



Obr. 5: Některé soubory rovin (hkl) v mřížce s primitivní buňkou

To znamená, že hrana a je dělena na h úseků o délce a/h , hrana b na k úseků o délce b/k a hrana c na l úseků o délce c/l . Kolmá vzdálenost mezi kterýmikoliv dvěma sousedními rovinami v souboru je vždy stejná a nazývá se **mezirovinná vzdálenost** (symbol d_{hkl} krátce d). V případě, že je soubor rovin, krátce rovina (hkl), rovnoběžná s jednou nebo dvěma hranami buňky, je odpovídající index roven 0. Např. rovina ($0kl$) je rovnoběžná s hranou a , rovina ($h00$) je rovnoběžná s hranami b, c apod. Dále je zajímavé si uvědomit, že např. u souboru (110) prochází uzly mřížky každá jeho rovina, zatímco u souboru (220) pouze každá jeho druhá rovina, takže platí $d_{110} = 2 \cdot d_{220}$, obecně $d_{hkl} = n \cdot d_{nhknl}$. Konečně, protíná-li soubor rovin některou z os v záporném smyslu (vzhledem ke zvolenému počátku), je příslušný index záporný např. ($-hkl$).

Symboliku (hkl) zpopularizoval v krystalografii již v roce 1839 W. H. Miller, tedy v době, kdy nebylo nic známo o vnitřní struktuře krystalů. Některé roviny (hkl) se projeví i na vnějším tvaru (habitu) krystalu jako krystalové plochy. Např. plocha (123) je rovnoběžná s rovinou (246) a obecně s rovinami ($nh nk nl$), takže v Millerově pojetí jsou indexy (hkl) popisující habitus krystalu vždy nejmenší, vzájemně nesoudělná čísla (Obr. 6).



Obr. 6: Millerovy indexy ploch: I (100), II (010), III (001), IV (111), V (210), VI (110), VII (113), VIII (1,-1,-3)

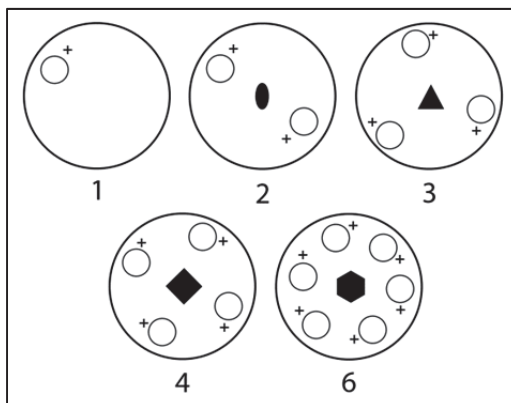
3.2 Symetrie krystalové struktury

Ideální krystalová struktura má jednu důležitou vlastnost, a sice že je **symetrická** (souměrná). Symetrii lze rozlišit na **translační** (pro krystal nutnou) a **rotační** (pro krystal možnou). Pro popis symetrie zavádíme pojmy **prvek a operace symetrie**. Operací symetrie nazýváme každou geometrickou transformaci, kterou se objekt dostane do polohy nerozlišitelné od polohy výchozí, resp. vznikne objekt ekvivalentní. Operace symetrie provádíme s objektem vzhledem ke geometrickým prvkům (přímka, rovina, bod), které nazýváme prvky symetrie. Pro popis symetrie objektů, např. molekul, se obvykle používá symbolika podle Schoenfliese. Symetrii krystalové struktury lze lépe vystihnout značením podle Hermanna a Mauguina, na které se budeme dále odkazovat.

Operace symetrie

Rotace

Při rotaci otáčíme objekt okolo osy, která buď prochází nebo neprochází objektem. Dospějeme buď k poloze objektu nerozlišitelné od polohy výchozí, nebo produkujeme objekt ekvivalentní (symetricky sdružený). Četnost rotační osy udává hodnota n (rotace o $360^\circ/n$), která v důsledku translační periodicity ideální krystalové struktury není libovolná. V krystalech se mohou vyskytovat pouze osy jednočetné (rotace o 0° - tzv. identita), dvojitě (rotace o 180°), trojitě (rotace o 120°), čtyřčetné (rotace o 90°) a šestičetné (rotace o 60°). Pro zobrazení těchto rotací a dalších operací symetrie použijeme tzv. stereografickou projekci, kdy prvky symetrie (viz Tab. 2) a ekvivalentní body (znázorněné kroužky) zakresluje do projekční kružnice (Obr. 7).

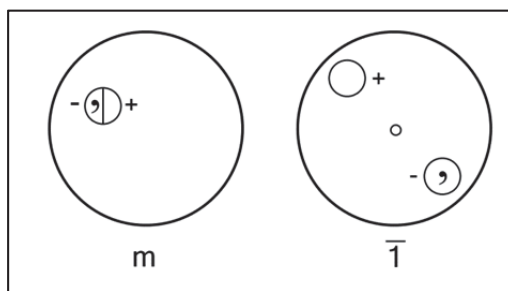


Obr. 7: Rotační osy vyskytující se v krystalech a jejich grafické symboly.
Znaménko + u ekvivalentního bodu (kroužku) značí jeho pozici nad rovinou projekce.

Pětičetná osa a osy vyšší než šestičetná jsou neslučitelné s translační periodicitou ideálních krystalů, nicméně v roce 1984 Shechtman a spol. zjistili, že struktura slitiny $Mn_{14}Al_{86}$ obsahuje pětičetnou osu. Pro vysvětlení této skutečnosti je třeba zavést představu neperiodické mřížky a látky tohoto typu se nazývají **kvazikrystaly**. Výklad této problematiky však přesahuje rámec těchto skript a nemá farmaceutickou aplikaci.

Zrcadlení

Můžeme-li vést objektem rovinu tak, že levá polovina tvoří zrcadlový obraz pravé, má objekt rovinu symetrie (zrcadlo) procházející jeho středem. Jsou-li dva objekty vůči sobě orientovány jako zrcadlové obrazy, potom jsou symetrické podle roviny souměrnosti (Obr. 8 vlevo).



Obr. 8: Operace zrcadlení m a inverze $\bar{1}$
(čárka v kroužku znamená objekt enantiomorfní (viz dále), znaménko – objekt pod rovinou)

Inverze

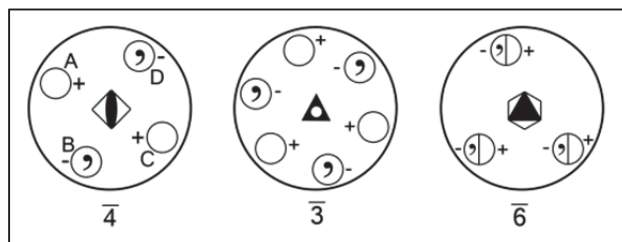
Inverze znamená promítnutí objektu přes střed symetrie. Každému bodu ležícímu na přímce procházející středem objektu, tedy i středem symetrie, musí odpovídat ekvivalentní bod na protilehlé straně přímky. Dva objekty jsou vůči sobě orientovány přes střed symetrie, je-li jeden středově symetrickým obrazem druhého a naopak (Obr. 8 vpravo).

Inverze, podobně jako zrcadlení, převádí pravé objekty v levé a naopak (např. pravou ruku v levou a naopak). Operace symetrie tohoto druhu se nazývají

enantiomorfní. Na druhé straně rotace produkuje vždy z pravých objektů pravé a z levých levé. Taková operace symetrie se nazývá **kongruentní**.

Rotační inverze

Při **rotační inverzi** se kombinuje otáčení s inverzí. Na Obr. 9 je znázorněna operace čtyřčetné rotačně inverzní osy (symbol $\bar{4}$) s bodem. Výchozí bod A otočíme po směru hodinových ručiček o 90° a inverzí získáme ekvivalentní bod B. Stejným způsobem generujeme ekvivalentní body C a D.



Obr. 9: Operace rotačně inverzních os

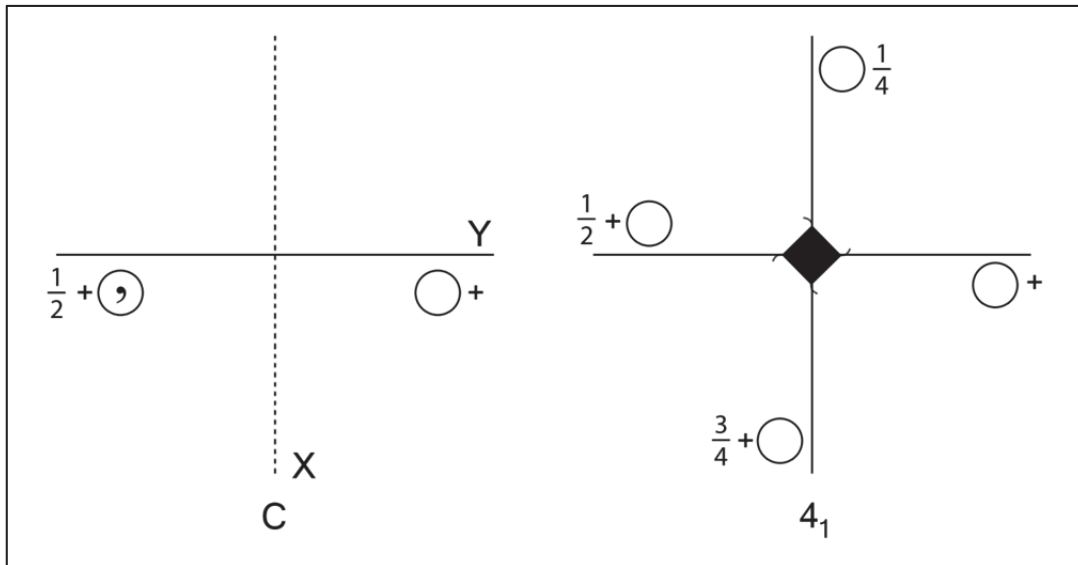
Podobně jako u čistých rotačních os se v krystalech vyskytují pouze osy $\bar{1}$, $\bar{2}$, $\bar{3}$, $\bar{4}$, $\bar{6}$. Operace jednočetné inverzní osy je v podstatě inverze a operace dvojitě inverzní osy je identická s rovinou souměrnosti (zrcadlem), která je na tuto osu kolmá ($\bar{2} \equiv m$). Operace trojčetné inverzní osy je ekvivalentní kombinaci trojčetné osy a inverze ($\bar{3} \equiv 3. \bar{1}$) a operace šestičetné inverzní osy kombinaci trojčetné osy a na ní kolmého zrcadla ($\bar{6} \equiv 3/m$). Pouze operaci čtyřčetné inverzní osy $\bar{4}$ nelze rozložit na žádnou kombinaci.

Skluzná rovina a šroubová osa

Operace na **skluzné rovině**, resp. **šroubové ose** je kombinací zrcadlení, resp. otáčení se zlomkovou (tzv. nemřížkovou) translací t . Jestliže po zrcadlení objektu v rovině vykonáme ještě translaci o určitý zlomek mřížkového parametru rovnoběžně s touto rovinou, provedli jsme operaci na skluzné rovině (Obr. 10 vlevo). Podle směru skluzu a velikosti translační složky t rozlišujeme tři typy skluzných rovin:

- osové (symboly a, b, c)
- úhlopříčné (symbol n)
- diamantové (symbol d)

Při operaci šroubové osy objekt nejprve kolem osy otočíme o rotační úhel ϕ a potom vykonáme translaci o zlomek mřížkového parametru ve směru osy. Výsledný pohyb je šroubový (Obr. 10 vpravo).



Obr. 10: Operace skluzné roviny c , operace šroubové osy 4_1

Obecný symbol pro n -četnou šroubovou osu je n_p . Velikost její translační složky t je dána poměrem p/n , kdy pro $p/n < 1/2$ je šroubová osa pravotočivá, pro $p/n > 1/2$ levotočivá a pro $p/n = 1/2$ neutrální (nezáleží na smyslu otáčení). V krystalech se setkáme pouze s následujícími šroubovými osami:

$$2_1, 3_1, 3_2, 4_1, 4_2, 4_3, 6_1, 6_2, 6_3, 6_4, 6_5.$$

Závěrem této podkapitoly si přehledně shrňme všechny probrané operace symetrie včetně jejich grafického znázornění (Tab. 2) a dvou ukázek (Obr. 11 a Obr. 12).

Tab. 2: Operace symetrie vyskytující se v krystalech (symbolika Hermannova - Mauguinova):

$\bar{1}$				
2		(b)		
3		2 \rightarrow	m ---	
4		2 ₁ \rightarrow	a,b ---	
6			c ---	
2 ₁		4 \rightarrow		
3 ₁ ,3 ₂		$\bar{4}$	n ---	
4 ₁ ,4 ₂ ,4 ₃		$\bar{3}$	d ---	
6 ₁ ,6 ₂ ,6 ₃ ,6 ₄ ,6 ₅				(e)
$\bar{3}$				
$\bar{4}$				
$\bar{6}$				
(a)		(c)	(d)	

(a) grafické symboly os (středu souměrnosti) orientované kolmo na rovinu projekce

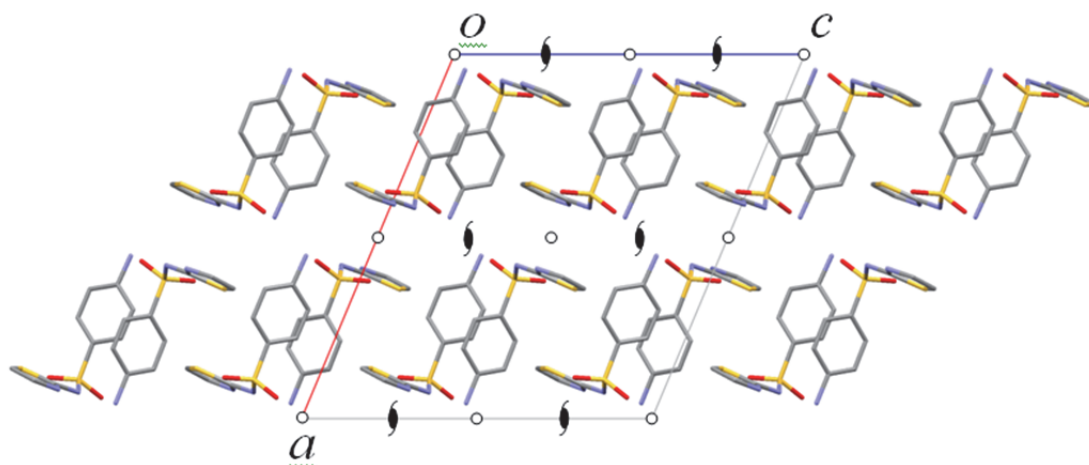
(b) osy rovnoběžné s rovinou projekce

(c) osy rovnoběžné nebo nakloněné k rovině projekce

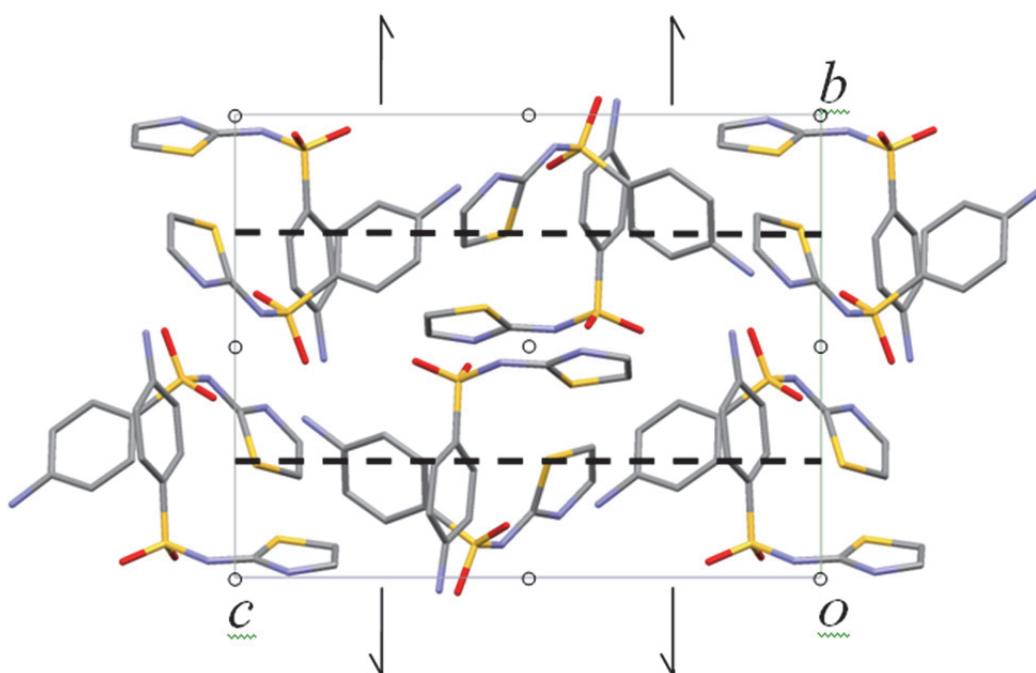
(d) roviny v normále k rovině projekce

(e) roviny orientované rovnoběžně s rovinou projekce

Příklady aplikace operací symetrie:



Obr. 11: Krystalová struktura sulfathiazolu (forma III) s vyznačením elementární buňky, šroubových os 2_1 a středů souměrnosti $\bar{1}$ (prostorová grupa $P2_1/c$)



Obr. 12: Krystalová struktura sulfathiazolu (forma I) s vyznačením elementární buňky, skluzných rovin c , prochází v $\frac{1}{4}$ hrany b , středů souměrnosti $\bar{1}$ a šroubových os 2_1 , které prochází v $\frac{1}{4}$ hrany c (prostorová grupa $P2_1/c$)

3.3 Bravaisovy mřížky

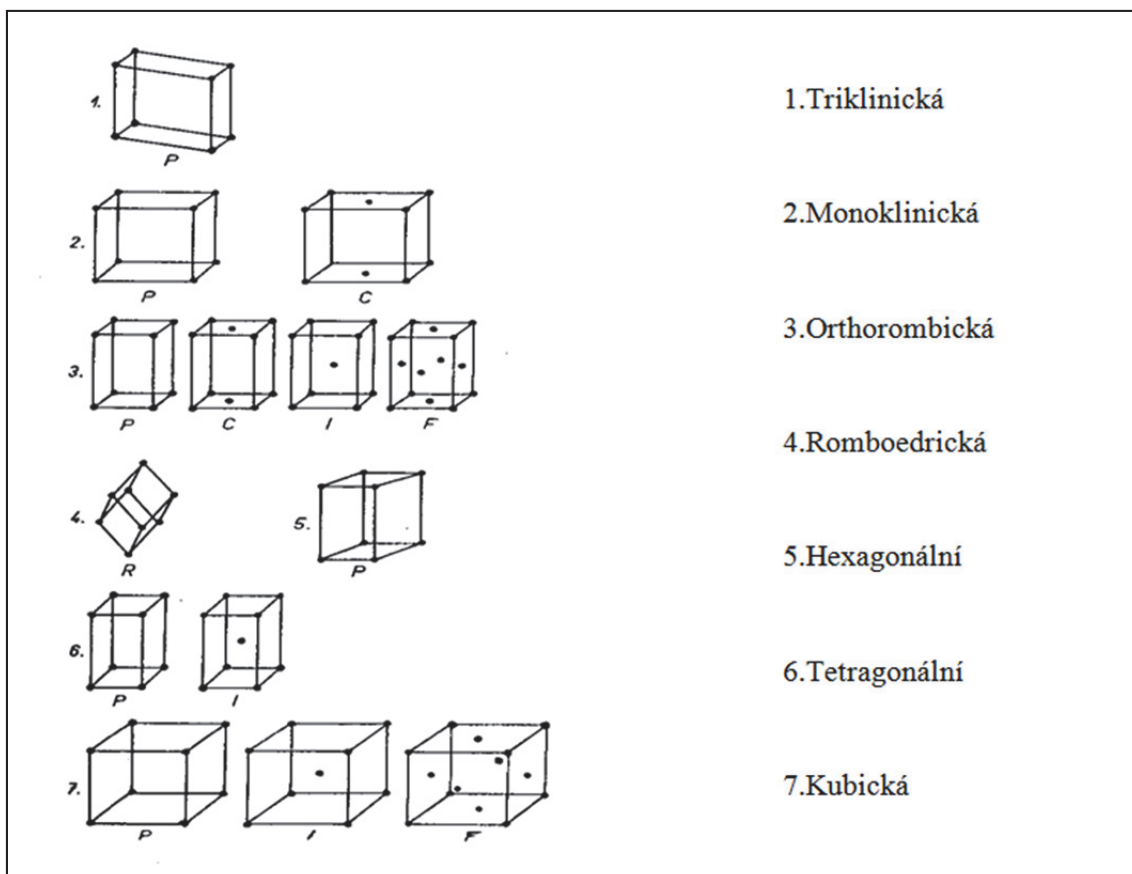
Symetrie, resp. přítomnost určitých prvků symetrie, je klasifikačním kritériem pro rozdělení krystalových tvarů, krystalových struktur a prostorových mřížek do určitých kategorií. Tyto kategorie jsou:

- **14 Bravaisových mřížek**
- **7 krystalografických soustav**
- **32 bodových grup (oddělení souměrnosti)**
- **230 prostorových grup**

Zabývejme se nejprve mřížkami. Vedle neomezeného počtu rozmanitých krystalových struktur existuje pouze omezený počet typů **prostorových mřížek**. Z hlediska systematiky je důležité vědět, kolik těchto typů je, což lze zjistit při respektování symetrie řazením lineárních mřížek vedle sebe (vznik rovinné mřížky) a vrstvením rovinných mřížek nad sebou (vznik prostorové mřížky). Při řazení a vrstvení musí každý mřížkový bod splňovat základní požadavek pro konstrukci mřížky - mít stejné a stejně orientované okolí. V lineární (jednorozměrné) mřížce se každý mřížkový bod opakuje translací podél přímky po periodicitě identity a . Existuje pouze jeden typ lineární mřížky. Řazení lineárních mřížek vedle sebe lze provést pouze pěti neekvivalentními způsoby. Tím dospějeme k pěti typům rovinných mřížek - kosodélníkové, obdélníkové, kosočtvercové, čtvercové a trojúhelníkové.

Vrstvením pěti rovinných mřížek je možno nalézt celkem 14 prostorových mřížek, které se podle autora jejich odvození nazývají **Bravaisovy mřížky** (A. Bravais, 1811-1863). V každé Bravaisově mřížce lze vybrat řadu buněk, z nichž volíme takovou, která vyhovuje smluvené konvenci. Podle této konvence existuje pouze 14 typů Bravaisových buněk (Obr. 13), z nichž každá reprezentuje maximální souměrnost své Bravaisovy mřížky, má pokud možno nejkratší hrany, co největší počet pravých úhlů mezi hranami a co nejmenší objem. Tyto požadavky vždy nespĺňují primitivní buňky, a proto polovinu Bravaisových buněk tvoří buňky primitivní a druhou polovinu buňky centrované. V případě triklinické krystalografické soustavy jsou tyto požadavky nejednoznačné, a proto zde navíc zavádíme podmínky (4). Triklinická Bravaisova buňka, která splňuje podmínky (4) se nazývá **redukovaná buňka**.

$$\begin{aligned} a + b + c &= \min, \\ |\pi/2 - \alpha| + |\pi/2 - \beta| + |\pi/2 - \gamma| &= \max, \\ |\cos \alpha| + |\cos \beta| + |\cos \gamma| &= \max, \\ |\cos \alpha \cos \beta \cos \gamma| &= \max \end{aligned} \quad (4)$$



Obr. 13: Bravaisovy buňky rozdělené do krystalografických soustav

3.4 Krystalografické soustavy

Krystaly, resp. krystalové struktury, a dále pak Bravaisovy mřížky a grupy symetrie dělíme na základě jejich symetrie do **sedmi krystalografických soustav**. Přítomnost určitého prvku souměrnosti, tzv. **minimální symetrie**, je postačující podmínkou pro zařazení krystalové struktury do určité krystalografické soustavy. Teprve z minimální symetrie vyplývají hodnoty mřížkových parametrů, které samy o sobě jako klasifikační kritérium pro určitou krystalografickou soustavu nejsou směrodatné (Tab. 3).

Tab. 3: Krystalografické soustavy

Krystalografická soustava	Minimální symetrie	Hodnoty mřížkových parametrů
Triklinická (trojklonná)	1	$a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$ - libovolné
monoklinická (jednoklonná)*	2 podél b nebo	$\alpha, \gamma = 90^\circ$; a, b, c, β - libovolné
ortorombická (kosočtverečná)	222 podél a, b, c (nebo kolmá mm)	$\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$; a, b, c – libovolné ($a \neq b \neq c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$)

romboedrická (trigonální, klencová)	3 (nebo $\bar{3}$) v tělesové úhlopříčce klence	$a=b=c$; $\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$
tertagonální (čtverečná)	4 ($\bar{4}$) podél c	$a=b$, c -libovolné $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$
hexagonální (šesterečná)	6 ($\bar{6}$) podél c	$a=b$; $\alpha=\beta=90^\circ$; $\gamma=120^\circ$, c – lib. ($a=b \neq c$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$)
Kubická (krychlová)	3,3,3,3 ($\bar{3}$, $\bar{3}$, $\bar{3}$, $\bar{3}$) v tělesových úhlopříčkách krychle	$a=b=c$; $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$

* Vedle uvedeného 1. postavení se vyskytuje i tzv. 2. postavení, kdy 2 je podél c nebo m je kolmé na c . Potom je γ libovolné.

V trojklonné soustavě (sem patří struktury maximálně se středem souměrnosti) mohou parametry $a, b, c, \alpha, \beta, \gamma$ nabývat libovolných, zpravidla však různých hodnot. Přítomnost pouze jedné dvojčetné osy nebo pouze jedné roviny symetrie ve struktuře má za následek, že dva ze tří úhlů musí být v Bravaisově buňce nutně pravé a takovou strukturu zařadíme do soustavy jednoklonné. Konvenčně častější je tzv. 1. postavení, kdy pravé úhly jsou α a γ , dvojčetná osa potom prochází ve směru hrany b nebo rovina souměrnosti je na hranu b kolmá. V této souvislosti je vhodné se zmínit o tom, proč neexistuje soustava dvojklonná, která by vyplňovala zdánlivou mezeru mezi trojklonnou a jednoklonnou soustavou a měla např. mřížkové parametry $a = b = c$, $\alpha = 90^\circ \neq \beta \neq \gamma$. Důvodem je fakt, že operace žádného prvku souměrnosti nemá za následek, že by se v buňce objevil pouze jeden pravý úhel. Jak operace dvojčetné osy, tak operace roviny souměrnosti způsobí kolmost dvou úhlů. Dvojklonná soustava je tedy pouze určitou variantou soustavy trojklonné. Dvě vzájemně kolmé roviny souměrnosti nebo dvě vzájemně kolmé dvojčetné osy v soustavě kosočtverečné vyžadují $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, v klencové soustavě trojčetná osa podmiňuje $a=b=c$; $\alpha=\beta=\gamma \neq 90^\circ$, čtyřčetná osa ve čtverečné soustavě vede k $a=b$; $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, šestičetná osa v šesterečné soustavě způsobí $a=b$; $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ a čtyři trojčetné osy v tělesových úhlopříčkách elementární buňky jsou příčinou, že buňka má tvar krychle $a=b=c$; $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

3.5 Grupy symetrie

Všechny krystalografické objekty obsahují jeden nebo více prvků symetrie. Symetrii objektu popisujeme **grupou operací symetrie**, která je množinou všech operací symetrie, které lze s objektem provést.

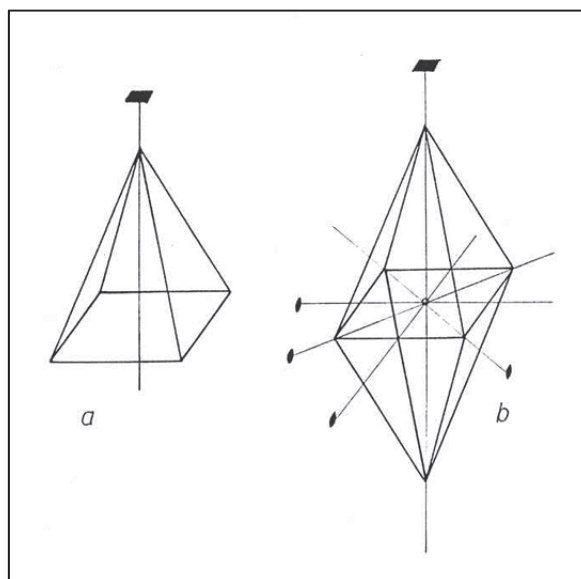
V krystalografii jsou symetrickými objekty vnější tvar krystalu, molekula, buňka, mřížka nebo krystalová struktura. U vnějšího tvaru krystalu, molekuly, buňky a mřížky používáme kategorii bodová grupa, u krystalové struktury kategorii prostorová grupa.

Bodové grupy

Pojem **bodová grupa** znamená, že jde o grupu takových operací symetrie, po jejichž provedení zůstane alespoň jeden bod objektu nepohyblivý. Např. jestliže objekt obsahuje pouze osu rotace, zůstane po provedení operace nepohyblivým prvkem osa. Jestliže objekt obsahuje osu rotace a na ní kolmou rovinu zrcadlení, nepohyblivým bodem je průsečík osy a roviny (bod).

Při popisu bodové symetrie se uplatní operace pouze tzv. 10 **makroskopických prvků souměrnosti**: 1, $\bar{1}$, m , 2, 3, 4, 6, $\bar{3}$, $\bar{4}$, $\bar{6}$. Operace těchto 10 prvků souměrnosti a pouze 22 jejich kombinací představuje celkem 32 krystalografických bodových grup neboli krystalografických oddělení (tříd) souměrnosti. Každý krystal patří na základě svého ideálního tvaru do jednoho oddělení. Omezený počet krystalografických bodových grup je důsledkem toho, že v krystalografii lze provést pouze některé kombinace operací souměrnosti, vzhledem k prostorové vázanosti.

Příklad možné kombinace uvádí Obr. 14. Krystal tvaru tetragonální pyramidy má čtyřčetnou vertikální osu. Jestliže kolmo k této ose, do podstavy pyramidy, umístíme rovinu zrcadlení, (provedeme kombinaci $4mm\ m$), vznikne tetragonální bipyráma ($4/mmm$). Ta má souměrnost, která je dána výsledkem této kombinace - čtyři dvojčetné osy, které nazýváme pasné a střed souměrnosti. Na druhé straně však nelze kombinovat např. v jednom směru šestičetnou osu se čtyřčetnou, čtyřčetnou inverzní osu s trojčetnou apod. V přírodě také neexistují krystalové tvary, které by odpovídaly těmto neproveditelným kombinacím.



Obr. 14: a) tetragonální pyramida, b) tetragonální bipyráma

Tabulka Tab. 4. podává seznam **všech 32 krystalografických bodových grup** rozdělených do 7 krystalografických soustav. Symboly bodových grup v **notaci Hermannově - Mauguinově** jsou jedno až trojčlenné a obsahují prvky souměrnosti ve význačných krystalografických směrech.

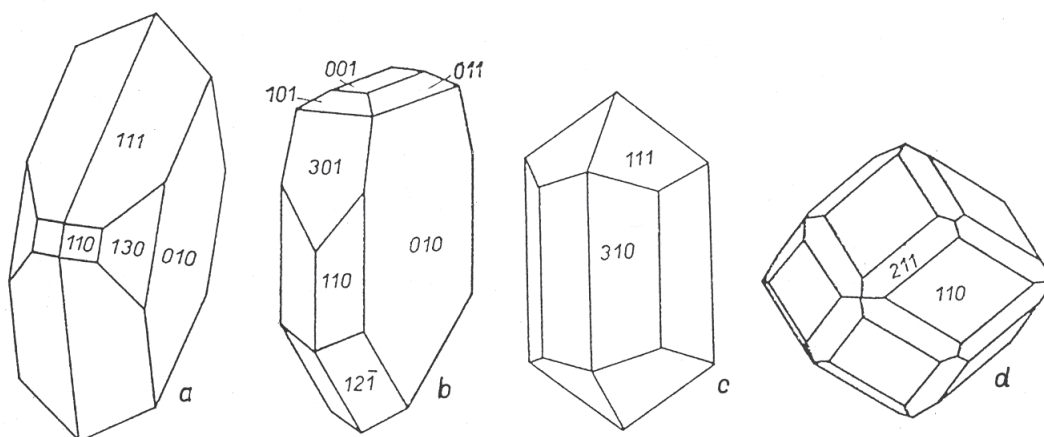
Trojklonná soustava nemá význačný směr. V jednoklonné soustavě je význačným směrem osa Y (1. postavení) nebo Z (2. postavení), v kosočtverečné soustavě jsou to tři

navzájem kolmé osní směry X, Y, Z. V klencové, čtverečné a šesterečné soustavě označuje první člen v symbolu symetrii podél hlavní osy - vertikály (směr osy Z, u klence směr tělesové úhlopříčky), druhý člen označuje symetrii podél vedlejší osy, která je k vertikále kolmá a třetí člen vyznačuje symetrii v pasném meziosním směru, tzn. ve směru, který půlí úhel mezi dvěma vedlejšími osami. Horizontální osy v krystalografickém kříži označujeme jako osy pasné, které protínají pasné rohy a pasné hrany. Dvěma osami prochází tzv. osní rovina. Tři osné roviny dělí krystalografický kříž na osm oktantů, v hexagonální a trigonální soustavě je to dvanáct dodekantů. V krychlové soustavě vyjadřuje první člen symbolu symetrii podél hlavní osy (všechny tři osy X, Y, Z jsou v krychlové soustavě stejnocenné), druhý člen symetrii ve směru tělesové úhlopříčky krychle a třetí směr symetrii ve směru stěnové úhlopříčky krychle.

Příklady:

- Symbol trojklonné bodové grupy $\bar{1}$ znamená, že objekt obsahuje pouze střed symetrie.
- Jednoklonná bodová grupa $2/m$ má ve směru osy Y (nebo Z) dvojčetnou osu a na ní kolmou rovinu symetrie.
- Symbol 222 kosočtverečné bodové grupy značí přítomnost tří navzájem kolmých dvojčetných os ve směrech X, Y, Z.
- Klencová bodová grupa $\bar{3}$ obsahuje trojčetnou inverzní osu v úhlopříčce klence.
- Čtverečná bodová grupa $\bar{4}2m$ má čtyřčetnou inverzní osu ve směru Z, dvojčetnou osu ve směru X a Y a rovinu souměrnosti kolmou na pasný směr meziosní.
- Symbol $6/mmm$ znamená šesterečnou bodovou grupu s šestičetnou osou ve směru Z a na ní kolmou rovinu souměrnosti, další rovinu souměrnosti kolmou na osu X, resp. Y a další rovinu souměrnosti kolmou na pasný meziosní směr.
- Krychlová bodová grupa 23 obsahuje ve směrech os X, Y, Z dvojčetné osy a ve směru tělesové úhlopříčky trojčetnou osu.

Na Obr. 15 jsou uvedeny příklady několika krystalových tvarů zařazených do odpovídajících bodových grup a indexace jejich krystalových ploch.



Obr. 15: Různé krystalové tvary a jejich plochy popsané indexy (hkl) a rozdělení do bodových grup: grupa mmm (a), grupa 222 (b), grupa $4/mmm$ (c), grupa $m\bar{3}m$ (d)

Prostorové grupy

Prostorová grupa vystihuje symetrii trojrozměrného periodického vzoru - krystalové struktury. Na rozdíl od bodové grupy, kde se prvky symetrie protínaly alespoň v jednom bodě, resp. alespoň jeden bod objektu zůstal po provedení všech operací bodové grupy nepohyblivý, jsou prvky souměrnosti prostorové grupy rozloženy v prostoru. Prvky prostorových grup tvoří následujících 26 operací souměrnosti:

$$1, \bar{1}, 2, 3, 4, 6, m, \bar{3}, \bar{4}, \bar{6}, 2_1, 3_1, 3_2, 4_1, 4_2, 4_3, 6_1, 6_2, 6_3, 6_4, 6_5, a, b, c, n, d$$

Kombinacemi těchto operací symetrie spolu s mřížkovými translacemi 14 Bravaisových mřížek lze odvodit pouze **230 prostorových grup**. Odvození prostorových grup, které představuje vrchol krystalové geometrie a symetrie, je spjato se jmény E.S.Fedorova (1890), A.Schoenfliese (1891) a W.Barlowa (1894). Omezený počet 230 prostorových grup však neznamená, že existuje pouze 230 krystalových struktur, nýbrž že každá ze zatím neomezeného počtu krystalových struktur patří na základě své symetrie pouze do jedné z 230 prostorových grup.

Při odvozování prostorových grup lze systematicky postupovat tak, že v bodových grupách postupně nahrazujeme rotační osy šroubovými osami a roviny souměrnosti skluznými rovinami. To znamená, že každá bodová grupa poskytne několik prostorových grup, o nichž říkáme, že jsou s danou bodovou grupou izogonální. V Tab. 4 jsou uvedeny všechny bodové grupy s příklady některých významných izogonálních prostorových grup. Podrobný přehled všech 230 prostorových grup lze nalézt např. na stránce: http://en.wikipedia.org/wiki/Space_group.

Mezinárodní symbol prostorové grupy je nejvýše pětičlenný. První je velké písmeno, které označuje typ Bravaisovy mřížky, a za ním následují jeden až čtyři symboly (případně znaménko / se nepočítá) prvků symetrie ve význačných krystalografických směrech v závislosti na krystalografické soustavě, podobně jako u grup bodových.

V trojklonné soustavě znamená symbol $P1$ necentrosymetrickou (bez středu symetrie) grupu a symbol $P\bar{1}$ centrosymetrickou grupu. V jednoklonné soustavě je udána symetrie podél osy Y , resp. Z . Např. symbol $P2_1/c$ představuje grupu s dvojitou šroubovou osou podél osy Y a na ni kolmou skluznou rovinu c . Symbol kosočtverečné prostorové grupy $Pba2$ znamená, že na osu X je kolmá skluzná rovina b , na osu Y je kolmá skluzná rovina a a ve směru osy Z prochází dvojitá osa. Do klencové soustavy patří grupa $R3c$, která má trojitou osu v tělesové úhlopříčce klence a s ní rovnoběžnou skluznou rovinu c . Symbol $I422$ označuje čtverečnou prostorovou grupu se čtyřčetnou osou podél směru osy Z , dvojitou osou podél osy X a Y a dvojitou osou podél směru stěnové úhlopříčky. Symbol $P63$ patří šesterečné prostorové grupě s šestičetnou šroubovou osou podél osy Z . V krychlové soustavě znamená symbol $F43m$ grupu se čtyřčetnou inverzní osou podél os X , Y a Z , trojitou osou ve směru tělesové úhlopříčky a rovinou souměrnosti kolmou na směr stěnové úhlopříčky.

Tab. 4: Bodové a významné prostorové grupy rozdělené do krystalografických soustav

Krystalografická soustava	Bodové grupy		Významné izogonální prostorové grupy
	Schoenfliesův symbol*	Hermannův-Mauguinův symbol	
Trojklonná	C_1	1	$P1$
	C_i	$\bar{1}$	$P\bar{1}$
Jednoklonná	C_2	2	$P2_1, C2$
	C_5	m	Pm, Pc, Cm
	C_{2h}	$2/m$	$P2/m, P2_1/c$
Kosočtverečná	D_2	222	$P222, I222$
	C_{2v}	$mm2$	$Pba2, Pna2_1, Fdd2$
	D_{2h}	mmm	$Pmmm, Pmna, Ibca$
Klencová	C_3	3	$P3, R3$
	C_{3i}	$\bar{3}$	$P3, R3$
	D_3	32	$R32$
	C_{3v}	$3m$	$R3c$
	D_{3d}	$\bar{3}m$	$P\bar{3}c1$
Čtverečná	C_4	4	$P4, I4_1$
	S_4	$\bar{4}$	$P\bar{4}, I\bar{4}$
	C_{4h}	$4/m$	$P4_2/n, I4_1/a$
	D_4	422	$I422$
	C_{4v}	$4mm$	$P4mm, I4_1cd$
	D_{2d}	$\bar{4}2m$	$P\bar{4}2_1c$
	D_{4h}	$4/mmm$	$P4/nnc, I4_1/acd$
Šesterečná	C_6	6	$P6_3, P6_5$
	C_{3h}	$\bar{6}$	$P\bar{6}$
	C_{6h}	$6/m$	$P6/m$
	D_6	622	$P6_222, P6_422$
	C_{6v}	$6mm$	$P6_3mc$
	D_{3h}	$\bar{6}2m$	$P\bar{6}2c$
	D_{6h}	$6/mmm$	$P6/mmm, P6_3/mmc$
Krychlová	T	23	$I2_13$
	T_h	$m3$	$Pa3$
	O	432	$F4_132, I432$
	T_d	$43m$	$I43m, I43d, F43m$
	O_h	$m3m$	$Fd\bar{3}m, Fm\bar{3}m, Pm\bar{3}m$

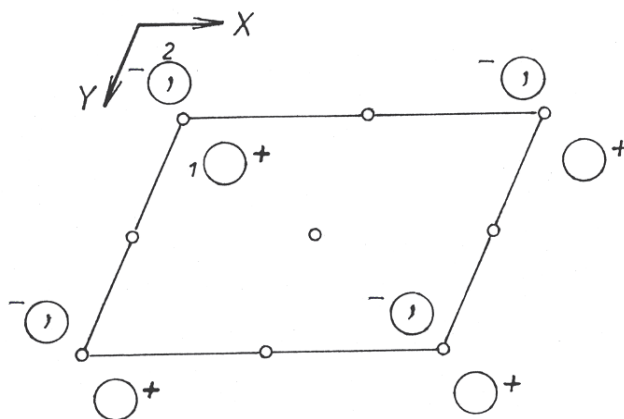
*Tato symbolika bodových grup se užívá ve spektroskopii

Rozložení prvků symetrie dané prostorové grupy v elementární buňce je graficky znázorněno zpravidla v projekci buňky podél krystalografické osy Z (podél hrany *c* elementární buňky). Se zvyšující se symetrií od soustavy trojklonné ke krychlové jsou tyto projekce komplikovanější, takže u prostorových grup kubické soustavy se zobrazuje pouze průmět 1/8 buňky. Operace souměrnosti jsou prováděny s atomem, skupinou atomů, molekulou apod., nebo obecně s bodem, který je znázorněn kroužkem.

Zopakujme si, že znaménko + značí pozici bodu nad rovinou projekce, znaménko – pod rovinou projekce a znaménko \cdot představuje enantiomorfní obraz, tzn. obraz inverzní nebo zrcadlově souměrný. Případný údaj 1/3+, 1/2- apod. znamená výšku bodu nad (pod) rovinou projekce.

Pro ilustraci si uvedeme jednoduchý příklad (Obr. 16):

Prostorová grupa $P\bar{1}$ (její pořadové číslo v International Tables je No.2)



Obr. 16: Prostorová grupa $P\bar{1}$

3.6 Krystalové struktury ve farmacii

Farmaceutické aktivní substance jsou většinou malé organické molekuly, které krystalizací vytváří krystalové struktury. Informaci o určité krystalové struktuře nalezneme buď v primární literatuře (časopisech nebo patentech) nebo v sekundárních zdrojích (krystalografických databázích). Pro farmaceutické aplikace je nejdůležitější databází CSD (the Cambridge Structural Database). Způsob prezentace krystalových dat a krystalové struktury je zhruba ve všech informačních zdrojích stejný. Nejdříve jsou uvedeny základní krystalografické parametry, viz Tab. 5.

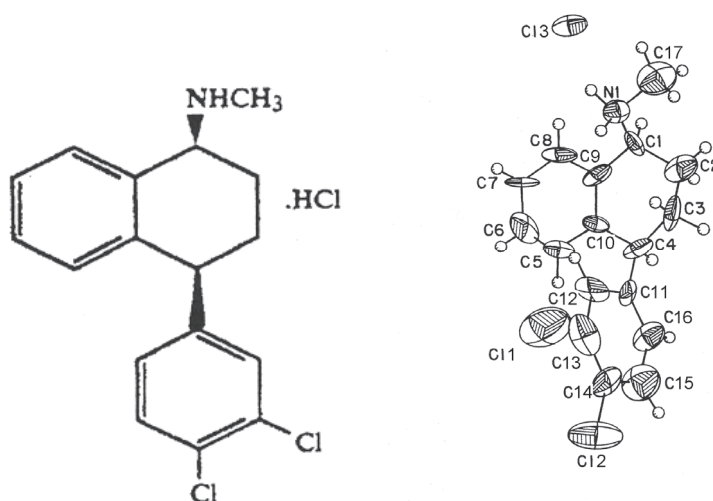
Tab. 5: Základní krystalografické parametry sertralinu hydrochloridu I (antidepresivum)

Cell dimensions (Å)	$a = 8.004(5)^*$
	$b = 8.372(5)$
	$c = 25.21(2)$
Molecules/unit cell	$Z = 4$
Cell volume (Å ³)	$V = 1689.3(6)$
Space group	$P2_12_12_1$
Crystal system	Orthorhombic
Density calculated (g/cm ³)**	$\rho = 1.354$

*Číslo v závorce znamená standardní nejistota

**Teoretická hodnota hustoty se vypočte ze vztahu $\rho = (Z \cdot M_r \cdot 1,66043 \cdot 10^{-27} \text{ kg})/V$, kde M_r je relativní molekulová hmotnost

Potom je zpravidla uveden chemický strukturní vzorec molekuly a její obrázek (Obr. 17), jak byl experimentálně zjištěn z RTG difrakčních metod. Atomy jsou očíslovány a často zobrazeny ve tvaru svých teplotně-vibračních elipsoidů. Následují pozice (frakční souřadnice) atomů v symetricky nezávislé části elementární buňky (Tab. 6), z kterých lze vypočítat libovolné geometrické parametry struktury (meziatomové vzdálenosti, úhly, torzní úhly, roviny proložené skupinami atomů atd.). Pozice všech atomů v buňce jsou tabelovány, takže v případě grupy $P2_12_12_1$, ve které krystaluje sertralin hydrochlorid I, je příslušná čtyřčetná obecná ekvivalentní poloha tato: $x, y, z; 1/2-x, -y, 1/2+z; 1/2+x, 1/2-y, -z; -x, 1/2+y, 1/2-z$.



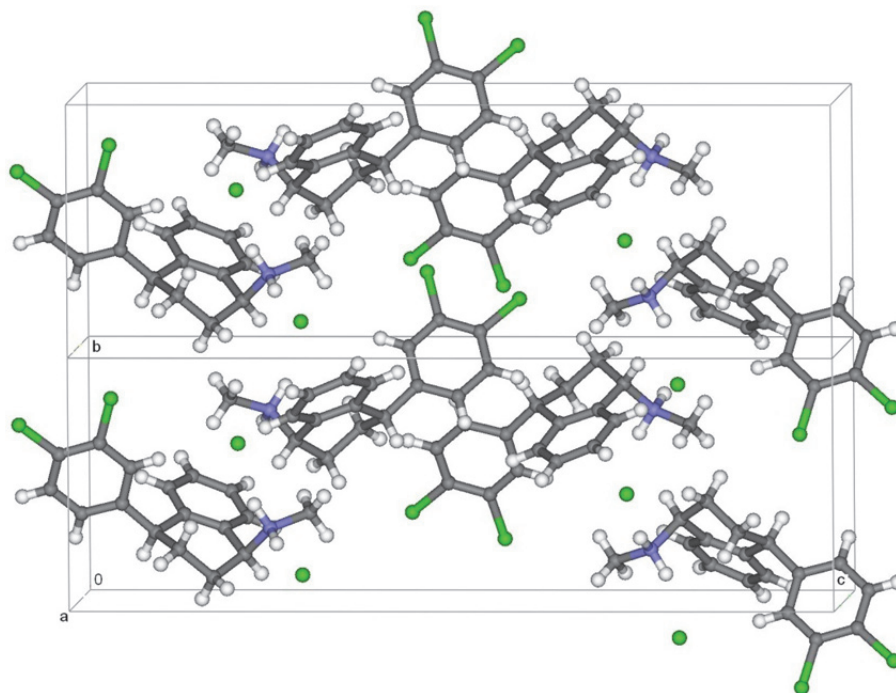
Obr. 17: Molekula sertralinu hydrochloridu.

Vlevo: chemická struktura, vpravo: experimentálně nalezená struktura s očíslovanými atomy ve tvaru teplotně-vibračních elipsoidů. Ignorování iontové povahy soli ve strukturním vzorci je pro farmaceutický průmysl typické

Tab. 6: Pozice atomů ve struktuře sertralinu hydrochloridu (bez atomů vodíku)

	x	y	z
C11	-0,0072(3)	-0,2982(2)	-0,2982(2)
C12	0,0027(3)	-0,1924(2)	1,07790(6)
C13	0,1095(2)	-0,1116(2)	0,79477(6)
N1	0,1999(6)	0,2293(6)	0,7558(2)
C1	0,2963(8)	0,3407(7)	0,7921(2)
C2	0,1718(7)	0,4224(7)	0,8296(2)
C3	0,1111(7)	0,3060(7)	0,8727(2)
C4	0,2589(7)	0,2513(6)	0,9073(2)
C5	0,5259(8)	0,0985(7)	0,8972(2)
C6	0,6759(8)	0,0654(8)	0,8705(3)
C7	0,7062(8)	0,1271(8)	0,8203(2)
C8	0,5839(8)	0,2191(7)	0,7961(2)
C9	0,4303(7)	0,2482(7)	0,8218(2)
C10	0,4068(7)	0,1931(6)	0,1931(6)
C11	0,2020(7)	0,1334(7)	0,9494(2)
C12	0,1349(8)	-0,0148(8)	0,9362(2)
C13	0,0750(8)	-0,9362(2)	0,9749(2)
C14	0,0836(8)	-0,0700(7)	1,0282(2)
C15	0,1546(8)	0,0728(8)	1,0416(2)
C16	0,2159(8)	0,1737(7)	1,0027(2)
C17	0,2924(8)	0,1769(8)	0,7065(2)

Závěrem je připojen i nezbytný obrázek „pakování“ molekul v krystalové struktuře s vyznačením jedné nebo více elementárních buněk (Obr. 18).



Obr. 18: „Pakování“ molekul v krystalové struktuře sertralinu hydrochloridu

Otázky:

Definujte elementární buňku.

Zakreslete polohu atomu resp. libovolného bodu v buňce označenou frakčními souřadnicemi 0,75; 0,5; 1.

Proložte primitivní buňkou rovinu (102).

Popište operace symetrie označené: 1, 4, 6, m , $\bar{3}$, $\bar{4}$, 3_1 , c , n .

4. MOLEKULÁRNÍ KRYSTAL

Už v roce 1926 V. M. Goldschmidt ve formulaci svých krystalochemických zákonů rozlišil krystaly podle jejich stavebních prvků, kterými jsou atomy, ionty nebo skupiny atomů (komplexní ionty, molekuly). Vlastnosti krystalu jsou určovány charakterem stavebních elementů a také způsobem, jakým jsou k sobě v krystalu vázány. Přitom způsob vazby stavebních prvků v krystalu vyplývá z podstaty těchto stavebních jednotek.

Farmaceutické substance jsou v naprosté většině organické sloučeniny, u nichž stavebními prvky jejich krystalů jsou celé molekuly. Typické krystaly organických látek jsou vytvářeny **nekovalentními interakcemi**. Tyto mezimolekulární interakce jsou předmětem zkoumání **supramolekulární chemie**, protože takový **molekulární krystal** představuje supramolekulární útvar (dokonce je podle prof. Dunitze supermolekulou *par excellence*). Pro organické sloučeniny tvořící molekulární krystaly je proto užitečné sledovat tvorbu a strukturu těchto krystalů z pohledu supramolekulární chemie. Na základě poznatků tohoto oboru je tak možné vysvětlit podstatu a příčinu mnoha dějů, s kterými se při krystalizaci organických sloučenin setkáváme. Patří mezi ně například podmínky vzniku krystalů, zvyšování čistoty surového produktu krystalizací a souvislost čistoty látky a teploty tání jejich krystalů, ale i výskyt polymorfismu, jako jevu velmi častého u organických látek. Některé z těchto procesů jsou z technologického hlediska natolik významné, že jsou podrobně rozebrány v kapitolách 5. a 6.

4.1 Vznik molekulárního krystalu

Proces krystalizace může probíhat za různých podmínek a v různých prostředích. Z praktických důvodů jsou nejvýznamnější krystalizace organických sloučenin z roztoků. Roztok představuje vícesložkový systém, protože kromě minimálně jedné rozpuštěné složky figurují v procesu krystalizace molekuly jednoho nebo i více různých rozpouštědel. Pokud roztok není nasycený, jsou v něm dominantní interakce rozpuštěné látky s molekulami rozpouštědla. I za těchto okolností ovšem dochází ke vzniku přechodných **agregátů (shluků)**, ale asociace molekul rozpuštěné složky je rušena interakcemi s molekulami rozpouštědla. Shlukování molekul je založeno na jejich vzájemném rozpoznání („recognition“), které řídí jejich následné přiblížení a vzájemnou orientaci do krystalového uspořádání, při kterém se mohou uplatnit atraktivní mezimolekulární interakce. Vzhledem k dynamickému procesu neustálé tvorby a rozpadu přechodných agregátů jsou v nich preferována taková uspořádání molekul, která agregát významně energeticky stabilizují. V roztoku přesyceném není již takové shlukování molekul účinně rušeno rozpouštědlem a tak může přesáhnout velikost agregátů kritickou mez, kdy uspořádání molekul v agregátu je stabilní a vznikne **krystalizační zárodek (nukleus)**. Další asociace (a růst krystalu) je spontánním dějem. Při něm molekuly přistupující ke krystalizačnímu zárodku jsou organizovány podle jeho

struktury, tudíž zárodek vytváří pro rostoucí krystal **matrici (templát)** a molekuly se v krystalu spontánně pravidelně řadí **samoskladbou** („self-assembly“).

Proces krystalizace je exaktněji probrán v kapitole 6, zde jsou z jeho supramolekulárního popisu odvozeny následující praktické závěry:

- Pro tvorbu molekulárních krystalů je třeba dosáhnout stavu, kdy atraktivní mezimolekulární síly převáží nad kinetickou energií molekul a nad interakcemi s molekulami rozpouštědla. Toho se v praxi dosahuje snižováním teploty roztoku nebo zvyšováním koncentrace roztoku (odpařováním rozpouštědla) nebo snížením solvatačních schopností prostředí (přídavkem „špatného“ = hůře solvatujícího) rozpouštědla.
- S větší mírou přesycenosti roztoku se zmenšuje kritický poloměr krystalizačních zárodků a tím i pravděpodobnost jejich tvorby. Důsledkem je větší počet zárodků v jednotce času a objemu, což je výhodné pro rychlost krystalizace. Naopak při malé míře přesycenosti je produkováno jen málo zárodků, které jen pomalu narůstají, což má význam při pěstování monokrystalů (například pro RTG strukturní analýzu).
- Supramolekulární rozpoznání molekul je podstatou čistícího efektu krystalizace. V procesu samoskladby do pravidelné struktury krystalu lépe zapadají „vlastní“ molekuly než molekuly nečistot. Ty se v procesu krystalizace hromadí v matečném louhu. Při zvýšené koncentraci příměsí však dochází i k jejich zabudování do krystalu. Nečistoty jsou strukturně více či méně odlišné, tím se omezeně podílejí na stabilizujících interakcích, čehož makroskopickým důsledkem je snížená teplota tání krystalů nečisté látky.
- U obecné organické sloučeniny musíme uvažovat možnost různých typů mezimolekulárních interakcí. Způsob uspořádání jednotlivých molekul v krystalu je výsledkem jejich souhrnného působení, přitom každý typ prostorového uspořádání může být výhodný pro jiný typ mezimolekulárních interakcí. Tím je možno si představit (i výpočetně modelovat) řadu v energetické výhodnosti málo odlišných krystalových uspořádání. O tom, který typ struktury vznikne v krystalizačním zárodku a v důsledku pak v celém krystalu, tak rozhodují i velmi subtilní a někdy špatně kontrolovatelné faktory. Proto u látek tvořících molekulární krystaly je velmi rozšířený jev polymorfismu, kdy molekuly jediné substance mohou vytvářet různé krystaly, lišící se uspořádáním molekul nebo zabudováním molekul rozpouštědla do krystalové struktury.
- Tvorbu žádaného typu krystalů lze dosáhnout „očkováním“, tj. vnesením externích krystalů do přesyceného roztoku, kde působí jako krystalizační zárodky „správné“ struktury, která se v tak vyvolané spontánní krystalizaci přenesou na celý krystalický produkt.

4.2 Typy vazeb v molekulárních krystalech

Kovalentní vazby

Kovalentní vazby, podle definice molekulárního krystalu, vytvářejí výhradně strukturu molekulárních stavebních jednotek a nepodílí se (příp. jen částečně) na mezimolekulárních interakcích. Kovalentní vazby patří k nejsilnějším interakcím (s energií ve stovkách kJ/mol). Mají vysokou směrovost. Změny běžných vazebných délek a valenčních úhlů jsou energeticky značně náročné. Proto až na výjimky nejsou pozorovány v těchto parametrech významnější odchylky. Zmíněné výjimky se nalézají zejména ve funkčních skupinách vytvářejících silné dipóly, které se uplatní ve významných nevazebných interakcích, například ve vodíkových vazbách. Vysoká energetická náročnost už neplatí u konformačně flexibilních molekul pro změny torzních úhlů. Bývá proto časté, že takové molekuly mají v krystalu tvar odlišný od struktury zjištěné nebo vypočtené pro izolovanou molekulu. Je i možné, že v krystalu existují chemicky identické molekuly v různých konformacích, tyto molekuly jsou ovšem z hlediska definice struktury a symetrie příslušného krystalu různé a nazývají se proto symetricky nezávislé molekuly.

Zvláštní zmínku zasluhují koordinační vazby iontů kovů s molekulárními ligandy. Ty mají charakter vazeb kovalentních, proto struktury, v nichž jsou organické molekuly propojeny tímto typem koordinačních vazeb, se označují jako koordinační polymery, pro něž se často používá zkratka „MOF“ z anglického termínu „metal-organic framework“.

Iontové vazby

Iontová vazba je charakteristická především pro krystaly anorganických solí. Interakce kation-anion se rovněž vyskytují mezi organickými molekulami, obsahujícími funkční skupiny bazického a kyselého charakteru, pokud jsou tyto skupiny v krystalu ionizovány. To je častý případ právě u farmaceutických substancí. Síla interakce kation-anion dosahuje až hodnot běžných pro kovalentní vazby (stovky kJ/mol). Tyto interakce jsou proto u ionizovaných molekul podstatné pro formování krystalového uspořádání. Také krystalová struktura ionizované formy organické sloučeniny se bude zásadně odlišovat od struktury krystalu tvořeného molekulami neionizovanými. Organické sloučeniny vytvářejí ionizační kationty či anionty složitých struktur, které samy o sobě mají specifické prostorové nároky a vytvářejí další typy interakcí. Coulombické síly iontů mají sférické (nesměrové) působení. Síla tohoto působení však ve srovnání s jinými typy mezimolekulárních interakcí nejmírněji klesá (s druhou mocninou) se vzdáleností iontů. Tato „měkkost“ umožňuje respektovat specifické prostorové požadavky dalších interakcí strukturně složitých iontů za předpokladu, že tak nedojde k repulzím stejně nabitých center. Možnost energeticky přijatelného většího oddálení opačně nabitých molekulárních struktur může umožňovat uspořádání, ve kterém je takový kation symetricky obklopen anionty a naopak, tak jak tomu je v iontových krystalech anorganických solí. Vlastnosti krystalů ionizovaných forem organických

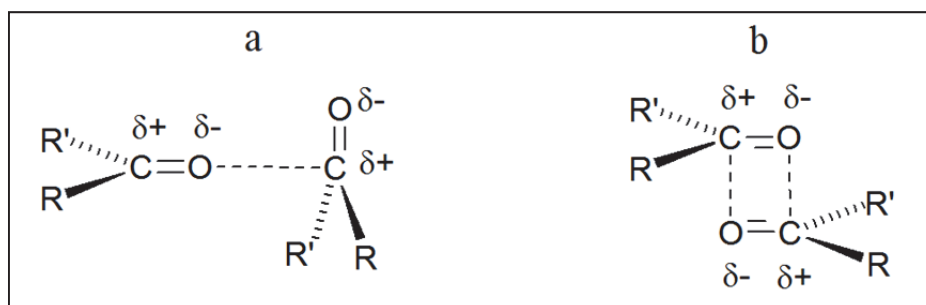
látek závisí na struktuře a vlastnostech zvoleného protiontu, jejich vzájemném poměru velikostí, vytváření různých typů vodíkových vazeb, hustotě uspořádání v pevném stavu a dalších faktorech ovlivňujících kinetiku rozpouštění, což se u farmaceutických substancí často využívá.

Interakce ion – dipól

Tyto interakce s elektrostatickou podstatou mají charakter podobný jako interakce kation – anion, jejich síla bývá nižší, jak odpovídá jen parciálnímu náboji dipólů. K těmto interakcím patří případy koordinace ligandů a kovového iontu, při nichž nedochází ke společnému sdílení elektronového páru ligandu. Tento stav ilustrují například ionty Na^+ solvatované molekulami vody nebo komplexy iontů alkalických kovů s crown-ethery. Takto charakterizované nekovalentní interakce s převážně elektrostatickou podstatou se liší od případů, kdy dochází ke sdílení elektronového páru dipólu s iontem na základě překryvu s jeho volným *d*-orbitalem za vzniku koordinační vazby.

Interakce dipól – dipól

Pro organické molekulové krystaly jsou tyto interakce (z energetického pohledu středně silné, řádově v desítkách kJ/mol) velmi charakteristické, protože vlivem heteroatomů začleněných ve funkčních skupinách dochází k polarizaci k nim směřujících kovalentních vazeb. Uvažuje se většinou vzájemné pouze působení dipólů, i když polarizace může vést ke kvadrupólům či multipólům. Podstatou je (převážně) opět elektrostatické působení opačně polarizovaných částí molekul či strukturních fragmentů. Příklady dvou typů dipól – dipólové interakce molekul obecného ketonu jsou ukázány na Obr. 19.



Obr. 19: Příklady interakce dipól - dipól

Interakce tohoto druhu jsou v krystalech organických látek velmi důležité, protože to bývají u organických molekul často interakce nejsilnější (pro dvojnásobnou interakci jako např. na Obr. 19b cca 20 kJ/mol). Pro sílu těchto interakcí je důležité přiblížení dipólů, protože síla interakce dipól – dipól klesá se vzdáleností parciálních nábojů mnohem strměji, než je tomu u interakce iontů.

Častý typ této interakce vzniká mezi skupinou D–H (D – donor H), v níž vodíkový atom má parciální kladný náboj, a elektronegatивnějším atomem A (akceptor H). Mezi vodíkovým atomem a atomem A se vytváří nekovalentní vazba, která se pro

charakteristickou účasť vodíkového atómu nazýva vodíkovou väzbou. Vodíkové väzby majú z interakcií dipól – dipól najväčší význam, a preto je jim venovaná samostatná podkapitola nižšie.

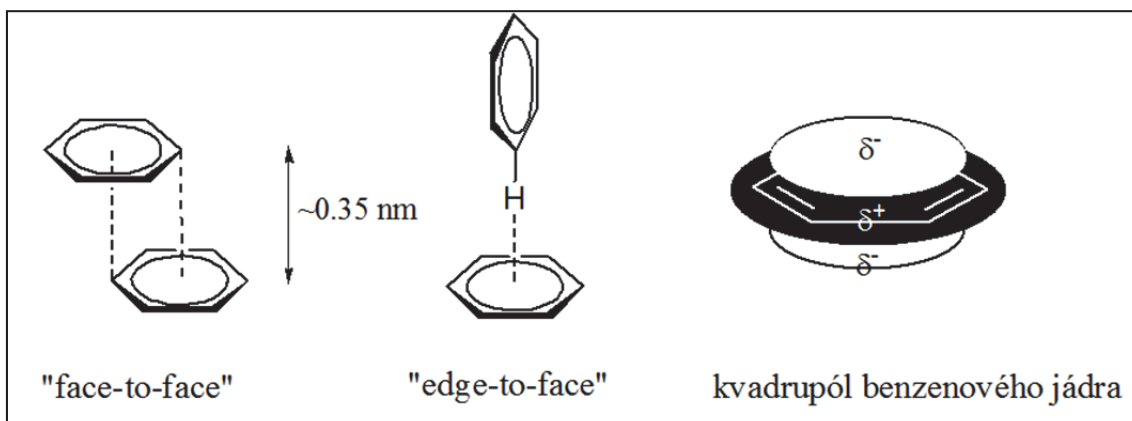
Kation – π -interakcie

Stejně jako v prípade interakcií ion – dipól je nutno vyčleniť prípady, kedy ion interaguje s π -systémom elektrónov prostredníctvom svojich neúplne zaplnených d -orbitalů za vzniku väzby kovalentního charakteru, jak je tomu napríklad v molekule ferrocenu. Do kation – π nezáväzných interakcií tak patrí kontakty iontů alkalických kovů s C=C väzbami alebo aromáty, prinášajúci energii v jednotkách až desítkách kJ/mol. Obdobné interakcie nekovových iontů, napríklad amoniových, patrí už do kategórie π vodíkových väzieb ^+X-H .

π – π Interakcie

Tyto interakcie sa vyskytujú medzi aromatickými jadrými. Jejich energia je posilena v prípade, že elektrónovo deficitní π -systém interaguje sa systémom elektrónovo bohatým, a i tak zriedka presahuje 30 kJ/mol. Lze je očakávať v krystaloch všetkých molekúl, obsahujúcich aromatický systém, u štruktúrne složitějších molekúl je však treba posúdiť jejich vliv vedle jiných možných typů interakcií.

π - π interakcie sa prejavujú dvoma spôsobmi orientácie aromatických jadier, označovanými anglickými termínmi „face-to-face“ a „edge-to-face“. U orientácie „face-to-face“ jsou jadra koplánární (ale „fázově“ posunutá) a u „edge-to-face“ orientácie směřuje okrajová C-H jednoho jadra ke středu kolmo postaveného jadra druhého (Obr. 20). Koplánarita i kolmost může být i jen přibližně dodržena. Obě tyto orientácie odpovídají tvaru benzenového kvadrupólu, kde plochy záporného náboje jsou lokalizovány nad a pod úrovní kruhu, naopak zóny kladného náboje přesahují oblast kruhu v jeho rovině.



Obr. 20: Příklady π - π interakcie

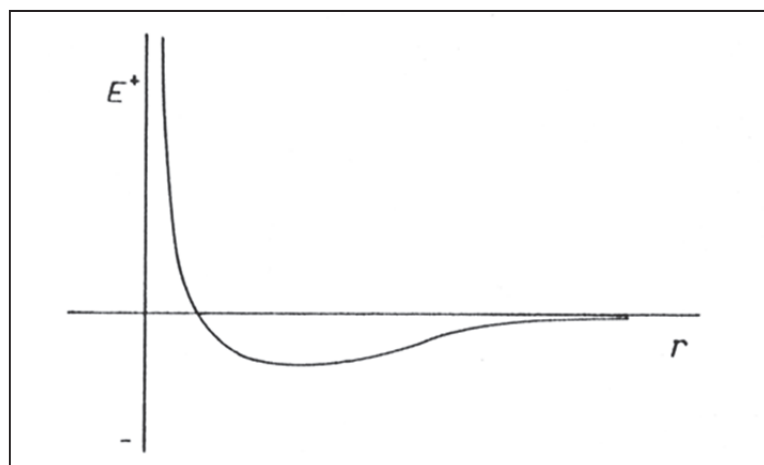
Van der Waalsovy síly

Van der Waalsovy síly jsou vedle vodíkové vazby nejdůležitějším typem interakcí v molekulárních krystalech. Původně byly tyto síly zavedeny van der Waalsem (1873) pro korekci stavové rovnice ideálního plynu, aby bylo vysvětleno chování reálných plynů, především možnost jejich zkapalnění. Pod termín van der Waalsovy síly se dnes zahrnují atraktivní síly působící ve všech skupenstvích jak mezi multipóly (zjednodušeně dipóly) a indukovanými dipóly, tak síly založené na slabém elektrostatickém působení momentálních (okamžitých) dipólů, které vznikají z fluktuační elektronů v obalech nevázaných atomů nacházejících se v těsném kontaktu. Pro malou směrovost a nízkou energii (v jednotkách kJ/mol) nelze na základě pouze van der Waalsových sil odhadovat vznik určitého krystalového uspořádání. Van der Waalsovy síly se často překrývají s ostatními (silnějšími) interakcemi, proto jejich energetický přínos lze jednotlivě obtížně vyhodnocovat. Přesto jsou to interakce pro formování krystalové struktury velice důležité, především že působí na dlouhou vzdálenost (až do 100 Å). I při existenci silnějších interakcí připadá na sumu van der Waalsových sil podstatná část stabilizační energie krystalu.

Síla van der Waalsových interakcí silně závisí na míře přiblížení příslušných atomů, resp. molekul. Často se pro jejich aproximaci používá vztah Lennardův-Jonesův:

$$E = -A \cdot r^{-6} + B \cdot r^{-12}, \quad (5)$$

kde první člen vyjadřuje atraktivní (přitažlivou) a druhý člen repulzní (odpudivou) složku. Se zmenšující se vzdáleností r (viz Obr. 21) nejprve narůstá absolutní hodnota prvního členu, tím hodnota E klesá až se dosáhne maximální stabilizace, při hodnotě r limitující k nule prudce roste kladný repulzní člen, energie E stoupá, až dosáhne kladných hodnot, kdy je již takový extrémně těsný kontakt destabilizující.



Obr. 21: Průběh Lenardova - Jonesova potenciálu. Minimum křivky je velmi mělké, což odpovídá slabé přitažlivé interakci van der Waalsových sil

Mechanismus přitahování van der Waalsovými silami je trojí: **orientační, indukční a disperzní** a sice $E = E_K + E_D + E_L$ (viz Tab. 7)

- 1) Jestliže molekulární krystal obsahuje pouze polární molekuly (např. CO₂ v suchém ledu), budou se opačně nabitě konce molekulárních dipólů orientovat tak, aby byly co nejbližší u sebe. Proti tomuto orientačnímu efektu působí tepelné molekulární vibrace. To znamená, že při vysokých teplotách orientační efekt zaniká. Keesom (1921) odvodil, že průměrná energie interakce mezi dvěma molekulami, které mají permanentní dipólové momenty μ a μ' a jsou od sebe vzdáleny r je rovna:

$$E_K = -\frac{2\mu^2\mu'^2}{3r^6kT}, \quad (6)$$

kde k je Boltzmanova konstanta a T teplota.

- 2) Při indukčním jevu se uplatní interakce mezi permanentním molekulárním dipólem a dipólem, který je jím indukován v sousední molekule. Permanentní dipól μ vytváří okolo sebe elektrické pole, které indukuje dipólový moment v sousední molekule. Pokud je indukovaná molekula také polární, pak se indukovaný dipólový moment sčítá s momentem permanentním. Míru ochoty vytvářet indukovaný dipól vyjadřuje tzv. polarizovatelnost α . Příslušnou rovnici pro energii této soustavy odvodil Debye (1920):

$$E_D = -\frac{2\alpha\mu^2}{r^6}, \quad (7)$$

- 3) Nejvýznamnější podíl van der Waalsových sil představuje disperzní jev, který vysvětlil London (1930). Pouze na základě tohoto jevu lze vysvětlit interakci mezi molekulami vzácných plynů a jejich pozorovanou kondenzaci. Podstata disperzní interakce vyplývá ze základního principu neustálého pohybu elektronů vůči atomovým jádrům, kdy nikdy nekoincidují těžiště kladného a záporného náboje v atomu. Toto nesférické rozložení nábojové hustoty vyvolává v každém atomu časově omezený dipól. Tento okamžitý dipól indukuje v sousedních atomech indukované dipóly, které jsou s ním ve fázi, takže výsledkem je přitažlivá interakce v systému:

$$E_L = -\frac{3I\alpha^2}{4r^6}, \quad (8)$$

kde I je ionizační potenciál atomu.

Rozpor mezi faktem, že disperzní síly jsou jednotlivě slabé, a tvrzením, že se významně podílejí na celkové stabilizační energii krystalu, vyžaduje podrobnější vysvětlení. To vychází ze skutečnosti, že na rozdíl od jiných mezimolekulárních interakcí (jako jsou například vodíkové vazby), které jsou uskutečňovány specifickými funkčními skupinami, jsou disperzní síly inherentně spojeny s celou molekulární strukturou, což vyplývá z jejich podstaty. Vzájemné přiblížení jakýchkoli částí sousedících molekul vyvolá u atomů v blízkém kontaktu malé změny v pravidelné

fluktuaaci jejich elektronů a v důsledku toho vznik slabých indukovaných dipólů. Jednotlivě je jejich interakce slabá, ale protože tyto indukované dipóly vznikají na celé periférii všech molekul v molekulárním krystalu, je jejich kumulované působení energeticky velmi významné.

Často se nepřesně soudí, že van der Waalsova interakce je nejsilnější při přiblížení na vzdálenost rovnou součtu van der Waalsových poloměrů (viz Tab. 8) kontaktních atomů. Energetické optimum takových kontaktů nevázaných atomů však odpovídá vzdálenosti o několik desetin Å delší, naopak součet van der Waalsových poloměrů udává mez přiblížení, za níž jsou interakce výrazně repulzní. Uvažování přesné optimální vzdálenosti však není pro hodnocení projevu disperzních sil důležité, protože se běžně uvažuje stabilizační příspěvek kontaktů až do vzdálenosti dvou- i třínásobku součtu van der Waalsových poloměrů. Nicméně však platí, že těsnější kontakty přinášejí větší stabilizační energii, s čímž souvisí mnohokrát experimentálně ověřená tendence směřující k nejtěsnějšímu krystalovému uspořádání.

Tab. 7: Relativní podíl (v %) efektů orientačního, indukčního a disperzního na van der Waalově přitažlivé interakci

Krystal	Efekt orientační	Efekt indukční	Efekt disperzní
He	0	0	100
Ar	0	0	100
Xe	0	0	100
CO	0,005	0,08	99,91
HCl	14,4	4,2	81,4
NH ₃	44,9	5,3	49,8
H ₂ O (led)	76,9	4	19,1

Tab. 8: Běžně užívané hodnoty van der Waalsových poloměrů r_w (Bondi 1964) pro atomy běžné v organických sloučeninách

Atom	H	C	O	N	S	Si	P	F	Cl	Br	I
r_w (Å)	1,20	1,70	1,52	1,55	1,80	2,10	1,80	1,47	1,75	1,95	2,15

$$1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$$

Vodíkové vazby

Daleko nejrozšířenějším typem a typickým příkladem interakcí dipól – dipól jsou vodíkové vazby. Vodíkové vazby se také hojně vyskytují v krystalech farmaceutických substancí.

Pro vodíkovou vazbu je obtížné uvést definici, která by vystihovala její podstatu ve všech podobách. Snad nejjednodušší je vyjít z popisu vodíkové vazby $D-H\cdots A$ jako interakce proton donorového centra $D-H$, obsahujícího kovalentně vázaný vodíkový atom, s centrem akceptorovým A . Při ní dochází k redistribuci elektronů, která se u klasické vodíkové vazby projeví prodloužením kovalentní vazby $D-H$ a zkrácením vzdálenosti $H\cdots A$ na hodnotu menší, než odpovídá součtu van der Waalsových poloměrů H a A . Původně byly vodíkové vazby popisovány v případech, kdy atomy D a A jsou typicky elektronegativní atomy, nejčastěji N a O . V poslední době jsou častěji charakterizovány vodíkové vazby v případech, kdy jako donory fungují i $C-H$ vazby a jako akceptory i π -elektronové systémy. Tab. 9. udává některé příklady donorových a akceptorových struktur.

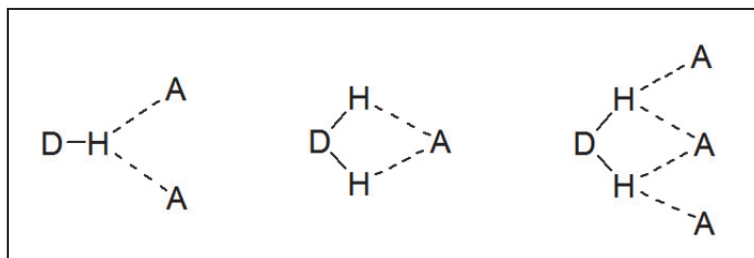
Tab. 9: Příklady donorových a akceptorových center vodíkových vazeb

Donorové skupiny D–H	O–H, N–H, P–H, S–H, F–H, Cl–H, Br–H, I–H, C–H
Akceptorová centra A	O, N, P, S, F, Cl, Br, I, C=C, C≡C, aromáty

Vodíková vazba v sobě zahrnuje podíl elektrostatický, příspěvek „charge-transfer“ komplexu (komplexu přenosu náboje) a účinek disperzních sil. Elektrostatický příspěvek, vznikající z coulombické interakce dipólů a multipólů, je energeticky nejvýznamnější a roste se stoupající elektronegativitou atomů D a A . Celkově je však energie i silných vodíkových vazeb (asi 50-100 kJ/mol) nižší ve srovnání s vazbami kovalentními. Pouze v případech, kdy akceptorové centrum nese záporný náboj, se síla vodíkové vazby blíží energii vazeb kovalentních. Přenos náboje spojený s vodíkovou vazbou je na úrovni maximálně asi 1% jednotkového náboje elektronu. Tento slabý přenos vzniká interakcí nevazebného orbitalu volného elektronového páru nebo π -elektronů akceptorového centra A s antivazebným orbitalem $D-H$ vazby. Překryv těchto orbitalů je velmi malý, charakter a geometrie zúčastněných orbitalů se tím příliš nezmění.

Směrovost vodíkové vazby je tak dána především anizotropním charakterem elektrostatické interakce dipól – dipól. Tato směrovost je mnohem méně vyhraněná, než je tomu u kovalentních vazeb. U většiny silných vodíkových vazeb se úhel $D-H-A$ blíží lineárnímu uspořádání, tj. hodnotě 180° , u středně silných vodíkových vazeb lze pozorovat odchylku až 40° , u slabých vazeb může být odchylka i větší. Statistickou analýzou směrovosti vodíkových vazeb v krystalech organických látek provedenou z dat Cambridgeské strukturální databáze byly určeny průměrné hodnoty úhlů 167° pro vazbu $O-H\cdots O$ a 161° pro vazbu $N-H\cdots O$.

Směrovost vodíkové vazby je dále komplikována v případech, kdy vazba od vodíkového atomu může současně směřovat k dvěma či třem akceptorovým centrům nebo obráceně (a méně často) jedno akceptorové centrum váže více vodíkových atomů. Tyto větvené vodíkové vazby (Obr. 22) se anglicky nazývají “furcated“, (rozvětvené) podle počtu větvení např. “bifurcated“.



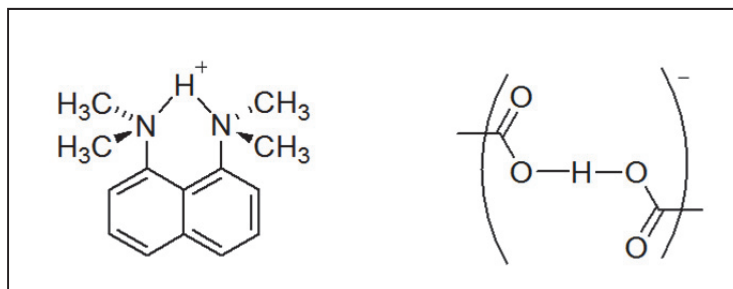
Obr. 22: Rozvětvené H-vazby

Jeden z projevů vodíkové vazby, že vzdálenost $H\cdots A$ je kratší než součet van der Waalsových poloměrů H a A (viz Tab. 9), se pravidelně vyskytuje až od středně silných vodíkových vazeb (viz Tab. 10). Lze nalézt určitý korelační vztah mezi vzdáleností $H\cdots A$, respektive $D\cdots A$, a silou vodíkové vazby.

Tab. 10: Parametry vodíkových vazeb $D-H\cdots A$

Typ vodíkové vazby	silné	střední	slabé
kovalentní charakter	částečný	slabý	žádný
energie vazby (kJ/mol)	60-120	16-60	< 16
vzdálenost $H\cdots A$ (Å)	1,2-1,5	1,5-2,2	2,2-3,2
vzdálenost $D\cdots A$ (Å)	2,2-2,5	2,5-3,2	3,2-4,0
úhel $D-H-A$ (°)	175-180	140-180	90-150

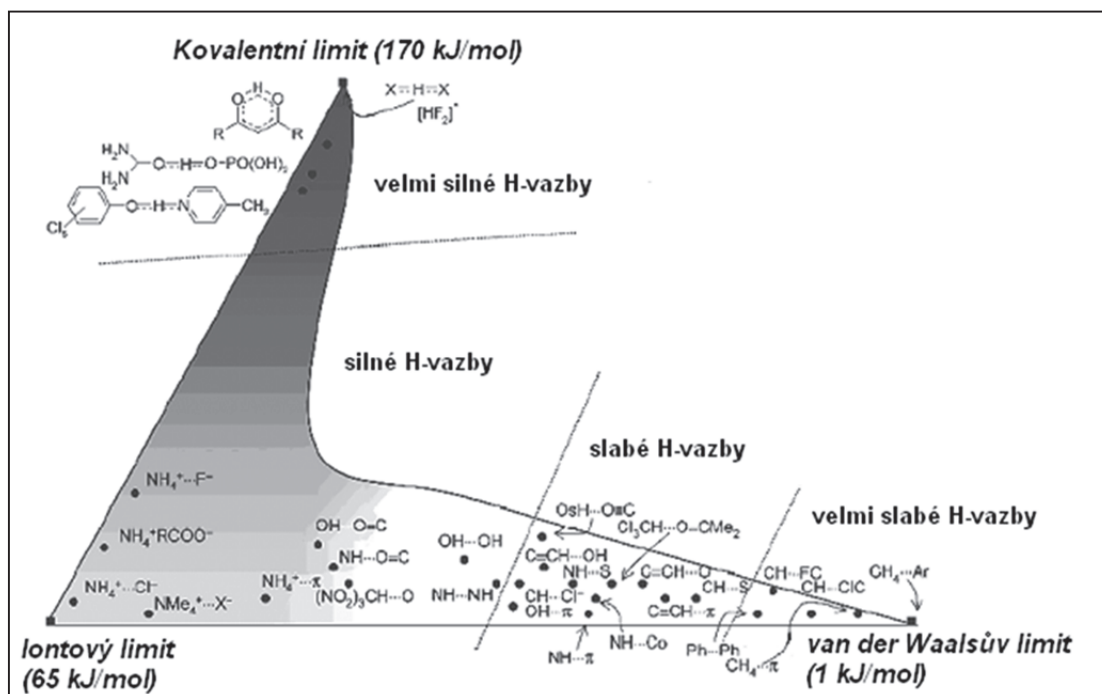
U silných vodíkových vazeb dochází pravidelně k prodlužování kovalentní vazby $D-H$, což při současném zkracování délky vodíkové vazby $H\cdots A$ může vést až ke stavu, kdy obě tyto délky se k sobě přiblíží natolik, že nelze jednoznačně rozhodnout, ke kterému z atomů D a A je vodíkový atom přednostně vázán. Někdy se krystalograficky dají odlišit dvě alternativní polohy vodíkového atomu, často se dá nalézt pouze jeho střední poloha. Vodíkové vazby tohoto charakteru se označují zkratkou LBHB („low barrier hydrogen bond“). Příkladem může být vazba $F-H\cdots F$ ve fluorovodíku, ale také vodíkové vazby v tzv. „protonových houbách“ (Obr. 23 vlevo) nebo i mezi ionizovanými a neionizovanými karboxylovými skupinami (Obr. 23 vpravo).



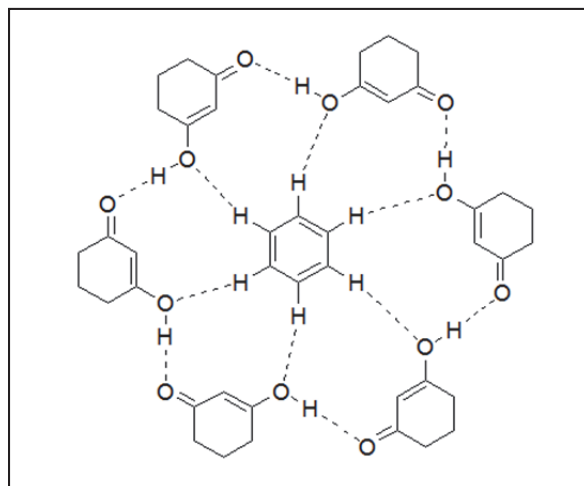
Obr. 23: H-vazby typu „low barrier hydrogen bond“

Různost jednotlivých typů vodíkových vazeb lze názorně graficky vyjádřit body v širokém poli mezi třemi extrémy podle Obr. 24. Jeden z vrcholů trojúhelníku odpovídá zcela kovalentní vazbě, druhému vrcholu přísluší čistě elektrostatický charakter vazby a třetí extrém je typ pouze van der Waalsovské vazby. Intenzita podbarvení odpovídá rozložení síly vazeb v tomto poli.

Pro krystalové uspořádání jsou především významné silné a střední vodíkové vazby Obr. 24. Ty se projevují nejen v pevné fázi, ale dají se charakterizovat i v plynné fázi i v roztoku. Většinou se předpokládá, že v konkurenci vazeb různé síly jsou to silnější vodíkové vazby, které řídí uspořádání molekulových komponent v krystalu. Možná existence slabších vodíkových vazeb může tento předpoklad vyvrátit, operují-li v určitém uspořádání tyto slabé vazby součinně. Příkladem může být struktura, která vzniká krystalizací cyklohexan-1,3-dionu z benzenu, Obr. 25.



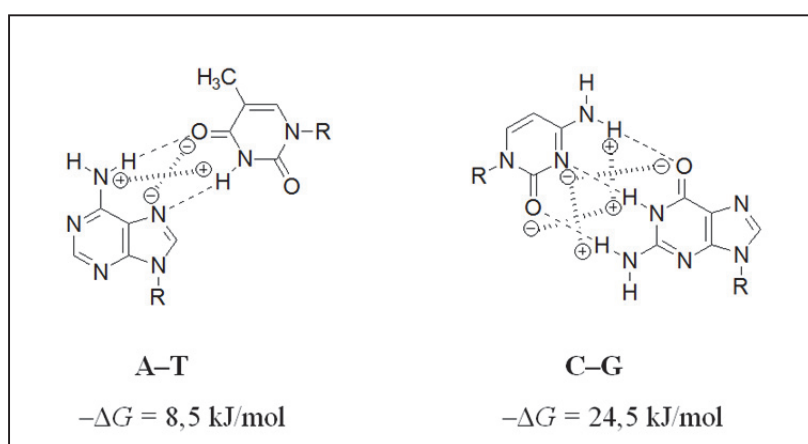
Obr. 24: Typy H-vazeb



Obr. 25: Stabilizace krystalové struktury středními a slabými H-vazbami

Ve struktuře na Obr. 25 jsou molekuly cyklohexandionu (v enolizované formě) uspořádány vodíkovými vazbami $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ střední síly (vzdálenost $\text{O}\cdots\text{O} = 2,579 \text{ \AA}$) do kruhu za přispění šesti slabých vodíkových vazeb $\text{C}-\text{H}\cdots\text{O}$ ($\text{C}\cdots\text{O} = 3,00 \text{ \AA}$). Takový cyklohexamer vzniká pouze při krystalizaci z benzenu, jehož molekula působí jako templát. Z jiných rozpouštědel krystaluje cyklohexandion v lineární formě řízené vazbami $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}$ bez zabudování molekul rozpouštědla.

Pro posouzení celkové stabilizační energie plynoucí z více vodíkových vazeb je důležité zvážit působení nábojů jednotlivých dipólů i mimo směr vodíkové vazby. Tyto sekundární interakce mohou mít charakter jak atraktivní, tak repulzní. Podrobně byly tyto vlivy zkoumány u párování nukleobází adenin-thymin a cytosin-guanin. V důsledku destabilizujících sekundárních interakcí je naměřená asociační energie páru **A-T** pouze třetinová vůči energii páru **C-G** (Obr. 26).



Obr. 26: Nábojové vlivy na párování nukleobází

Efekt sekundárních interakcí se projevuje nejen mezi jednotlivými molekulami, ale ve všech třech rozměrech a má tak významný vliv na skládání vodíkovými vazbami organizovaných vrstev („pakování“).

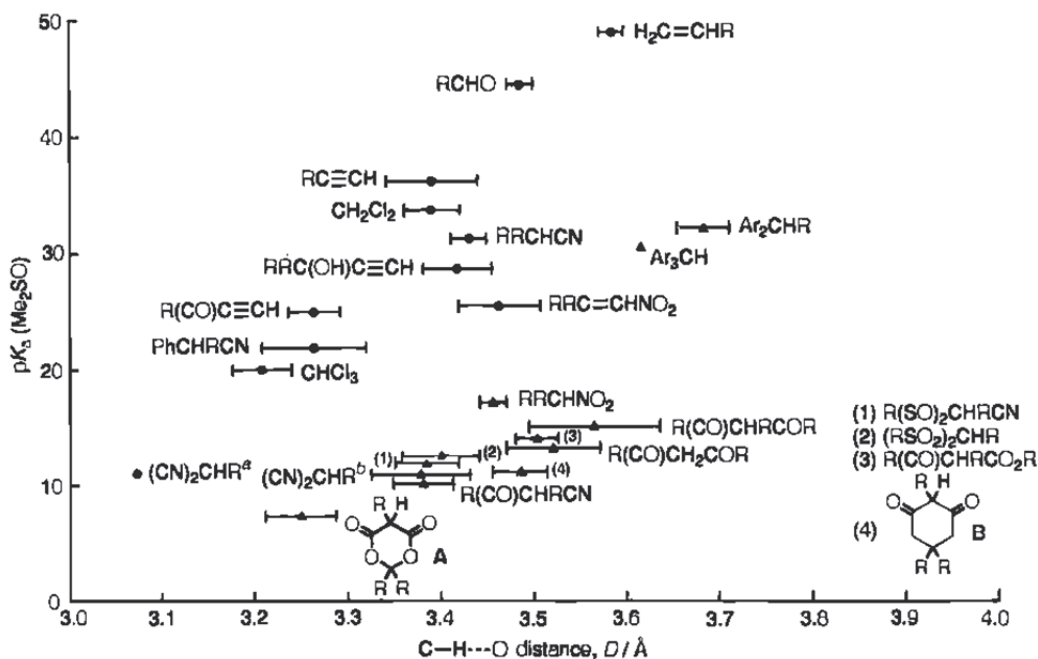
Slabé vodíkové vazby existují i mezi slabými donory, jako jsou C–H vazby, a slabými akceptory, např. π -systémy nebo těžkými atomy (Br, S, Se). U těchto vodíkových vazeb lze očekávat široké rozmezí úhlů D–H–A a vzdálenosti D...A výrazně delší než 3 Å. V nepřítomnosti silnějších donorových a akceptorových center jsou však i tyto slabé vodíkové vazby významné pro krystalové uspořádání.

Při analýze krystalových struktur je třeba hledat slabé vazby i do vzdálenosti přesahující součet van der Waalsových poloměrů. Nalezení určité směrovosti interakce je kriteriem pro odlišení takové slabé vodíkové vazby od nesměrového působení disperzních sil.

Na sílu vodíkových vazeb C–H...O má větší vliv kyselost vodíkových atomů v donoru než bazicita O atomů akceptoru. Na

Obr. 27 je graficky vyjádřen nepříliš těsný vztah mezi experimentální délkou vodíkových vazeb C–H...O a naměřenými hodnotami pK_a C-kyselin.

Výskyt vodíkových vazeb je pro řadu organických sloučenin tak charakteristický, že na jejich základě vznikl soubor pravidel, podle nichž se dají tyto vodíkové vazby předpovědět.

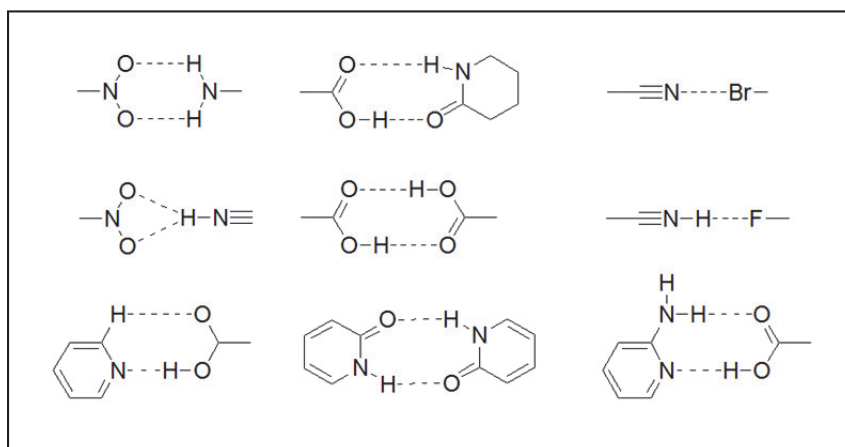


Obr. 27: Korelace mezi délkou H-vazeb C–H...O a naměřenými hodnotami pK_a organických kyselin

Nejobecnější z tohoto souboru pravidel (tzv. „Etter’s rules“ podle jejich autorky prof. Margaret Etter) jsou tato:

- všechny dobré donory a dobré akceptory se účastní vodíkových vazeb
- intramolekulární vodíková vazba uzavírající šestičlenný kruh má přednost před intermolekulární vodíkovou vazbou
- všechny dobré donory a dobré akceptory neúčastněné v intramolekulárních vodíkových vazbách vytvoří intermolekulární vodíkové vazby.

Tato pravidla také obsahují popis preferovaných vodíkových vazeb u určitých typů sloučenin. Reprezentativní příklady takových „standardních“ vodíkových vazeb jsou v grafické formě shrnuty v následujícím přehledu (Obr. 28).



Obr. 28: Preferované H-vazby

4.3 Analýza struktury molekulárních krystalů

Protože molekuly se v krystalu organizují na základě mezimolekulárních interakcí, je nalezená krystalová struktura přesným zobrazením jejich působení. Jedná se ale prakticky ve všech případech o výsledek kombinovaného vlivu více typů interakcí, takže je obtížné vliv každého ze zúčastněných typů charakterizovat. Postupuje se obvykle tak, že se hledají v krystalu nejprve interakce nejsilnější, například vodíkové vazby nebo u ionizovaných struktur elektrostatické interakce iontů. Současně je snahou celkově třírozměrné krystalové uspořádání rozložit, například na skládání dvourozměrných vrstev. Je častým jevem, že jeden typ interakcí se uplatňuje při utváření vrstev a jiné interakce při jejich vrstvení.

Není žádná přímá souvislost mezi krystalovou strukturou farmaceutické substance a její biologickou aktivitou. V krystalu se ale manifestují síly, které se velmi pravděpodobně uplatňují u biologicky aktivní molekuly při její interakci s receptory v organismu. Proto jsou informace z rozboru struktury molekulárního krystalu cenné zvláště v případech, kdy interakce v organismu nejsou dostatečně zmapovány.

U krystalů obsahujících molekuly rozpouštědla přináší analýza jejich příspěvků ke struktuře krystalu východiska k úvaze, jak lze volbou rozpouštědla krystalovou strukturu ovlivnit a tím i vlastnosti výsledné pevné fáze.

Otázky:

Jaké experimentální podmínky usnadní vznik molekulárního krystalu?

Popište typy vazebných interakcí a uveďte příklady.

Jaké typy vazeb jsou energeticky nejsilnější a jaké nejslabší?

V jakých hodnotách se pohybuje energie a délka vodíkové vazby?

5. KRYSTALIZACE

Finálně se pevné léčivé látky obecně vyrábí solidifikačními postupy z kapalně fáze. Nejdůležitějším solidifikačním potupem je krystalizace. Krystalizace je jedním ze základních procesů v přírodě (odpařování moří, mrznutí vody). Ačkoliv je krystalizace známa tak dlouho, stále se jí v některých případech nedaří cíleně řídit. Těmito případy jsou ve farmaceutickém průmyslu krystalizace nestabilních polymorfů a jejich možné a nekontrolovatelné polymorfni přechody na stabilní fáze v určitých technologických stupních (např. vlhká granulace, mikronizace).

Krystalizace je separační a čistící proces a je finálním stupněm výroby pevné léčivé látky. Krystaly vznikají nejčastěji z fáze kapalně. Při krystalizaci dochází k samospořádkujícímu supramolekulárnímu procesu, při kterém se nahodile orientované molekuly skládají do vnitřně vysoce uspořádaných krystalů. Abychom mohli krystalizaci řídit, je nutné tento proces ovlivnit již v prvotním, tzv. prenukleačním stádiu. To znamená, že musíme ovlivnit jak termodynamiku, tak kinetiku procesu krystalizace.

Sledovanými parametry krystalického produktu jsou:

- výtěžek
- chemická a fyzikální (polymorfni) čistota krystalů
- distribuce velikostí krystalů
- krystalový tvar
- specifický povrch
- obsah zbytkových rozpouštědel

Produkce je v neposlední řadě ovlivněna také ekonomickými a ekologickými aspekty.

5.1 Nukleace

Již v roce 1724 Fahrenheit zjistil, že voda může být ochlazená až na $-9,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, aniž zmrzne. Později, v roce 1813 Gay-Lussac ukázal, že roztoky mají schopnost se přesytit, aniž dojde ke krystalizaci a vydržit tak dlouhou dobu. První etapa krystalizace totiž vyžaduje, aby se dostatečně rychle v přesyceném roztoku vytvářely krystalizační zárodky, tzv. **nuklea**. Druhou etapou je **růst krystalu**. Jestliže k nukleaci nedojde, resp. koncentrace nukleí nepřekročí kritickou mez, vzniká při solidifikaci amorfni fáze.

Na různých místech krystalizujícího roztoku vznikají sekvencí molekulárních adicí molekulární klastry (agregáty, asociáty):



Roztok pak obsahuje klastry různých velikostí $A_2 \dots A_n$, které mají tendenci se spontánně rozpadat, ovšem v důsledku vzájemných kolizí i rostou. Klastry, které dosáhnou tzv. kritické velikosti, se nazývají **nuklea** a jsou schopné dalšího růstu (již se samovolně nerozpadají). Nukleus tvoří (podle typu sloučeniny) několik desítek až tisíc molekul. Novější teorie uvádějí tzv. **dvoukrokový nukleační model** (two-step nucleation model), podle kterého se v prvním kroku vytvoří krůpěj kapalné fáze s vysokou koncentrací stavebních částic, která ve druhém kroku restrukturalizuje do uspořádaného nuklea.

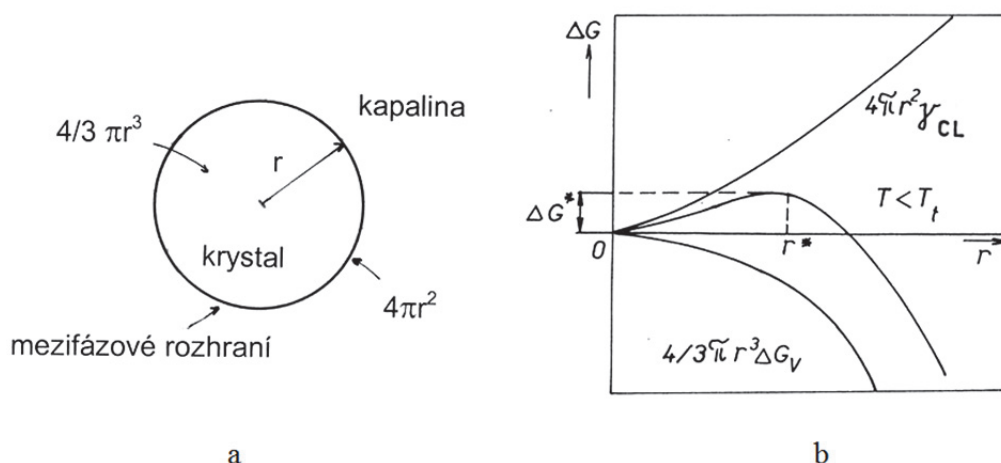
Nukleace může být buď **primární (spontánní)** nebo **sekundární**. Primární nukleaci dělíme na **homogenní** a **heterogenní**. Homogenní nukleace je idealizující stochastický proces a slouží k nastavení reálnějšího modelu. Při homogenní nukleaci se nuklea tvoří náhodnými srážkami molekul kdekoli v objemu krystalujícího roztoku. Heterogenní nukleace probíhá přednostně na stěně krystalizátoru, na míchadle nebo na krystalizačním přídatku. Bližší realitě je samozřejmě nukleace heterogenní. Sekundární nukleace je vyvolaná, např. přídatkem krystalizačních oček nebo jinými vlivy (pohybem míchadla krystalizátoru). **Očkovaná nukleace** se používá v případě, když je potřeba s jistotou vykrytalovat žádaný polymorf. Při očkování přidáváme k výchozímu roztoku krystalky (zárodky, očka) požadované fáze.

Homogenní nukleace

Při **teorii homogenní nukleace** uvažujeme kulovitý zárodek (agregát) a jednosložkový systém (Obr. 29). Vytvoření fázového rozhraní mezi kapalnou a pevnou fází je spojeno se změnou Gibbsovy energie ΔG , vztažené na jeden agregát:

$$\Delta G = (4\pi/3)r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma_{CL} \quad (10)$$

kde ΔG_v (hnací síla nukleace) má záporné znaménko a značí rozdíl mezi Gibbsovými energiemi jednotkových objemů pevné a kapalné fáze při $T < T_i$ (T_i je teplota tuhnutí). Veličina γ_{CL} je mezifázové napětí mezi fází kapalnou (L) a krystalickou (C) a r je poloměr kulovitého agregátu. První člen ve vztahu (10) způsobuje pokles a druhý člen růst ΔG .



Obr. 29: Krystalizační zárodek (a). Nukleační bariéra ΔG^* a kritický poloměr nuklea r^* (b)

Nukleace je spontánní děj, a proto při něm musí ΔG klesat. Po překonání hranice **kritického poloměru** r^* a **nukleační bariéry** ΔG^*_{homo} , nuklea dále spontánně rostou do krystalů, protože pro ně platí $d\Delta G/dr < 0$. S rostoucím podchlazením se snižuje jak r^* tak ΔG^*_{homo} . Naopak agregáty s $r < r^*$ mají tendenci se rozpadat, protože $d\Delta G/dr > 0$. Toto chování je založeno na jednoduchém faktu, že povrch kulovité částice se zvětšuje s r^2 , zatímco její objem s r^3 , takže vnitřní přitažlivé vazby v agregátu nakonec převáží nad mezifázovým napětím. V roztoku existují v mikroměřítku fluktuace koncentrací a pravděpodobnost, že některá fluktuace překročí nukleační bariéru extrémně rychle, roste s rostoucím přesycením.

V okamžiku vzniku nuklea prochází křivka na Obr. 29 b extrémem, a proto platí:

$$(d\Delta G/dr)_{r=r^*} = 0 \quad (11)$$

Provedením derivace (3) v rovnici (2) získáme pro velikost kritického poloměru r^* vztah:

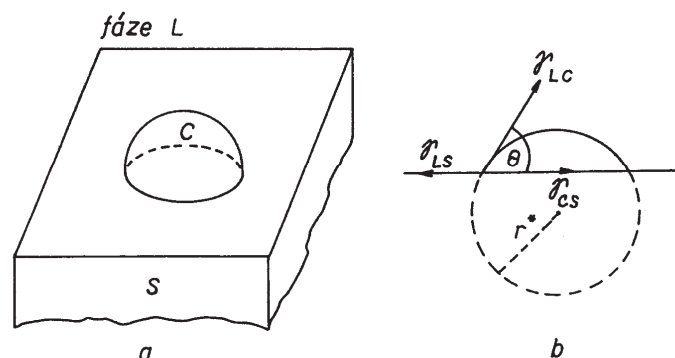
$$r^* = 2\gamma_{CL} / \Delta G_V \quad (12)$$

a dále dosazením (12) do (10) dostaneme výraz pro bariéru homogenní nukleace ΔG^*_{homo} :

$$\Delta G^*_{homo} = (16\pi\gamma_{CL}^3) / (3\Delta G_V^2) \quad (13)$$

Heterogenní nukleace

Mechanismus **heterogenní nukleace** více vystihuje reálný proces. Stěny krystalizátoru nebo krystalizační aditiva představují cizí volný povrch (S), na kterém se snáze zachytí molekulární agregát. Aby tento agregát dorostl do nuklea (C), stačí mu vytvořit pouze jeho vrchlík (Obr. 30). Heterogenní nukleace tak může nastat při vyšší teplotě než nukleace homogenní.



Obr. 30: Heterogenní nukleace. a) vrchlík (kulová úseč) nuklea, b) adhezní úhel

Heterogenní nukleace je energeticky výhodnější, protože vzniká-li nukleus na povrchu pevného substrátu, postačí k jeho vytvoření mnohem menší počet atomů (molekul), než by vyžadoval nukleus o stejné kritické velikosti r^* při homogenní nukleaci. Práce potřebná k vytvoření nuklea (tj. nového povrchu) je zmenšena o smočený volný povrch (S), přičemž adhezní úhel θ je definován rovnováhou (Obr. 29 b.):

$$\gamma_{LS} = \gamma_{CS} + \gamma_{LC} \cos \theta, \quad (14)$$

kde γ_{ij} jsou mezifázová napětí (LS – kapalina-pevný povrch, CS – nukleus-pevný povrch, LC – kapalina-nukleus).

Nukleační bariéra heterogenní nukleace je nižší než homogenní nukleace. Příslušný vztah (15) modifikuje rov. (13) funkcí adhezního úhlu $f(\theta) < 1$:

$$\Delta G^*_{het} = \Delta G^*_{homo} \cdot f(\theta) \quad (15)$$

Pro $\theta=180^\circ$ je $f(\theta)=1$ a nukleace se uskuteční pouze homogenním mechanismem.

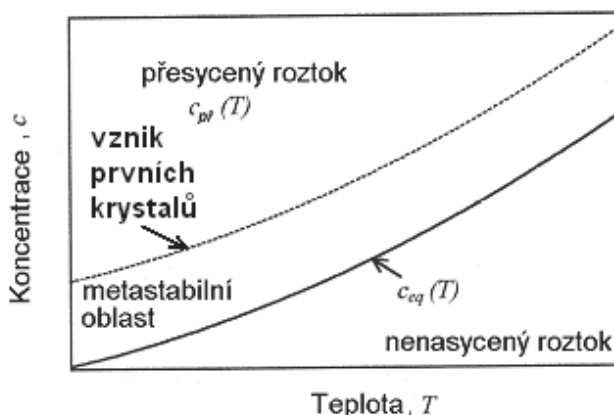
Pokud je roztok ponechán primární (spontánní) nukleaci, znamená to nebezpečí, že vykrytaluje nechtěný polymorf (pokud systém vykazuje polymorfni chování). V takovém případě se při řízené krystalizaci často používá **nukleace sekundární – očkovaná**. Při očkování se přidávají k výchozímu roztoku krystalky (očka, zárodky) požadovaného polymorfu. Sekundární nukleace může být vyvolána i jinými, nechtěnými vlivy, např. pohybem míchadla krystalizátoru.

5.2 Termodynamika krystalizace

Jak již bylo několikrát zdůrazněno, krystaly mohou nukleovat a růst pouze tehdy, jestliže je **roztok přesycený**. Přesycení roztoku lze dosáhnout např. ochlazením, odpařením rozpouštědla, vysrážením (velmi častý případ ve farmaceutické technologii) atd. Přesycení roztoku je vyjádřeno jako:

$$\Delta c = c_{př} - c_{eq}, \quad (16)$$

kde c_{pr} je koncentrace přesyceného roztoku a c_{eq} koncentrace nasyceného roztoku (*equilibrium* = rovnováha). Na Obr. 31 je znázorněna obecná rozpouštěcí křivka (závislost koncentrace krystalizující léčivé látky na teplotě pro nasycený roztok).



Obr. 31: Obecná rozpouštěcí křivka (plná čára). Tečkovaná čára určuje šířku metastabilní zóny

Tečkovaná rovnoběžná křivka, která odpovídá maximálnímu přesycení (začnou se vylučovat první krystaly), určuje spolu s křivkou nasycení šířku **metastabilní oblasti (zóny)**. Šířka metastabilní zóny je dána rozdílem mezi teplotou, při které je roztok nasycený a teplotou, při které se začnou spontánně vylučovat první krystaly. Rozdíl těchto dvou teplot je tzv. **podchlazení roztoku**. Šířka metastabilní zóny závisí také na typu nukleace (homogenní, heterogenní, sekundární), ale především na přítomných nečistotách. Roztok, jehož složení leží pod křivkou $c_{eq}(T)$, je nenasyčený a krystaly se zde budou rozpouštět. Látka může nukleovat a dále růst pouze v přesyceném roztoku při určitých hodnotách koncentrace a teploty. Krystalizace léčivé látky se musí provést právě v metastabilní oblasti. Čím je metastabilní zóna užší, tím snadněji krystaly vznikají. Typická hodnota šířky metastabilní oblasti je okolo 10 K.

Z termodynamického hlediska dochází ke krystalizaci tehdy, když je chemický potenciál (parciální molární Gibbsova energie) krystalizované složky v rovnovážném stavu μ_{eq} nižší než chemický potenciál této složky v přesyceném stavu μ_{pr} . Hnací silou krystalizace je příslušný rozdíl:

$$\Delta\mu = \mu_{pr} - \mu_{eq} \quad (17)$$

Vzhledem k obecnému vztahu:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a, \quad (18)$$

kde μ_0 je standardní chemický potenciál a a aktivita, dostaneme kombinací rovnic (18) a (17):

$$\Delta\mu / RT = \ln(a_{př} / a_{eq}) = \sigma, \quad (19)$$

kde $\sigma = \Delta\mu / RT$ je **přesycení**, které reprezentuje **hnací sílu krystalizace** a $a_{př} / a_{eq}$ je termodynamický poměr aktivit přesyceného a nasyceného roztoku. Aktivita složky i v roztoku je rovna součinu:

$$a_i = (\gamma_i x_i), \quad (20)$$

kde x_i je molární zlomek a γ_i aktivitní koeficient.

Vyčíslení či odhad aktivitních koeficientů a z toho vyplývající výpočet přesycení bývá často velmi komplikovaný. Pro ideální roztok nebo v případě, kdy aktivitní koeficient nezávisí na koncentraci, lze vztah (9) vyjádřit jako:

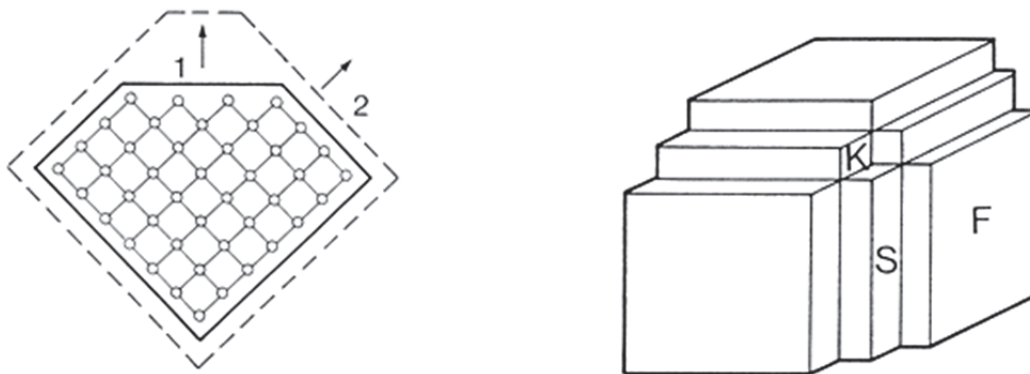
$$\Delta\mu / RT = \ln(x_{př} / x_{eq}) \approx (x_{př} - x_{eq}) / x_{eq}, \quad (21)$$

Často však nezbývá, než oblast přesycení, v závislosti na teplotě a vlastnostech matečného roztoku, experimentálně stanovit.

5.3 Mechanismus růstu krystalů

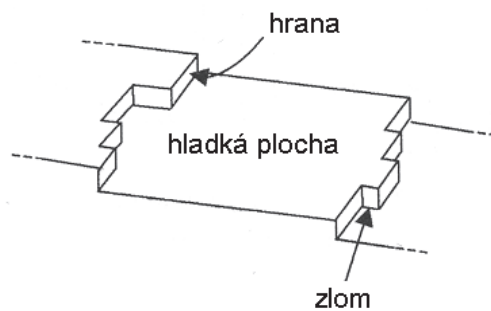
Růst krystalů v přesyceném roztoku je komplikovaný proces, jehož detaily nejsou doposud zcela objasněny. Důvodem je, že přesycený roztok obsahuje celou škálu stavebních jednotek (atomy, ionty, molekuly, dimery, trimery, polymery, klastry a jejich hydratované formy atd.), jejichž struktura je někdy nejasná. Při růstu krystalu převažuje tok stavebních jednotek směrem na povrch krystalu nad jeho odtokem z povrchu. Řídícím procesem je převážně difúze. Výsledkem růstu krystalu je **krystalová plocha**, která je popsána Millerovými indexy (hkl). Typická hodnota rychlosti růstu krystalové plochy je 0,5 mm/hod, ale tato hodnota může být velmi proměnlivá v závislosti na podmínkách krystalizace. Soubor všech krystalových ploch se označuje jako **krystalový tvar** neboli **habitus krystalu, příp. krystalový design**. Podle podmínek krystalizace nemusí všechny krystalové plochy habitu vždy stejnoměrně vyrůst, konstantní však zůstávají vždy úhly mezi plochami (tzv. Stenův zákon).

Na Obr. 32 a je schematicky nakreslen růst dvou krystalových ploch u dvourozměrného krystalu. Každá stavební jednotka (kroužek) je zde vázána se 4 nejbližšími sousedy. Zatímco u plochy 1 dochází při jejím růstu k navázání stavební jednotky dvěma vazbami, u plochy 2 je to vazba pouze jedna. Plocha 1 má tudíž dvojnásobně vyšší energii než plocha 2 a proto plocha 1 roste dvakrát rychleji než plocha 2. V konečném výsledku je krystalový habitus tvořen převážně plochami, které rostou nejpomaleji a mají tudíž nejmenší energii (Obr. 32 b). Jinými slovy, nejrychleji rostou plochy s nejmenší hustotou uzlových bodů. Obvykle nejpomaleji roste krystal ve směru nejkratšího mřížkového parametru. Je důležité si uvědomit, že růstem ploch není míněno jejich zvětšování, ale nabývání jejich tloušťky.

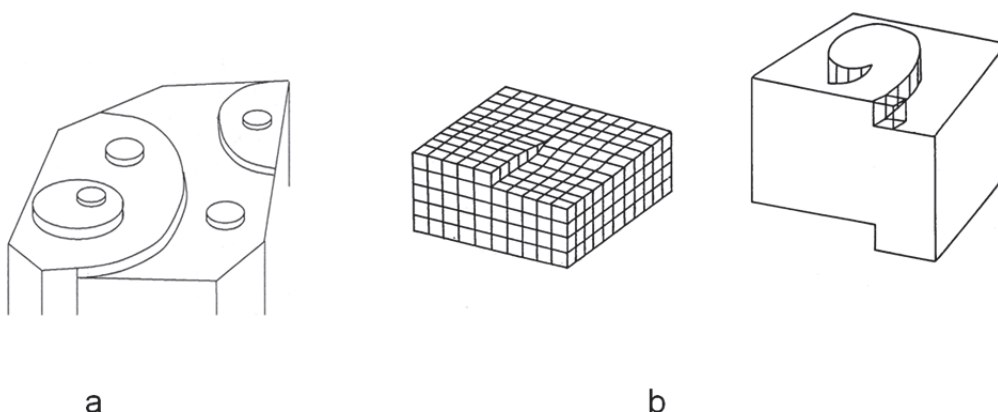


Obr. 32: Růst krystalových ploch. a) dvojrozměrný krystal, b) trojrozměrný krystal – podle značení Hartmana a Perdocka roste nejpomaleji plocha F („flat“), potom plocha S („stepped“) a nejrychleji plocha K („kinked“)

Krystalová plocha však nenarůstá přísunem stavebních jednotek „pravidelně jako vojsko v řadě“, ale růstovými mechanismy. Z energetického hlediska se stavební jednotky nejnáze připojují ke zlomům krystalové plochy, méně ochotně k hranám a velmi neochotně k hladké ploše (Obr. 33). Pokud není k dispozici dostatečné množství hran a zlomů, potom na hladké ploše dochází k povrchové nukleaci (Obr. 34 a.) nebo k využití přítomných čarových defektů reálné krystalové struktury – šroubových dislokací (Obr. 34 b). Při růstu krystalu roste tento typ dislokace ve všech směrech stejně rychle, a proto vzniká šroubový chod.



Obr. 33: Růst krystalu



Obr. 34: Růst krystalu mechanismy povrchové nukleace (a) a šroubové dislokace (b)

5.4 Kinetika krystalizace

Růstové mechanismy však nezohledňují časovou závislost krystalizace. Proto je nutné zvolit kinetický popis krystalizace a vzít v úvahu externí parametry jako teplotu, tlak či koncentraci v systému. Kinetických teorií krystalizace je popsána celá řada, zmíníme se pouze o nejstarší a nejvýznamnější z nich, o tzv. **filmové teorii**.

Filmová teorie růstu krystalů

Pokud má krystal v přesyceném roztoku růst, musí být rozpuštěná složka transportována objemem matečného roztoku k povrchu nuklea. Tam je následně ukotvena do krystalické struktury. Transport probíhá přes **tenkou vrstvu roztoku (film)** - odtud název teorie. Tato vrstva filmu je v dynamické rovnováze jak s povrchem krystalu na jedné straně, tak s objemovou fází matečného roztoku na straně druhé. Tloušťka filmu δ (okolo 20-50 μm) závisí na teplotě a hydrodynamice krystalizačního systému (míchání roztoku). Vlastní krystalizace se potom dá popsat následujícími kroky:

- přenos složky z objemové (roztokové) fáze do vrstvy filmu obklopující krystalickou fází
- difúze složky přes vrstvu filmu
- zakotvení stavební částice do krystalické fáze
- odvedení krystalizačního tepla do matečného roztoku

Celkovou kinetiku krystalizace bude určovat nejpomalejší, tzn. řídicí děj. V nemíchaném roztoku to bude zřejmě difúze, v míchaném krystalizátoru to pravděpodobně bude zakotvení částice do krystalu. Někdy je těžké rozhodnout, který děj je řídicí.

Rychlost difúze je popsána prvním Fickovým zákonem:

$$\left(\frac{\partial m}{\partial t}\right)_x = -D \cdot A \cdot \left(\frac{\partial c(x)}{\partial x}\right)_t, \quad (22)$$

kde člen $\frac{\partial m}{\partial t}$ znamená množství složky difundující plochou A za jednotku času ve směru x při daném koncentračním gradientu. D [m^2/s] je difúzní koeficient krystalizující složky v přesyceném roztoku. Vztah (22) bývá také často vyjádřen jako vztah hustoty difúzního toku j_A [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] a koncentračního gradientu:

$$j_A = -D \cdot \left(\frac{dc}{dx}\right)_t, \quad (23)$$

Obě rovnice (22) a (23) vyjadřují relaci mezi koncentračním tokem na jedné straně a jeho gradientem na straně druhé. Podle základní termodynamické bilance je tento gradient záporný, protože hustota difúzního toku se mění proti směru koncentračního gradientu. Proporcionální konstanta, difúzní koeficient D , je charakteristická pro každý krystalizační systém.

Pro rigorózní popis krystalizace je však zapotřebí bilancovat koncentrační profil u povrchu krystalu. Pro závislost koncentrace na vzdálenosti od povrchu krystalu je účelné sestavit jednoduchý rovnovážný model, jehož princip je dokumentován na Obr.

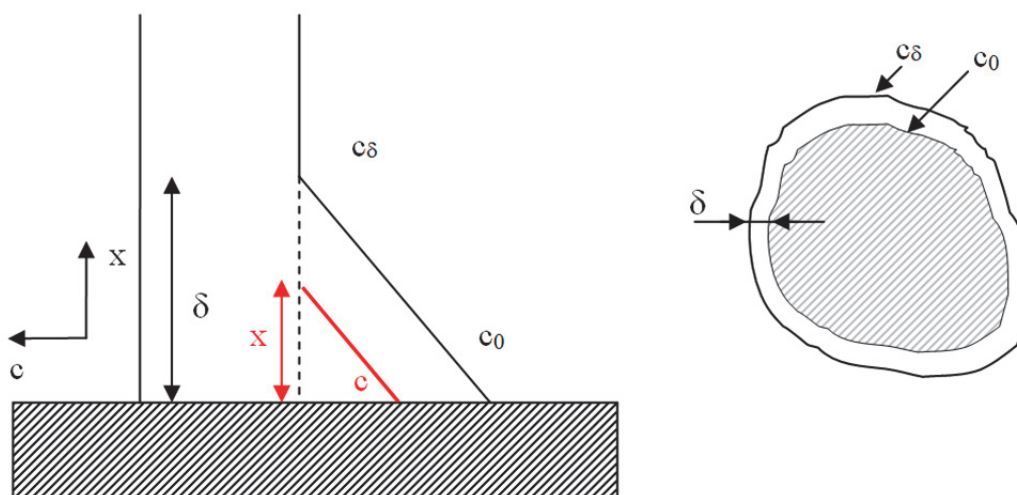
35. Člen na pravé straně rov. (23), $\left(\frac{dc}{dx}\right)$ je zakreslen v souřadnicích c , x pro situaci v ustáleném stavu v těsné blízkosti tenkého laminárního filmu obklopující pevnou fázi, spolu s představou jednoho krystalu obklopeného přesyceným roztokem. Koncentrace látky stoupá z hodnoty c_0 na povrchu krystalu do koncentrace $c_\delta = c_{\text{př}}$ v přesyceném matečném roztoku.

Pokud budeme předpokládat lineární profil koncentrace, jak je naznačeno v Obr. 35, můžeme bilancovat libovolnou koncentraci c v pozici x , podle podobnosti trojúhelníků, jako:

$$\frac{c - c_\delta}{x} = \frac{c_0 - c_\delta}{\delta} \quad (24)$$

Spojením rovnic (24) a (22) dostaneme pro rychlost difúze vztah:

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{c - c_\delta}{x} = -D \cdot A \cdot \frac{c_0 - c_\delta}{\delta} = D \cdot A \cdot \left(\frac{c_\delta - c_0}{\delta}\right) \quad (25)$$



Obr. 35: Koncentrační profil v těsné blízkosti tenkého filmu obklopující pevnou fázi a představou jednoho krystalu obklopeného přesyceným roztokem (vpravo).

δ - tloušťka tenkého laminárního filmu, c_0 - koncentrace složky na povrchu pevné fáze, c_δ - koncentrace složky na hranici tenkého laminárního filmu

Pro odvození modelu krystalizace je nutné v dalším kroku popsat také rychlost zakotvení stavební částice do krystalové struktury na základě koncentračního profilu v laminárním filmu na povrchu krystalu. V prvním přiblížení lze zvolit proces prvního řádu. Potom formálně platí:

$$\frac{dm}{dt} = k_s \cdot A \cdot (c_0 - c_{eq}) \quad (26)$$

V rovnici (18) reprezentuje symbol k_s koeficient sdílení hmoty (formální rychlostní konstanta). Pro ustálený stav systému se množství složky zakotvené do krystalu rovná množství, které bylo transportováno difúzí. Tak je možné odstranit z rovnic (25) a (26) velmi těžko dostupnou koncentraci na povrchu krystalu, c_0 :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{1}{\left(\frac{\delta}{D} + \frac{1}{k_s}\right)} \cdot A \cdot (c_\delta - c_{eq}) = \bar{k} \cdot A \cdot \Delta c, \quad (27)$$

kde \bar{k} značí celkovou rychlostní konstantu krystalizace. Ta je závislá na celé řadě faktorů, jako je složení matečného roztoku, intenzita míchání, teplota atd. Rovnici (28) je možné použít pro celkový popis rychlosti krystalizace. Je však zapotřebí si uvědomit, že celková rychlostní konstanta \bar{k} v sobě zahrnuje jak difúzní koeficient D a informaci o tloušťce laminárního filmu δ , tak i koeficient sdílení hmoty k_s potřebný pro popis zakotvení stavební částice do krystalové struktury.

Vezmeme-li v úvahu vlastní mechanismus růstu krystalu, rychlost zabudování částice do krystalu závisí na druhé mocnině lokálního přesycení. Celkový řád

krystalizace g, kdy řídicími ději jsou jak difúze (první řád), tak zabudování (druhý řád), je tedy roven $1 \leq g \leq 2$. V inženýrských modelech je rychlost nukleace úměrná Δc^n , kde n je vyšší než 2 (přibližně 3-6). To znamená, že rychlost nukleace výrazněji závisí na přesycení než je tomu u růstu krystalů.

5.5 Variace termodynamických a kinetických parametrů a jejich vliv na krystalizaci

Pro doplnění termodynamické a kinetické bilance je nutné zmínit také parametry, které krystalizaci nejvíce ovlivňují. Na toto téma byla publikována celá řada prací, objasňujících většinou relace mezi teplotou, tlakem a koncentrací (přesycením) na jedné straně a krystalizační rychlostí či parametry krystalizátoru na straně druhé. Pro ilustraci zde zmíníme základní chemicko-inženýrské vztahy pro výpočet parametrů krystalizátoru.

Jak již zjistil Arrhenius, rychlostní konstanta silně závisí na teplotě. To samozřejmě platí i pro rychlostní konstantu krystalizace \bar{k} :

$$\frac{d \ln \bar{k}}{dT} = \frac{\bar{E}}{RT^2}, \quad (28)$$

kde \bar{E} je aktivační energii růstu krystalů, kterou je možné porovnat s aktivační energií difúze. Pokud jsou tyto dva procesy srovnatelně rychlé, jsou srovnatelné i jejich aktivační energie. Vyhodnocení aktivačních energií z krystalizačních dat může mít proto velký význam při praktickém řízení krystalizace.

Pro inženýrskou praxi bývá však podstatně důležitější otázka, které další parametry, kromě teploty, a jakou měrou ovlivní chod krystalizátoru a jakými prostředky je možné toto chování popsat. Obecně lze odvodit, že rychlostní konstanta krystalizace \bar{k} je funkcí všech parametrů, které ovlivňují termodynamiku i kinetiku krystalizace. Proto:

$$\bar{k} = f(\vartheta, d_k, \eta_L, \rho_L, \dots), \quad (29)$$

kde ϑ je teplota krystalizace, d_k průměr krystalů, η_L viskozita matečného roztoku, ρ_L hustota matečného roztoku. K řešení rovnice (29) vedou cílené krystalizační experimenty a výsledky jsou uváděny buď ve formě rozsáhlé tabulky hodnot, anebo lépe ve formě tzv. Froesslingovy relace:

$$Sh = A + B \cdot Re^c \cdot Sc^d, \quad (30)$$

která obsahuje standardní kriteriální rovnice:

$$Sh = \frac{k_D d_k}{D\rho}, \quad Re = \frac{u d_k \rho_L}{\eta_L}, \quad Sc = \frac{\eta_L}{D\rho} \quad (31)$$

Tzv. Sherwoodovo číslo udává poměr konvektivního a difúzního transportu hmoty, Reynoldsovo číslo definuje obtékání krystalů v matečném roztoku a Schmidtovo číslo popisuje relaci mezi matečným roztokem (jeho viskozitou a hustotou) a difúzní vrstvou δ u povrchu krystalu. Vyjádření kritériálních rovnic odpovídá běžné inženýrské praxi.

V rovnici (30) jsou neznámé A , B , c a d nastavitelné parametry, které jsou odvozeny z vlastního krystalizačního systému na základě analýzy krystalizačních dat. Například pro kouli je $A=2$, pro krystaly tvaru tetraedru $A=2\sqrt{2}$, atd. Pro $Sh>30$ je možno položit $A=0$.

Konstanta B slouží pro vlastní fitování experimentálních dat a podle různých autorů nabývá hodnot od 0,3 do 0,8. Parametry c a d z rovnice (30) již pouze pomáhají ke kineticky správnému popisu experimentálních výsledků: $c \in (0,5-0,6)$, $d=1/3$.

V praxi bývá Froesslingova relace využita pro prvotní popis systému. Následně jsou jednotlivé kritériální rovnice sledovány s cílem co nejlépe porozumět (a nafitovat) studovaný krystalizační problém.

Pro inženýrskou praxi jsou důležité dva okruhy technologických problémů:

- je nutné změnit parametry stávajícího zařízení, tzn. jedná se o simulační řešení problému krystalizace
- je zadán požadavek na nové zařízení krystalizace podléhající návrhovému výpočtu

Podle cíle práce je volena také taktika řešení. Zatímco změna parametrů krystalizace je velmi často v režii technologů a je ji možno řešit známou inženýrskou cestou, například pomocí Froesslingovy relace, je návrh průmyslového krystalizačního uzlu mimořádně komplexní problém, který bývá často unikátním příkladem spolupráce mnoha profesí.

5.6 Krystalizační techniky ve farmacii

Krystalizace finální léčivé látky není ve farmaceutické výrobě velkotonážní kontinuální proces (jako např. výroba močoviny nebo sacharózy), ale probíhá zde v jednotlivých šaržích jako výroba **chemických specialit**. Hlavním úkolem krystalizace je vyčistit produkt – léčivou látku (tzv. **chemická čistota**) a připravit ji ve vysokém výtěžku. V posledních letech přistoupil k požadavku chemické čistoty ještě požadavek **fyzikální čistoty**, tj. výroba požadovaného polymorfu, zvláště v případech pokud hrozí nebezpečí nekontrolované polymorfní transformace. Hlavně z tohoto důvodu je nezbytné, aby krystalizační proces v krystalizátoru byl podrobně monitorován a všechny probíhající procesy byly pod kontrolou. Výroba léčivé látky je většinou několikastupňová syntéza probíhající v jednom reaktoru, který je ve finálním kroku zároveň krystalizátorem.

Jak již bylo několikrát řečeno, nukleace nastává v přesyceném roztoku a toho lze dosáhnout:

- odpařováním rozpouštědla
- ochlazením roztoku
- přidáním antisolventu (vysrážení produktu)
- změnou pH
- přidáním látky, která chemickou reakcí vytvoří žádaný produkt (tzv. reakční krystalizace)
- k přípravě jak krystalické, tak amorfni léčivé látky lze použít i techniky lyofilizace a sprejového sušení

Ve výrobě se často používá technika přidání antisolventu („srážedla“), aby se skokově snížila rozpustnost krystalizované léčivé látky v matečném roztoku a tím se dosáhlo co největšího výtěžku. Např. přídavek vody vysráží látku z polárního organického rozpouštědla a naopak. Jako srážedlo lze také použít kyselinu nebo zásadu, pokud je rozpustnost léčivé látky výrazně závislá na pH. To lze využít např. u karboxylových kyselin, protože snížením pH vodných roztoků jejich solí vznikají volné (nedisociované) kyseliny, jejichž rozpustnost ve vodě bývá velmi nízká. Při použití techniky vysrážení je požadována rozpustnost produktu v rozmezí 1-10 mg ml⁻¹. Formálně podobná je krystalizace chemickou reakcí po přidání reagentu k roztoku, kdy výchozí složka a produkt se výrazně liší rozpustností v určitém rozpouštědle.

Krystalizace změnou teploty, zpravidla ochlazením roztoku, se často používá v případě, když je rozpouštěcí křivka léčivé látky výrazně teplotně závislá. Při použití této metody je výhodné, když rozpustnost leží v rozmezí 10 až 100 mg ml⁻¹. Pokud rozpustnost leží mimo toto rozmezí, získá se buď malý výtěžek (při nižší hodnotě) nebo velké, pomalu rostoucí krystaly (při vyšší hodnotě). Pokud nevyhovuje hodnota rozpustnosti v jednom rozpouštědle, lze požadovaného rozmezí dosáhnout použitím směsi rozpouštědel.

Krystalizace odpařováním rozpouštědla, příp. vakuová krystalizace, přichází v úvahu, když rozpouštěcí křivka právě není výrazně teplotně závislá. Pro výslednou kvalitu produktu je důležitá i rychlost dosažení přesyceného roztoku. Hodnota rozpustnosti léčivé látky při technice odpařování by měla být >10 mg ml⁻¹.

Při vysrážení produktu většinou dochází k velkému přesycení a k nebezpečí nekontrolované spontánní nukleace a následné rychlé krystalizace, kdy z roztoku naráz vypadne až 50 % produktu. Kontrolované rychlosti nukleace a tím záruky reprodukovatelnosti šarží se dosahuje přidáním **krystalizačních oček** požadované finální fáze. Také lze využít např. ultrazvuku (**tzv. sonokrystalizace**) nebo vyvolání nukleace jinými rázovými vlnami, příp. využít při krystalizaci z vody zavádění páry pod hladinu přesyceného roztoku.

S očkovanou nukleací jsou spojeny dva problémy. Jaké množství oček je potřeba k úspěšné krystalizaci a v jakém okamžiku očka do roztoku přidat? Empiricky byla stanovena hmotná bilance mezi velikostí oček (L_S), velikostí krystalů produktu (L_P), hmotností produktu (M_P) a hmotností oček (M_S), která konstatuje, že prakticky veškerá

hmota naroste na vložených očkách (tzn., že sekundární nukleace během procesu je prakticky nulová):

$$L_P / L_S = (M_P / M_S)^{1/3} \quad (32)$$

Očka se přidávají max. do 10 hm.% výtěžku, což v průmyslovém měřítku („scale up“) může představovat i několik desítek kilogramů požadovaného produktu. Očka se do roztoku doporučuje přidat v $\frac{1}{4}$ až $\frac{1}{2}$ šířky metastabilní oblasti, ve směru od rovnovážné rozpouštěcí křivky, a nejlépe ve formě krystalické kaše, ve které jsou očka „aktivována“. Mletí oček pro aktivaci se nedoporučuje, spíše mají být čerstvě krystalizována. To lze někdy obtížně splnit, protože se většinou používají očka oddělená z předchozí šarže. Při první šarži ovšem vzniká problém, kde očka opatřit. To lze řešit výrobou menšího množství v laboratorním měřítku. Pokud jsou problémy s krystalizací oček nepřekonatelné, pak do arsenálu generických firem patří i jejich extrakce z tablet konkurence (**tzv. reverzní inženýrství**). Úspěšná očkovaná krystalizace je i empirickou záležitostí zkušeného obsluhujícího personálu.

Důležitou podmínkou úspěšné krystalizace je, aby vznikající krystaly vytvářely s roztokem suspenzi, která je stále promíchávána. Pro kvalitu výsledného produktu jsou důležité fyzikální vlastnosti suspenze, např. její viskozita a hustota, což ovlivňuje možnost sedimentace, která je nežádoucím faktorem. Krystaly nesmí klesat na dno krystalizátoru, kde mají tendenci se shlukovat do agregátů. Problém agregace krystalů pak komplikuje následující technologické stupně výroby léčiva a sice mikronizaci (mletí) a vlhkou granulaci.

Dalším sledovaným parametrem je **velikost** vznikajících **krystalů**. Pokud jsou krystaly příliš velké, dochází k jejich oděru a ke vzniku mikrokrystalického prachu, na kterém může docházet k další, nežádoucí nukleaci. Kvalitu krystalů lze ovlivnit geometrií a typem krystalizátoru a operačními podmínkami (hydrodynamikou). Jedná se o způsob a rychlost míchání suspenze, tvar míchadla, velikost krystalizátoru, umístění míchadla atd.

Velikosti krystalů vyráběných léčivých látek se běžně pohybují v rozmezí 10–50 μm . Někdy se vyrábí i větší krystaly (až stovky μm), ale jen tehdy, když jsou speciálně požadovány pro vývoj lékové formy. To se využívá např. při přímé tabletaci léčivé látky bez granulace. V tomto případě musí být rozpustnost léčivé látky velmi dobrá a velikost krystalů nesmí nepříznivě ovlivnit disoluční profil substance. Velké krystaly nesmí způsobit kolísání obsahu léčivé látky v tabletě.

Sledovaným parametrem produktu je také **tvár krystalů (krystalový design)** a **drsnot jejich povrchu**. Tvar krystalů určuje důležité mechanické vlastnosti produktu, jako je sypaná hustota, filtrovatelnost, mikronizovatelnost aj. a kromě toho ovlivňuje i vlastnosti formulací. Polymorfy jedné léčivé látky se obvykle liší krystalovým tvarem, ale i jeden polymorf může vytvořit několik různých habitů. Tvarově se liší krystaly např. různých solvátů β -estradiolu, ale i acetylsalicylová kyselina (aspirin) krystaluje v různých tvarech. Tvar krystalů lze především ovlivnit použitým rozpouštědlem, resp. směsí rozpouštědel, speciálně i obsahem vody v rozpouštědle. Rozpouštědla lze podle příbuznosti hodnot jejich parametrů (např. polarita, dipólový moment, viskozita,

povrchové napětí, bod varu, hustota aj.) kategorizovat do skupin, což pomáhá při vytváření cíleného krystalového designu.

Tvar krystalů lze ovlivnit i krystalizačními aditivy, které se přednostně adsorbují na určité plochy a tím blokují jejich růst. Princip působení aditiv spočívá v tom, že každá krystalová plocha má v povrchové vrstvě jinak orientovanou stavební molekulu, a aditivum se naváže pouze na určité orientace. Jako aditivum lze použít např. močovinu, soli, kyselinu octovou aj.

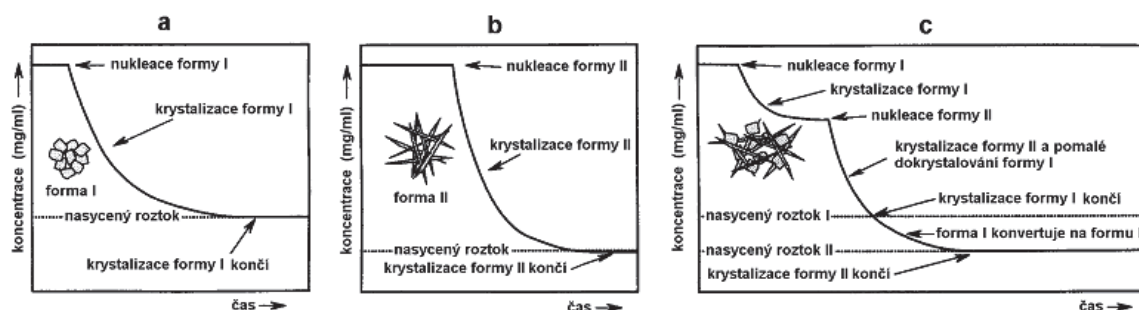
Tvar krystalů je také ovlivněn **stupněm přesycení** (stupeň přesycení $S > 1$ je definován poměrem $S = c/c_{eq}$, kde c znamená koncentraci uvažovaného přesyceného roztoku). Při rychlé krystalizaci za velkého přesycení vznikají dendrity. Jsou to stromkovité útvary, jejichž tvar lze vysvětlit tím, že se difúzí nestačí přivést k povrchu dostatečné množství materiálu a přednostně rostou pouze významné krystalové směry jako kostra. Také se nestačí odvést krystalizační teplo a tak se v bezprostředním okolí krystalu snižuje stupeň přesycení.

Klíčovou úlohu má tvar krystalů u pulmonárních pevných lékových forem, používaných např. při léčbě bronchiálního astmatu (Seretide®, GlaxoSmithKline). Při inhalaci musí částice léčiva, právě v závislosti na svém optimálním aerodynamickém tvaru, doletět až do plic.

Drsnost povrchu krystalů často rozhoduje o míře zachycení zbytkového rozpouštědla v krystalech. Povolený obsah zbytkového rozpouštědla v krystalech je přísně stanoven a krystaly je třeba sušit, aby byla dosažena požadovaná hodnota. Kvalita povrchu krystalů rozhoduje o délce sušící doby, což se promítne do energetických nároků výroby.

Krystalizace polymorfů

Při krystalizaci v polymorfním systému nejdříve krystalují nestabilní polymorfy, které se posléze transformují na nejstabilnější formu. K této samovolné transformaci nikdy nedochází obráceně. Výhodou nejstabilnějšího polymorfu je jeho relativně snadná robustní výroba a reprodukovatelnost šarží, ale nevýhodou je jeho nejnižší rozpouštěcí rychlost a tudíž nejnižší biodostupnost. Proto při výběru vhodného polymorfu musí farmaceutická firma zvážit všechny aspekty dané technologie.



Obr. 36: a), b) Nukleace a krystalizace čistých polymorfů I a II a polymorfni přechod (c). Forma II je stabilnější protože má nižší rozpouštěcí rychlost

O tom, jaký polymorf vykrytalizuje, se rozhoduje v **prenukleačním stadiu**, tedy u klastrů, na základě **kompetice kinetických a termodynamických faktorů** řídicích krystalizační proces. Vzhledem k tomu, že energetické rozdíly mezi polymorfy jsou velmi malé, snadno se může stát, že vykrytalizuje jiný polymorf, než je požadován. Faktorů, které ovlivňují krystalizaci (nukleaci) je celá řada:

- teplota a tlak při krystalizaci
- intenzita míchání roztoku
- rychlost a stupeň ochlazení roztoku
- zvolené rozpouštědlo (srážedlo)
- obsah vody (jiného kosolventu) ve finálním rozpouštědle
- pH roztoku
- koncentrační a teplotní gradienty
- přítomnost nečistot, cizích iontů v roztoku
- doba krystalizace
- zvukové, ultrazvukové, mikrovlnné, laserové nebo jiné rázy
- doba stání produktu v matečném roztoku
- stupeň přesycení roztoku

Některé faktory jsou velmi subtilní, a je obtížné je mít všechny dokonale a reprodukovatelně pod kontrolou ve výrobním měřítku. I u technologie, která byla doposud bezproblémová a vedla vždy k požadovanému polymorfu, může dojít k jevu, který Dunitz a Bernstein nazvali „**disappearing polymorph**“ (**ztracený polymorf**). Dlouho vyráběný polymorf se najednou nedaří reprodukovat. Příčinou je zřejmě skutečnost, že (náhodou??) vzniknou mikroskopická prenuklea jiného polymorfu, která kontaminují krystalizační zařízení, příp. jsou přítomná ve vzduchu a tak může tvrdošijně krystalovat vždy jiný polymorf a pokusy vykrytalizovat původní polymorf na stejném místě jsou dlouhodobě neúspěšné. Pokud se zjistí, že výrobní šarže obsahuje jiný polymorf, je nutné zpětně dohledat, jak byly nastaveny (dodrženy) všechny krystalizační parametry.

Zvládnutí krystalizace určitého polymorfu ve výrobním měřítku (tzv. **krystalové inženýrství**) může být velkým problémem, zvláště když není k dispozici krystalizační očko. Na druhé straně má očkovaná krystalizace svá omezení. Pokud rozpouštěcí křivka metastabilního polymorfu kříží hranici metastabilní oblasti stabilnějšího polymorfu, pak tento metastabilní polymorf nelze vykrytalizovat očkováním při ochlazování roztoku.

Univerzální technika, jak usměrnit polymorfni chování určité API žadaným směrem, tj. robustně a reprodukovatelně vyrábět určitý polymorf, neexistuje. Někdy lze použít očkování podobnou strukturou („tailor-made impurities“), která může snížit nukleační bariéru.

V případě komplikovaných polymorfni systémů, může zjednodušení spočívat v přechodu na vhodnou sůl, pokud lze substanci převést na kyselou nebo zásaditou formu. Např. u námelového alkaloidu terguridu (léčba parkinsonismu) je známo 7 krystalových forem, zatímco u protonizované formy (báze), terguridu hydrogenmaleinátu,

polymorfie pozorována dosud nebyla. Léková forma Mysalfon[®] (TEVA), kde aktivní substancí je tergurid, byla formulována právě z jeho hydrogenmaleátu.

V poslední době je snahou kontrolovat prenukleační a nukleační mechanismy přímo v molekulárním měřítku. K tomuto účelu se využívají různé, nukleaci vyvolávající povrchy, např. polymery, Blodgett-Langmuirovy filmy, grafit, specificky orientované krystalové plochy substrátů atd. Tyto povrchy specificky interagují s prenukleačními klastry. Pokud má určitý polymorf podobnou geometrii mřížky jako substrát, nastává epitaxiální růst. U polymorfu, který vůči substrátu vykazuje značnou mřížkovou inkoherenci (nesouměřitelnost) se růst zablokuje. To znamená, že substrátový povrch má zde funkci polymorfně selektivní. Jako příklad lze uvést selektivní nukleaci šesti konformačních polymorfů 5-methyl-2-[(2-nitrofenyl)amino]-3-thiofenkarbonitrilu na různých plochách monokrystalu kyseliny pimelové.

Otázky:

Jaké jsou typické možnosti ovlivnění krystalizace požadovaného polymorfu?

Co je hnací silou nukleace a čím je ovlivněna?

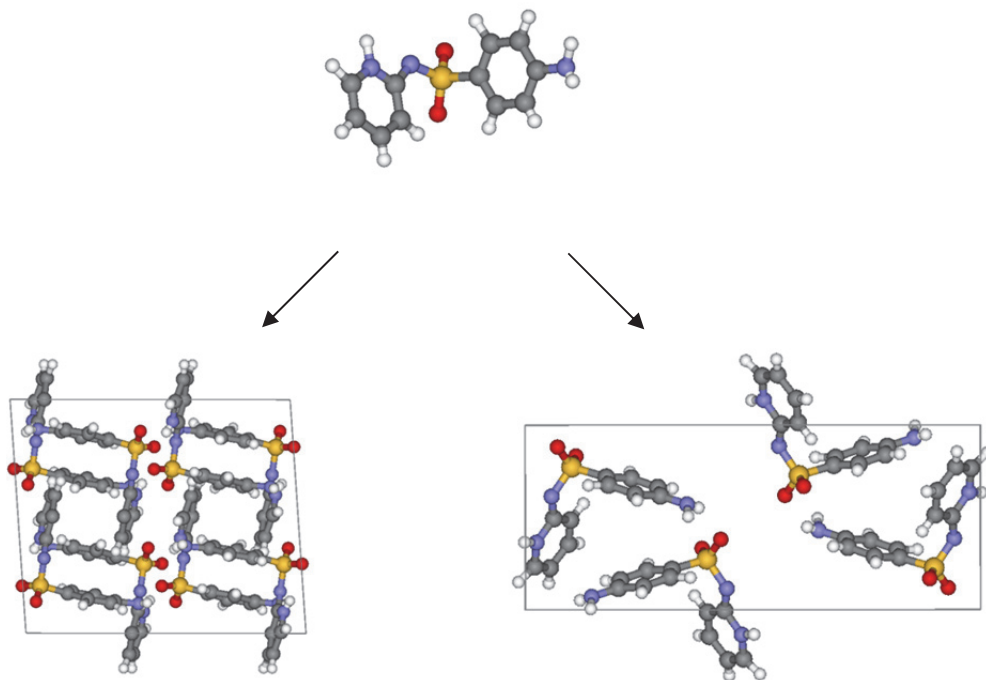
Jak se liší heterogenní a homogenní nukleace?

Popište mechanismus a proces krystalizace.

Jaký proces je označován termínem „očkování“?

6. POLYMORFISMUS

Pojem **polymorfie** resp. **polymorfismus** (z řeckého: *polys* = mnohý, *morfé* = tvar) použil poprvé Mitscherlich v roce 1822. Všiml si, že u některých arseničnanů a fosforečnanů může jedna sloučenina, určitého chemického složení, vykrystalovat ve více krystalových tvarech. Dnes polymorfismus definujeme jako možnost molekuly (chemické entity) krystalovat, v závislosti na krystalizačních podmínkách, ve více krystalových strukturách neboli **polymorfech**. Pokud se do struktury při krystalizaci zabudují i molekuly solventu (nejčastěji vody), hovoříme o **solvátech (hydrátech)**. Solváty se také označují jako **pseudopolymorfy** nebo **solvatomorfy**, ale tyto pojmy jsou stále předmětem diskuse. Pevná forma určité molekuly může být též amorfní a v poslední době je snaha rozlišovat i mezi několika amorfními formami jedné molekuly, což označujeme jako **polyamorfismus** (polymorfismus amorfátů).

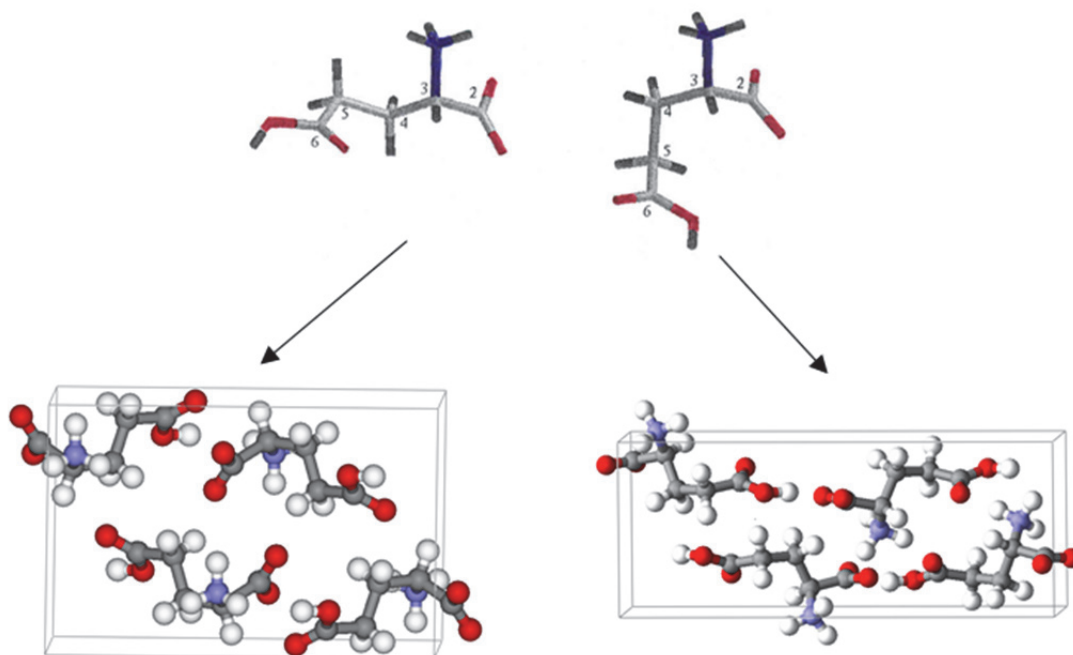


Obr. 37: Molekula sulfapyridinu, $C_{11}H_{11}N_3O_2S$ (léčba bakteriálních infekcí) a její dva pakovací polymorfy (z celkových 6 popsáných), které se liší v architektuře krystalové struktury

Rozeznáváme dva základní typy polymorfismu: **pakovací** a **konformační**. Pakovací polymorfismus znamená, že molekula je rigidní a polymorfy se liší pouze jejím „pakováním“ v krystalové struktuře. Konformační polymorfismus vzniká tehdy, když je molekula flexibilní a tvoří konformery, které odlišně krystalují. V praxi se setkáváme jak s čistým pakovacím nebo konformačním polymorfismem, tak se smíšenými typy (Obr. 37 a Obr. 38).

Jev polymorfismu organických molekul, zejména v posledních dvaceti letech, výrazně ovlivnil farmaceutický vývoj, výzkum, výrobu a kontrolu, kde začal být podrobně monitorován.

Význam polymorfismu prudce stoupl v roce 1995, po patentovém sporu mezi firmami Glaxo a Novopharm, týkající se dimorfismu ranitidinu hydrochloridu, formy I a formy II (léčba žaludečních vředů). To, že nešlo o záležitost zanedbatelnou, svědčí i výše celosvětových prodejů ranitidinu (léčivo Zantac[®], Glaxo), které v roce 1993 dosáhly částky 3,44 mld USD.



Obr. 38: Dva rotamery L-glutamové kyseliny a odpovídající konformační polymorfy

Ve farmaceutické praxi je zvykem zahrnovat polymorfy, solváty (hydráty) a amorfáty jedné léčivé látky pod pojem **pevné formy** a označovat je např. římskými číslicemi (např. prednisolon forma I – V) nebo písmeny (chloramfenikol forma A, B; indomethacin forma α, β, γ), symetrií (cyklosporin A, tetragonální prostorová grupa $P4_1$ nebo monoklinická prostorová grupa $P2_1$) aj. Je třeba počítat i s tím, že značení pevných forem, příp. polymorfů je bohužel někdy nejednotné, vzniká v historickém sledu a tak občas různí autoři označí dva rozdílné polymorfy stejně.

Pro farmaceutickou produkci je podstatné, že polymorfy jedné molekuly se liší svými vlastnostmi a to především rozpouštěcí rychlostí (někdy až o řád). Problémem farmaceutických výrobců jsou nečekané polymorfní přechody v organických soustavách, které jsou často hysterizní, špatně definované a často probíhají přes kapalnou fázi („solvent-mediated“). Polymorfní přechody mohou proběhnout ve všech technologických stupních výroby léčiva (při finální krystalizaci léčivé látky, vlhké granulaci, mikronizaci, tabletaci nebo i v hotové tabletě, např. působením pomocných látek, tzv. excipientů). Národní regulační autority (např. v ČR SÚKL = Státní ústav pro kontrolu léčiv nebo v USA FDA = Food and Drug Administration) vyžadují při

registraci léčiva po farmaceutických producentech monitorování všech jeho pevných forem a možných fázových přechodů, stejně jako předepsanou garanci polymorfní čistoty produktů.

V současnosti tvoří okolo 85 % produkce farmaceutických firem právě pevné lékové formy (tablety), a proto si žádný výrobce nemůže dovolit problém polymorfismu u svých výrobků ignorovat.

6.1 Problémy s polymorfismem, které musí řešit farmaceutické firmy

Každá farmaceutická firma produkující pevné lékové formy musí řešit následující problémy:

- 1) Jaká je patentová situace u příslušné farmaceuticky účinné substance.
- 2) Jaká je frekvence výskytu polymorfů u určité, farmaceuticky zajímavé molekuly?
- 3) Lze polymorfismus teoreticky předpovědět?
- 4) Jak lze připravit zvolený polymorf dostatečně robustní, kontrolovanou a reprodukovatelnou technologií?
- 5) Jaké jsou podobnosti a rozdíly ve vlastnostech jednotlivých polymorfů? Neohroží záměna polymorfu zdraví pacienta?
- 6) Jaké, dostatečně citlivé a validované techniky se hodí k identifikaci, rozlišení a stanovení polymorfů?
- 7) O jaký typ polymorfu má zájem ten, kdo vyvíjí lékovou formu - patentová situace, rozpustnost, morfologie, možnost mikronizace?

Frekvence výskytu polymorfů

Počet pevných forem, které určitá molekula může vytvářet je dán počtem možných interakcí mezi molekulami v molekulárním krystalu (H-vazby, van der Waalsovy síly, π - π interakce atd.). Některé malé organické molekuly, na kterých je především založen současný farmaceutický průmysl, mohou vytvářet až několik desítek pevných forem. Např. u sulfathiazolu je známo přes 100 pevných forem, u karbamazepinu a atorvastatinu přes 50. To jsou však extrémní případy (nehledě na možný překryv výsledků u různých autorů), maximální počet „čistých“ polymorfů, od jedné molekuly, zřídka převyšuje 3. Pokud je molekula protonizována v soli (např. sertralin hydrochlorid nebo tergurid hydrogenmaleinát) a ještě solvatována, potom počet dalších intermolekulárních kontaktů stoupá a tím stoupá i počet možných pevných forem. Solvent (nejčastěji H₂O) se může (častější případ) nebo nemusí (je volně pohyblivý - řídkší případ) zapojit do systému vodíkových vazeb v krystalové struktuře pevné formy.

Právě o organických molekulách provokativně prohlásil již v roce 1963 McCrone, že „... každá molekula je potenciálně polymorfní, počet jejích polymorfů závisí pouze na množství peněz, času a energie, investovaných do jejího výzkumu“. Zdá se, že toto

tvrzení platí dokonale, počty nově popsaných pevných forem rostou úměrně tomu, jak je studovaná molekula v centru pozornosti. Na druhé straně však, například u dlouho známé sloučeniny, sacharosu, polymorfismus pozorován dosud nebyl. Rozumné vysvětlení zde chybí.

Ve farmacii je zhruba používáno celkem asi 6000 různých molekul (ročně přibude nových jen přibližně 40). Tento odhad je přibližný, protože relevantní databáze neshromažďují molekuly, ale aktivní substance (API) a od jedné molekuly může být používáno několik jejích solí nebo i různá proléčiva (látky s různými chránícími skupinami, které se v organismu snadno odštěpí a poskytnou tutéž účinnou formu látky). Výsledky ze 150 „screeningových“ studií ukázaly, že 87 % aktivních substancí se vyskytuje ve více než jedné formě (51 % existuje ve více než jednom polymorfu, 39 % se vyskytuje i v amorfni formě, 37 % tvoří hydráty a 31 % solváty). Protože databáze specializovaná na polymorfii neexistuje, lze se přibližně orientovat podle aktuálních záznamů v Cambridžské strukturní databázi (CSD). Ty ukazují, že ze všech 292 661 organických struktur je 14 300 označeno jako „polymorph“, „phase“ nebo „modification“ a 48 900 jako „solvate“ nebo hydrate“, tj. celkem 22 % z celkového počtu se vyskytuje ve více fázích. Tato informace je ovšem zkrácená směrem dolů, protože většina laboratoří publikuje strukturu pouze jedné formy, kterou se podaří vykrytalovat.

Odpověď na otázku, zda je polymorfie častým jevem u farmaceuticky využívaných molekul, zní ano. Každý farmaceutický výrobce musí provádět průběžný „screening“ (mapování) a rešerši na polymorfismus svých aktivních substancí. Komplexní „screening“ na polymorfismus zvolené molekuly může zahrnovat až několik tisíc krystalizačních experimentů provedených kombinatoriálně při použití 100 i více rozpouštědel a jejich směsí, včetně variace dalších krystalizačních podmínek. Pokud je to možné, nejčastěji se používá voda, která nemá žádný toxikologický limit. „Screening“ se většinou provádí pomocí krystalizačních automatů. Seznam pořadí používaných rozpouštědel se striktně řídí směrnici Mezinárodní komise pro harmonizaci (ICH) zpracovanou do směrnice Evropské medicínské agentury (EMA) již v roce 1997. Směrnice rozděluje rozpouštědla do 4 kategorií. Do první kategorie jsou zařazena rozpouštědla prakticky vyloučená z důvodů známé toxicity. Patří mezi ně benzen a některé chlorované uhlovodíky. Do stejné kategorie by patřila i další rozpouštědla, která by mohla být chemicky reaktivní nebo mutagenní, např. sirouhlík nebo hexamethylfosfortriamid. Do druhé kategorie jsou zařazena rozpouštědla, jejichž obsah v účinné farmaceuticky aktivní substanci je limitován buď obsahem nebo nejvyšší denní dávkou přípustnou pro člověka. Ve třetí kategorii jsou doporučena rozpouštědla, jejichž maximální limit je stanoven na 5000 ppm, uvedená v následující tabulce (Tab. 11).

Tuto tabulku by měl tedy respektovat každý, kdo se zabývá farmaceutickým vývojem, nicméně znalost této tabulky by byla velmi prospěšná každému, kdo vyvíjí látky nebo produkty, které přijdou do přímého styku s člověkem a mohly by jeho zdraví ovlivnit. V kategorii čtyři jsou pak rozpouštědla, kde nejsou dostatečné údaje proto, aby mohly být schváleny obecně platné limity. Výrobce účinné látky by pak šel do rizika při schvalování léčiva, avšak samozřejmě má možnost předložit zdůvodnění jejich použití a vlastní toxikologické studie prokazující neškodnost použité dávky.

Tab. 11: Přehled rozpouštědel s nejnižší toxicitou (Class 3 solvents ICH)

Kyselina octová	Heptan
Aceton	Isobutyl acetát
Anisol	Isopropyl acetát
1-Butanol	Methyl acetát
2-Butanol	3-Methyl-1-butanol
Butyl acetát	Methylethyl keton
t-Butyl methyl ether	Methylisobutyl keton
Kumén	2-Metyl-1-propanol
Dimethylsulfoxid	Pentan
Ethanol	1-Pentanol
Ethyl acetát	1-Propanol
Ethyl ether	2-Propanol
Mravenčan ethylnatý	Propyl acetát
Kyselina mravenčí	Tetrahydrofuran

Predikce polymorfismu

Existence polymorfismu a důvody, které vedou k jeho výskytu, jsou fundamentální povahy, detailní vysvětlení zatím neznáme. Predikce polymorfie je v zásadě predikcí krystalové struktury. Současná odpověď, zda je tato predikce možná, zní nikoliv, i když se v této oblasti velmi intenzivně pracuje. V současnosti nejlepším programovým balíkem je systém Cerius Materials Studio, který obsahuje i modul **Polymorph Predictor**, vycházející z molekulárních simulací. Dílčím úspěchem je předpověď existence třetího polymorfu paracetamolu a jeho následné experimentální potvrzení.

Predikce polymorfismu je spíše akademická záležitost. Důvodem je fakt, že při patentových sporech farmaceutických firem nemá predikce prakticky žádnou váhu.

Při predikci neznámého polymorfu je v prvním kroku nutné předpovědět prostorovou grupu. To je poměrně snadný úkol, protože organické látky obvykle krystalizují pouze v několika málo grupách z 230 možných. Výběr je navíc omezen chiralitou molekuly. Většina chirálních organických molekul krystaluje v grupě $P2_1$, $P1$ nebo $P2_12_12_1$. Achirální látky obvykle krystalizují v grupách $P2_1/c$, $P\bar{1}$, na $P2_1$ a $C2/c$, směsi enantiomerů v grupách $P2_1/c$, $P\bar{1}$, $C2/c$ nebo $Pbca$. Tyto předpoklady o symetrii splňuje přibližně 78 % látek obsažených v CSD. Ve druhém kroku je nutné předpovědět mřížkové parametry. Na základě statisticky ověřeného předpokladu o stabilní velikosti pakovacího koeficientu pro jeden nevodíkový atom organické molekuly (hodnota 19,4) lze poměrně přesně odhadnout objem základní buňky. Velikosti mřížkových parametrů musí být zvoleny tak, aby tomuto objemu odpovídaly. Přesnější predikce hodnot

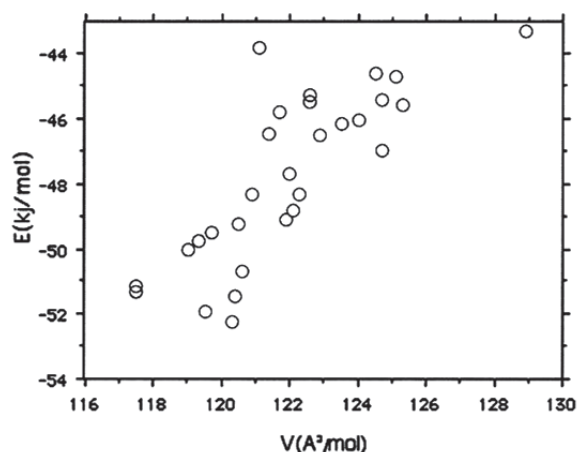
mřížkových parametrů založená na statistice existujících struktur, je bohužel značně nespolehlivá. Získají se pouze určité intervaly, ve kterých mřížkové parametry pravděpodobně leží. Posledním a nejdůležitějším krokem predikce struktury je určení pozic molekul v elementární buňce. Zde se ale u běžných organických látek naráží na tři zásadní problémy.

První problém se týká výpočtu slabých molekulárních interakcí, které drží krystal pohromadě. Pro předpověď krystalové struktury je nutné mít k dispozici přesný popis všech silových působení mezi molekulami v krystalu a zejména popis energetických změn, ke kterým při těchto interakcích dochází. Optimální by byl popis kvantově-mechanickými metodami na úrovni *ab-initio*. Čím slabší interakce chceme popsat, tím přesnější musí být výpočet a tím více efektů do něho musíme nutně zahrnout (např. korelační energie). Kvantově-mechanický výpočet slabých interakcí je díky tomu mnohem náročnější než běžně prováděné výpočty. Výpočetní náročnost roste exponenciálně s počtem elektronů zahrnutých do zpracování. I při nasazení té nejvýkonnější techniky lze v současné době rutinně řešit slabé interakce pouze v systémech o několika desítkách atomů. Pro potřeby predikce je ale nutné tento výpočet opakovat pro různá uspořádání celého komplexu molekul, čímž se výpočetní náročnost neúnosně zvyšuje. Algoritmy pro přímé vyhledání lokálních minim, případně globálního minima energetické hyperplochy jsou ve stádiu výzkumu a uspokojivé řešení dosud není k dispozici. Problém se dá částečně řešit metodou molekulárních simulací s použitím empirických potenciálů, založených na značné aproximaci popisu silových působení. Příkladem je klasická Lennardova-Jonesova funkce 6-12 (člen atrakce r^{-6} a člen repulze r^{-12} , kde r je vzdálenost) pro popis van der Waalsových (VdW) interakcí. Tvarový průběh funkcí těchto potenciálů je většinou odvozen z úvah podložených kvantově-mechanickými výpočty. Empirické koeficienty, určující vlastnosti určitého atomu, jsou odvozené z experimentu, zejména ze strukturních dat již vyřešených krystalových struktur. Popis interakcí pomocí empirických potenciálových funkcí funguje spolehlivě většinou pouze pro molekuly charakterem blízké těm, které byly použity pro kalibraci empirických konstant daného potenciálu. Výsledkem molekulární simulace je výpočet nejstabilnější konfigurace.

Druhý zásadní problém, spojený s předpovědí krystalové struktury, je identifikace správného řešení. Předpověď krystalové struktury probíhá většinou podle následujícího schématu: při výpočtu je generována řada možných elementárních buněk v rozumném rozmezí mřížkových parametrů. Pro zvolené prostorové grupy je do takové buňky umístována molekula a je provedena minimalizace energií vazebných interakcí. Celý postup se zkouší pro velké množství jak elementárních buněk, tak výchozích pozic molekuly. V případě flexibilní molekuly může být dalším parametrem, který je nutné měnit, např. torzní úhel této molekuly. Výsledkem celého výpočtu je pak řada potenciálních řešení, jejichž kvalita se dá ohodnotit velikostí energie intermolekulárních sil a v případě flexibilní molekuly i potenciální energií výsledné konformace molekuly. Funkce pro hodnocení správného výsledku má většinou velice plochý průběh. Rozdíly v energiích jednotlivých řešení jsou většinou velmi malé, okolo $4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$. Navíc se do jejího průběhu promítají chyby, způsobené použitím empirických potenciálů nebo kvantově-mechanických výpočtů na nedostatečné úrovni přesnosti. Tímto způsobem se

pro běžné molekuly obsahující několik desítek nevodíkových atomů vygenerují tisíce možných řešení, z kterých je obtížné vybrat ta reálná (Obr. 39). Reálná řešení nemusí mít vždy nejnižší energii z celého souboru.

Třetím, těžkým problémem je výpočet entropického členu ($G = H - TS$), který se projeví při každém krystalovém pakování nad teplotou absolutní nuly a zvláště při polymorfních přechodech vyvolaných zahříváním. Entropický člen se většinou statisticky odhaduje.



Obr. 39: Graf znázorňující vypočtenou mřížkovou energii vynesenu proti objemu molekuly (objem elementární buňky dělený počtem molekul v buňce) pro 30 možných krystalových struktur benzenu

Kromě toho je nutné vzít do úvahy i dynamickou povahu krystalizačního procesu. To, jaká forma ve skutečnosti při krystalizaci vznikne, není dáno pouze termodynamikou, ale i kinetikou krystalizace. Farmaceutická firma musí vedle formy patentovat i její přípravu. Pro přesnou predikci by tedy bylo nutné modelovat jak kinetické aspekty, tak nukleační procesy při krystalizační teplotě a teprve až na základě těchto informací identifikovat, zda daná fáze (polymorf) opravdu vykrytalizuje. Celou věc dále komplikuje možná solvatace.

Dalším přístupem k predikci je považovat krystal za supramolekulu. Při krystalizaci (supramolekulární reakci) se jednotlivé stavební částice (molekuly) navzájem rozpoznávají („recognition“) a určitým způsobem samoskladně uspořádávají („self-assembly“). Je zajímavé, že směry těchto interakcí často koincidují se šroubovými osami nebo skluznými rovinami v krystalu. Z hlediska supramolekulární chemie chápeme stavební částice (molekuly) jako tzv. supramolekulární synthony, které přenášejí informaci o svém tvaru do krystalové struktury. Většinou se určitá konformace molekuly v roztoku přenesou i do krystalu.

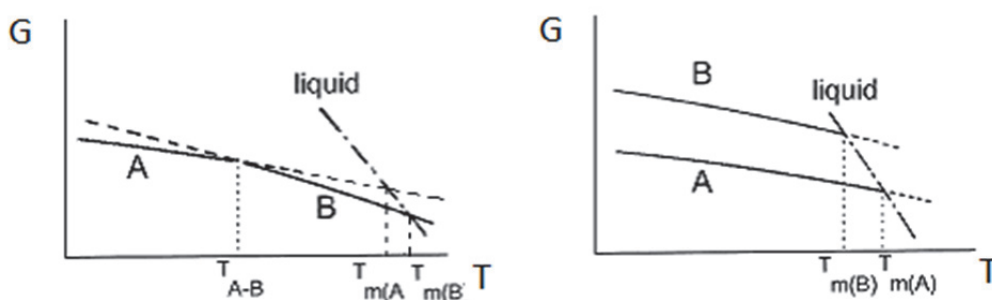
Polymorfní přechody a cílená výroba zvoleného polymorfu

V polymorfním systému je za definovaných podmínek vždy jeden **polymorf stabilní (nejstabilnější)**. Nejstabilnější polymorf je charakterizován:

- nejnižší Gibbsovou energii
- nejnižší rozpouštěcí rychlostí
- nejnižší biodostupností
- nejnižší reaktivitou

Hnací silou **polymorfni (fázové) transformace** je, stejně jako u chemické reakce, záporná hodnota změny Gibbsovy energie, ve směru: nestabilní polymorfy → nejstabilnější polymorf. Možnost polymorfni transformací v polymorfni systému vyplývá tedy z nestejné stability polymorfů. Polymorfni transformace je fázovým přechodem prvního řádu, kdy se skokově mění záporná entropie a objem, tzn. první derivace Gibbsovy energie podle teploty a tlaku: $(\partial G/\partial T)_p = -S$, $(\partial G/\partial p)_T = V$. Fázová přeměna může být rychlá nebo pomalá, je spojena s překonáním energetické bariéry (ΔG) a probíhá v roztoku či v suspenzi („solvent-mediated“) nebo v pevné fázi.

V polymorfni systémech rozlišujeme dva typy přechodů: **enantiotropní** a **monotropní** (Obr. 40). Při enantiotropii je možná polymorfni přeměna v pevném stavu, při monotropii je polymorfni přeměna možná pouze přes kapalnou fázi. Ve farmacii je většina přechodů monotropních.



Obr. 40: Enantiotropie (vlevo) a monotropie (vpravo)

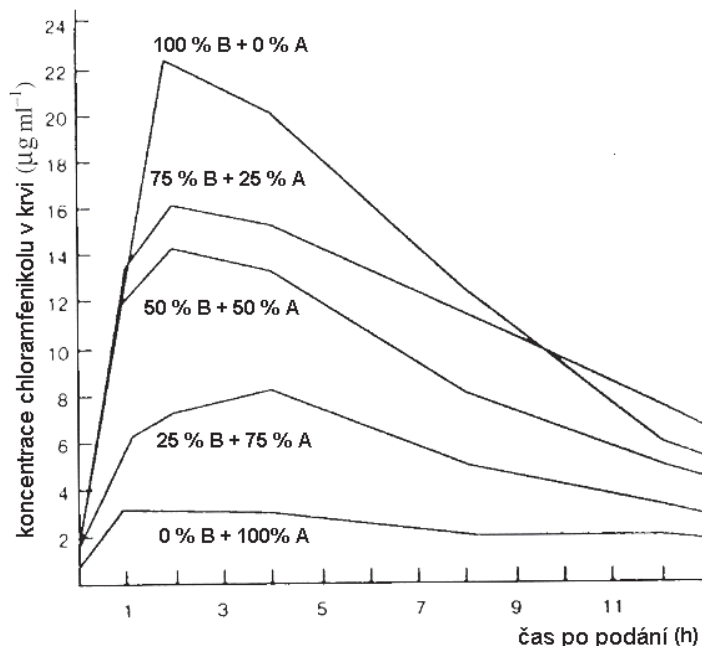
Vlastnosti polymorfů

Ačkoliv je biologický účinek léčivé látky vyvolán interakcí molekuly léčiva s cílovým receptorem (vytvoření komplexu droga/receptor), kdy se především vlivem konformačních změn ovlivní přirozený chemismus buňky, je důležité v jaké pevné formě je pacientovi léčivo podáváno. To znamená, že záleží nejenom na molekulové, ale i krystalové struktuře léčivé látky. Krystalová struktura totiž výrazně ovlivňuje rychlost rozpouštění léčiva a tím jeho farmakokinetický profil a biodostupnost.

Různé polymorfy se u jedné API mohou lišit v rychlosti rozpouštění až o řád, (např. premafloxacin I/III nebo chloramfenikol A/B viz Obr. 41), takže se u nejméně rozpustné (nejstabilnější) formy nedosáhne ani minimální léčivé koncentrace. Průměrná hodnota poměru rozpouštěcích rychlostí dosahuje mezi polymorfy různých API okolo 2, ale i to

může výrazně ovlivnit biodostupnost léčiva. Na druhé straně amorfní forma může mít až 10x větší rozpouštěcí rychlost než nejstabilnější polymorf.

Velké rozdíly v rozpouštěcí rychlosti polymorfů mohou být příčinou velkých rozdílů v jejich distribuci v organismu. Nízká plasmatická koncentrace může způsobit, že se neúplně obsadí příslušné membránové receptory v místě účinku a jsou zablokovány substrátem nebo že se změní charakter účinku z agonisty na antagonistu nebo naopak.



Obr. 41: Farmakokinetické profily směsí dvou polymorfů chloramfenikolu (A, B)

Rychlost rozpouštění není jediným důležitým parametrem, ve kterém se polymorfy liší. Rozdíly ve velikosti a tvaru krystalů ovlivňují mlecí, tabletovací, filtrovací, sypné a další důležité technologické parametry. Rozdíly nalzáme i v chemické reaktivitě, termální stabilitě, hygroscopicitě, hustotě, tvrdosti atd. (Tab. 12).

Ačkoliv zatím není známo, že by podcenění, resp. zanedbání rozdílných vlastností polymorfů způsobilo neštěstí podobné „conterganové aféře“ v 50. letech 20. století (plodové malformace způsobené podáním racemátu), farmaceutické firmy jsou velmi opatrné.

Na významu nabývá rovněž sledování případných polymorfních přeměn přímo v lékové formě během expirace a studium faktorů, které tuto transformaci mohou vyvolat (např. použití různých technologií při lisování tablet: komprimace v suchém stavu nebo vlhká granulace). Polymorfní transformace léčivé látky v tabletě mohou ovlivnit i přítomné excipienty a jejich vlastní polymorfismus, např. manitol nebo laktóza se mohou vyskytovat v několika krystalových formách, které se liší strukturou i technologickými vlastnostmi.

Např. ritonavir (Norvir®) byl firmou Abbot formulován ve formě kapslí uchovávaných za laboratorní teploty. Původní polymorf označovaný jako I se však začal autokatalyticky přeměňovat na polymorf II, který byl méně rozpustný a biodostupnost

účinné látky se tak podstatně snížila. Deset let byla proto používána jako náhrada gelové kapsle, kterou bylo nezbytné uchovávat při nízké teplotě, a teprve poté se podařilo vyvinout novou lékovou formu, která je stálá i při obvyklých teplotách. Dalším známým případem je Rotigotin, antiparkinsonikum podávané ve formě náplastí. Jeho polymorfismus nebyl původně znám, avšak právě vznik nového polymorfu způsobil snížení jeho absorpce a produkt byl stažen z trhu.

Analytické techniky pro identifikaci a stanovení polymorfů

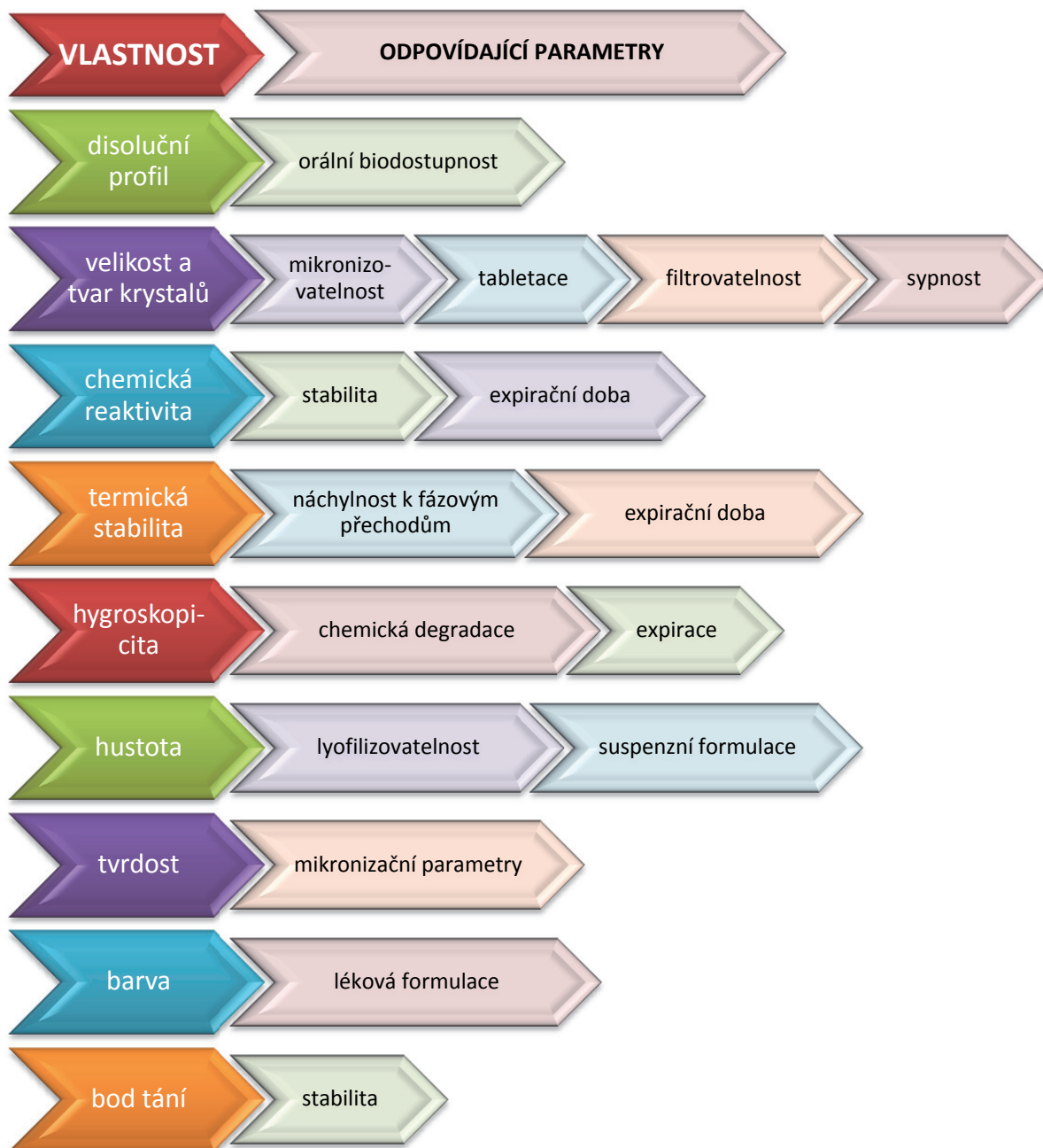
Vzhledem k rozdílům v krystalové struktuře a vlastnostech polymorfů existuje i velký počet analytických technik pro jejich identifikaci, rozlišení a stanovení. Některé jsou velmi citlivé, jiné méně - např. stanovení bodu tání nebo hustoty. Podstatné je však, které analytické techniky jsou uznávány regulačními autoritami. Podle směrnice FDA (Food and Drug Administration) ICH Q6A k nim patří:

- RTG prášková (fázová) analýza
- Spektroskopie pevného stavu (NMR, IČ, Ramanova)
- Termická analýza (TGA, DSC, mikrokolorimetrie)
- Mikroskopie (optická, termooptická, SEM, AFM)
- Mikrometrie (granulometrie, povrch částic, porozita, hustota)
- Stanovení rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti
- Sorpce/desorpce vlhkosti

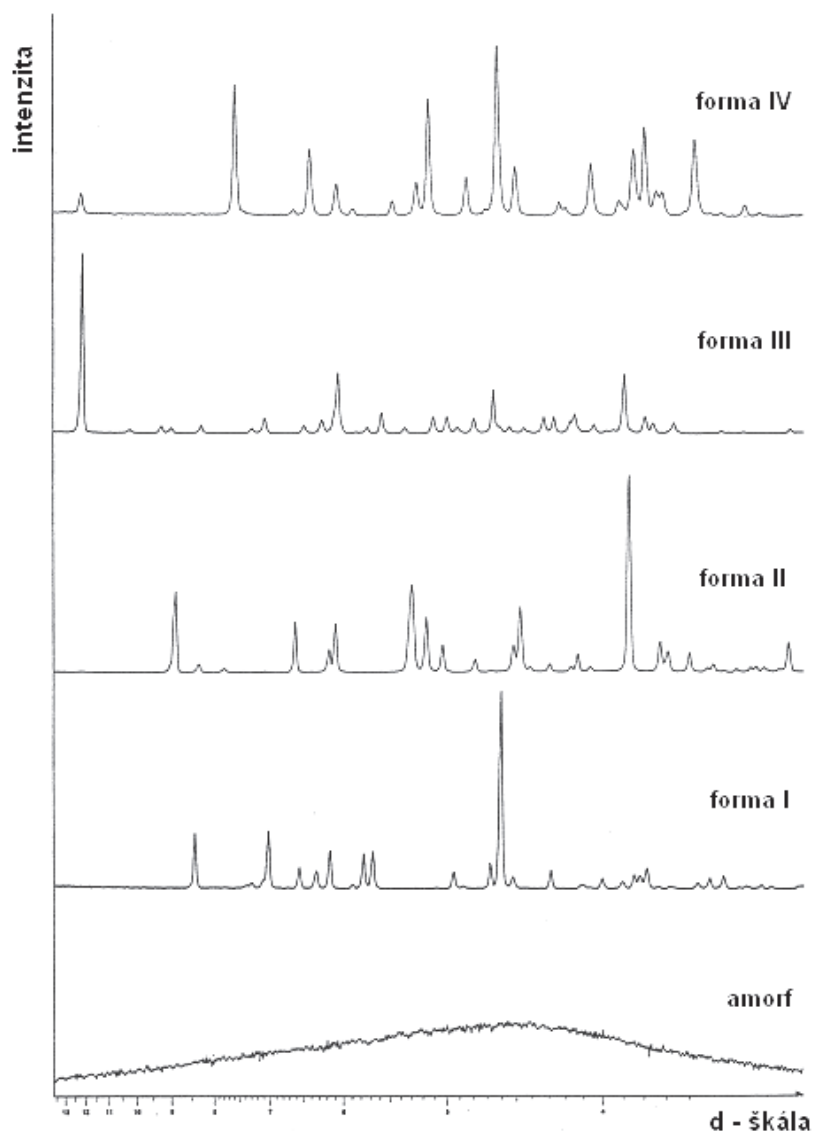
Nejpoužívanější analytickou metodou je RTG prášková analýza. RTG difraktogramy různých pevných forem mají odlišné RTG práškové difraktogramy (Obr. 42). Podobně je tomu i u ostatních metodik. Kromě toho je samozřejmě uznávána i RTG strukturní analýza z monokrystalu. Ovšem primárním produktem farmaceutického průmyslu jsou polykrystalické prášky o zrnitosti 10-50 μm . K rutinní RTG strukturní analýze však potřebujeme monokrystal o velikosti řádově 0,1 mm (výjimečně stačí i okolo 0,01 mm). Vypěstování monokrystalu od určitého polymorfu může být někdy problém. Z výsledků RTG monokrystalové strukturní analýzy je však možné vypočítat teoretický RTG práškový difraktogram a porovnat ho s experimentálně získaným RTG práškovým difraktogramem výrobní šarže. Shoda obou difraktogramů pak dokazuje (monitoruje), že výroba reprodukovatelně produkuje pouze požadovaný polymorf.

Vedle validovaných analytických technik jsou vyvíjeny i jiné postupy. K velmi zajímavým patří metodika tzv. skanovací transiometrie (spojení kalorimetrie a dilatometrie), kdy se kontinuálně mění tlak a/nebo teplota (typické skanovací rychlosti: $T: 8 \times 10^{-4} \text{ K} \cdot \text{s}^{-1}$, $p: 2 \text{ kPa} \cdot \text{s}^{-1}$) a měří se přímo objemové, entalpické a tlakové změny indikující polymorfnní přechody.

Tab. 12: Hlavní vlastnosti, ve kterých se polymorfy liší a jejich dopad na farmakologické a výrobní parametry

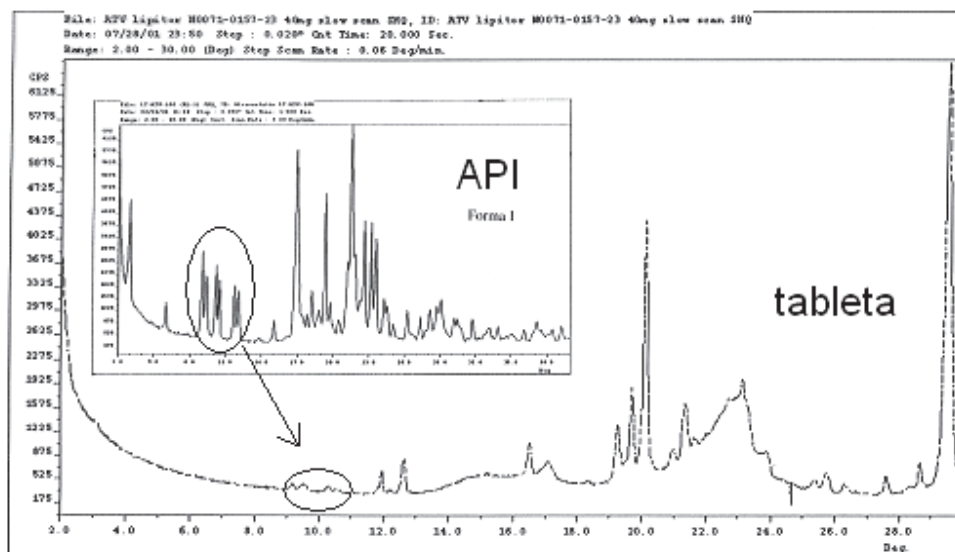


Validované analytické techniky musí, kromě stanovení čisté léčivé látky (API), být schopné stanovit polymorf také v lékové formě – nejčastěji v tabletě. Zde samozřejmě ruší excipienty a pokud není k dispozici v celém spektru (záznamu) vhodné „okno“, ve kterém registrujeme signál pouze od substance a které je pro substanci dostatečně reprezentativní, potom je identifikace a stanovení nemožné (Obr. 42).



Obr. 42: RTG práškové difraktogramy různých pevných forem fananserinu (antidepresivum)

Regulační autority vypisují detekční limity, kterých je nutné dosáhnout při stanovení polymorfů. Ty se samozřejmě stále zpřesňují k vyšší citlivosti. Velmi citlivá je Ramanova spektroskopie, kde se udává detekční limit 0,1% polymorfni čistoty. I RTG prášková analýza byla pro farmaceutické aplikace precizována také k limitu desetín %, ale pouze pro vybrané případy. Např. měřením směsí dvou forem azithromycinu (antibiotikum) o různých koncentracích byl dosažen detekční limit 0,1% formy II vedle formy I. Při stanovení amorfni a krystalické fáze laktosy (excipient) vedle sebe metodou RTG práškové difrakce, byl dosažen detekční limit 1 %.



Obr. 43: RTG difraktogram čistého API (atorvastatin, forma I) a difraktogram její léčivé formy (Sortis[®], Pfizer). Příslušné registrační okno je znázorněno oválem. Ostatní difrakční linie API jsou v tabletě překryty difrakcemi excipientů nebo pozadím

Zajímavou metodikou pro „screening“ a identifikaci polymorfů je kapilární technika při RTG práškové difrakci. Tímto uspořádáním experimentu je možné monitorovat polymorfni přeměny v jedné kapiláře a měřit charakteristiky polymorfů *in situ*.

6.2 Polymorfy v léčivých formách

Finální léčivá formulace musí být sestavena s ohledem na zvolený polymorf. Jestliže je zvolen nestabilní polymorf, pak má během výroby léčivé formy i během expirace (např. v tabletě) tendenci přecházet na nejstabilnější polymorf. Při mokré granulaci hrozí přechod na stabilnější hydrát, při tabletaci může dojít k polymorfni přechodu vlivem vloženého tlaku, při zvýšené teplotě (sušení) hrozí desolvatace atd. Solvatační a desolvatační procesy mění velikost částic, což také ovlivní biodostupnost. Polymorfni přeměnu mohou „katalyzovat“ i excipienty, které mohou být rovněž polymorfni. Protože polymorfni transformace může dramaticky změnit vlastnosti výsledného léčivého přípravku, je proto velmi důležité, aby v hotové formulaci byla monitorována polymorfni čistota.

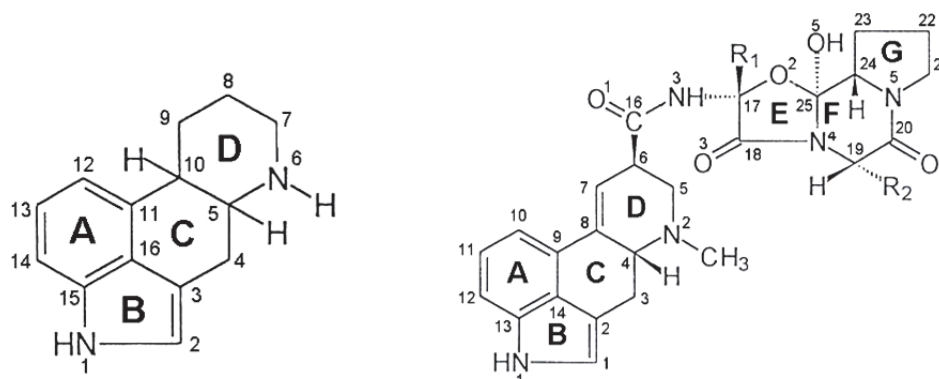
Metastabilní a amorfní formy musí být v léčivé formulaci stabilizovány přidávkem stabilizátorů pro dosažení srovnatelné expirace s nejstabilnější formou. Taková stabilizace může být dosažena vytvořením pevné disperze API ve vhodném polymeru, např. v polyvinylpyrrolidonu (PVP) nebo v kyselině polyakrylové (PAA). Tyto polymery mají schopnost inhibovat krystalizaci amorfního acetaminofenu (paracetamolu). Stabilizační efekt spočívá jednak v chemické interakci API s polymerem a potom v antiplastickému efektu polymeru. Fázový přechod je totiž spojen s plastickou deformací materiálu.

6.3 Příklady polymorfních a solvatomorfních systémů

Námelové alkaloidy

Přírodních námelových alkaloidů je popsáno více než 80 a jejich semisyntetických derivátů okolo 300. Vznikají jako sekundární metabolity houby *Claviceps purpurea* parazitující na žitě. Většina z nich vykazuje výraznou biologickou aktivitu. Zjednodušeně je lze rozdělit na nepeptidické a peptidické. Nepeptidické alkaloidy zahrnují klaviny a deriváty kyseliny lysergové, peptidické alkaloidy tvoří majoritně ergopeptiny, minoritně ergopeptamy (biologicky neaktivní). Hydrogenací dvojně vazby C7 = C8 u přirozených ergopeptinů se syntetizují jejich deriváty – dihydroergopeptiny. Změnou konfigurace na C6 u přírodních ergopeptinů vznikají biologicky neaktivní ergopeptiny (deriváty isolysergové kyseliny)

Pro námelové alkaloidy je charakteristický tetracyklický ergolinový (resp. ergolenový) skelet, tvořený kruhy A, B, C, D. Peptidické alkaloidy obsahují navíc tripeptidickou skupinu, vázanou k ergolinu (ergolenu) resp. k lysergové kyselině amidickou vazbou.



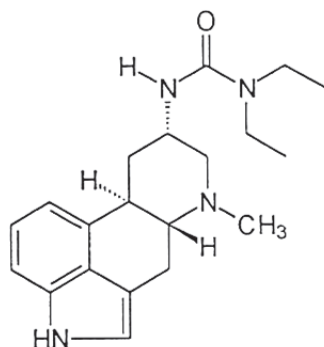
Obr. 44: Vlevo: číslování ergolinového skeletu a značení kruhů (skelet obsahující dvojnou vazbu v poloze 8,9 je $\Delta^{8,9}$ -ergolen a v poloze 9,10 $\Delta^{9,10}$ -ergolen). Vpravo: číslování ergopeptinů a značení kruhů (R_1 = methyl, ethyl, isopropyl; R_2 = benzyl, isopropyl, isobutyl, *sec*-butyl)

Nepetidický námelový alkaloid tergurid

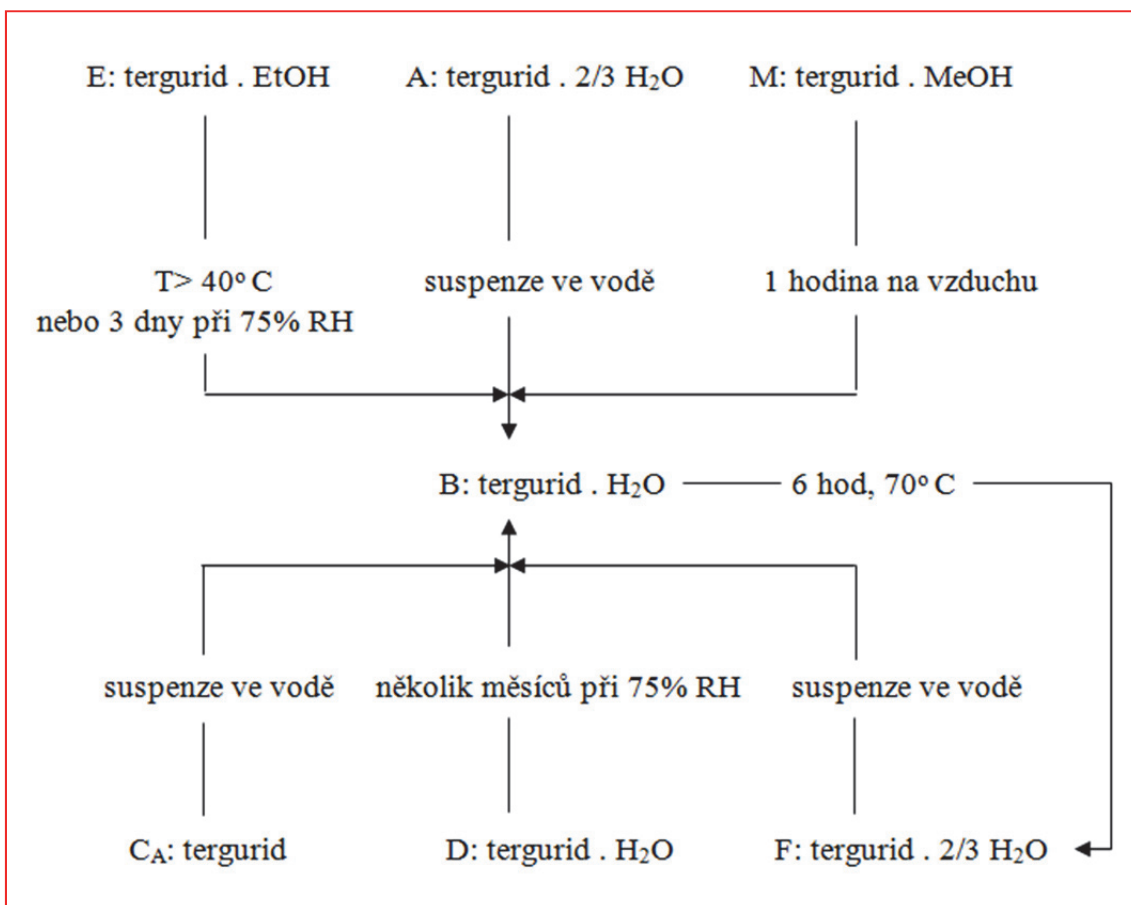
Semisyntetický derivát tergurid působí jako dopaminový agonista a v terapii se používá jako antiparkinsonikum a inhibitor prolaktinu. Vyrábí se katalytickou hydrogenací lisuridu nebo redukcí lisuridu lithiem v kapalném amoniaku. Tři chirální centra na atomech C5, C8 a C10 vedou k existenci 8 možných stereomerů, tvořících 4 enantiomerní páry. Terapeuticky je používán výhradně isomer 5*R*,8*S*,10*R*, zkráceně nazývaný *trans*-D-tergurid podle postavení vodíků H5 a H10. Pevná léková forma volné báze je prodávána pod obchodním názvem Teluron[®] (Schering).

Polymorfismus *trans*-D-terguridové (dále jen terguridové) molekuly zahrnuje 7 forem: dva monohydráty (označované B a D), dva dvoutřetinové hydráty (A a F), jednu bezvodou formu (C_A) a dva solváty: ethanol solvát a methanol solvát (E a M). Transformační schéma je uvedeno na Obr. 46.

Nejstabilnější formou je sice B, ale pro výrobu Teluronu[®] se používá bezvodá forma C_A. Krystalizace bezvodé formy a jednotlivých hydrátů je velmi přísně podmíněna obsahem vody ve finálním rozpouštědle. Methanol a ethanol solváty krystalují z příslušných bezvodých alkoholů.



Obr. 45: *trans*-D-tergurid



Obr. 46: Transformační schéma terguridových forem (RH-relative humidity)

Otázky:

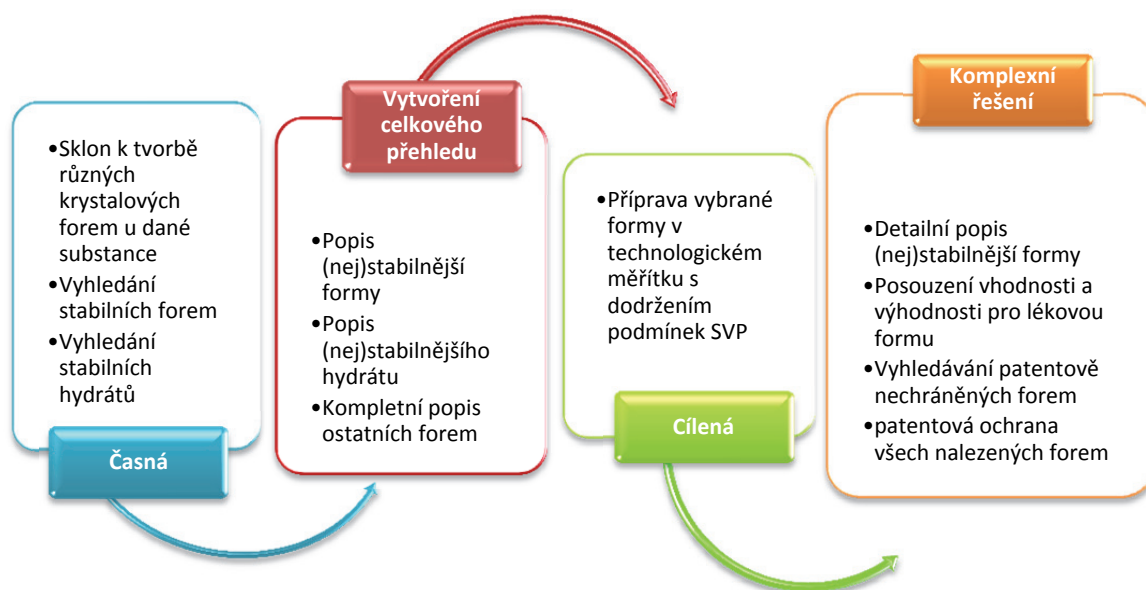
Vysvětlete pojmy polymorfismus a polymorf.

Jaké vlastnosti má enantiotropní polymorf?

Uveďte 3 příklady látek, které jsou monotropními polymorfy a 3 příklady enantiotropního polymorfismu.

7. ANHYDRÁTY (ANSOLVÁTY), HYDRÁTY (SOLVÁTY), SOLI, KOKRYSTALY, AMORFNÍ FORMY

Vývoj pevného léčiva je komplexní proces, který zahrnuje paralelní testování a optimalizaci řady parametrů. Především aktivitu vůči specifickému receptoru, orální absorpci, minimalizaci nežádoucích účinků, robustnost a reprodukovatelnost výroby, stabilitu atd. V určitém stupni vývoje originálního, ale i generického léčiva se farmaceutická firma musí rozhodnout, jakou pevnou API vybere pro svoji lékovou formulaci (drug candidate). V úvahu přichází 4 základní fyzikální a chemické typy: **anhydrát (ansolvát), hydrát (solvát), sůl, kokrystal**, které všechny mohou být navíc polymorfní. V tom případě musí být vybrán ještě optimální polymorf. Kromě krystalických fází lze léčivé přípravky formulovat také z amorfních API. Originální firma se většinou snaží vybrat stabilní krystalickou fázi aktivní molekuly, u které nehrozí fázové transformace. Optimální je stabilní anhydrát. Pokud anhydrát z nějakého důvodu nelze použít (např. nízká stabilita, rozpustnost nebo patentová kolize), hledají se stabilní fáze ostatních typů. Výběru vhodné pevné formy musí být věnována pozornost již od začátku vývoje nového léčiva (Obr. 47).



Obr. 47: Schéma vývoje vhodné pevné aktivní substance

Velmi častou volbou pro formulaci je sůl, protože soli vykazují obecně vyšší rozpustnost v polárních rozpouštědlech. Volba soli však na druhé straně znamená, že do formulace se zavádí další chemikálie (u solí partnerský protiion a u kokryсталů kokryсталizační partner).

Když je stabilní fáze patentově chráněna originální firmou, tak generické firmy často volí pro formulace méně stabilní, ale stálé fáze. Z patentového hlediska je důležité, že některé pevné formy určité molekuly mohou být patentově kolizní a jiné nikoliv. Volbou nestabilní fáze samozřejmě vzniká riziko nežádoucích fázových přechodů během výroby léčiva nebo při jeho skladování. Tyto fázové přechody zahrnují transformace typu:

- méně stabilní polymorf → stabilní polymorf
- nestabilní anhydrát → stabilní hydrát
- nestabilní hydrát → amorf
- amorfát (semikrystal) → stabilní krystalická fáze

Je důležité ještě jednou připomenout, že jev polymorfismu se netýká pouze anhydrátů a hydrátů, ale také solí a kokrystalů, které jsou často navíc ještě hydratovány (solvatovány).

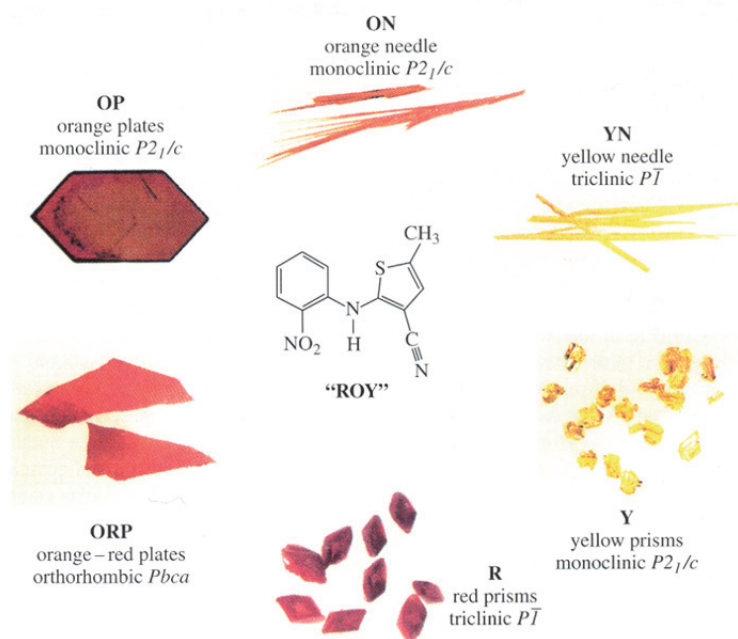
V následujících podkapitolách budou probrány jednotlivé typy API pro pevné lékové formulace.

7.1 Anhydráty (ansolváty)

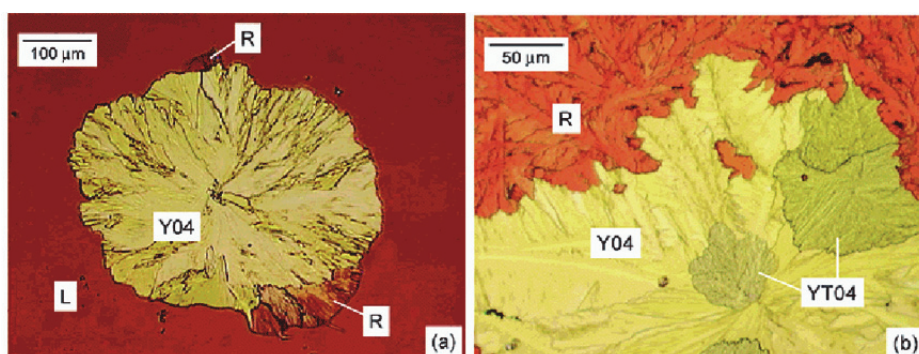
Stabilní anhydrát, který navíc splňuje všechna další chemická, fyzikální, biologická a technologická kritéria pro „drug candidate“ je optimální volba API. Situaci však může komplikovat příp. čistý polymorfismus. Některé čisté polymorfy jsou výhodně připravenelné (a někdy je to jediná možnost) desolvatací vhodných solvátů.

Systémy zahrnující pouze čisté polymorfy jsou někdy velmi komplikované. Rekordmanem je sloučenina 5-methyl-2-[(2-nitrofenyl)amino]-3-thiofenkarbonitril, intermediát olanzapinu, triviálně nazvaná ROY (Red-Orange-Yellow). U ROYe bylo původně publikováno 6 čistých makroskopických polymorfů (Obr. 48), které byly posléze doplněny o 2 další mikroskopické polymorfy (Y04 a YT04, Obr. 49), takže výsledkem je impozantní oktamorfismus.

Oktamorfismus je ovšem kuriozitou, nejčastějším případem je dimorfismus (90,7%), následuje trimorfismus (8,4%), tetramorfismus (0,9%), pentamorfismus (0,1%).

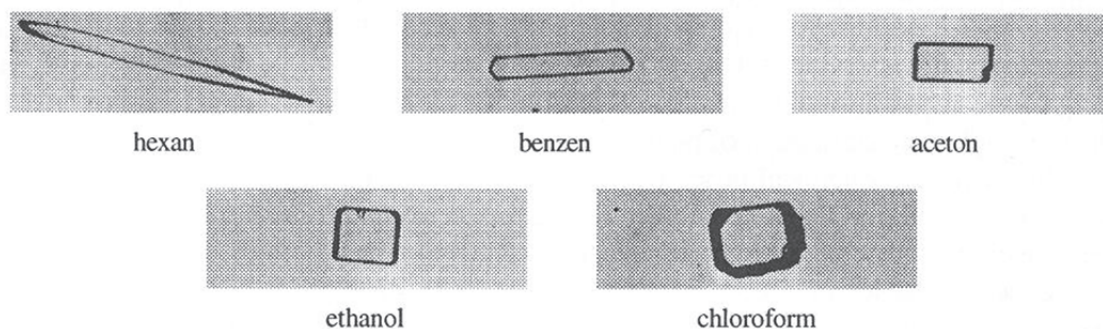


Obr. 48: Šest polymorfů sloučeniny 5-methyl-2-[(2-nitrofenyl)amino]-3-thiofenkarbonitril, intermediát olanzapinu, triviálně nazývané ROY



Obr. 49: Sedmý a osmý mikroskopický polymorf ROY

Z hlediska technologických procesů (mikronizace, granulace, tabletaže) je u krystalických forem důležité v jakém krystalovém tvaru (habitu) API vykristalují. Polymorfy, hydráty nebo solváty od určité molekuly se liší svojí krystalovou strukturou, což se navenek může projevit i v markantně různém krystalovém tvaru. Je velký rozdíl, mikronizujeme-li např. lístkovité krystalky nebo krystalky tvaru hranolů. U lístků je to samozřejmě komplikovanější, protože mají tendenci se „lepít“ na stěny mikronizátoru, hranolovité krystalky jsou daleko výhodnější. Ovlivnit krystalový tvar i beze změny struktury je možné, a sice volbou finálního rozpouštědla při krystalizaci. Např. kyselina acetylsalicylová (Aspirin[®]) krystalizuje v různých tvarech z různých rozpouštědel (Obr. 50), aniž rozpouštědlo vstoupí do krystalové struktury (nejedná se tudíž o solvatomorfismus, ale o krystalový desing).



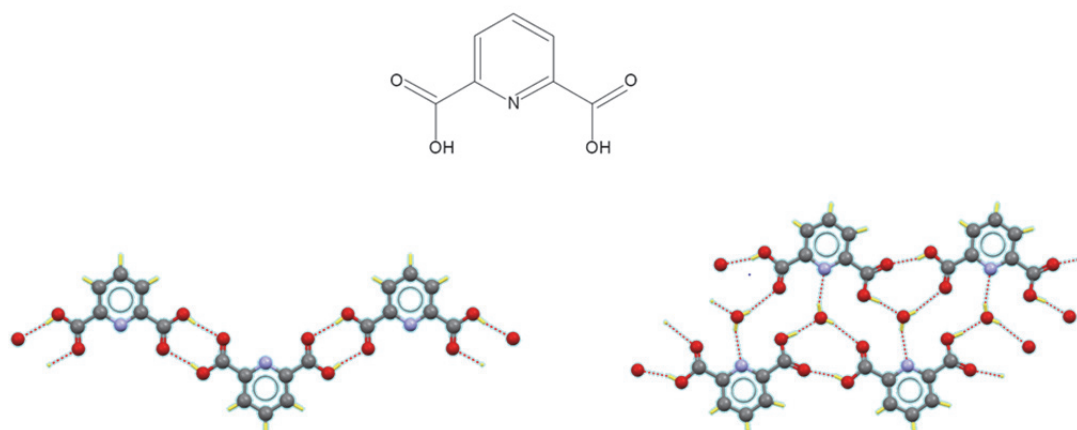
Obr. 50: Různé tvary acetylsalicylové kyseliny krystalované z různých rozpouštědel (převzato z Byrn R. S., Pfeiffer R. R., Stowell G.J.: Solid-State Chemistry of Drugs, 2nd ed. SSCI, Inc. West Lafayette, Indiana 1999).

7.2 Solváty (hydráty)

U solvátů vykazuje molekula různý stupeň solvatace. Nejrozšířenějšími solváty jsou **hydráty**. Analogicky k polymorfům se vyskytují také pojmy solvatomorfy (či pseudopolymorfy), které lze ovšem považovat za ekvivalentní solvátům.

Mnoho farmaceuticky zajímavých molekul disponuje jak protonovými donory, tak akceptory. Jejich zapojení do systému H-vazeb formulovala M. Etterová (viz str. 43).

Pokud v krystalové struktuře nejsou všechny dobré donory a akceptory zapojeny do systému H-vazeb, potom se systém snaží zapojit i molekuly solventu (rozpouštědla). Příkladem je anhydrát a monohdrát kyseliny dipikolinové, kde stabilnější fází je právě monohdrát (Obr. 51), protože v anhydrátu nejsou do systému H-vazeb zapojeny všechny dobré donory a akceptory protonu.



Obr. 51: Anhydrát kyseliny dipikolinové (vlevo, kde není do systému H-vazeb zapojen pyridinový dusík) a její monohdrát (vpravo)

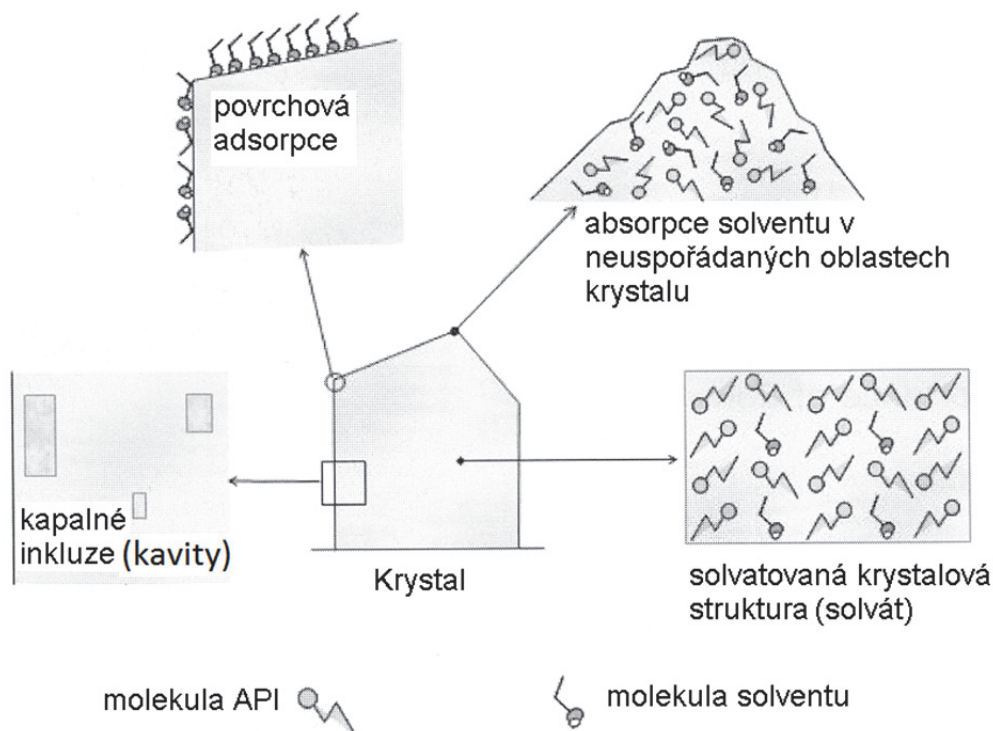
Snaha struktury se více stabilizovat vede při krystalizaci k „vychytání“ zbytkových molekul vody v solventu a tvorbě stabilních hydrátů (např. vychytání zbytkových molekul vody z acetonu při krystalizaci dvoutřetinového hydrátu terguridu).

Některé molekuly disponují možností vytvářet s různými solventy velké množství solvátů. Např. u sulfatiazolu je popsáno 5 čistých polymorfů a přes 100 solvátů.

Ze solvátů jsou farmaceuticky obvykle přijatelné pouze hydráty a ethanol solváty (např. atorvastatin vápenatý ethanol solvát nebo indinavir sulfát ethanol solvát), ale u farmaceutických účinných substancí používaných ve velmi malém množství byly schváleny i další typy solvátů. Význam solvátů spočívá především v tom, že jsou důležitými prekuzory pro jinak obtížně dostupné polymorfy ansolvátů. Ty se připravují právě desolvatací solvátů (např. cabergolin forma I). Desolvatací dvou různých solvátů lze také získat fáze různých vlastností. Např. stabilním hydrátem dihydroergocristinu mesylátu je monohdrát, který je ovšem velmi málo rozpustný. Jeho rozpustnost lze podstatně zvýšit, pokud ho připravíme desolvatací dihydroergocristinu mesylátu monohdrátu bis(ethylacetát) solvátu, tzn. odstraněním ethylacetátu.

V mnoha procesech výroby je API vystavena vlivu solventů nebo solventových par. Když organický solvent nemůže být z finálního produktu beze zbytku odstráněn vhodnou sušicí procedurou, hovoříme o „zbytkových rozpouštědlech“, které jsou obecně považovány za nečistoty. Podrobnosti jsou uvedeny v již zmíněné směrnici ICH Q3C vydané Evropskou medicínskou agenturou na základě doporučení ICH (International Conference of Harmonization).

Solvent může být vázán v pevné látce několika způsoby (Obr. 51). První způsob je navázání solventu na povrch API slabými fyzikálními interakcemi (adsorpce). Takto navázaný solvent je odstranitelný sušením. Vzhledem k anisotropii fyzikálních vlastností krystalu má každá krystalová plocha vůči adsorpci solventu jinou afinitu. Dalším způsobem je navázání solventu do krystalu při jeho růstu ve formě mikroskopických kapalných inkluzí. Tyto kavity obsahují kromě solventu i jiné nečistoty matečného louhu. Obsah solventu v inkluzích je obvykle <0,5%. Solvent uzavřený v kavitách není sušením snadno odstranitelný. Vyšší obsahy solventu se zachycují (absorbují) v lokalizovaných neuspořádaných (amorfních) oblastech nebo defektech krystalové struktury, které vznikají při mechanických procesech (mletí, granulace). Když jsou molekuly solventu pravidelně navázány na molekuly aktivní substance (VdW síly, H-vazby) a stabilizují krystalovou strukturu, tak se jedná o **stechiometrický solvát**. V **nestechiometrickém solvátu** jsou molekuly solventu ve struktuře API umístěny velmi volně v kavitách.



Obr. 52: Způsoby zachycení zbytkového rozpouštědla v krystalu API

Obecně patří solváty mezi tzv. multikomponentní sloučeniny. Méně často se též můžeme setkat s označením klatráty. Klatráty jsou však strukturální klece, které mohou další molekulu uzavírat. Nejdůležitější mezi solváty jsou hydráty a ve farmacii se často používají. Molekuly vody se ve struktuře hydrátu často zapojují do systému H-vazeb. Obrazně řečeno: molekuly vody působí v hydrátu jako lepidlo pro molekuly API.

Stechiometrické solváty jsou molekulární sloučeniny, přičemž v jejich vzorci je přesně vyjádřen poměr zastoupení obou složek. Např. na jednu molekulu aktivní substance připadá ve struktuře jedna, dvě, tři a více molekul solventu. Existují však i případy, kdy na jednu molekulu aktivní substance formálně připadá necelý počet molekul solventu. Např. ve dvoutřetinovém solvátu to znamená, že na jednu aktivní molekulu připadají $2/3$ molekuly solventu neboli na 3 aktivní molekuly 2 molekuly solventu. Molekuly solventu se zapojují do systému slabých interakcí. Desolvatace stechiometrického solvátu vždy vede buď k jiné krystalické fázi (polymorfu, desolvatovaný solvát), nebo k neuspořádané amorfní fázi. Desolvatovaný solvát je ovšem velmi choulostivý ve srovnání se stejnou fází (polymorfem) připraveným jiným způsobem. Nejpoužívanějšími hydráty jsou monohydráty. Vyšší hydráty: di-, tri-, semi- jsou daleko méně časté.

Nestechiometrické solváty jsou hůře definovatelné. Jsou to nejspíše intersticiální tuhé roztoky. Krystalová struktura je vybudována z molekul API a v dutinách (kavitách) této struktury jsou zachyceny molekuly solventu, které se nezúčastní slabých interakcí s molekulami API. Zachycené množství solventu závisí na jeho parciálním tlaku a na teplotě. Typickými nestechiometrickými solváty jsou nanotrubičky, které v kanálcích obsahují neuspořádané molekuly solventu. Pro nestechiometrické solváty jsou typické desetinné poměry mezi aktivní a solvatující molekulou, např. 1 : 0,88 apod.

Nestechiometrické hydráty se pro formulaci téměř nepoužívají. Důvodem je např. i skutečnost, že velmi slabě v nich vázaná voda („free water“) může reagovat snadno s excipienty.

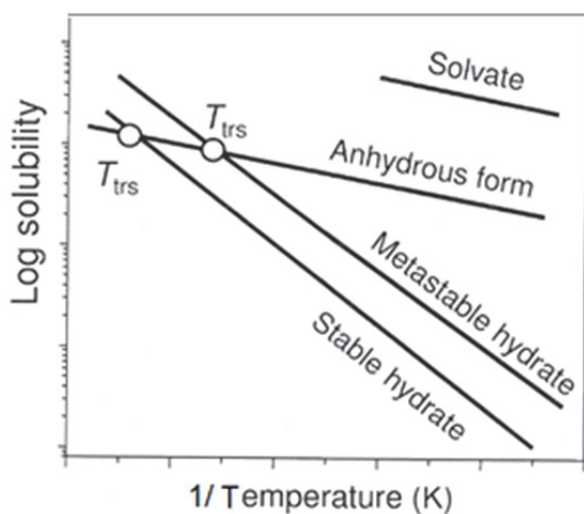
Desolvatace stechiometrického solvátu je téměř vždy spojena se změnou krystalové struktury, zatímco při desolvataci nestechiometrického solvátu může struktura zůstat zachována.

Screening solvátů je součástí celkového polymorfního screeningu API. V technologii API je nutné uvažovat i vznik nežádoucích hydrátů např. při vlhké granulaci. Také při lyofilizaci může dojít ke vzniku neobvyklých solvátů, např. fenobarbital dioxan solvát. Hydráty, příp. solváty mohou také snadno vzniknout ve vodných (a jiných) suspenzích nebo při expozici API vodními parami fázovou transformací. Vzhledem k tomu, že solvent (voda) drží v solvátu slabými interakcemi, je nutné solváty uchovávat za citlivých podmínek (suchá atmosféra, parciální tlak, přesná teplota).

Při pozorování desolvatace (dehydratace) se původně transparentní krystalický materiál vizuálně zakalí do běla vlivem velmi rozsáhlé povrchové nukleace nové fáze (pseudomorfóza).

Inspekce databáze Cambridge Structural Database ukazuje, že daleko nejčastějším solventem je voda, následovaná dichlormethanem, methanolem, benzenem, acetonitrilem, toluenem, tetrahydrofuranem, ethanolem a acetonem. Je zřejmé, že databáze CSD se týká všech organických látek, jejichž struktura byla vyřešena difrakčními metodami, zatímco kdyby databáze zahrnovala pouze farmaceuticky účinné substance, pořadí solventů by bylo dozajista jiné.

Solváty se většinou stabilizují s klesající teplotou. Někdy však může být hydrát stabilní fází v systému (např. tergurid monohydrát). Stabilita solvátů se studuje teplotními metodami (TG, DTA, DSC), které umožní nalézt teploty transformace, T_{trs} metastabilního nebo stabilního hydrátu na anhydrát (Obr. 53).



Obr. 53: Schematické znázornění přechodu hydrátů na anhydrát

Stechiometrické hydráty uvolňují molekuly vody do 120 °C, zatímco rozklad organické fáze nastává až po 150 °C. Tzn. desolvatací solvátu (hydrátu) vznikne jiná fáze téže aktivní molekuly. Proto jsou obecně anhydráty (ansolváty) stabilnější, ale není tomu tak vždy (viz např. tergurid monohydrát).

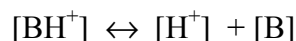
Na druhé straně mohou být solváty velmi odolné vůči degradaci. Nestechiometrický prednisolon *terc*-butylacetát solvát obsahuje v kanálech struktury molekuly solventu, které zabraňují přístupu (penetraci) vzduchu, a tak je zabráněno vzniku oxidačních, resp. hydratačních produktů.

V preformulačním stadiu může být zvolen hydrát jako API. Důvodem je např., že je lépe rozpustný než anhydrát nebo má lepší schopnost tablety a tablety se lépe a rychleji rozpouští. Solváty se prakticky pro formulaci nepoužívají, jejich hlavní význam spočívá v tom, že mohou být prekursorem, jinak těžko krystalizovatelného polymorfu, který se získá jejich desolvatací (např. cabergolin, forma II).

7.3 Soli

Asi 2/3 používaných substancí ve farmacii jsou slabé elektrolyty, které jsou schopné vytvářet **soli**. Sůl obsahuje aktivní substanci v ionizované formě, ale s jinými a často lepšími farmakokinetickými parametry. Např. viskózní kapalný skopolamin (báze) tvoří krystalický hydrobromid nebo kapalná kyselina valproová vytváří pevnou sodnou a hořečnatou sůl. Nutným předpokladem pro tvorbu solí je přítomnost ionizovatelných skupin v aktivní molekule (např. amid nebo karboxyl).

Soli jsou přítomné v roztoku zčásti ve formě iontů. Ionty jsou hydratovány, a proto jsou obecně ve vodě rozpustnější než neionizované molekuly. Na protonizovanou bázi $[BH^+]$ můžeme nahlížet jako na kyselinu a její rozklad popsat disociační rovnicí:



Pro dekadické logaritmy disociačních konstant platí:

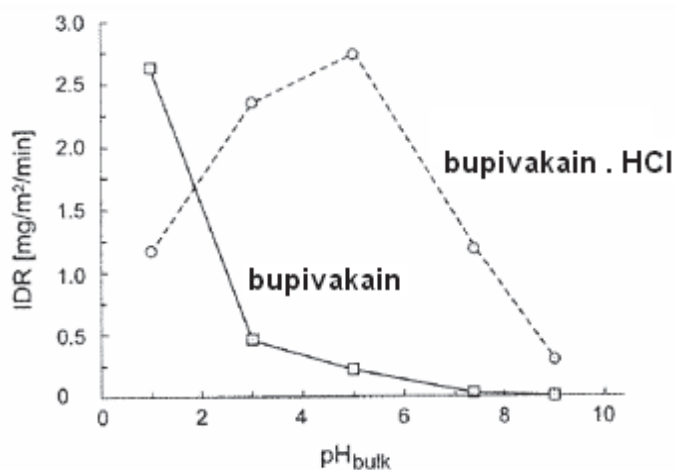
$$pK_a + pK_b = 14,$$

takže sílu kyselin a bází můžeme vyjádřit pouze hodnotou konstanty pK_a (Tab. 13).

Tab. 13: Síla kyselin a zásad

Slovní vyjádření	Kyselina, pK_a	Zásada, pK_a
Velmi silná	< 0	>14
Silná	0 – 4,5	9,5 – 14
Slabá	4,5 – 9,5	4,5 – 9,5
Velmi slabá	9,5 – 14	0 – 4,5
Extrémně slabá	>14	< 0

Ve farmácii používáme pro formulaci jak soli slabých kyselin a silných zásad, tak soli silných kyselin a slabých zásad. Důležité je, že každá sůl vykazuje maximální rozpustnost při určité hodnotě pH (pH_{max}). Proto je výhodné korelovat pH_{max} s pH finálního místa gastrointestinálního traktu, kde dochází k absorpci léčiva, viz příklad na Obr. 54.

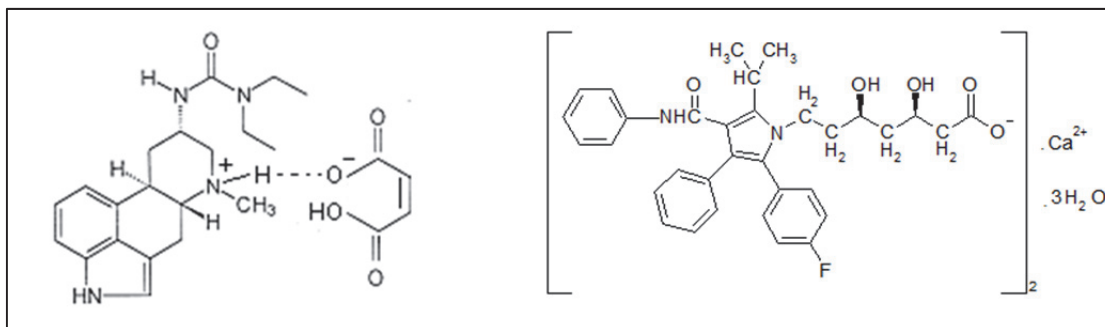


Obr. 54: Příklad rozpustnosti v závislosti na pH. Hodnota pH žaludku je 1 – 3 a pH v tenkém střevě je 5 – 7. Bupivakain.HCl má hodnotu $\text{pH}_{\text{max}} = 5$
– převzato z Shah J.C., Maniar J.J.: J. Contr. Rel. 23, 261 (1993)

Okolo 50 % dnešních léčivých přípravků je formulováno ze solí. Důvodem je fakt, že na rozdíl od volných bází mají soli obecně lepší rozpustnost ve vodě. To proto, že ve vodě jsou dobře ionizovatelné. Kromě toho sůl, která je výborně rozpustná ve vodě, se dobře hodí i pro injekční podávání. Na druhé straně ovšem vynikající rozpustnost ve vodě znamená, že se léčivo v organismu snadno difúzně rozptýluje a penetruje biologickými membránami a následkem toho je méně specifické co do místa účinku a také se rychleji vylučuje z těla.

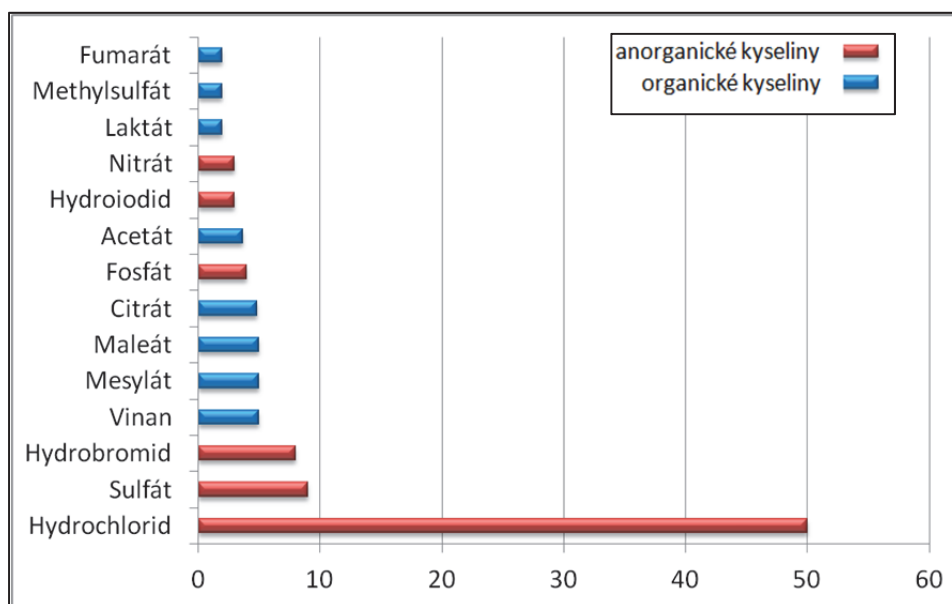
Převedením báze nebo kyseliny na sůl lze také např. zredukovat počet polymorfů, redukovat hygroskopicitu, zlepšit sypnost práškovitého stavu atd. V neposlední řadě může být formulace ze soli pro generickou firmu jedna z možností, jak se vyhnout patentové kolizi s dalšími výrobci.

Aktivní farmaceutická molekula tak může v soli vystupovat ve formě kationtu (asi v 75 % všech používaných solí) nebo aniontu (asi v 25 % všech používaných solí, příklady na Obr. 55). Pro použitelnost partnerského kationtu a aniontu (protiiontu) platí požadavek jejich farmaceutické přijatelnosti. Tomu dnes vyhovuje 69 aniontů a 21 kationtů (Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, selection and use. (Stahl P. H. & Wermuth C.G., Eds). Wiley/VCH/VHCA, Weinheim/Zürich 2002.).



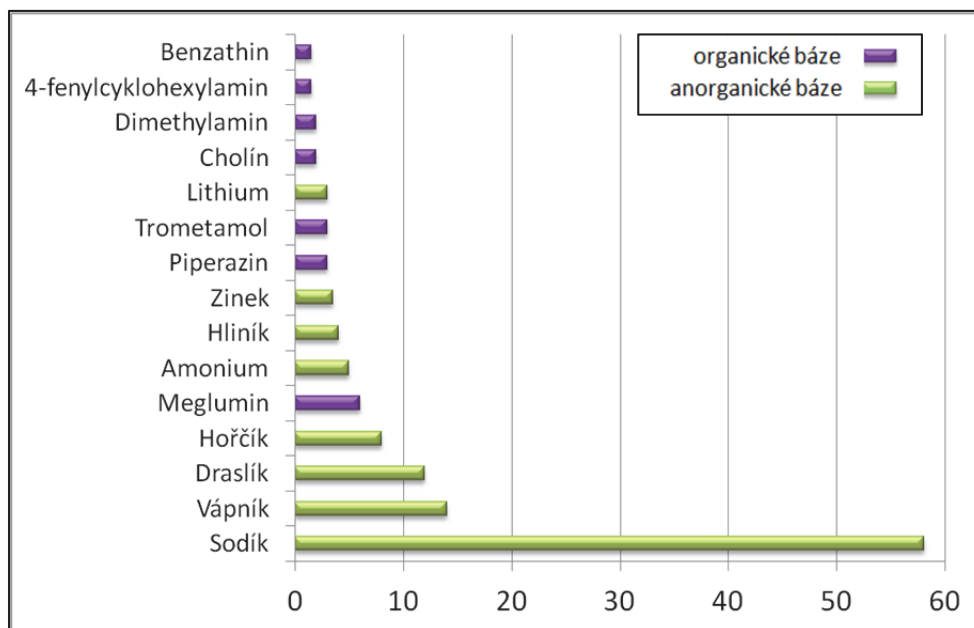
Obr. 55: Tergurid hydrogenmaleinát (vlevo), atorvastatin vápenatý trihydrát (vpravo)

Nejfrekventovanějším partnerským aniontem je hydrochlorid (např. *codeini hydrochloridum dihydricum*, *ephedrini hydrochloridum* a mnoho dalších), nejfrekventovanějším partnerským kationtem je ion sodný (např. *diclofenacum natrium* aj.). Protože sodné soli jsou většinou výborně rozpustné, používají se často v injekčních aplikacích. Přehled dalších používaných protiiontů, z hlediska jejich četnosti, je uveden v grafech na Obr. 56 a Obr. 57.

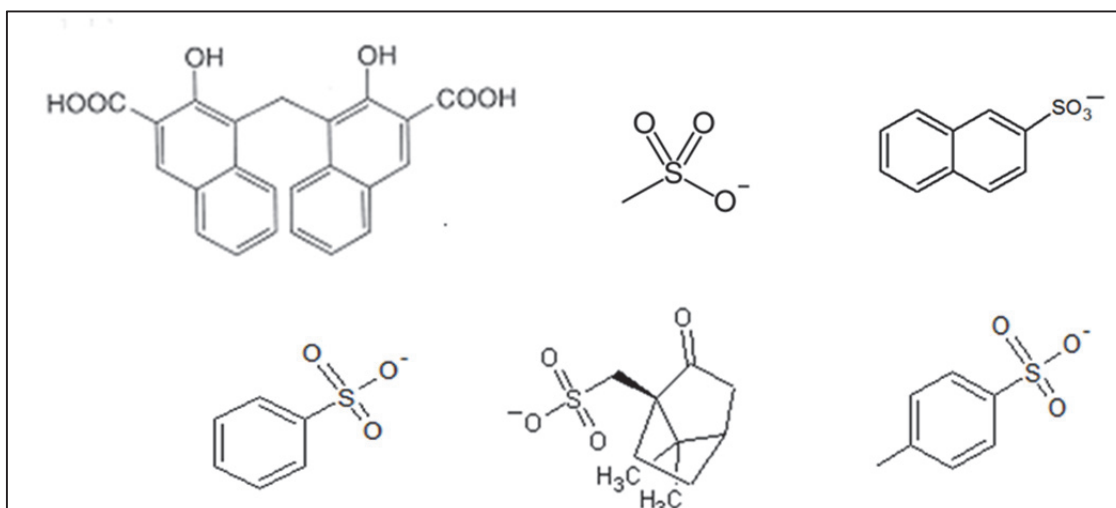


Obr. 56: Četnost výskytu protiiontů při tvorbě farmaceutických solí v %

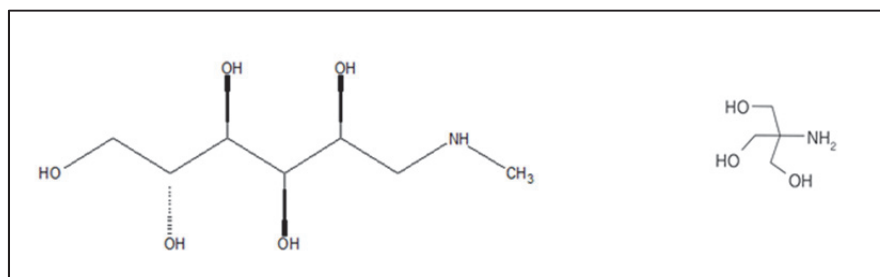
Méně obvyklý je anion methylsulfát $(\text{CH}_3)\text{SO}_4^{2-}$ (pozor, neplést s mesylátem). Velmi oblíbené jsou organosulfonáty: methansulfonáty (mesyláty), naftalensulfonáty (napsyláty), paratoluensulfonáty (tosyláty), benzensulfonáty (besyláty) a kafrsulfonáty (kamsyláty), viz Obr. 58. Z protikationtů je méně obvyklý meglumin a tromethamin (Obr. 59).



Obr. 57: Četnost výskytu protikationtů při tvorbě farmaceutických solí v %



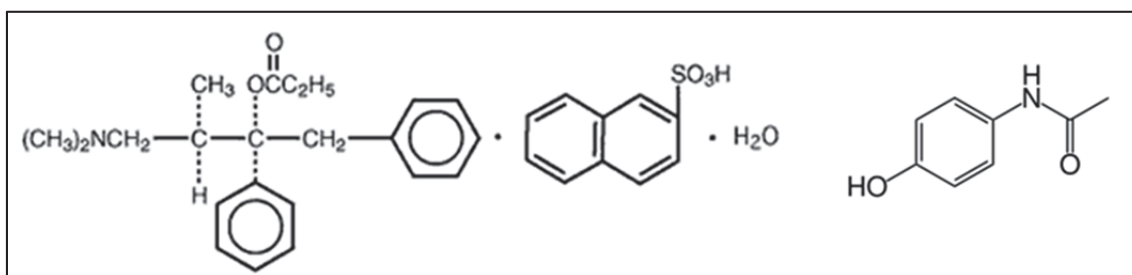
Obr. 58: Postupně zleva: k. pamoová (embonová), mesylát, napsylát, besylát, kamsylát a tosylát



Obr. 59: Zleva meglumin a tromethamin

Řada používaných solí pro formulace je hydratovaných (např. *atorvastatinum calcicum trihydricum*) a navíc může být i polymorfní.

Farmaceutické formulace občas obsahují více než jednu léčivou látku. V tomto případě je nutné uvažovat možné vzájemné interakce léčivých látek v léčivém přípravku. Např. analgetikum propoxyfen bylo původně formulováno jako propoxyfen hydrochlorid. V kombinaci s aspirinem se však propoxyfen hydrochlorid snadno rozkládal a byl nestabilní. Teprve po přeformulování na propoxyfen napsylát se systém stabilizoval. Kromě toho propoxyfen napsylát má ve srovnání s propoxyfenem hydrochloridem poloviční orální toxicitu, jak bylo zjištěno na krysách a myších, a delší dobu účinku (jiný farmakokinetický profil). Dnes se používá směs propoxyfen napsylát monohydrát + acetaminofen (paracetamol), kterou obsahuje léčivý přípravek Darvocet (Eli Lilly), Obr. 60. Ten má vyšší stabilitu, nižší toxicitu a delší dobu účinku než původní formulace. Dalším příkladem směsi dvou API je léčivo Caduet (Pfizer): *amlodipini besylas* + *atorvastatinum calcicum trihydricum*. Další příklady jsou uvedeny v Tab. 14.



Obr. 60: Propoxyfen napsylát monohydrát + acetaminofen (paracetamol)

Převedením báze na sůl lze někdy obejít problém komplikovaného polymorfního chování báze. Např. námelový alkaloid tergurid jako báze krystaluje v 7 formách (anhydrát, 2 monohydráty, 2 dvoutřetinové hydráty, methanol solvát a ethanol solvát). Převedením báze na sůl získáme monomorfní tergurid hydrogen maleinát - Mysalfon®, Teva.

Ovšem ne vždy lze z cizojazyčného (anglického, latinského) názvu aktivní substance jednoznačně poznat zda se skutečně jedná o sůl či nikoli. Je to dáno rozdílností v chemickém názvosloví. Tak například abiraterone acetate, steroidní léčivo s antiandrogenním účinkem používané při rakovině prostaty není octanem abirateronu, ale acetát tvoří ester s OH skupinou abirateronu, který je vlastně proléčivem, a právě hydrolýza esteru v organismu vede k aktivní formě léčiva. Podobně i většina ostatních názvů steroidních léčiv v sobě skrývá názvoslovný chyták, a jména fluticasone propionate, fluticasone furoate, estradiol valerate, estradiol sulphate apod., reprezentují kovalentní estery a nikoli soli příslušných kyselin. V případě názvu codeine resinate se rovněž nejedná o binární stechiometrickou sůl, ale teprve podrobnější znalost technologie přípravy by odhalila, že se jedná o léčivo s prodlouženým účinkem připravené iontovou výměnou s ionexovou pryskyřicí.

Tab. 14: Příklady léčivých přípravků obsahujících více než jednu API

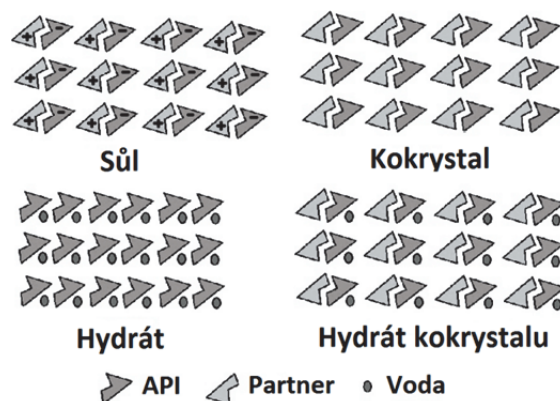
Lék	Výrobce	API
Panadol®	GlaxoSmithKline	codeini dihydrogenphosphas hemihydricus paracetamololum coffeinum
Kodynal®	Zentiva	codeini hydrochloridum dihydricum ephedrini hydrochloridum emetini dihydrochloridum
Codipront®	Pfizer	codeini resinas phenyltoloxamini resinas
PK-Merz®	Merz	amantadini sulfas
Viregyt-K®	Egis	amantadini hydrochloridum

Krystalizace API ve formě soli může také sloužit k izolaci aktivní substance ze směsi, a tudíž k jejímu čištění. Pokud se výrobce v procesu vývoje léčiva rozhodne pro sůl, je nutné si uvědomit, že toto rozhodnutí je více méně ireverzibilní, protože změna soli v posledních etapách vývoje znamená daleko větší ekonomické a časové dopady než třeba změna polymorfu nebo hydrátu.

Obejití problému polymorfismu však není jediným důvodem pro volbu soli. Soli mají obecně vyšší rozpustnost a biodostupnost než volné báze nebo kyseliny. Dále mají jiné fyzikálně-chemické a technologické vlastnosti (stabilitu, hygroskopičnost, tekutost neboli sypnost práškovitého stavu atd.), a proto jsou pro farmacii velmi důležité.

7.4 Kokrystaly

Další pevnou formou, která se stále více prosazuje při formulaci léčiv je kokryystal. Kokryystal je stechiometrická multikomponentní sloučenina typu hostitel : host, ve které jsou komponenty struktury v neionizovaném stavu. Užší vymezení termínu zahrnuje mezi farmaceutické kokrystaly látky vznikající pouze z komponent, které jsou za běžných podmínek v pevném stavu. Příklady API tvořících velké množství kokryystalů jsou např. karbamazepin či piroxikam. Rozšířením forem pevných látek o kokrystaly můžeme připravit i kombinace: polymorfy kokryystalu, solváty/hydráty kokryystalu, kokrystaly soli či solváty/hydráty kokryystalu soli. Současná legislativa, zejména v USA (FDA), však nevnímá kokrystaly stejným způsobem jako solváty, ale deklaruje je jako preformulaci léčiva, tedy jako mezistupeň mezi účinnou látkou jako takovou a finální lékovou formou.



Obr. 61. Vybrané typy multikomponentních sloučenin

Stejně jako ostatní pevné formy (polymorfy, soli, hydráty, solváty či amorfy), jsou farmaceutické kokrystaly hledány pomocí více či méně rozsáhlého screeningu. V porovnání s tradičními pevnými formami, podání aktivní substance formou kokrystalu umožňuje použití vyššího počtu potenciálních kokrystalizačních partnerů (koformerů), jejichž seznam je omezen na molekuly s akceptovatelným bezpečnostním profilem a dále může být zúžen na látky s funkčními skupinami odpovídajícími tvorbě synthonů s danou API. Supramolekulární synthon lze chápat jako ne vazebnou interakci mezi molekulami (komponentami kokrystalu), která přispívá k uspořádání molekul v prostoru, zpravidla jej tvoří vodíkové můstky, ale i jiné slabší interakce.

Mezi časté kokrystalizační partnery patří karboxylové kyseliny (jablečná, vinná, citronová, skořicová, mandlová a jiné), které už svým triviálním názvem napovídají, že jde o přírodní látky vyskytující se v potravě. Dalšími používanými kokrystalizačními partnery bývají vitamíny (např. vitamín B₃, neboli nikotinamid, je velmi častý koformer), aminokyseliny, kofein nebo sacharin, čímž je k dispozici široká škála funkčních skupin, které mohou interagovat s funkčními skupinami farmaceutické substance a tvořit tak synthony. Interakce má většinou charakter vodíkové vazby a na rozdíl od solí nedochází k transferu vodíku mezi donorem a akceptorem.

Screening kokrystalů a solí, kokrystalizační metody

Screening pevné fáze se stává nedílnou součástí vývoje pevné lékové formy. Ionizovatelnou API lze podrobit screeningu polymorů, solvátů, solí i kokrystalů. Při kokrystalizačním screeningu je většina používaných kokrystalizačních partnerů převzata ze screeningu solí, čímž dochází k překryvu; mnohdy je připravená nová fáze na pomezí solí a kokrystalu. O charakteru nové fáze potom rozhodují s jistotou až výsledky strukturních analýz. K rozlišení solí a kokrystalu se používá i **pravidlo ΔpK_a** (pK_a báze – pK_a kyseliny), ale u obtížně ionizovatelných látek jsou hodnoty pK_a obtížně stanovitelné. Příkladem kokrystalu, který je patentován a prodáván jako farmaceutická sůl, je kofein – kyselina citronová (patentován jako kofein citrát).

V závislosti na množství API je lepší racionálně zúžit výběr z běžně používaných až 200 kokrystalizačních partnerů na počet přijatelnější pro screening. Možností je využití predikcí, které na základě různě sofistikovaných výpočtů (kvantově-mechanické

výpočty krystalových struktur, aplikace Hansenova pravidla rozpustnosti nebo využití studia elektrostatických potenciálů, tvar a polarita molekul tvořících kokrystal) vyhodnocují kokrystalizační partnery, s nimiž je největší šance připravit kokrystal. Jednodušší predikce jsou většinou založeny na úvahách o rozpustnosti, výše zmíněném parametru ΔpK_a a komplementaritě funkčních skupin zúčastněných molekul, proto podobné úvahy a zkušenost mohou mnohdy posloužit stejně dobře. Všechny výpočty je ovšem nutné doplnit experimenty.

Obecná a zaručená metoda na přípravu kokrystalů zatím neexistuje, proto bylo vyvinuto několik technik, kterými lze zvýšit pravděpodobnost úspěšné přípravy kokrystalu na míru. Kokrystalizační metody používané při screeningu lze rozdělit do dvou základních kategorií: **s použitím a bez použití rozpouštědel**. Z metod bez použití rozpouštědel se nejčastěji používá společné tavení a společné mletí, metody s rozpouštědly zahrnují kokrystalizaci odpařováním rozpouštědla, pomalým či rychlým chlazením roztoku, přidávkem antisolventu, kokrystalizaci v suspenzi, působením ultrazvuku či superkritické kapaliny.

V literatuře je pro některé metody definovaný parametr η , který vyjadřuje poměr objemu solventu k hmotnosti pevné směsi. Na základě parametru η je možné metody porovnat, od suchého mletí, kde η je rovno nule, přes vlhčené mletí ($\eta = 0,2\text{--}12 \mu\text{l mg}^{-1}$), suspenze ($\eta = 2\text{--}12 \mu\text{l mg}^{-1}$) až po kokrystalizaci z roztoků ($\eta \gg 0$). V tomto pojetí se metody liší hlavně množstvím rozpouštědla a jeho nasycením vstupními látkami.

Před samotnými experimenty screeningu je vhodné dobře uvážit fyzikálně-chemické vlastnosti zkoumané aktivní substance a jejich očekávané vylepšení a vybrat nejpravděpodobnější kokrystalizační partnery. Volba kokrystalizační metody je také důležitá a její výběr by měl ideálně být šitý na míru pro každou API. Tím vším maximalizujeme šance pro úspěšnou přípravu kokrystalu.

Popsané laboratorní techniky přípravy kokrystalů mají všechny své klady a zápory. Doposud nebyla žádná metoda obecně přijata jako zaručená, která by vždy vedla k přípravě kokrystalu, a to i v případě, že je kokrystal již popsán. Použitím více kokrystalizačních metod, např. technik používajících rozpouštědel kombinovaných s metodami bez rozpouštědel lze ale významně zvýšit pravděpodobnost, že námi zvolené metody povedou k úspěšnému nalezení nového kokrystalu. V následujícím textu jsou blíže popsány jednotlivé kokrystalizační metody.

Odpařování rozpouštědla, rušená kokrystalizace, přidavek antisolventu

Nejstarším způsobem přípravy kokrystalů, který je také jedním z nejjednodušších, je volné odpařování rozpouštědla z roztoku. Obě komponenty jsou rozpuštěny v rozpouštědle či ve směsi rozpouštědel při pokojové či zvýšené teplotě a baňky (vialky) jsou ponechány na dobře odvětrávaném místě po několik dní či týdnů.

Rozpustnost použitých látek v solventu by měla být podobná (v anglických publikacích se vžil pojem congruent – kongruentní), aby i míra nasycení byla srovnatelná. Při velmi odlišné rozpustnosti může jedna komponenta začít krystalizovat v době, kdy druhá složka je ještě příliš zředěná. Odpařováním a krystalizací méně rozpustné složky se mění celkové složení systému a API s kokrystalizačním partnerem

již nemusejí být ve stechiometrickém poměru nutným pro vznik kokryystalu. Proto je žádoucí najít vhodné rozpouštědlo nebo směs rozpouštědel, ve kterém mají vstupní látky srovnatelnou rozpustnost. Ochoťně vznikající kokryystalu lze připravit i ze zředěných roztoků, čehož lze využít i při pěstování monokryystalů vhodných pro strukturní analýzu. Většina popsaných kokryystalů, jejichž struktura byla vyřešena z monokryystalu, byla připravena právě krystalizací z roztoku.

Mají-li vstupní komponenty výrazný rozdíl rozpustnosti při různých teplotách, lze vyzkoušet i rušenou krystalizaci, kdy jsou zahorka nasycené roztoky zprudka zchlazeny. Při pomalém chlazení zvyšujeme šance přípravy monokryystalu. Další možností iniciace krystalizace z roztoku je přidavek antisolventu – rozpouštědla mísitelného se solventem a tvořícího s ním směs, ve které je pevná látka (API, kokryystal) méně rozustná. Při všech pokusech ale zůstává riziko vykrytalizování jedné nebo obou vstupních složek aniž by vznikal kokryystal. U velmi dobře rozpustných látek není výjimkou zatuhnutí roztoku ve viskózní sklo, z kterého není možné získat krystalický produkt.

Společné tavení

Metoda společného tavení byla poprvé popsána Lehmannem již v 19. století a dále byla rozvíjena manželi Koflerovými, po nichž je v literatuře pojmenována. Látky byly postupně taveny a rekrystalizovány na upraveném bodotávku s mikroskopem. Na sklíčko je nejprve umístěna látka s vyšším bodem tání (A), která se roztaví a po zchlazení se ponechá krystalizovat. Na okraj krystalizující taveniny je umístěna druhá látka s nižším bodem tání (B), která je roztavena. Tavenina částečně rozpouští látku A, čímž po zchlazení vzniká oblast mísení, která je srovnatelná s binárním fázovým diagramem vstupních komponent, kde na jedné straně máme 100 % látky A, na druhé 100 % látky B a mezi nimi se složení mění s koncentračním gradientem. Při chladnutí může v oblasti mísení se správným složením vznikat nová fáze.

Mletí

Jednoduchá, časově nenáročná metoda, která nebere v úvahu rozpustnost, je společné mletí. V třecí misce s tlučkem či v různých mlýncích je možné semlít dvě i více látek ve stechiometrickém poměru a připravit tak kokryystal, např. kokryystal kofeinu s kyselinou glutarovou vzniká velmi ochotně během několika minut společného mletí. Použitím různých poměrů mezi látkami lze připravit i kokryystalu se stejným kokrytalizačním partnerem o různé stechiometrii, které se metodami s použitím rozpouštědel nedaří připravit. Mletím krystalického materiálu vzniká nejčastěji krystalická fáze, ale některé molekuly mletím amorfizují (známý je případ laktosy či trehalosy), proto je dobré vyhledat, zda při použití dané API nehrozí podobné riziko.

Při přípravě fyzikálních směsí vzorků pro jiné kokrytalizační metody se stechiometrická směs vstupních komponent často homogenizuje v třecí misce. Je nutné si uvědomit, že u ochotně vznikajících kokryystalů může třením dodaná energie iniciovat konverzi látek na kokryystal, stejně jako u méně stabilního kokryystalu může mletí (např. při přípravě vzorku k analýze, zpracování ve výrobě) nastartovat rozpad na vstupní složky. Analýza vzorku na možné fázové změny by měla po mletí směsi či kokryystalu následovat vždy.

Mletí s přikapáváním rozpouštědla

V případě, že energie dodaná mletím nestačí na iniciaci konverze, je možné přidat rozpouštědlo. Množství přidaného rozpouštědla je často překvapivě malé, ale dostačující k alespoň částečné konverzi, která při prvotním screeningu nemusí být stoprocentní. Desítky mikrolitrů solventu přikapáváme k desítkám až stovkám miligramů mleté směsi, proto je tato metoda považována za šetrnou k životnímu prostředí. Role solventu spočívá jak ve vlhčení, které brání ohřevu látek při vzájemném tření a které usnadňuje kontakt částic (molekulární mazivo), tak v rozpouštění vstupních pevných látek.

Kokrystalizace v suspenzi

Součástí polymorfního screeningu je rekrystalizace dané API z několika rozpouštědel. Experimentálně jednoduchým způsobem se ukázala příprava suspenzí API v každém solventu, které byly při pokojové teplotě umístěny na třepačku po několik týdnů. Koncentrace API v roztoku je díky nerozpuštěnému podílu při dané teplotě maximální, čímž je maximální i aktivita API, která tak má nejlepší možnost přejít na svou nejstabilnější formu.

Tato myšlenka byla uplatněna i při vývoji této kokrystalizační metody. Připraví se suspenze, ve které jsou obě vstupní složky (API a kokrystalizační partner) částečně rozpuštěné, ale od každé zůstává v roztoku nerozpuštěný podíl. Tím se dosáhne kritické aktivity pro vznik kokryystalu. Tvoří-li komponenty stabilní kokryystal, vznikne touto metodou po určité době téměř vždy. Protože se v systému ustanovuje rovnováha, snižuje se po vykrystalizování kokryystalu koncentrace vstupních látek v roztoku a část nerozpuštěného podílu vstupních látek se rozpouští. Tímto způsobem rekrystalizuje celý pevný podíl v suspenzi. Jsou-li vstupní látky v suspenzi ve stechiometrickém poměru, ve kterém vzniká kokryystal, připraví se kvantitativně. Je-li jedna ze vstupních složek v přebytku, pevný podíl bude tvořen jak kokrystalem, tak přebývající vstupní složkou. Příprava série suspenzí je velmi rychlý a jednoduchý úkon s možností automatizace.

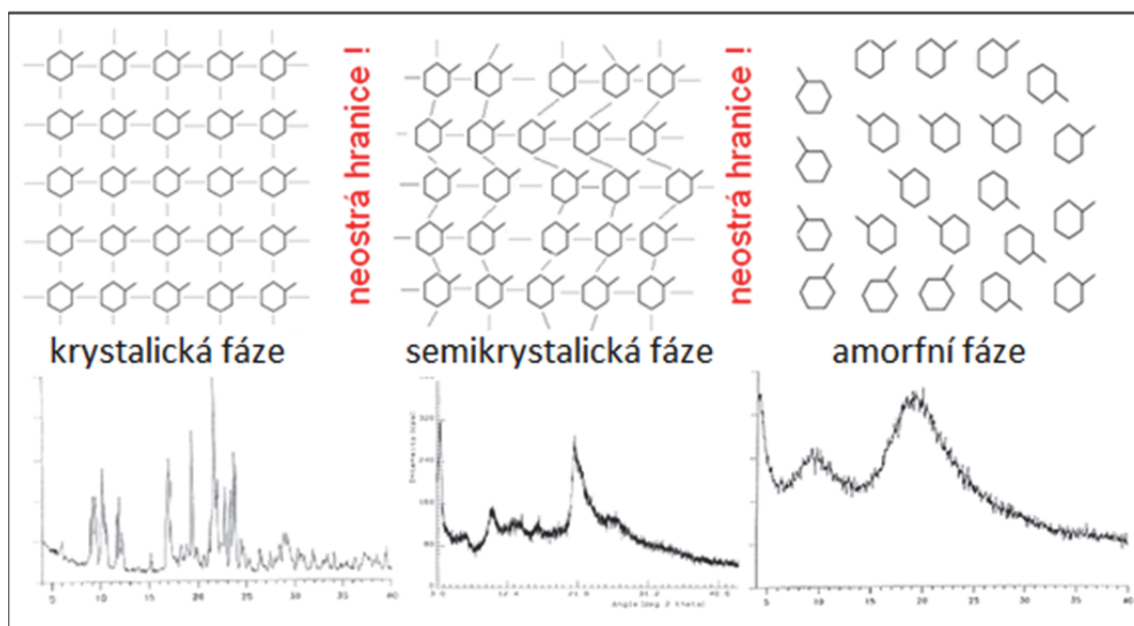
Kokrystalizace ultrazvukem

Krystalizaci lze iniciovat i ultrazvukem, použití speciálních ultrazvukových sond vedlo k úspěšné přípravě několika kokryystalů. Z běžně dostupné laboratorní techniky lze využít ultrazvukovou lázeň, která je hojně využívána i při rozpouštění pevných látek v solventech. Pro krystalizaci v ultrazvukové lázni byl upraven polystyrenový plovák, do kterého byly vyvrtány otvory a umístěny vialky s fyzikálními směsmi kokrystalizovaných látek (5 mg) zakápnutých rozpouštědlem (10 μ L). Metoda byla ověřena na přípravě kokryystalů karbamazepinu se sacharinem a s nikotinamidem. Volba rozpouštědla a doba pobytu v lázni měla největší vliv na přípravu kokryystalů. Oproti kokrystalizaci v suspenzi, kterou tato metoda připomíná, ultrazvuková lázeň umožňuje lepší kontakt složek i v málo zvlhčené směsi.

7.5 Amorfní formy (amorfáty)

Tradičně jsou amorfní fáze považovány za ztuhlé kapaliny, které mají reologické vlastnosti pevné fáze. Flexibilní molekuly, které mají mnoho vnitřních stupňů volnosti (torzních úhlů), často pomalu a obtížně krystalují, protože existuje řada možností, jak se mohou zabudovat do krystalové struktury (např. polysacharidy nebo syntetické polymery). Tyto molekuly snadněji vytváří amorfní fáze než molekuly rigidní. Ostrý přechod mezi amorfními a krystalickými fázemi neexistuje. V téměř spojitě linii mezi teoreticky 100% krystalickou fází a 100 % amorfní fází si přechod můžeme představit jako postupné hromadění defektů krystalové struktury vedoucí nakonec k jejímu úplnému rozbourání (amorfizaci). Částečně krystalické fáze nazýváme semikrystaly (někdy též parakrystaly). U semikrystalické fáze často kolísá tvar a velikost elementární buňky (Obr. 61).

Amorfní fáze vykazují vnitřní uspořádání pouze na krátkou vzdálenost (SRO „short range order“), což znamená, že pravidelné translační opakování molekul je rychle nahrazeno jejich nahodilou distribucí. V současné době převládá názor, že semikrystalický stav je pouze prekurzorem stavu krystalického.



Obr. 61: Zleva: forma krystalická, forma semikrystalická, forma amorfní a jejich charakteristické RTG práškové difraktogramy

Mnoho API vytváří jak amorfní, tak krystalické fáze. Kromě toho se často používají i amorfní excipienty. Preformulace spočívající v nanesení malého množství API na pevný sorbent, např. semikrystalickou celulózu, je nejen způsobem jak zabránit krystalizaci nanesené látky (několik monovrstev nestačí ke vzniku krystalu), ale i způsobem jak zajistit lepší homogenitu při přípravě finální lékové formy. V Tab. 15 je uvedeno několik příkladů. Amorfní fáze stojí energeticky výše, a proto vykazují samovolnou snahu přejít na fáze krystalické přes relativně stabilní plató

semikrystalického stavu. Termodynamická nestabilita amorfni fáze způsobuje, že amorfni látka má vždy tendenci krystalizovat. Amorfni fáze obsahuje nahromaděnou energii spojenou s entropií, která nebyla uvolněna při krystalizaci (viz krystalizační teplo). Krystalizace předpokládá dostatečnou nukleační rychlost a růst krystalů. Nukleace probíhá dostatečně rychle pouze v přesyceném roztoku a klíčovou roli má teplota. Nukleační rychlost exponenciálně stoupá se snižující se teplotou, zatímco intenzita molekulárního pohybu má tendenci právě opačnou. Pokud je formulována amorfni API, tak jedním z úkolů formulace je amorfni fázi stabilizovat a zabránit její krystalizaci. Na druhé straně však amorfni fáze mohou být i překvapivě stálé.

Zatímco krystalické fáze jsou charakterizovány teplotou tání T_i a parametry krystalové struktury (mřížkové parametry, prostorová grupa, pozice atomů v elementární buňce atd.), amorfni fáze jsou charakterizovány pouze teplotou skelného přechodu T_g .

Ve farmaceutických formulacích výrazně převažují krystalické fáze nad amorfními (amorfni fáze tvoří pouze několik % celkového portfolia – nicméně jsou důležité), semikrystalické fáze jsou pro formulace nevhodné, uplatní se pouze velmi výjimečně.

Obecně mají amorfni formy větší objem a menší hustotu než krystalické fáze.

Hlavní důvody, proč farmaceutické firmy volí při formulaci léčiva amorfni nebo semikrystalické API, jsou dva:

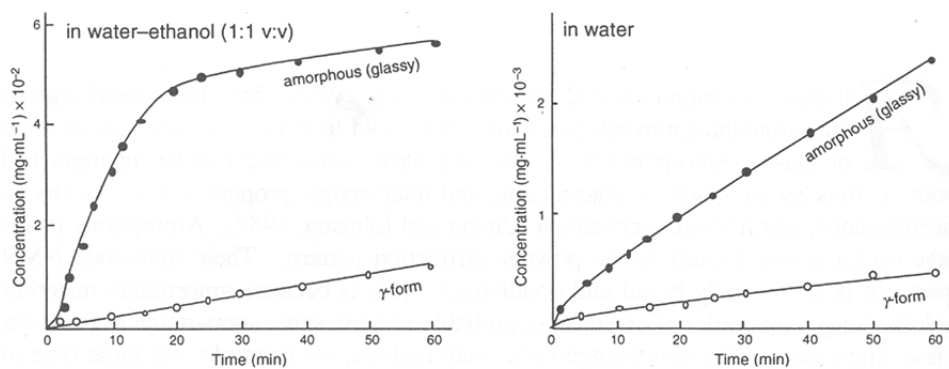
- 1) Léky formulované z amorfni forem jsou zpravidla rychleji rozpustné, a proto mají rychlejší nástup účinku než krystalické formy. Příkladem je novobiocin (antibiotikum), který je v amorfni formě 10x rychleji rozpustný než jeho krystalická forma. Podobné chování vykazuje i indomethacin (Obr. 62). Větší rozpouštěcí rychlost je na druhé straně negativně kompenzována nižší fyzikální a chemickou stabilitou amorfni forem
- 2) Z důvodu vyhnutí se patentové kolizi, generické firmy někdy při formulaci dají přednost amorfni fázi před fází krystalickou. Např. Torvacard vyráběný Zentivou obsahuje jako API amorfni formu atorvastatinu vápenatého, zatímco originální přípravek Sortis vyráběný Pfizerem obsahuje krystalický atorvastatin vápenatý trihydrát.

Tab. 15: Příklady používaných amorfních API a excipientů

API	excipienty
<ul style="list-style-type: none">• indomethacin• benperidol• sertralin hydrochlorid• atorvastatin vápenatý• cefalosporin• quanipril hydrochlorid• itrakonazol• zafirlukast• cilastatin,• nelfinavir mesylát• felodipin	<ul style="list-style-type: none">• polyvinylpyrrolidon (PVP)• polyethylenglykol (PEG)• vysušená laktóza• hydroxypropyl-celulóza• škroby• oxid křemičitý

Kromě toho některé API jen obtížně krystalují, a proto jsou dostupnější v amorfní formě. Na druhé straně je však třeba počítat s tím, že amorfní formy vykazují termodynamickou nestabilitu, jiné fyzikální a chemické chování a tendenci přecházet ve stabilnější, krystalické fáze. Ve srovnání s krystalickými fázemi je pro amorfní formy charakteristická také vyšší hygroskopicitá a vyšší molekulární mobilita. Z těchto důvodů je třeba počítat s tím, že pevné formulace z amorfních fází mají kratší expiraci (např. zmíněný Torvacard s amorfním atorvastatinem vápenatým má expiraci 18 měsíců, zatímco Sortis má expiraci 36 měsíců). Často je nutné chránit amorfní formy před transformací na krystalické formy pod inertní atmosférou, např. pod dusíkem. Na druhé straně však nelze na amorfní formy, zejména pak stabilizované amorfní formy, pohlížet jako na něco neobvyklého a se zvyšující se molekulovou hmotností je naopak zcela běžné, že se látky používají jako amorfy a nejsou ani schopné vytvářet krystalické fáze.

Každá krystalická fáze však reálně obsahuje určitý podíl (i když někdy velmi malý) amorfní fáze, vzniklý v důsledku mechanické manipulace s krystalickou fází (amorfizace hran a rohů krystalů, viz Obr. 52).



Obr. 62: Disoluční profil amorfního a krystalického (γ -forma) indomethacinu
(Fukuoka E. et al.: Pharmacobio-Dynamics 9, S5 (1986))

Z důvodu dosažení větší stability jsou amorfní fáze ve formulacích stabilizovány, aby byla potlačena intenzivní molekulární mobilita. To se děje přidávkem vhodných polymerních stabilizátorů, např. sorbitol, který vytvoří s amorfní fází disperzi a ta je stabilizována systémem H-vazeb ve struktuře.

7.6 Amorfní hydráty

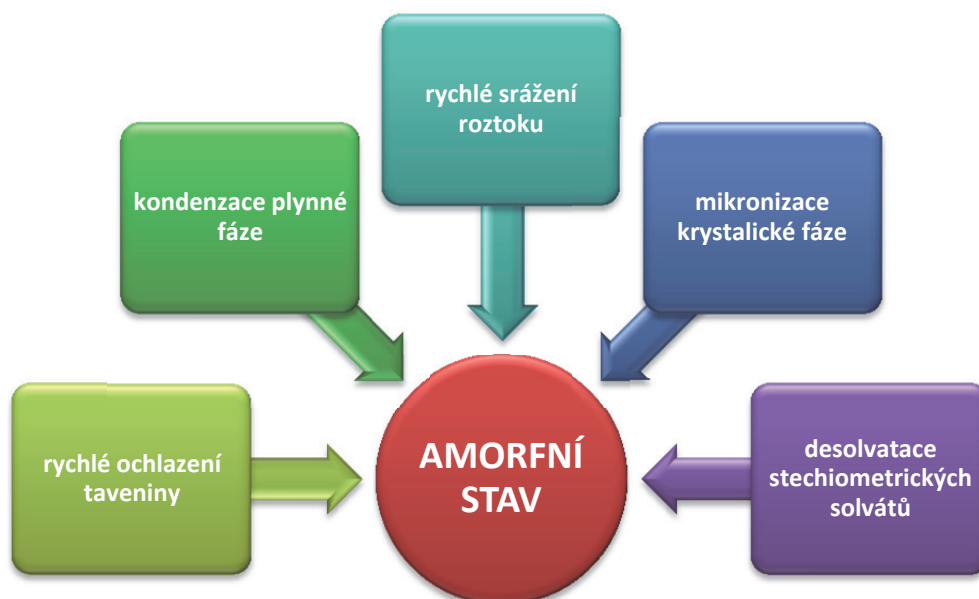
V poslední době se v patentové literatuře objevují pojmy, jako např.: „amorphous form of hydrated trisodium salts of alendronate, amorphous esomeprazole hydrate, amorphous form of imatinib mesylate hydrate, amorphous hydrates form of rimonabant“ apod. Z tohoto důvodu je vhodné zavést pojem „**amorfní hydrát**“.

Zatímco obsah vody v amorfních fázích kolísá v závislosti na teplotě, tlaku a relativní vlhkosti okolí, v amorfních hydrátech může být konstantní po dlouhou dobu, např. rok i více. Amorfní hydrát je metastabilní, vodou nasycená amorfní fáze. Všechny možné pozice pro vazbu vody jsou ve struktuře amorfního hydrátu již vysyceny a proto si amorfní hydrát podrží neměnný obsah vody dlouhou dobu. „Normální“ amorfní fáze tak mají tendenci samovolně přecházet na amorfní hydráty a ty posléze na krystalické hydráty. Amorfní hydrát přichází v úvahu i pro formulaci.

Zavedení pojmu farmaceutický amorfní hydrát je výrazně ovlivněno patentovou politikou farmaceutických firem, nezbývá však, než tento pojem akceptovat.

7.7 Příprava amorfních fází

Ve farmaceutické výrobě se amorfní fáze připravují využitím několika základních technologií (Obr. 63).

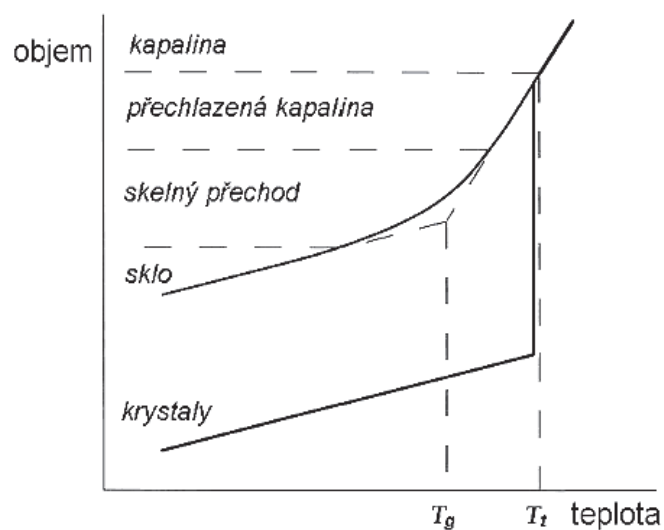


Obr. 63: Metody přípravy amorfních fází

Rychlé ochlazení taveniny

Základním předpokladem uplatnění metody rychlého chlazení (quench-cooling) je fakt, že látka se nesmí v tavenině rozkládat. Tomu se dá někdy zabránit tak, že tavicí proces probíhá v dusíkové atmosféře. Principem je skelný přechod v tavenině, který vede k sirupovitým amorfním fázím s vysokou viskoelasticitou.

Nepatrně pod teplotou tání (T_f) nastává u většiny látek krystalizace, jejímž úvodním krokem je nukleace (přesně v T_f je nukleační bariéra nekonečně vysoká!). Jestliže sledujeme křivky na Obr. 64. tak vidíme, že při krystalizaci se skokově mění objem. Některé taveniny však mohou pod T_f přejít do stavu **přechlazené taveniny** a nekystalovat. Oblast přechlazené taveniny je metastabilním stavem, kde objem zvolna klesá a viskozita stoupá se snižující se teplotou. Po dosažení určité hodnoty dynamické viskozity taveniny, řádu 10^{12} Pa.s (hranice mezi kapalným a tuhým stavem) vzniká na horní křivce zaoblený zlom, který nazýváme **skelným přechodem**. Skelný přechod je transformací, které na ose teploty odpovídá určitý teplotní interval, jehož pomyslný střed (průsečík směrnic) se označuje jako **teplota skelného přechodu** T_g . Hodnota T_g není konstantou, protože výrazně závisí na rychlosti chlazení kapaliny. Při vzniku skla se musíme krystalizaci vyhnout, takže rychlost ochlazování taveniny musí být dostatečně velká, aby koncentrace nukleí nepřekročila kritickou mez.



Obr. 64: Objemové změny během ochlazování kapaliny a skelný přechod

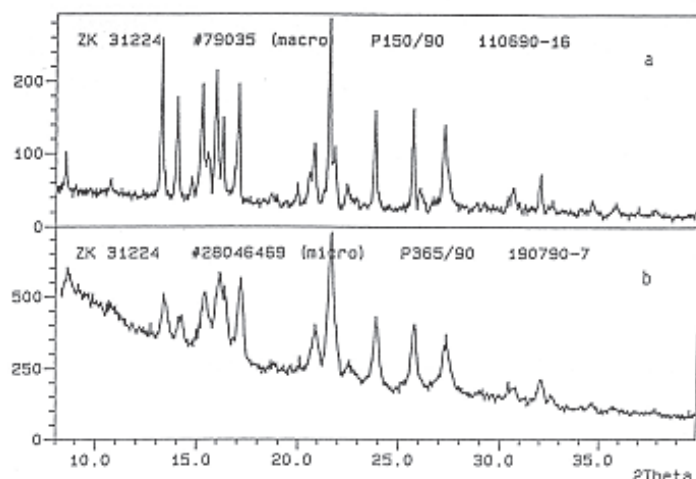
Při skelném přechodu se struktura nestačí uspořádat a „zamrzne“ ve stavu přechlazené kapaliny. Při stejných množstvích zaujímá sklo (amorfní fáze) větší objem než krystalická fáze, protože neuspořádaná struktura zaujímá větší objem než uspořádaná.

Při metodě rychlého chlazení se obvykle během několika vteřin sníží teplota ze stavu nad T_l do teploty kapalného dusíku. Takto se připravují amorfní fáze např. indomethacin, felodipin, nifedipin. Rychlost chlazení ovšem nemusí být vždy vysoká, někdy stačí taveninu, která má tendenci dobře přecházet do skelného stavu, ochladit pouze na laboratorní teplotu (např. amorfní benperidol).

Mikronizace krystalické fáze

Mikronizace (zmenšování velikosti zrna pevných substancí na úroveň mikronů) je nejčastěji ve farmaceutickém průmyslu prováděna mletím. Přitom se zrna zmenšují z velikosti 10 – 50 μm (krystalizační velikost) na velikost 5 – 10 μm . Při mikronizaci dochází ke změnám ve vzhledu RTG práškových difraktogramů – difrakční linie se rozšiřují (Obr. 65).

Pokud další intenzivní mikronizací klesne velikost zrn na $\approx 100 \text{ \AA}$ (0,01 μm), substance se v některých případech stává amorfní (přejde přes skelný přechod) nebo zůstává ve svých nanozrnech krystalická, ale nanozrna jsou uspořádána nahodile – amorfně. Příslušné analytické techniky mezi těmito dvěma stavy obtížně rozlišují, např. pro RTG difrakci se oba stavy jeví jako RTG-amorfní. Teplotu skelného přechodu, T_g při mikronizaci lze určit měřením křivky DSC.



**Obr. 65: Dva difraktogramy námellového alkaloidu terguridu E:
a) před mikronizací, b) po mikronizaci**

Obecně platí, že amorfni fáze vzniklé intenzivní mikronizací jsou reaktivnější než amorfni fáze vzniklé ochlazením taveniny. Důvod zřejmě spočívá v tom, že mikronizací je do fáze vložena energie, takže se jedná o vysoce energeticky aktivovaný stav. Energie vložena mletím do amorfni fáze se asi z 10% zužitkuje na zvětšení povrchu materiálu a 90% vybudí termodynamicky aktivovaný metastabilní stav. To se projeví ve vyšších rozpouštěcích rychlostech ve vodě (např. cefalexin nebo griseofulvin). U hydrátů se mletím může snížit teplota dehydratace (např. hydratovaná forma ampicilinu). Mletím je také možné způsobit isomerizaci nebo chemickou degradaci (např. kyselina *p*-aminosalicylová).

Redukce velikosti částic do nanoměřítka (řádově 100 nm) se využívá v procesu Elan Nanosystems®. Z nanočástic se pak formulují nanokrystalické suspenze, které mají vyšší rozpouštěcí rychlosti než klasické mikrokrystalické suspenze. Tato technologie byla úspěšně použita u nových nanokrystalických formulací: Rapamunu® (sirolimus, imunosupresivum), Tricoru® (fenofibrát, hypolipidemikum) a Emendu® (aprepitant, lék proti zvracení po chemoterapii) a tak zvýšena jejich orální biodostupnost.

Lyofilizace a sprejové sušení

V obou těchto příbuzných metodách figuruje plynná fáze a jedná se o velmi efektivní procesy. Obě metody se kromě farmaceutického průmyslu používají široce v potravinářství.

Principem **lyofilizace** (freeze drying) je odstranění vody ze zmrzlého roztoku sublimací ledu. Lyofilizace zahrnuje tři hlavní kroky:

- Rychlé zmrazení roztoku v kapalném dusíku
- Primární sušení roztoku sublimací při sníženém tlaku (neboli odsušení ledu sublimací)
- Sekundární dosušení (obvyklé zpracování mírným zahřátím, vedoucí ke stabilizaci amorfu)

Je-li roztok zmrazen např. na -25°C (tlak 64 Pa) a vymrazovací spirála kondenzátoru má teplotu -50°C , pak hnací silou lyofilizace je rozdíl uvedených teplot. Odstraněná voda kondenzuje ve formě ledu na vymrazovací spirále a jen malá část vodní pary se odtažuje vývěvou. Produktem je lyofilizovaný prášek, který je většinou amorfní.

Důležitou aplikací lyofilizace je příprava lyofilizovaných prášků pro injekční použití. Injekční roztoky jsou většinou nestabilní a nehodí se pro dlouhodobé skladování. Pokud se však injekční roztok připraví těsně před použitím rozpuštěním lyofilizovaného prášku ve vodě, tak je problém nestability vyřešen.

Princip technologie **sprejového sušení** (spray drying) spočívá v rozstříkávání koncentrovaného roztoku do horké atmosféry (vzduch, dusík). Je důležité, aby rozstříkovací tryska produkovala velmi jemné kapičky, které se v horké atmosféře vysuší během několika vteřin a zbyde amorfní fáze, která je odtažována spodem zařízení. Jedná se tedy o kontinuální proces, jehož produktem jsou dokonale sférická zrnka o velikosti několika μm , která vykazují výborné tokové vlastnosti. Metodou sprejového sušení jsou vyráběna především antibiotika. Některé amorfní API produkované sprejovým sušením mají ovšem tendenci přecházet na krystalickou fázi (např. indomethacin, laktóza), čemuž je ve formulaci bráněno přísadkou vhodných excipientů (stearan hořečnatý nebo mikrokrytalická celulóza).

Metoda sprejového sušení může být použita i pro produkci nanočástic v technologii RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution), kdy je substance spolu s excipientem rozpuštěna v superkritickém CO_2 . Touto technologií je možné získat nanokuličky předem zvolené velikosti, např. naproxen s poly-L-laktovou kyselinou.

Ostatní metody

Amorfní fázi lze získat také neobvyklými podmínkami při krystalizaci (např. rychlé srážení, rychlá desolvatace solvátů atd.).

Při použití metody **rychlého srážení** je předpokladem vysoce přesycený roztok. Vyloučení amorfní nebo semikrystalické fáze lze dosáhnout přidáním srážedla (antisolventu) nebo rychlou změnou pH. Např. amorfní piretanid byl připraven rychlým okyselením jeho zásaditého roztoku. Při rychlé **desolvataci (dehydrataci)**, např. karbamazepinu dihydrátu, pod atmosférou dusíku, lze připravit čistou amorfní fázi karbamazepinu. Rychlé vytrhávání molekul vody uspořádanou krystalovou strukturou zborí (amorfizuje).

Otázky:

Vysvětlete pojmy anhydrát, solvát, amorf a kokrystal.

- **Popište tyto fáze**
- **Nalezněte rozdíly**
- **Jmenujte příklady**

Jaká forma účinné látky je první volbou a proč?

8. VELIKOST A TVAR ČÁSTIC, MIKROSTRUKTURA PEVNÝCH LÉKOVÝCH FOREM

Pevné lékové formy umožňují přesné a pohodlné dávkování léčivé látky, maskování nepříjemné chuti, zlepšení biodostupnosti, stability a kontrolované uvolňování léčivé látky do organismu. Mezi pevné lékové formy patří tablety, tobolky, granuláty, zásypy a další. Nejrozšířenějším zástupcem jsou tablety. Tablety jsou zpravidla tvořeny látkami účinnými (API) a pomocnými (excipienty), z nichž každá musí plnit předem zamýšlenou funkci. Pomocné látky jsou látky, jiné než účinné, které byly shledány bezpečnými a jsou obsaženy v lékové formě za účelem:

- Zlepšení zpracovatelnosti během výroby léčiva
- Ochrany, zvýšení stability nebo biodostupnosti léčivé látky
- Pomoci při identifikaci léčiva (barviva, atd.)
- Pomoci zlepšení celkové bezpečnosti a účinnosti během skladování a použití.

V Tab. 16 je uveden a vysvětlen přehled funkcí pomocných látek v tabletě společně s konkrétními příklady. Není vždy jednoduché rozřadit pomocné látky striktně do uvedených kategorií, protože valná většina je schopna plnit hned několik funkcí. Například škrob lze použít jako plnivo, pojivo i rozvolňovadlo.

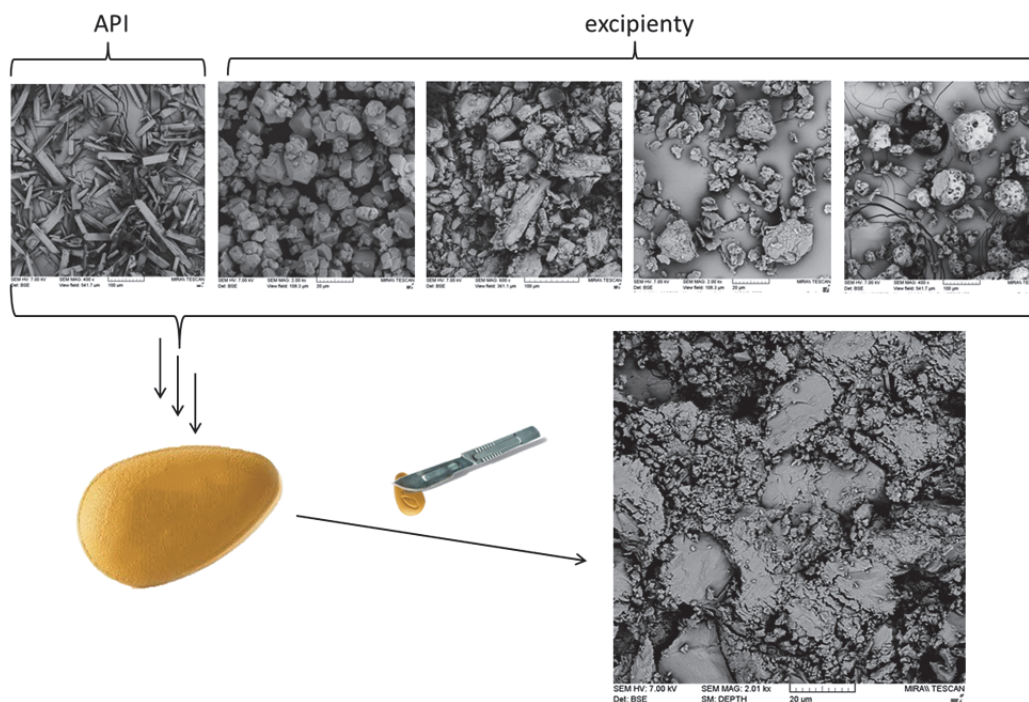
Pochopení unikátních vlastností práškových materiálů je nezbytné pro racionalizaci jejich formulace a zpracování. Práškové materiály se skládají z pevných částic obklopených plynem, které mají vlastnosti pevných látek, kapalin i plynů. To znamená, že jsou schopné do určité míry odolat deformacím, vykazují tokové vlastnosti a je možné je částečně stlačit.

Velikost, tvar, pevnost a hustota částic společně, ovlivňují výslednou mikrostrukturu vylisované tablety. Mikrostrukturu lékové formy určuje složení, homogenita, porozita, velikost a tvar částic a případně vlastnosti obalové vrstvy. Tyto parametry ovlivňují kinetiku vstupu tekutiny do tablety. Homogenita musí být dosažena vždy a je kontrolována například pomocí mapovacích spektrálních technik. Sledovanými parametry obalové vrstvy jsou tloušťka a porozita. Oba jsou závislé na použité filmotvorné látce a technologii přípravy. Porozita jádra tablety je významně ovlivněna jak výrobou – tlakem a rychlostí lisování, tak vlastnostmi lisovaných materiálů - velikostí a tvarem částic (Obr. 66).

Nejdůležitějšími parametry, jež ovlivňují mikrostrukturu pevných lékových forem, jsou velikost a tvar částic.

Tab. 16: Přehled pomocných látek, jejich funkce a příklady

Typické složení tablet	
Účinná látka (API)	Fyziologicky aktivní látka, která je nositelem vlastních účinků léčiva <i>Př. Paracetamol, losartan</i>
Plniva	Fyziologicky inertní, dobře snášené látky, doplňující objem léčiva na technologicky potřebnou hmotnost tablety, zlepšují vnitřní strukturu výlisku <i>Př. Laktóza, mikrokrytalická celulóza, manitol, sorbitol, škrob, fosforečnan vápenatý</i>
Pojiva	Suchá pojiva se používají na zlepšení plastické deformatelnosti tabletoviny (mikrokrytalická celulóza) nebo na přípravu lepidých roztoků (vlhčiva) při vlhké granulaci (želatina, škrobový hydrogel) <i>Př. Hydroxypropylcelulóza, hydroxypropylmethylcelulóza, polyvinylpyrolidon</i>
Rozvolňovadla	Zrychlují rozpad tablet, díky čemuž se začne léčivá látka dříve rozpouštět. Buď ve vodě bobtnají (škorb a jeho deriváty) nebo reagují s kyselým prostředím žaludku (NaHCO ₃) <i>Př. Krosopovidon, kroskrmelóza, glykosiláty škrobů, celulózy</i>
Kluzné látky	Snižují tření v násypce tabletovacího lisu, zlepšují skluz tabletoviny do matrice <i>Př. Koloidní oxid křemičitý, mastek</i>
Mazadla	Zamezují přilepení tabletační směsi na razidla, snižují mezičásticové tření <i>Př. Stearát hořečnatý, kyselina stearová, polyethylenglykol</i>
Filmotvorné látky	Tvoří potahové vrstvy tablety <i>Př. Polyvinylalkohol, šelak, vosky, celulózy</i>
Regulátory vlhkosti	Udržují minimální obsah vlhkosti tabletoviny nutný pro dobrou lisovatelnost a stabilitu léčivé látky <i>Př. Škrob, glycerol, sorbitol</i>
Další látky	Barviva, příchutě, sladidla, ... <i>Př. Erythrosin, titanová běloba, pomerančová esence, sacharin</i>



Obr. 66: Příklad společně slisovaných látek pomocných (excipienty) a látky účinné (API) a pohled na řez vzniklé mikrostruktury přímým lisováním

8.1 Velikost a tvar částic

Velikost částic je rozměrová vlastnost částice v prostoru charakterizovaná jednotkou délky. Velikost všech částic v ideálním práškovém materiálu by byla stejná, ale reálný materiál se skládá z částic o určitém velikostním rozpětí – velikostním intervalu. V praxi se proto, při popisu velikosti, používá pojem distribuce velikosti částic (DVC). V závislosti na tom, zda se vyjadřuje distribuce objemu nebo počtu částic, rozlišuje se početní a objemová DVC. Početní distribuce vyjadřuje procentuální rozložení všech měřených částic podle zvoleného délkového parametru, např. maximálního průmětu. Obdobně, objemová distribuce představuje procentuální rozložení objemu všech částic. Dalším, neméně důležitým parametrem popisu částic je jejich tvar. Znalost tvaru částic napomáhá při analýze jejich velikosti, a také lépe chápat chování prášků při transportu, zpracování i rozpouštění. Velikost a tvar jsou neoddelitelné parametry, které ovlivňují chování i zpracování prášků.

Vznik částic a úprava jejich velikosti

Pevné částicové systémy mohou být vyrobeny konstruktivně nebo destruktivně. Konstruktivní způsoby jsou: krystalizace, sprejové sušení, lyofilizace a techniky používající superkritické kapaliny (fluids). Destruktivní metody jsou mletí a drcení.

V dnešní době je velmi obvyklé, že výrobci lékové formy nakupují účinnou látku od jiné společnosti. Ta musí s dodávanou látkou doložit i příslušnou dokumentaci, která je nezbytnou součástí registrační dokumentace vyrobené lékové formy. Rekrystalizace nebo jiná konstruktivní technika znamená manipulaci s léčivou látkou (např.

rozpuštění v rozpouštědlech), a tudíž není možné použít dodanou dokumentaci pevného stavu. Proto jsou konstruktivní techniky preferované v případě, že výrobce lékové formy je zároveň i výrobcem účinné látky. Tyto techniky umožňují připravit částice požadované velikosti a tvaru. Z výchozího materiálu je možné, na rozdíl od destruktivních technik, připravit větší i menší částice v porovnání s výchozím materiálem.

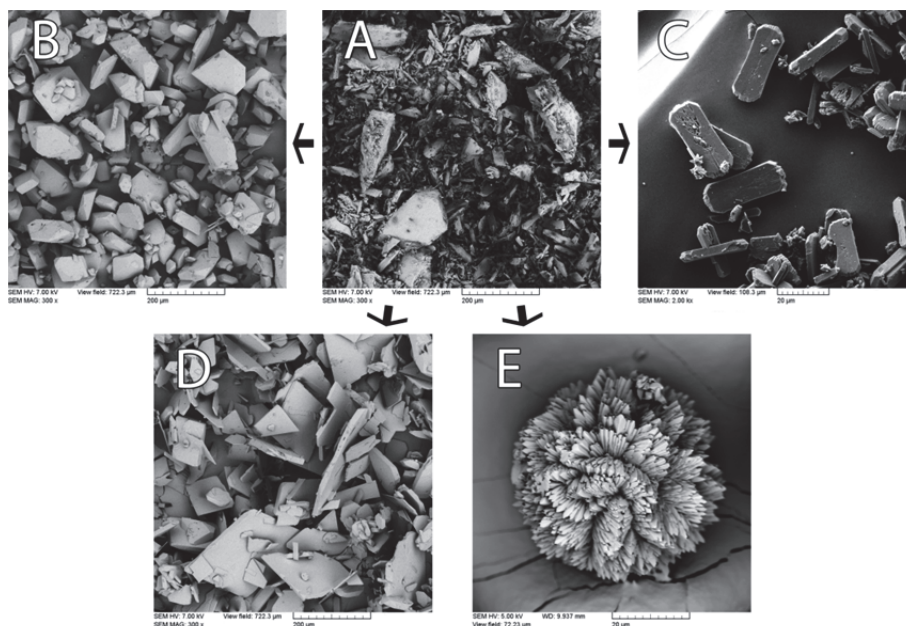
Nejběžněji používanou konstruktivní metodou je krystalizace. Z důvodu zlepšení materiálových vlastností farmaceutických prášků je možné ovlivnit, změnou krystalizačních podmínek, výsledný tvar krystalu při zachování stejné polymorfní formy. Na Obr. 67 jsou představeny rozdílné tvary krystalů paracetamolu, které byly připraveny za rozdílných podmínek krystalizace. Ve všech případech se jedná o formu I, jež byla prokázána pomocí techniky DSC. Krystalizace z roztoku ethanolu a vody (1:5) vede k nepravidelným částicím. Čistý ethanol vede ke krystalizaci destiček. Tyto dva tvary jsou preferenční pro formu I. Abychom získali další tvary, je třeba přidat do roztoku vhodné aditivum, které obsazuje určité plochy vznikajícího krystalu s vyšší preferencí než molekuly paracetamolu. Paracetamol tím nasedá na méně preferované plochy a produktem jsou méně obvyklé tvary krystalů. Přidáním vysokohustotního polyvinylpyrolidonu (PVP) dochází, v závislosti na rychlosti míchání, ke vzniku sférolitů nebo kvádrů.

Rychlost míchání je parametr, který neovlivňuje pouze tvar vzniklých krystalů, ale především jejich velikost. Pokud je znám robustní krystalizační postup, v uvedeném případě příprava destiček a nepravidelných krystalů, každé zvýšení rychlosti míchání vede k menším krystalům a současně k zachování jejich tvaru. V případě nerobustního procesu, změna otáček vede vždy ke změně velikosti a při určité hraniční rychlosti dojde i ke změně tvaru. Tak je tomu v případě přípravy sférolitů nebo kvádrů paracetamolu.

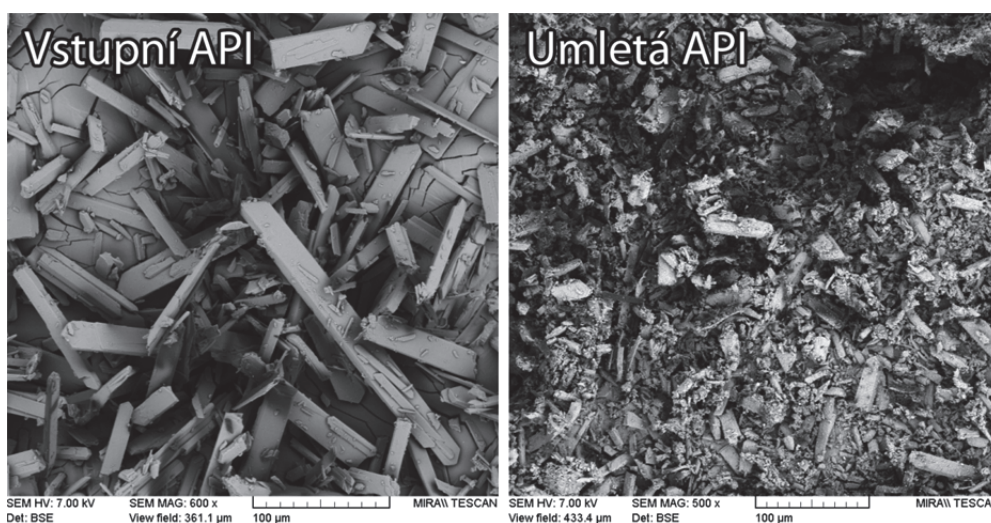
Ostatní konstruktivní techniky se nepožívají jako techniky první volby, protože jsou zpravidla nákladnější. Mají ovšem své uplatnění v případě, kdy nelze pomocí prosté krystalizace připravit zamýšlený polymorf nebo amorfát určitého tvaru nebo z důvodu jakékoli nestability léčivé látky.

Při použití techniky superkritických kapalin dojde ke krystalizaci srážením. Superkritické kapaliny existují při vysokých teplotách a tlacích, při kterých mají plynná a kapalná fáze stejnou hustotu a chovají se jako jediná fáze. Běžně používaným médiem je CO₂, který má nízkou kritickou teplotu (31°C), je netoxický, nehořlavý a levný.

Destruktivní způsoby změny velikosti částic jsou mletí nebo drcení. Rychlost změny velikosti je dána povahou mletého materiálu, počáteční velikostí před mletím, dobou mletí a typem mlýna. Při mletí dochází k rozbíjení a štěpení částic a jedná se tedy pouze o proces zmenšování velikosti částic. Připravené fragmenty výchozích částic bývají nepravidelné (Obr. 68). Protože se jedná o změnu velikosti i tvaru, dochází ke změně materiálových vlastností.



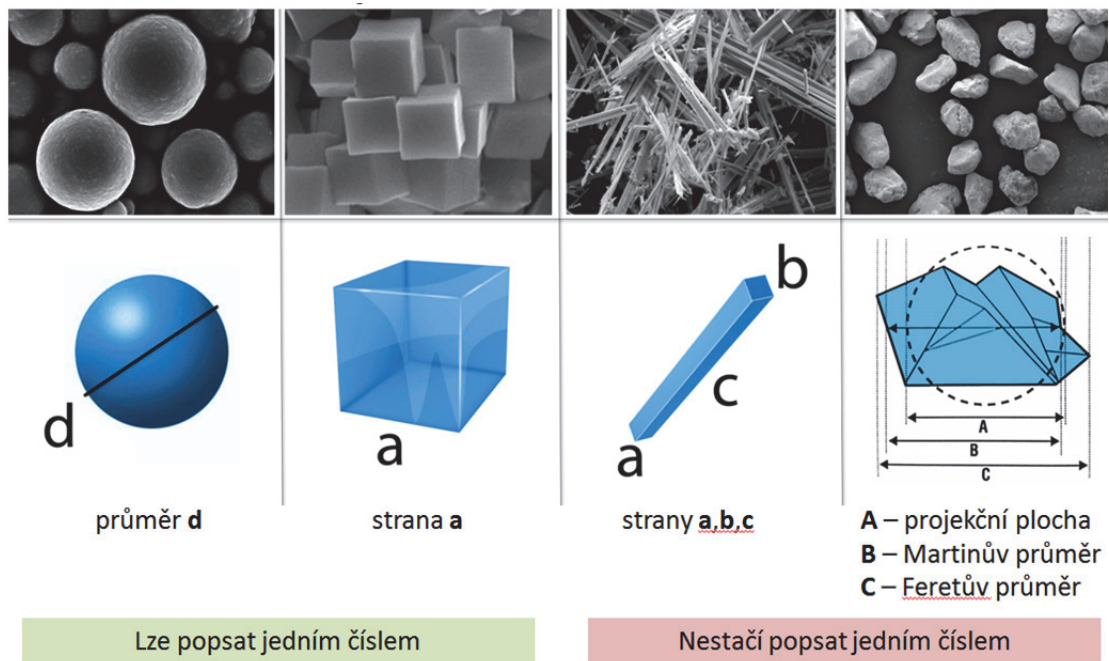
Obr. 67: Nepravidelné částice (B), kvádry (C), destičky (D) a sféruity (E) paracetamolu formy I připravené rozdílnými způsoby krystalizace ze surového paracetamolu (A)



Obr. 68: Příklad změny velikosti a tvaru částic mletím

Popis velikosti a tvaru částic

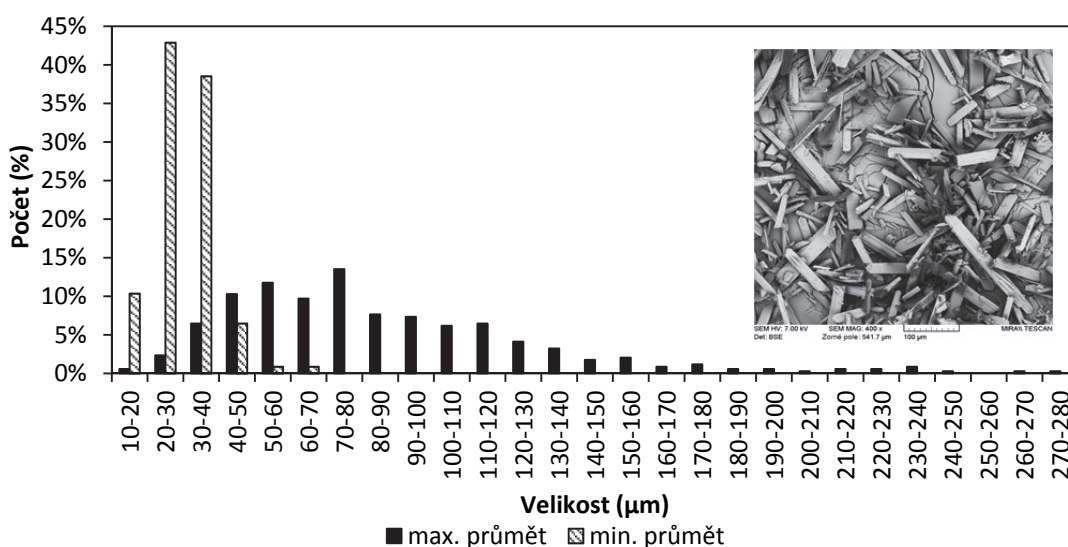
Podle Evropského lékopisu patří mezi základní tvary částic: jehličky, destičky, sloupečky, kvádry, krychle, koule a nepravidelné částice. Ilustrativní příklady některých tvarů jsou uvedeny na Obr. 69. Nejjednodušší popis velikosti je v případě pravidelných geometrických těles – koulí a krychlí, které je možné popsat jedním číslem. Sloupečky, destičky a kvádry je možné popsat třemi délkami stran. Pro nepravidelné částice byla v minulosti definována řada parametrů, např. Martinův a Feretův průměr.



Obr. 69: Příklady možnosti popisu velikosti a tvaru částic

Počtní distribuce velikosti částic

Na základě jednoho či více délkových parametrů je možné zrekonstruovat početní distribuci velikosti částic, která se získá obrazovou analýzou mikroskopických snímků. Početní DVČ má tvar histogramu (Obr. 70), kde na ose x je příslušný délkový parametr a na ose y je vyneseno procentuální zastoupení počtu částic v dané velikostní třídě. V případě, že se nejedná o koule či krychle je preferován záznam dvou až tří histogramů, jež pomohou lépe pochopit rozložení velikosti. Například pro jehličky je vhodné uvést početní DVČ dle minimálního a maximálního průmětu.

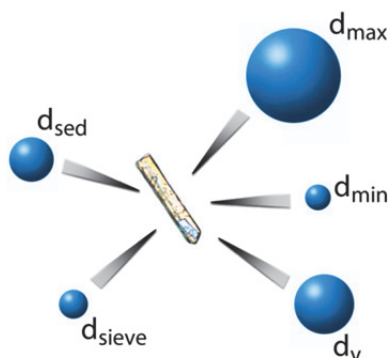


Obr. 70: Početní distribuce měření velikosti jehličkovitých částic léčivé látky (API) v závislosti na min. a max. průmětu (obrazová analýza)

Objemová distribuce velikosti částic

V závislosti na použité metodě analýzy má objemová DVČ tvar histogramu nebo spojitě distribuční křivky. Na ose x je velikost částic a na ose y je zaznamenáno procentuální rozložení objemu všech měřených částic do příslušných velikostních tříd.

Ve snaze popsat všechny tvary jedním číslem (nejenom koule a krychle), byla do praxe zavedena aproximace na tzv. ekvivalentní koule. Tzn. koulí o stejném objemu, maximální délce, minimální délce, rychlosti sedimentace, velikosti ok síta apod.), jako má měřená částice (Obr. 71). Tato aproximace bývá pro každou metodu měření velikosti částic rozdílná, a proto jednotlivé metody neposkytují zcela porovnatelné výsledky objemové DVČ. Důvodem jsou rozdílné fyzikální principy metod a z nich plynoucí rozdílné aproximace na skutečný objem.



Obr. 71: Způsob sférických aproximací nepravidelných tvarů částic

Percentilní d -hodnoty

Tyto hodnoty byly zavedeny proto, aby bylo možné číselně vyjádřit distribuci velikosti částic. I když je možné těchto hodnot vyjádřit více, zpravidla se uvádějí hodnoty tři - dolní decil - $d(0,1)$, horní decil - $d(0,9)$ a medián $d(0,5)$. Jedná se o hodnoty odečtené z kumulativní křivky při příslušném procentu počtu částic. Kumulativní křivka popisuje procentuální nárůst výskytu částic s jejich narůstající velikostí. Má vždy tvar rostoucí funkce s oborem hodnot od 0 do 100 %, např. $d(0,1) = 10\mu\text{m}$ znamená, že deset procent měřených částic je menších než 10 mikronů. Popis pomocí několika d -hodnot ovšem postrádá detailnější pohled na distribuci velikosti částic.

Důležitost velikosti a tvaru

Zpracovatelnost

Velikost a tvar částic ovlivňují procesy přepravy, mletí, homogenizace, granulace a tabletování prášků. Především je třeba vzít v úvahu síly působící mezi částicemi (adheze a koheze), mezi částicemi a výrobním zařízením (vibrace) a rozdíly ve velikosti jednotlivých složek v tabletě.

Míra adheze a koheze částic mezi sebou je dána velikostí kontaktních ploch mezi částicemi a také elektrostatickým nábojem materiálu. Snižováním velikosti částic až na určitou hraniční velikost tyto síly převáží síly gravitační a materiál má tendenci se shlukovat do aglomerátů, lepí se na sebe a vykazuje špatnou sypnost. S narůstajícími

kontaktními plochami mezi částicemi, především u jehliček a destiček, dochází k umocňování aglomerace. Kontrastním příkladem jsou nepravidelné částice zpravidla větší než půl milimetru. Takový materiál vykazuje velmi dobré tokové vlastnosti.

Při zpracování prášků do lékových forem vznikají vibrace. Např. během přepravy, při mísení nebo plnění zásobních botek před tabletačí. Vibrace prášků způsobuje jejich rozdělení podle velikosti. Běžným jevem je přesun malých částic do spodní části nádoby. To platí jak pro směs, tak pro čistý materiál, který má širokou distribuci velikosti částic. Vibrace mohou také vést ke zhutnění (konsolidaci) práškového lože. Stupeň zhutnění je rovněž závislý na velikosti částic. Rozdělení prášku podle velikosti lze ovšem pozorovat i při nevibračních pohybech.

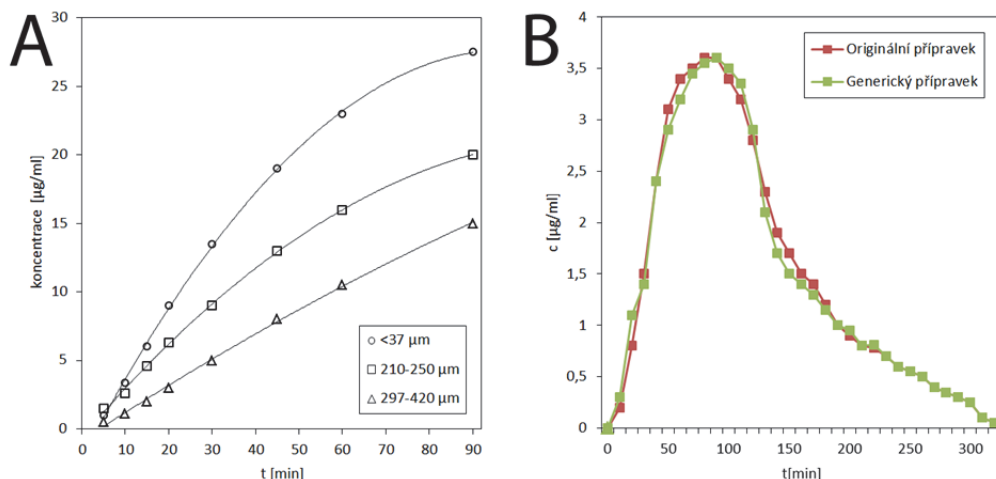
S narůstajícím rozdílem v DVČ, se u čistých látek nebo směsí, zvyšuje riziko protichůdného procesu homogenizace, a to segregace práškové směsi. Správným mísením, kontrolou homogenity a případně úpravou velikosti částic je možné segregáční proces minimalizovat. Další alternativou je příprava granulátu účinné látky s vybraným excipientem a následná homogenizace se zbytkem tabletoviny.

Chování

Při podávání *per os* závisí rychlost dezintegrace tablety na její mikrostruktúře, která ovlivňuje rychlost vstupu kapaliny do tablety. Při dostatečně rychlé dezintegraci tablety závisí rozpouštěcí rychlost léčivé látky na velikosti jejího specifického povrchu. Velikost specifického povrchu závisí nepřímo úměrně na velikosti částic a přímo úměrně na porozitě částic. Zvýšení specifického povrchu léčivé látky způsobí snížení fyzikálních překážek rozpouštění a urychlení tohoto procesu. Jinými slovy, čím jsou částice menší a poréznější, tím větší procento molekul léčivé látky je situováno na povrchu a při rozpouštění jich difunduje do kapaliny větší množství. Změna rozpouštěcí rychlosti je uvedena na Obr. 72 A, kde jsou ukázány disoluční profily tablet obsahující stejnou léčivou látku s rozdílnou distribucí velikosti částic.

Důležité je si uvědomit, že změnou velikosti částic lze ovlivnit rozpouštěcí rychlost, nikoli rozpustnost. Rozpustnost pevných látek závisí na krystalové struktúře a vnějších podmínkách rozpouštění. Změnou velikosti částic jednoho polymorfu, rozpouštěného při stejných podmínkách, nedojde ke změně rozpustnosti (uváděné např. v g/ml). Dojde ovšem ke změně rozpouštěcí rychlosti, která souvisí se změnou specifického povrchu.

Změny rozpouštěcí rychlosti, úpravou velikosti částic, je využíváno při modifikaci chování generika *in vivo*. Během bioekvivalenční studie (BES) se prokazuje shodný koncentrační průběh léčivé látky v krvi na čase u generického a originálního přípravku (Obr. 72 B). Mezní limity potvrzené shody jsou dány legislativou. Z praktických a ekonomických důvodů se BES provádí na závěr vývoje generického přípravku. Průběžná shoda se kontroluje pomocí disolučních testů, resp. shodou disolučních profilů originálu a generika. Takové hodnocení není příliš nákladné a je možné ho provádět opakovaně. Změnou distribuce velikostí částic generika je možné upravit disoluční profil tablety do požadovaného průběhu.



Obr. 72: A - Disolucní profily tablet s API o různé velikosti částic. Menší částice mají vyšší rozpouštěcí rychlost. B - Průběh plazmatické koncentrace amlodipinu v přípravku Agen (generikum firmy Zentiva) a Norvasc (originál firmy Pfizer)

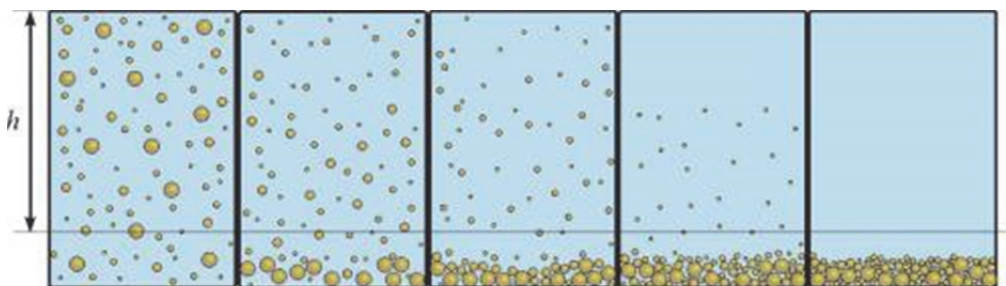
Jinou pevnou lékovou formou jsou například inhalační přípravky obsahující léčivou látku samotnou nebo nanesenou na nosičích. Při inhalačním podání pevné léčivé látky, např. při léčbě bronchiálního astmatu, lidské dýchací ústrojí velmi úspěšně odfiltruje částice nad určitou velikost, aby se zajistila integrita přívodu vzduchu a předešlo se podráždění plic. Vdechnutí musí být pro člověka snadné a lék se musí v plicích dobře deponovat. Specifickou velikost částic léčivé látky v práškových inhalátorech je proto nutné kontrolovat.

8.2 Metody měření velikosti částic

Existuje několik metod měření distribuce velikosti částic. Starší metody pracují na principu rozdělení vzorku do úzkých intervalů velikostí a podle procentuálního zastoupení hmotnosti v každém intervalu se provede vyhodnocení (viz síťová nebo sedimentační metoda). V současné době jsou ve farmacii validovanými metodami laserová difrakce a obrazová analýza mikroskopických snímků. Bohužel je problematické porovnávat výsledky měření mezi jednotlivými metodami. Je to způsobené jinými principy, na kterých jsou jednotlivé metody založeny. Pro porovnání výsledků měření DVČ je proto nutné použít jednu techniku při dodržení stejných podmínek měření.

Sedimentační metoda

Principem sedimentační metody je rozdělení částic na frakce díky rozdílné sedimentační rychlosti různě velkých částic (Obr. 73).



Obr. 73: Průběh sedimentace různě velikých částic. Koncentrace částic se detekuje v hloubce h . Doba sedimentace se prodlužuje zleva doprava

Dle Stokesovy rovnice pro koule, rychlost sedimentace závisí přímo na rozdílu hustot vzorku a kapaliny, gravitačním zrychlením, velikostí částic a nepřímo na viskozitě kapaliny (33). Z těchto parametrů vychází Stokesův zákon:

$$v = D_s^2 \cdot (\rho_p - \rho_L) \cdot \frac{g}{18\eta_L} \quad (33)$$

kde v je sedimentační rychlost částice, D_s je Stokesův (ekvivaletní průměr koule), ρ_p a ρ_L jsou hustoty částice a kapaliny, g reprezentuje gravitační zrychlení a η_L je viskozita kapaliny.

Je zřejmé, že pokud by byla kapalina viskóznější, pak by částice klesaly pomaleji. Do zařízení je možné přidat centrifugu, čímž se změní charakter usazování, ale sníží se doba měření. Pak je nutné do rovnice (33) zahrnout další členy charakterizující centrifugu.

Tato metoda je vhodná pro částice 0,1 – 300 μm . Je to robustní technika vhodná k průmyslovým aplikacím za relativně nízkých nákladů. Nevýhod je několik. Tuto metodu nelze použít k analýze vzorku, obsahující částice různé hustoty. S jemností frakce narůstá doba analýzy. V neposlední řadě je citlivost přístrojů ovlivněna fyzikálními faktory, jako jsou interakce mezi částicemi a Brownův pohyb. Citlivost, přesnost a rozlišení jsou také omezeny v případě, že hustota částic je podobná hustotě dispergující látky.

Sítová analýza

Sítová analýza je jednou z nejstarších metod charakterizace prášků na základě distribuce velikosti částic. Principem metody je prosévání vzorku přes řadu sít, která mají odstupňované velikosti otvorů. Vzorek se umístí do nejhořejšího, a zároveň nejhrubšího, síta a všechna síta se třepou definovanou dobu. Aparatura pro sítovou analýzu je znázorněna na Obr. 74. Tato metoda je levná a slouží často jako metoda hrubého zjištění distribuce velikosti částic, která je potom zpřesněna pokročilejšími metodami.



Obr. 74: Aparatura síťové analýzy

Základní dělení síťové analýzy je na suchou a mokrou cestu. Suchá cesta je vhodná, pokud je většina částic větších než 75 μm . Při prosévání částic o menší velikosti není dosažena dostatečná tíhová síla, která by překonala síly adheze (přilnutí k sítu) a koheze (vzájemná soudržnost částic). Tyto síly zabrání prostupu částicím, které by jinak sítím prošly. Mokré síťování lze použít až do velikosti částic kolem 10 μm .

Obrazová analýza mikroskopických snímků

Distribuce velikosti částic se z mikroskopických snímků získává pomocí softwaru obrazové analýzy (např. NIS Elements). Obrazová analýza NIS Elements je založena na principu označení dostatečně velkého souboru částic (1000 a více) a odečtení řady parametrů pro každou z nich. Mezi nejpoužívanější parametry patří minimální a maximální průměr, projekční plocha a vypočítaný objem ekvivalentní koule a kruhovitost. Na základě uživatelem zvolených parametrů a znalosti měřítka snímku, program vygeneruje histogram DVČ. Zpracovávat je možné „živý“ i archivovaný obraz. Výsledkem je nejčastěji objemová nebo početní distribuce velikosti částic. Objemová distribuce se získá nejčastěji aproximací na objem ekvivalentních koulí. Výpočet je založen na odečtení skutečné plochy částice, převodem na kruh se stejnou plochou a odečtení jeho průměru. Tento průměr je také označován jako ekvivalentní objemový průměr a je použit při výpočtu objemu ekvivalentní koule (Obr. 75). Početní distribuce představuje procentuální rozdělení částic do histogramu na základě délky, např. maximálního průměru. Kombinací několika početních distribucí (např. minimálního a maximálního průměru) je možné tvar částic lépe prezentovat. Výhodou obrazové analýzy je možnost korelovat výsledek distribuce se skutečným snímkem částic.

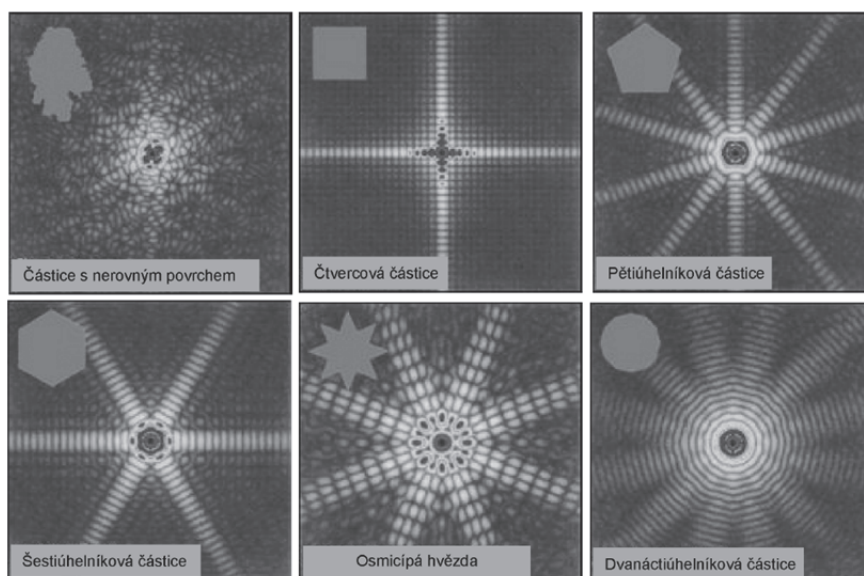


Obr. 75. Postup aproximace částice na objem ekvivalentní koule

Metoda laserová difrakce

Laserová difrakce je stále více preferovaná metodika měření velikosti částic ve farmaceutickém průmyslu. Jedná se o techniku hromadného měření částic, kdy se proměřují miliony částic během jednoho měření a kromě toho dokáže provést měření přes velmi široký dynamický rozsah. Princip spočívá v kontinuálním průtoku částic měřicí celou, na kterých difraktuje laserový svazek. Informace o velikosti a tvaru částic jsou obsaženy ve vzniklém difrakčním obrazci (Obr. 76) a odtud pomocí Fourierovy transformace převedeny na distribuční křivku. Před měřením je nutné nejdříve vyvinout a validovat metodu pro konkrétní vzorek. To znamená stanovit fixní a hledané parametry měření, které souvisí s vlastnostmi měřené látky. Laserová difrakce je rychlá, reprodukovatelná a robustní metoda.

Protože metoda laserové difrakce poskytuje difrakční obraz a nikoliv přímý obraz částice, je vhodné výsledek doplnit mikroskopickými snímky skutečných tvarů částic.



Obr. 76: Příklady difrakčních obrazců snímaných detektorem laserového difraktometru

Otázky:

Jaký je obecný účel pomocných látek v tabletě?

Jaké jsou základní druhy pomocných látek a jejich funkce?

Popište parametry velikosti a tvaru částic? Co tyto parametry ovlivňují?

Jakými způsoby lze modifikovat velikost a tvar částic? Jak se nazývají dvě základní kategorie těchto modifikací?

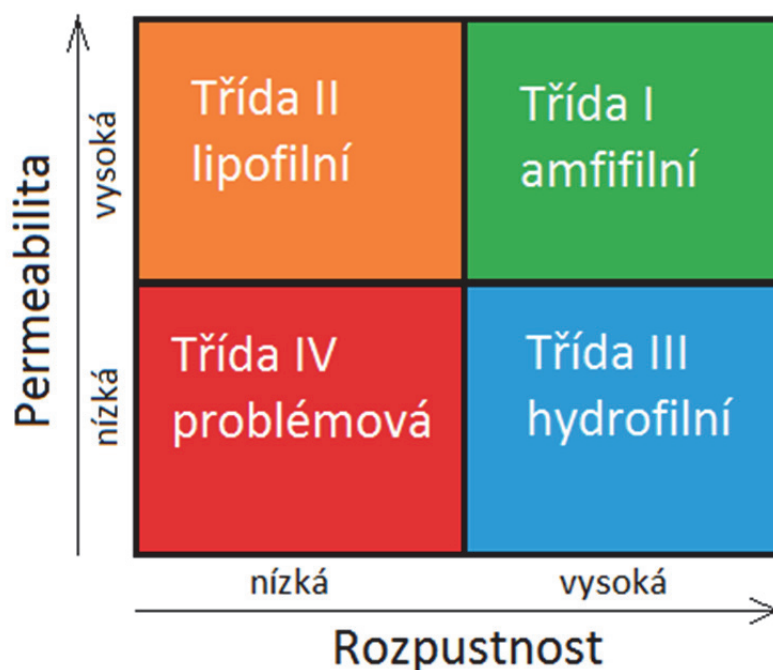
Jaké existují metody měření velikosti a tvaru částic? Popište ve zkratce dvě nejpoužívanější.

Vysvětli početní, objemovou DVČ a d-hodnoty? K čemu slouží?

9. ROZPOUŠTĚNÍ A ROZPUSTNOST

Pro farmaceutické aplikace je důležité, aby léčivá látka byla dobře a rychle rozpustná ve vodě (gastrointestinální trakt, zkráceně GIT, je vodné prostředí) a měla dobrou permeabilitu (schopnost průchodu biologickými membránami). To jsou základní předpoklady rychlé absorpce léčiva do krevního oběhu. Pro predikci absorpce slouží **biofarmaceutický klasifikační systém** (Biopharmaceutical Classification System, BCS), který léčivé látky dělí do čtyř skupin podle míry rozpustnosti a permeability (Obr. 77):

- I. Vysoce rozpustné a vysoce permeabilní (tramadol, losartan)
- II. Málo rozpustné a vysoce permeabilní (atorvastatin, itraconazol)
- III. Vysoce rozpustné a málo permeabilní (gabapentin, valcyklovir)
- IV. Málo rozpustné a málo permeabilní (acyklovir, cyklosporin)



Obr. 77: Biofarmaceutický klasifikační systém

Léčivá látka je **vysoce rozpustná**, když se její nejvyšší léčebná dávka rozpustí ve 250 ml (nebo méně) vodného pufru (pH 1-7,5) a **vysoce vstřebatelná (permeabilní)**, když se vstřebá nejméně z 90%. Je nutné si ale uvědomit, že BCS je určité dvouparametrové zjednodušení složitého procesu absorpce léčivé látky, kdy je třeba vzít v úvahu daleko více parametrů (stabilita, vazba na plazmatické bílkoviny atd.).

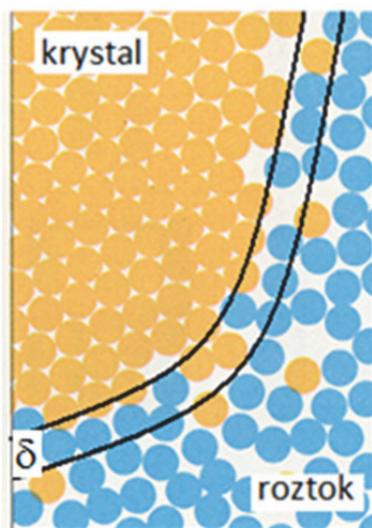
Pro léčivé látky spadající do kategorie I (a do kategorie III) by mělo platit, že během 15 minut dojde k jejich rozpuštění z 85 %. V takovém případě lze tvrdit, že

biodostupnost přípravku nebude limitována rozpouštěním léčivé látky. Rozpouštění je naopak limitujícím faktorem u léčivých látek spadajících do kategorie II. U léčivých látek z kategorie III je limitujícím faktorem absorpce permeabilita. Léčivé látky z kategorie IV jsou z hlediska orálního podání problémové.

Výše uvedený klasifikační systém se týká lékových forem s okamžitým uvolňováním léčiva (immediate release, conventional release). V takových lékových formách není kladena uvolňování (rozpuštění) léčiva z lékové formy žádná překážka. Kromě tohoto typu lékových forem existují ještě lékové formy s prodlouženým uvolňováním (extended release, prolonged release) a se zpožděným uvolňováním (delayed release, enteric coated, gastro resistant). Rozdíl mezi posledně jmenovanými typy lékových forem spočívá v tom, že u léčiv s prodlouženým uvolňováním je aktivní látka uvolňována postupně po delší dobu, zatímco v případě léčiv se zpožděným uvolňováním je potah lékové formy rezistentní proti kyselému prostředí žaludku a k uvolnění léčiva dochází až v tenkém střevě. Těmto specifickým lékovým formám je potom přizpůsobeno i provedení disolučního testu.

9.1 Rozpouštění

Rozpouštění neboli disoluce je obrácený proces vůči krystalizaci (solidifikaci) – při rozpouštění se částice rozpouštědla tlačí do povrchových vrstev krystalové struktury a uvolňují její stavební částice do roztoku. Při tom se překonává určitá energetická bariéra (δ). Stavební částice krystalu (v případě farmaceutických krystalů molekuly) se pak díky vlastnímu pohybu rovnoměrně rozptýlí mezi molekuly rozpouštědla (Obr. 78). Protože asi 2/3 aktivních farmaceutických substancí jsou slabé elektrolyty, tak se jejich molekuly ve vodném roztoku zčásti ionizují a hydratují.



Obr. 78: Proces rozpouštění krystalické látky s vyznačením energetické bariéry – tloušťky laminárního filmu δ

Podobným způsobem probíhá rozpouštění amorfních látek, které se obecně rozpouštějí rychleji než látky krystalické vzhledem ke své daleko méně uspořádané a labilní struktuře.

Tento zjednodušený a sumární popis rozpouštění je nutné podrobněji rozebrat ze dvou hledisek: z hlediska bilance a z hlediska mechanismu. Při rozpouštění se jedná o přenos hmoty z krystalu do roztoku, tzn. ve směru klesajícího gradientu koncentrace. Rozpouštěcí proces je anizotropní a probíhá na fázovém rozhraní mezi pevnou a kapalnou fází a je charakterizován dvěma základní parametry – rozpustností (solubility) a rozpouštěcí rychlostí (dissolution rate). Rozpouštění látky ilustruje její disoluční profil, což je nejčastěji závislost rozpustnosti na čase.

9.2 Rozpustnost

Rozpustnost je dosažitelná rovnovážná koncentrace látky (c_{eq}) v určitém objemu roztoku při dané teplotě, tlaku, pH a zvoleném rozpouštědle (pro farmacii především ve vodném prostředí). Veličina c_{eq} – **rovnovážná rozpustnost** se často označuje jako c_s (**saturační rozpustnost**). Stanovuje se v nasyceném roztoku měřené léčivé látky, který se vytvořil po dlouhé době (např. po 24 hod) nad pevnou fází, která se již dále, za výše uvedených podmínek, nerozpouští. Látky dobře rozpustné ve vodě jsou polární povahy a nazývají se **hydrofilní**. Naopak látky **hydrofobní** jsou ve vodě rozpustné málo, protože jsou málo polární. Ve farmacii se rozpustnost vyjadřuje různým způsobem, nejčastěji v mg/ml (roztoku), příp. v $\mu\text{g/ml}$ (roztoku), molární koncentrací, mol dm^{-3} nebo počtem ml rozpouštědla, které je potřeba k rozpuštění 1 g léčivé látky.

Rozpustnost čistých léčivých látek není snadno stanovitelným parametrem, o čemž svědčí rozptyl publikovaných hodnot (Tab. 17), které odpovídají ne vždy jasně definovaným podmínkám.

Tab. 17: Variace v hodnotách rozpustnosti léčivých látek ve vodě při 25 °C nalezené v literatuře

API	Rozpustnost v mg/ml	Rozpustnost v $\mu\text{g/ml}$
dexamethason	89,1; 121,0	
diklofenak		0,6 - 2,4
digoxin	28,0; 97,9	
estradiol	0,16; 5,00	
hydrokortizon	280; 359	20 - 80
ibuprofen		
indomethacin	4,00; 14,0	
lidokain	2,30; 4,60	
progesteron	7,90 ; 200	
riboflavin	66,0; 99,9	

Rozpustnost lze vypočítat i teoreticky (Hildebrantovy parametry, solvatochromní parametry), ovšem i zde existuje rozptyl mezi teoretickými a naměřenými hodnotami.

Důvodem těchto disproporcí jsou často nepřesná a nedostatečně definovaná měření (většinou není ustavena rovnováha mezi kapalnou a pevnou fází) a různými autory různě definované a vzájemně těžko porovnatelné pojmy rozpustnosti (biological solubility, native solubility, natural solubility, buffered solubility, thermodynamic solubility, kinetic solubility aj.) a nedokonalý matematický model.

V tabulkách se hodnota rozpustnosti substancí uvádí většinou k teplotě 25 °C, nověji k teplotě 37 °C (což je fyziologická teplota lidského těla). Pro farmacii je důležitá závislost rozpustnosti na pH, vzhledem k prostředí zažívacího (gastrointestinálního, GIT) traktu. Měření se provádí v rozmezí pH 1 – 7,5.

Zvyšování rozpustnosti

Léčivá látka, aby byla účinná, musí v krevní plazmě dosáhnout určitého minimálního koncentračního limitu (mikromolární, příp. nanomolární hladiny). Základním problémem farmaceutického průmyslu je fakt, že léčivé látky jsou organické sloučeniny, které se obecně ve vodě příliš nerozpouští. Z tohoto důvodu jsou hledány cesty, jak jejich rozpustnost zvýšit. Na druhé straně však zvyšování rozpustnosti vede často ke zvýšení nestability (chemické a fyzikální). Při formulaci je nezbytné volit optimální řešení balance rozpustnost/stabilita.

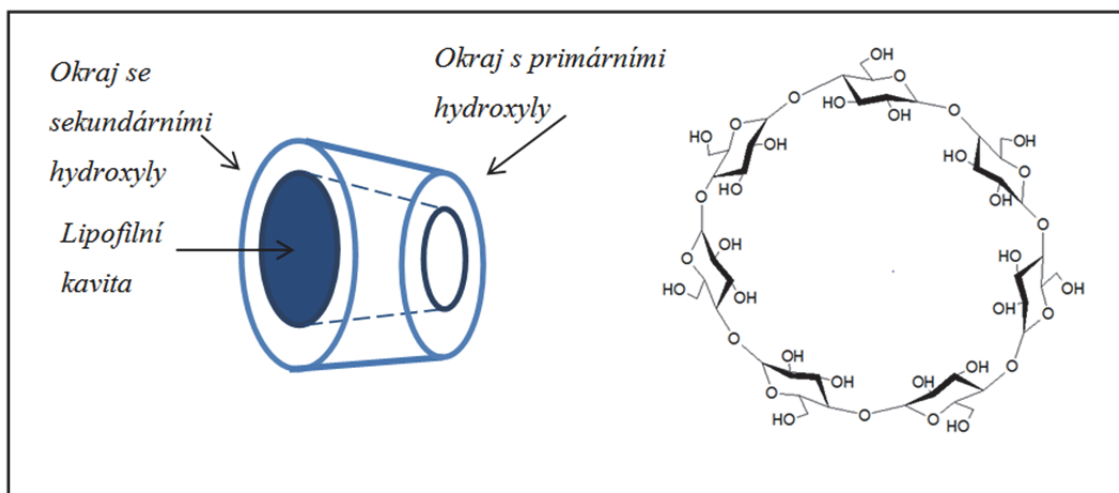
Zvýšení rozpouštěcí rychlosti farmaceutické substance lze docílit celou řadou postupů. První možností je změna formy např. převedením slabé kyseliny nebo slabé báze na sůl, hydrát nebo kokystal (viz kap. 7). I výběrem jiného polymorfu, lze docílit změnu farmakodynamických vlastností, jak již bylo zmíněno v kap. 5.

Dále se používají proléčiva (prodrugs), což jsou chemicky modifikované substance, které obsahují dodatečné funkční skupiny, např. estery. Proléčivo určité substance může být více rozpustné než substance sama (může mít i lepší permeabilitu), přičemž v zažívacím traktu se hydrolyticky nebo enzymaticky transformuje na léčivou substanci. Používanými příklady jsou (proléčivo/substance): fosfofentyoin/fenytoin, valacyklovir/acyklovir aj.

Zvýšení rozpustnosti lékové formulace je možné dosáhnout i několika technologickými postupy, např. zmenšením velikosti částic (mikronizací) nebo extruzí taveniny. Při přípravě extrudované lékové formy je účinná látka dispergována v tavenině pomocných látek a výsledný extrudát může být po sféronizaci naplněn přímo do tvrdých želatinových tobolek. Dalšími technologickými postupy je příprava nanosuspenzi, mikroemulzí nebo vytvoření porézní matrice (pevné disperze). Tyto technologie si řada farmaceutických firem nechala patentovat: Zydis (R.P. Scherer, Inc.), WOWTAB (Yamanouchi Pharma Technologies, Inc.), OraSolv and DuraSolv (Cima Labs, Inc.), FlashDose (Fuisz Technologies, Ltd.), Flashtab (Prographarm Group), OraQuick (KV Pharmaceutical Co., Inc.), Quick-Dis (Lavipharm Laboratories Inc.), NanoCrystal (Elan Corp.).

Často se používá vytvoření inkluzního komplexu mezi málo rozpustnou substancí a hostitelskou fází. Za hostitelskou molekulu bývá nejčastěji volen nativní β -cyklodextrin (bioabsorbovatelný cyklický oligosacharid), do jehož kavity tvořené kruhem sedmi

glukopyranosových jednotek (Obr. 79), se umístí molekula málo rozpustné substance. Vnější část kavity je hydrofilní a vnitřní kavita má lipofilní charakter, cyklodextriny jsou tedy ideální volbou pro hydrofóbní a lipofilní léčiva. Pro přípravu komplexů lze aplikovat celou řadu experimentálních postupů: odpařování z roztoku, mletí, tření za přítomnosti rozpouštědla, lyofilizaci a sprejové sušení nebo přípravu v suspenzi. Výsledný komplex je nekystalická a metastabilní fáze, která má ovšem vyšší rozpustnost než samotná substance. Příkladem jsou komplexy cyklodextrinů s prednisolonem (Captisol) a prostaglandinem E₁.



Obr. 79: Struktura β -cyclodextrinu

9.3 Rozpouštěcí rychlost

Z 1. Fickova zákona plyne rovnice, která je v literatuře známa pod názvem Noyesova – Whitneyova (34). Tato rovnice definuje rozpouštěcí rychlost, tzn. množství látky dm , které se rozpustí v časovém intervalu dt :

$$\frac{dm}{dt} = \frac{A \cdot D}{\delta \cdot V} (c_{eq} - c_t) = KA(c_{eq} - c_t) \quad (34)$$

kde A je plocha mezifázového rozhraní mezi roztokem a pevnou fází, D je difúzní koeficient rozpouštěné látky, δ je tloušťka laminárního filmu, V je objem roztoku v použitém testu, c_{eq} (c_s) je rovnovážná (saturační) koncentrace, c_t je koncentrace v čase t , a $K (= D/(\delta \cdot V))$ je rychlostní konstanta rozpouštění. Rozpouštěcí rychlost dm/dt má ve farmacii typické rozměry [$\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$] nebo [$\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$]. Kinetika rozpouštění v uzavřeném systému je 1. řádu.

Vzhledem k tomu, že při rozpouštění pevná fáze ubývá – klesá velikost povrchu (A není konstantní), je vhodné rozpouštěcí rychlost vztáhnout k jednotce povrchu [např. cm^{-2}] a tak definovat tzv. **vlastní rozpouštěcí rychlost** (intrinsic dissolution rate, IDR):

$$\left(\frac{dm}{dt}\right)/A = \frac{D}{\delta V}(c_{eq} - c_t) = \frac{k}{V}(c_{eq} - c_t) \quad (35)$$

kde $k (= D/\delta)$ je konstanta vlastní rozpouštěcí rychlosti. Tato konstanta má rozměr [délka \cdot čas⁻¹]. Ve farmacii bývá vlastní rozpouštěcí rychlost vyjadřována v různých jednotkách [g.s⁻¹.cm⁻²], [mg.min⁻¹.cm⁻²] nebo [mg.min⁻¹.m⁻²].

Situaci kdy $c_{eq} \gg c_t$ (reálný stav - systém je velmi vzdálen od rovnovážného stavu) označujeme jako tzv. „**sink**“ **podmínky** (sink = výlevka):

$$\left(\frac{dm}{dt}\right)/A = \frac{k}{V}c_{eq} \quad (36)$$

V případě „sink“ podmínek je rychlost rozpouštění konstantní a řídí se kinetikou 0. řádu.

Z rovnic 34-36 vyplývá, jak lze rychlost rozpouštění urychlit: zvětšením A , např. rozmělněním substance na menší částice, čímž dojde ke zvětšení povrchu, nebo zvýšením smáčivosti povrchu jiným rozpouštědlem nebo zvýšením D – měřením při vyšší teplotě. Naproti tomu hodnotu δ lze snížit (a tudíž zvýšit rychlost rozpouštění) lepším a intenzivnějším promícháváním roztoku. Kromě toho je rozpouštěcí rychlost ovlivněna všemi parametry pevného (krystalického) stavu: stupněm krystalinity (amorficity), krystalovým habitem, krystalovou strukturou (polymorfismem) atd. Na rozpouštěcí rychlost mají vliv i zvolené vnější podmínky testu: hydrodynamika, teplota, viskozita, pH a další faktory charakterizující disoluční prostředí. Hodnoty těchto parametrů jsou však stanoveny příslušnou lékopisnou normou.

V zaživacím traktu probíhá rozpouštění léčiva komplikovaněji než v testovacích aparaturách. Především je časově proměnná rychlost rozpouštění a kinetika se pohybuje mezi 0. a 1. řádem.

9.4 Disoluce pevných lékových forem

Disoluční test je vyžadován u všech pevných lékových forem, u kterých je pro dosažení terapeutického efektu nezbytná absorpce léčiva organizmem. Disoluční test je přesně definován lékopisem a musí být:

- diskriminující
- správný
- přesný
- transferovatelný
- robustní

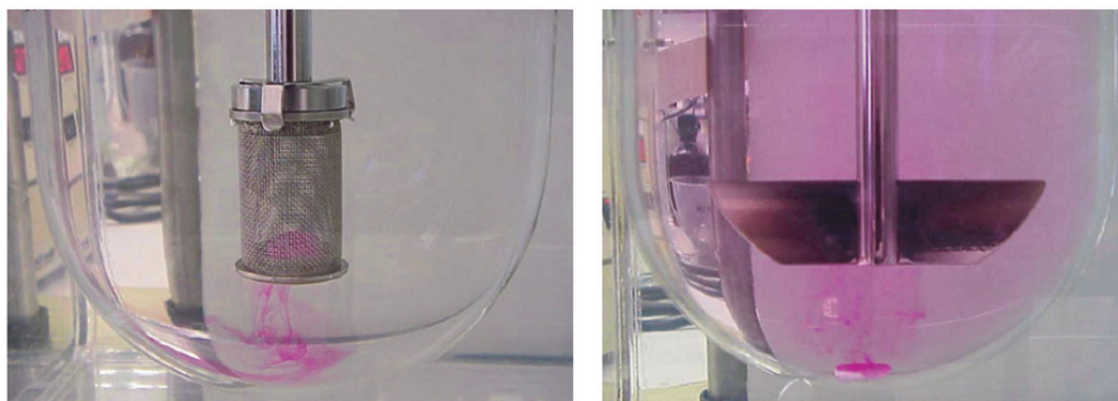
Disoluční test by měl indikovat takové změny lékové formy (velikost částic, velikost povrchu, změnu polymorfu, hydrataci aj.), které by ovlivnily rozpustnost nebo rozpouštěcí rychlost nebo dostupnost *in-vivo*.

Disoluční aparáty a média

Disoluční test se provádí v zařízeních, zvaných disoluční aparáty. Při disolučních testech se nejčastěji používá košíčková (USP 1) a pádélková (USP 2) aparatura (Obr. 80), které jsou doporučeny a standardizovány v U.S. Pharmacopei (USP). Ačkoliv z technického hlediska lze disoluční aparát považovat za poměrně jednoduchý přístroj, je nutno si uvědomit, že požadavky disolučního testu přístroj splňuje pouze za předpokladu, kdy jsou jeho parametry (termostatování, vzdálenosti míchadel nebo košíčků od dna nádob, vycentrování hřídele atd.) drženy v limitech, předepsaných lékopisy. Parametry disolučního aparátu musí být v pravidelných intervalech testovány jednak ověřováním skutečných hodnot těchto parametrů měření a jednak prováděním disolučních testů s tzv. kalibračními tabletami (prednison a kyselina salicylová), u kterých je limitován jak minimální tak i maximální nalezený obsah léčivé látky.

Aparát s košíčky je tvořen termostátovanou disoluční nádobou, ve které je hřídel s košíčkem. Zkoušená léková forma se vkládá dovnitř košíčku, který se během disolučního testu otáčí. Aparát s košíčky se většinou používá pro disoluční test tobolek. Otáčky košíčku jsou voleny zpravidla v rozsahu otáček 50 – 100 ot./min.

Aparát s pádly je tvořen termostátovanou disoluční nádobou, ve které je rotující hřídel s míchadlem. Zkoušená léková forma se v tomto případě vnáší do disoluční nádoby. Otáčky míchadla jsou voleny zpravidla v rozsahu otáček 50 – 75 ot./min.



Obr. 80: Košíčková (vlevo) a pádélková (vpravo) metoda měření rozpouštěcí rychlosti

Obecně se doporučuje (není však nutností), aby disoluční médium splňovalo „sink“ podmínky. Ty jsou splněny, když objem média je minimálně trojnásobný vzhledem k objemu média potřebného k vytvoření nasyceného roztoku substance. Bude-li se tedy v disolučním testu provádět test lékové formy s deklarovaným obsahem aktivní látky 100 mg, o rozpustnosti 100 mg/l daného disolučního média a při dané teplotě, budou potřeba 3 litry tohoto média, aby byly splněny „sink“ podmínky.

Nejběžnějším disolučním médiem je voda, nicméně toto médium má kromě nesporných výhod i svá úskalí, kterými jsou především variabilita hodnoty pH použité vody i změna pH hodnoty a povrchového napětí během disoluce v závislosti na povaze látek, které se během disolučního testu rozpouštějí. V případě vody lze vyzorovat

poměrně paradoxní situaci, kdy např. FDA před použitím vody jako disolučního média odrazuje, zatímco pro japonský úřad FYI je voda médiem první volby.

V případě lékových forem, které jsou ve vodě málo rozpustné, je přípustné použít v médiu vhodný tenzid, jehož koncentrace by měla být experimentálně podložena.

Jako typická média se používají: - voda

- kyselina chlorovodíková (0,1- 0,001M)
- octanové pufrы
- fosfátové pufrы
- roztoky polysorbátů
- roztoky dodecylsulfátu sodného (SDS)
- roztoky lauryldimethylamino N oxidu
- kombinace pufrů s tenzidy
- simulovaná žaludeční šťáva bez enzymu
- simulovaná intestinální šťáva bez enzymu

V disolučních testech se používá objem média od 500 ml do 1000 ml, nejčastěji však 900 ml. Přesné podmínky pro již běžně používané farmaceutické substance definuje FDA na svých stránkách.

V souvislosti s disolučním testem se často hovoří o tzv. *in-vivo – in-vitro* korelaci. Jak už název napovídá, je to vztah, kdy výsledek disolučního testu odpovídá skutečné biodostupnosti. Úkolem disolučního testu je rozlišit vyhovující (biodostupné) léčivo od léčiva nevyhovujícího. *In-vivo – in-vitro* korelace lze dosáhnout, pokud je k dispozici léčivo s prokázanou vyhovující nebo nevyhovující biodostupností. V takových případech lze vhodnou modifikací disoluční metody dosáhnout korelace výsledku disolučního testu se skutečnou biodostupností léčiva.

V poslední řadě je vhodné zmínit i existenci tzv. biorelevantních médií, které simulují prostředí, ve kterém dochází k rozpouštění léčiva. Tato média svým složením zaručují nejen adekvátní pH hodnotu, ale i koncentraci žlučových kyselin a osmolaritu, které odpovídají jak lačnému, tak nasycenému stavu. Tato média mají smysl např. pro nastavení *in-vivo – in-vitro* korelace během vývoje lékové formy. Ve fázi rutinního disolučního testování lékové formy, která již je na trhu, se ale takto komplikovaná média nepoužívají.

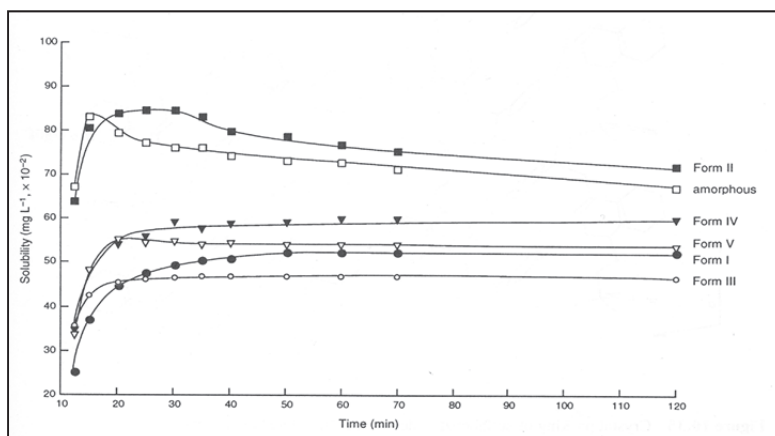
Jako základ pro nastavení *in-vitro* disoluční specifikace může být použit biofarmaceutický klasifikační systém, zda je možné dosáhnout *in-vivo – in-vitro* korelace. Aplikace vhodné disoluční metody je pak dána typem lékové formy.

Disoluční profil

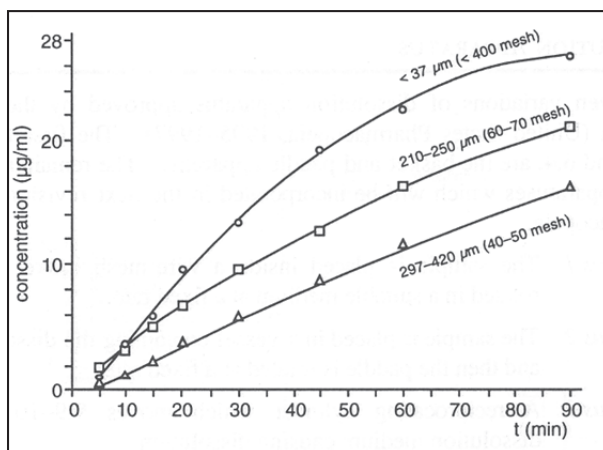
V těchto skriptech uvažujeme nejstarší a nejrozšířenější teorii rozpouštění pevné látky přes filmovou (laminární, difúzní) vrstvu roztoku. Existují i jiné teorie, pro všechny je však společné, že při rozpouštění musí částice uvolňované z krystalu překonávat potenciálovou bariéru rozhraní pevná látka / kapalina.

Ustavení rovnovážného roztoku graficky ilustruje disoluční profil látky, který udává závislost koncentrace na čase. Disoluční profily lze také porovnávat např. při různých hodnotách pH nebo velikosti částic apod.

Pro kompletní představu o rozpustnosti a rozpouštění látky je někdy důležité změřit i jiné profily, např. závislosti typu: vlastní rozpouštěcí rychlost / rozpustnost nebo vlastní rozpouštěcí rychlost / pH aj. Při stanovení určitého disolučního nebo jiného profilu musí být ostatní proměnné v systému nastaveny tak, jak to předepisuje lékopis či jiná norma. Na Obr. 81 a Obr. 82 jsou uvedeny příklady různých disolučních profilů.

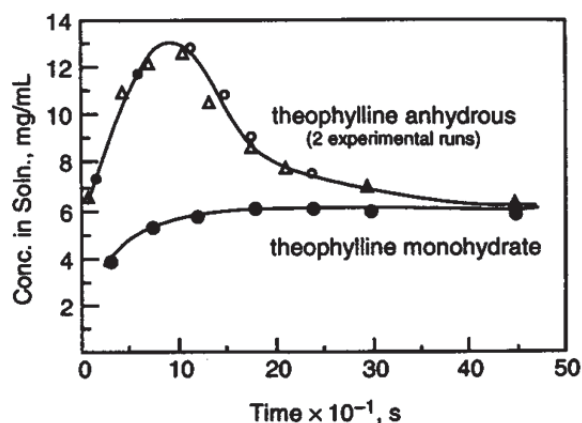


Obr. 81: Disoluční profily různých polymorfů a amorfní formy sulfameru
(převzato z Byrn S.R., Pfeiffer R.R., Stowell J.G. Solid State Chemistry of Drugs.
Second Edition. SSCI, Inc. West Lafayette Indiana 1999)



Obr. 82: Disoluční profily erytromycinu estolátu při různých velikostech částic
(převzato z Byrn S.R., Pfeiffer R.R., Stowell J.G. Solid State Chemistry of Drugs.
Second Edition. SSCI, Inc. West Lafayette Indiana 1999)

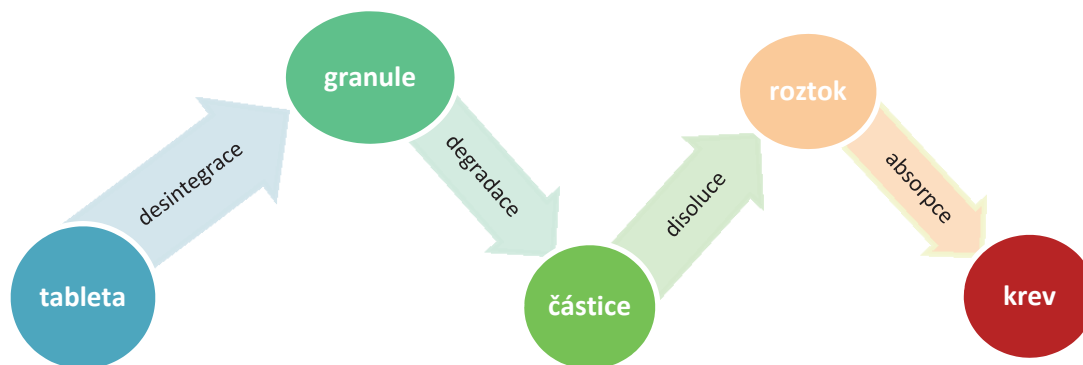
Disoluční profil: vlastní rozpouštěcí rychlost / pH, je důležitý pro posouzení rozpustnosti solí. Protože absorpce léčiva probíhá v největší míře v tenkém střevě, je důležité, aby maximální rozpustnost látky byla při pH 6-8. Soli jsou obecně rozpustnější než volné kyseliny nebo báze a mají i vyšší rozpouštěcí rychlosti. Jak již bylo uvedeno, každá sůl je charakterizována hodnotou pH_{max} , při které je hodnota její rozpouštěcí rychlosti nejvyšší.



Obr. 83: Disoluční profily bezvodého a hydratovaného teofilinu
 (převzato z Byrn S.R., Pfeiffer R.R., Stowell J.G. Solid State Chemistry of Drugs.
 Second Edition. SSCI, Inc. West Lafayette Indiana 1999)

9.5 Mechanismus rozpouštění

Při orálním podání pevné lékové formy dojde v zažívacím traktu pacienta k následujícím procesům:



Obr. 84: Schéma rozpouštění pevné lékové formy v zažívacím traktu

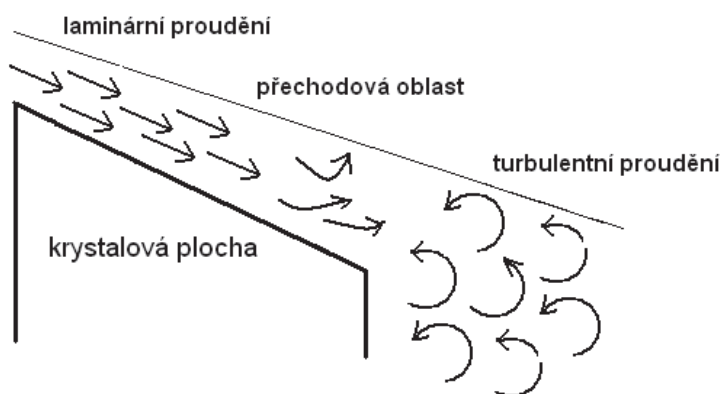
Je možný však i jiný mechanismus, kdy léková forma působením excipientů – rozvolňovadel v GITu nabobtná a praskne náraz. Rozpouštěcí proces je u většiny pevných formulací dokončen v tenkém střevě, kde jsou částice omývány střevní kapalinou. Mechanismus rozpouštěcího procesu zahrnuje proudění (konvekci), difúzi (prolínání) a přechodovou fázi konvekce – difúze. Pro rozpouštěcí rychlost je důležité, který z těchto mechanismů v konkrétním případě dominuje. Rozpouštění je anizotropní proces (různé krystalové plochy se rozpouštějí různě rychle) a navíc rozpouštění krystalové plochy neprobíhá ideálně po vrstvách, ale na povrchu se vytváří různé krátery a vyvýšeniny.

Hydrodynamika rozpouštění pevné látky zahrnuje jak laminární, tak turbulentní proudění (Obr. 85). Při laminárním neboli vrstevnatém proudění jsou proudnice rovnoběžné a nemísí se. Mezi jednotlivými vrstvami existuje vnitřní tření. Laminární proudění vhodně popisuje proudění reálných kapalin při malých rychlostech. Při turbulentním proudění se proudnice navzájem promíchávají, takže vznikají víry. Turbulentní proudění není stacionární, tzn., že částice kapaliny nemají ve všech místech stejnou rychlost. Turbulentní proudění se uplatňuje při vyšších rychlostech.

K rozlišení laminárního proudění od turbulentního se používá hodnota bezrozměrného Reynoldsova čísla, které je dáno vztahem:

$$Re = \frac{v_s d}{\nu} \quad (37)$$

kde v_s je rychlost proudění [cm/s], ν je kinematická viskozita [cm²/s] při zvolené teplotě a d je charakteristický rozměr hydrodynamického systému, např. poloměr tablety [cm] obtékané rozpouštědlem. Při nižších hodnotách Re je proudění laminární, při vyšších turbulentní. Hranice není ostrá, ale je popisována tzv. přechodovou oblastí (viz Obr. 85).



Obr. 85: Laminární a turbulentní proudění

Komponentu konvekce - difúze v rozpouštěcím procesu reprezentuje bezrozměrné Pecletovo číslo, které je definované:

$$Pe = \frac{v_s d}{D} \quad (38)$$

kde D je difúzní koeficient rozpouštěné látky. Vzájemný poměr Pe/Re ($= \nu/D$) se nazývá Prandtlovo nebo Schmidtovo číslo. V disolučních testech jsou vztahy 37 a 38 modifikovány zahrnutím parametrů míchání a rozměrů nádoby, ve které se testy provádí.

Jak při krystalizaci, tak při rozpouštění jsou krystalky obklopeny filmovou (difúzní) vrstvou roztoku, která je téměř v klidu, takže nepodléhá hydrodynamickému chování okolní kapaliny. Tuto vrstvu stavební částice krystalu překonávají difúzním

mechanismem. Při rozpouštění má roztok na vnitřní hranici difúzní vrstvy (u krystalu) koncentraci c_0 , na vnější hranici koncentraci $c_\delta = c_{\text{eq}}(c_s)$, přičemž platí $c_0 > c_{\text{eq}}(c_s)$, takže je zajištěn koncentrační gradient směrem od krystalu do roztoku. Řídícím (nejpomalejším) dějem celého rozpouštění je většinou popsán difúzní krok, pokud uvažujeme pouze stacionární systém.

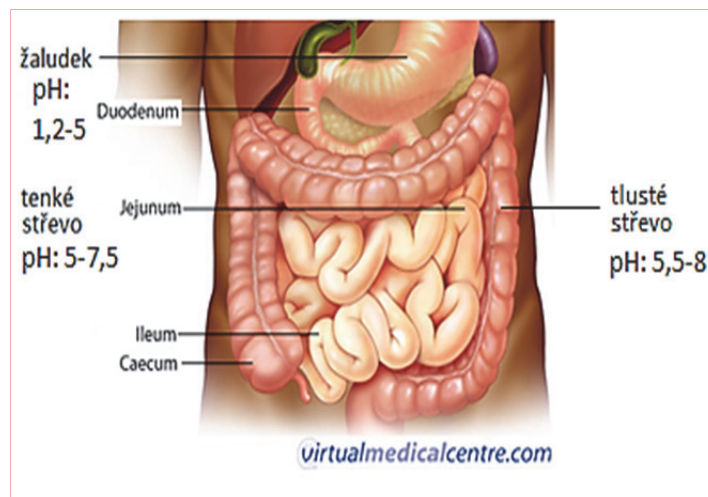
V Tab. 18 jsou pro ilustraci uvedena kompletní disoluční data kyseliny salicylové.

Tab. 18: Kompletní disoluční data kyseliny salicylové – převzato z Mauger J. et al.: Dissolution Technologies. August, 3 (2003)

Parametry disolučního testu	Hodnota
Rozpustnost kyseliny salicylové ve vodě při 37 °C	1,87 ⁻² M, 2,58 mg/ml
Rozpustnost kyseliny salicylové ve fosfátovém pufru pH 7,4 při 37 °C	7,30 ⁻² M, 10,07 mg/ml
Výsledné pH nasyceného roztoku salicylové kyseliny v 0,05 M fosfátovém pufru při 37 °C	3,2
Difúzní koeficient kyseliny salicylové	1,132 ⁻⁵ cm ² /s
Kinematická viskozita vody při 37 °C	0,00699 cm ² /s
50 otáček za min. 100 otáček za min.	5,235 otáček/s, 10,47 otáček/s
Reynoldsovo číslo	1,73 ² při 50 ot./min 3,45 ² při 100 ot./min
Pecletovo číslo	1,07 ⁵ při 50 ot./min 2,13 ⁵ při 100 ot./min
V/D	617
Bezrozměrný rychlostní faktor míchání, γ	0,4

9.6 Absorpce léčiv

Hlavní způsob aplikace pevného léčiva je ústy (perorálně neboli *per os*). Tento způsob aplikace se také nazývá enterální. Léčivo dostane do GITu. Jícnem prochází do žaludku a dále do tenkého střeva (Obr. 86). V GITu dochází k rozpadu lékové formy (tablety) a uvolňování léčiva.



Obr. 86: Část gastrointestinálního traktu a specifickými hodnotami pH

Uplatňují se procesy dezintegrace (rychlost závisí na tabletovacím tlaku a na porozitě tablety), deagregace (vliv rozvolňovacích excipientů, např. stearátu nebo škrobu) a rozpouštění. V tenkém střevě je léčivo již v roztoku a v jeho částech zvaných jejunum a ileum dochází k absorpci léčiva. Absorpce z tenkého střeva je nejčastější, je ovšem možná i absorpce z ústní dutiny, ze žaludku, z tlustého střeva a z rekta. Tenké střevo má však v GITu největší absorpční plochu (200 m²) a je bohatě prokrveno. Mechanismy, které absorpci umožňují jsou především difúze, dále transport přes nosiče, transport přes vodní membránové póry a pinocytóza.

Volná difúze přes buněčné stěny tenkého střeva probíhá bez dodání energie ve směru záporného koncentračního gradientu podle 1. Fickova zákona. Při tomto ději dochází k rozpuštění léčiva ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčné stěny (membrány) a molekuly tak putují ve směru dovnitř buňky. Transport léčiva buněčnou membránou neboli permeabilitu léčiva ovlivňují jeho fyzikálně-chemické vlastnosti: lipofilita/hydrofilita, pK_a a lokální pH. Lipofilní látky prostupují přes membránu přímo, rychlost difúze je přímo úměrná jejich rozpustnosti v tucích. Hydrofilní látky jsou v tucích nerozpustné a proto mohou difundovat pouze prostřednictvím vodních pórů v membráně. Míru lipofility, resp. permeability neutrálních léčiv (neelektrolytů) určuje hodnota **rozdělovacího koeficientu P** (nezávisí na pH ani na pK_a)

$$P = c_{\text{oktanol}} / c_{\text{voda}} \quad (39)$$

kde c jsou rovnovážné (saturační) koncentrace látky v systému oktanol-voda (oktanol je hydrofóbní).

Pokud je léčivo slabou kyselinou nebo zásadou (elektrolytem), potom je míra lipofility určena hodnotou **distribučního koeficientu D** (závisí na pH a na pK_a)

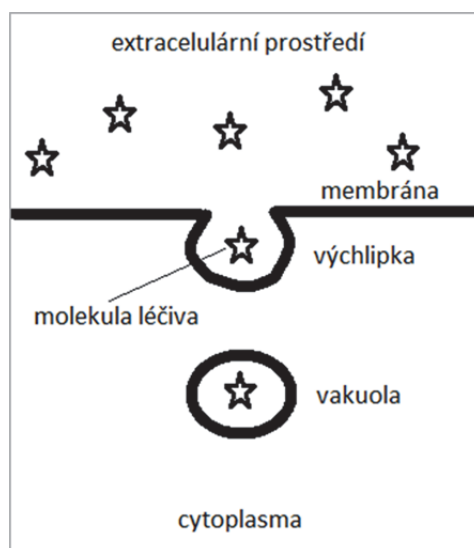
$$\log D = \log P - \log \left[1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_a)} \right] \quad - \text{ slabá kyselina} \quad (40)$$

$$\log D = \log P - \log \left[1 + 10^{(\text{pK}_a - \text{pH})} \right] \quad - \text{ slabá báze} \quad (41)$$

Transport přes nosiče, tzv. přenašečové proteiny (P-glykoprotein) probíhá tak, že molekula léčiva vytvoří s nosičem komplex a ten projde membránou. Na druhé straně membrány je léčivo z komplexu uvolněno a samotný nosič se vrací zpět (tak jsou přenášeny např. aminokyseliny).

Prostup přes vodní membránové póry je vymezen malou velikostí pórů (0,4 nm) a může probíhat buď prostou difúzí nebo filtrací vlivem rozdílu v hydrostatickém a osmotickém tlaku na obou stranách buněčné membrány. Jak bylo uvedeno, tímto způsobem se přenáší pouze hydrofilní molekuly a ionty.

Pinocytóza se uplatní hlavně u velkých molekul léčiva, kdy se vytvoří výchlíпка membrány, do které je molekula zachycena. Výchlíпка přejde ve vakuolu (měchýřek), pomocí které se molekula léčiva transportuje (Obr. 87). Proces však vyžaduje působení adenosintrifosfátu (ATP).



Obr. 87: Pinocytóza

Kromě těchto tzv. transcelulárních mechanismů existují i mechanismy paracelulární, kterými se molekula léčiva transportuje mezi buňkami. Nicméně, jak již bylo uvedeno, nejdůležitějším mechanismem absorpce léčiv je transcelulární difúze.

Po průchodu střešní stěnou vstupují léčiva v krvi portální žilou do jater, kde jsou v různé míře metabolizována. Tento jev se nazývá efekt prvního průchodu játry (first-pass effect). Teprve potom vstupují do systémové cirkulace, takže do krevního oběhu se dostane pouze část perorálně aplikované dávky léčiva. Efekt prvního průchodu játry spolu se ztrátami ve střešní stěně tak snižují orální biodostupnost léku: např. morfin 20-40%, cimetidin 60-70% atd.

Otázky:

Co to je rozpouštění a rozpustnost?

Jak lze docílit zlepšení rozpustnosti? Jaké metody jsou vhodné pro API ve formě slabé báze nebo slabé kyseliny, případně pro hydrofóbní látky?

Jak se zjišťuje disoluční profil léčiva a na čem závisí?

Popište mechanismus rozpouštění API.

10. STABILITA A DEGRADACE

Každý léčivý přípravek má svoji dobu života (life-cycle, life-time), která začíná v okamžiku jeho výroby a končí vypršením doby **expirace**. Datum expirace omezuje dobu použitelnosti léku pro pacienta. Po dobu použitelnosti má lék deklarované jakostní znaky, především deklarovaný obsah API a excipientů. Doba použitelnosti se stanovuje na základě **stabilitních studií**. Na druhé straně lék od okamžiku výroby degraduje, tzn., že se postupně zvyšuje obsah degradačních produktů API a excipientů. **Degradační produkty** jsou buď méně aktivní než API nebo neaktivní nebo výjimečně toxické. Degradaci nelze úplně zastavit, lze ji pouze různými způsoby zpomalit. V okamžiku vypršení expirace je API degradována asi z 5 %. Tento limit je běžný u většiny národních regulačních autorit.

10.1 Stabilitní studie

Podle direktivy FDA existuje 6 kategorií stability léků:

- fyzikální
- chemická
- mikrobiologická
- terapeutická
- toxikologická
- genotoxická

U pevných léčiv patří do kategorie fyzikální stability především nežádoucí polymorfni přechody, které byly podrobně probrány v kap. 6. Mikrobiologická stabilita znamená odolnost proti mikrobiálnímu růstu, terapeutická stabilita odolnost proti ztrátě terapeutického účinku, toxikologická stabilita hodnotí vznik možných toxických degradačních produktů a genotoxická stabilita vznik možných mutagenních degradačních produktů, který by mohly poškodit DNA.

Nejrozsáhlejší problematiku však tvoří stabilita chemická, resp. **chemické degradace léčiv**.

Chemická stabilita

Chemická stabilita pevných léčiv je velmi důležitým a sledovaným parametrem jakosti léčiv. Jedná se o vlastnost léčiva zachovat si během doby použitelnosti určené chemické jakostní znaky. Léčivo musí po celou dobu použitelnosti (do expirace) být chemicky stabilní především v širokém rozmezí teploty, vlhkosti, při působení světla a při kombinaci těchto vlivů. Z tohoto důvodu je léková formulace podrobována testům stability. Při chemických zkouškách se stanovuje obsah aktivní substance, vybraných excipientů, nečistot a degradačních produktů. Používají se tři druhy stabilitních testů:

- zátěžový (stresový) test
- zrychlený test
- dlouhodobý test

Zátěžový test: ke vzorku šarže API jsou přidány chemikálie (např. zředěná kyselina, báze, peroxid vodíku) – účelem je rychle identifikovat možné degradační produkty.

Zrychlený test: vzorek šarže API je např. ozářen světlem – účelem je urychlit degradační procesy.

Dlouhodobý test: simulují se skladovací podmínky v různých klimatických oblastech, délka testu je 12 měsíců a vzorky jsou analyzovány každé 3 měsíce – účelem je stanovit dobu expirace.

Po expiraci léčivo významně degraduje a výsledkem chemických procesů probíhajících v pevné fázi jsou různé degradační produkty, na které se mění aktivní substance, příp. i excipienty. Po vypršení expirace by léčivý přípravek neměl být používán.

Stanovení degradačních produktů je součástí sledování celkové čistoty léčiva. Rozlišují se dva základní typy nečistot a sice:

- nečistoty související s výrobou API a lékové formy
- nečistoty, které vznikají při skladování

Nečistoty z výroby API a její lékové formy jsou: anorganické (těžké kovy z vody) a organické (nečistoty výchozího materiálu, nezreagovaný výchozí materiál, intermediáty, produkty bočních a nežádoucích reakcí, zbytková rozpouštědla, nežádoucí enantiomery aj.).

Nečistoty vznikající při skladování jsou: degradační produkty API a excipientů, produkty nežádoucích interakcí API-API, API-excipienty aj.).

Závěrem je nutné konstatovat, že perfektně čistou API ani její lékovou formu nelze principiálně vyrobit. Na druhé straně obsah přítomných nečistot nesmí ohrozit zdraví pacienta. V současnosti je standardní čistota léčiv 99,9 %, přičemž přítomné nečistoty (0,1 %) musí být identifikovány. Nečistotami jsou všechny látky, které nejsou chemickými entitami definovanými jako API a excipienty.

10.2 Degradální reakce

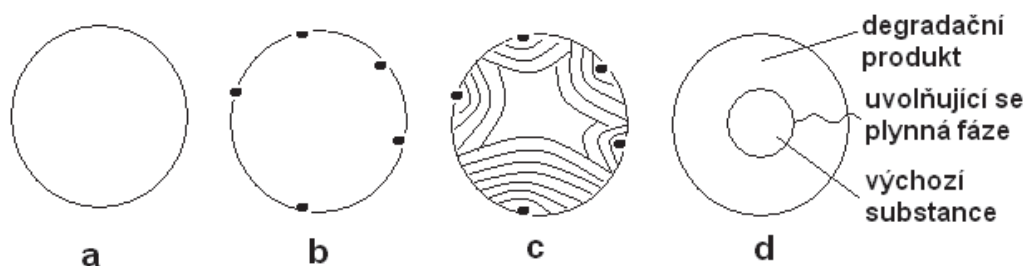
Chemické degradační reakce v pevných léčivech startují na **defektech krystalové struktury**, jsou umožněny molekulární mobilitou a jsou řízeny topochemicky. Hlavní defekty jsou dislokace, hranice zrn a mikrokystalické trhlinky. Defekty v léčivech se generují při technologických procesech (mikronizace, tableťace).

Termodynamika, kinetika a mechanismus reakcí v pevné fázi jsou důkladně prostudovány u anorganických uhličitů, oxidů a hydrátů v souvislosti s optimalizací

velkotonážních technologií a studiím degradačních procesů (např. procesy v keramice, koroze kovů). Z těchto poznatků vychází i studium chemických degradačních procesů v pevných léčivech.

Mechanismus reakcí v pevné fázi

Pod pojem chemická reakce pevných látek zahrnujeme chemické pochody, kde mezi výchozími látkami a produkty vždy figuruje pevná fáze. Převážná většina reakcí v pevné fázi je heterogenní a probíhá na fázových rozhraních. Přitom dochází ke složitému vazebnému a strukturnímu přeformování výchozích látek v produkty. Z termodynamického hlediska je hnací silou reakce ve směru: výchozí látky \rightarrow produkty, záporná hodnota změny Gibbsovy energie, tzn., že systém spěje k $G \rightarrow \min$. Z kinetického hlediska je rychlost reakce dána nejpomalejším, tzv. řídicím dějem. Tím je u reakcí pevných látek nejčastěji povrchová nukleace nebo difúze.

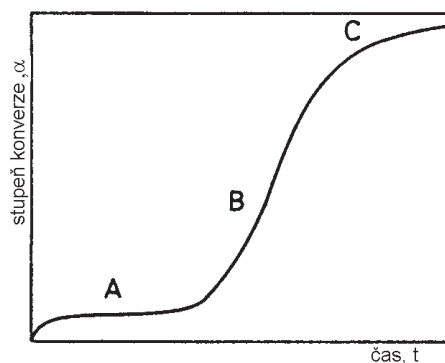


Obr. 88: Řídicí děj povrchové nukleace

Na Obr. 88. je uveden obecný příklad tepelně degradačního procesu, při kterém se uvolňuje plynná fáze (např. CO_2 při dekarboxylaci 4-aminosalicylové kyseliny působením tepla). Předpokládejme kulovitou částici výchozí substance (a), na jejímž povrchu se náhodnými fluktuacemi atomů a molekul vytváří nuklea degradačního produktu: 3-aminofenolu (b). Nuklea rostou (c), degradační reakce probíhá na fázovém rozhraní mezi substancí a produktem, které se posouvá směrem dovnitř původní částice (c). Vznikající plyn, CO_2 , rychle difunduje vrstvou produktu směrem ven (d), takže řídicím (nejpomalejším) dějem procesu je povrchová nukleace degradačního produktu.

Kinetiku procesu vyjadřuje graf závislosti stupně konverze (α) výchozí substance na čase (t), viz Obr. 89. Křivka závislosti má esovitý (sigmoidální) tvar a skládá se ze tří oblastí.

V úvodní části (A), zvané indukční perioda, dochází ke vzniku nukleí a rozbíhá se jejich růst. V prostřední části (B) zvané akcelerační perioda, se reakce na rozhraní degradační produkt-výchozí substance urychluje a rozhraní se kontinuálně rozšiřuje až k inflexnímu bodu. Za tímto bodem se rostoucí krystaly začínají dotýkat, tím se jejich růst zpomaluje, až se posléze zastaví (oblast C – dobíhající perioda).



Obr. 89: Kinetika degradace děje z Obr. 88

Pro popis kinetiky tohoto obecného modelu bylo odvozeno několik kinetických rovnic, lišících se v popisu přesného mechanismu nukleace a růstu nové fáze. Nejdůležitější jsou rovnice Proutova-Tompkinsova a rovnice Avramiho-Erofeevova:

$$\ln [(\alpha / (1-\alpha))] = kt + c \quad (42)$$

$$[- \ln (1-\alpha)]^n = kt \quad (43)$$

kde α je stupeň konverze, t je čas, k je rychlostní konstanta, c je konstanta a exponent n může být $1/4$, $1/3$, $1/2$, $2/3$ nebo 1.

Stejně jako u anorganických materiálů, např. při korozi kovů v oxidačních atmosférách, uvažujeme při chemické degradaci pevných léčiv i mechanismy difúzní. Difúze v pevných látkách znamená migraci jedné fáze volnými kanály v krystalové struktuře druhé fáze, jedná se tedy o prolínání dvou pevných fází. Zatímco např. u oxidace Zn na ZnO je reakční mechanismus podrobně prostudován - řídicím dějem je difúze iontů Zn^+ vrstvou produktu ZnO, difúzní mechanismy v pevných léčivech jsou téměř neznámé. Nicméně i zde je pro difúzi nutnou podmínkou iontová, resp. molekulární mobilita, umožněná jak reálnými poruchami krystalové struktury, tak flexibilitou molekuly, resp. jejích postranních řetězců. Právě na postranních řetězcích převážně dochází k oxidaci, hydrolýze a jiným degradacím pevných léčiv. Je zřejmé, že difúze probíhá rychleji v amorfních látkách (právě z důvodu snadnější mobility molekul) a proto je jejich reaktivita vyšší než u látek krystalických.

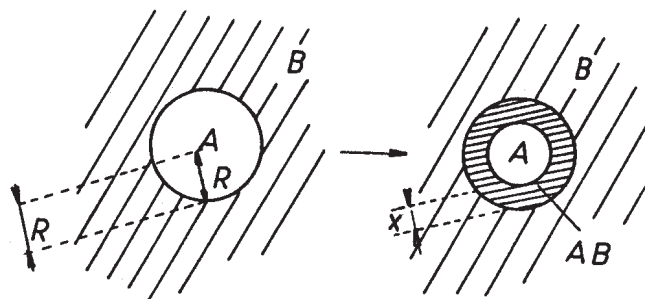
Difúze je jediným možným mechanismem při reakci dvou pevných látek za vzniku pevného produktu (např. reakcí hydrochloridu *p*-aminosalicylové kyseliny s uhličitánem sodným vzniká *p*-aminosalicylová kyselina, chlorid sodný, voda a oxid uhličitý). Pokud uvažujeme jednorozměrnou difúzi, potom její kinetiku popisuje tzv. parabolický zákon:

$$x^2 = kt \quad (44)$$

kde x je tloušťka narůstající vrstvy degradačního produktu, t je čas a k je rychlostní konstanta.

Pokud uvažujeme mechanismus trojrozměrné difúze, předpokládáme, že jedna z reagujících látek (B) je mnohem jemnější než druhá (A), takže látku B lze považovat

za spojitou fázi obklopující částice fáze A. Při reakci se vrstva produktu AB tvoří na částicích A (Obr. 90).



Obr. 90: Janderův model difúzního mechanismu reakce v pevné fázi

Pro počáteční etapu reakce lze vrstvu produktu pokládat za rovinnou a rychlost nárůstu bude splňovat parabolický zákon. Odvození příslušné kinetické rovnice vychází ze vztahu:

$$\alpha = \frac{V_t}{V_o} = \frac{4/3\pi R^3 - 4/3\pi(R-x)^3}{4/3\pi R^3} \quad (45)$$

kde V_t je objem produktu v čase t a V_o je objem produktu po dokončení reakce, R je poloměr částice A a x je tloušťka vrstvy produktu. Výraz (4) lze upravit na:

$$x = R [1 - (1 - \alpha)^{1/3}] \quad (46)$$

Zahrnutím parabolického zákona do výrazu (46) získáme finální, tzv. **Janderův vztah**:

$$kt = R^2 [1 - (1 - \alpha)^{1/3}]^2 \quad (47)$$

Pro větší hodnoty α Janderův vztah již nevyhovuje (vrstvu produktu nelze dále považovat za rovinnou) a musíme uvažovat jako řídicí děj ustálenou difúzi kulovou vrstvou produktu (Gistling a Brounštejn):

$$kt = R^2 [1 - 2/3\alpha - (1 - \alpha)^{2/3}] \quad (48)$$

Reakce v pevné fázi se liší od reakcí v homogenních fluidních mediích v základním aspektu: zatímco reakce v kapalném nebo plyném stavu závisí hlavně na reaktivitě a koncentraci volných reaktantů, reakce v pevné fázi jsou ovlivněny především krystalovou strukturou (říkáme, že reakce jsou řízeny topochemicky). Jinými slovy, závisí v jaké pevné fázi (polymorf, hydrát, amorfát, atd.) reagující látka do reakce vstupuje. Chemicky nejméně reaktivní je většinou stabilní polymorf (anhydrát) a dále je též

známo, že reakce na amorfních fázích probíhají rychleji než na fázích krystalických. Kromě toho jsou reakce v pevné fázi ovlivněny ještě dalšími faktory, ke kterým zejména patří: teplota, tlak, okolní atmosféra a její vlhkost, záření, velikost a tvar částic, excipienty aj.

10.3 Kategorizace degradačních reakcí

Degradační reakce v pevných léčivech lze rozdělit do následujících kategorií (Tab. 19).

Tab. 19: Kategorizace degradačních reakcí léčiv

Rozdělení podle iniciace:	Rozdělení podle chemického procesu:
<ul style="list-style-type: none"> • působení atmosféry (kyslíku) • působení vlhkosti • působení světla (fotoiniciace) • působení tepla • působení mikrovln (urychlení) • působení excipientů (katalýza nebo reakce s excipienty) • působení mikronizačních a tabletačních tlaků 	<ul style="list-style-type: none"> • oxidace • hydrolýza • dehydratace (desolvatace) • dekarboxylace • dehydrohalogenace, dehalogenace • deamidace, denitrogenace • esterifikace • isomerizace (tautomerismus) • epimerizace (racemizace) • polymerace • cyklizace

Oxidační degradace

Risperidon, hydrokortizon, methotrexat, adinazolam, hydroxyl vázaný přímo na aromatický kruh (např. askorbová kyselina, katecholaminy, morfinany), konjugované dieny (např. vitamin A), aromatické heterocykly (např. námelové alkaloidy) a mnoho dalších je velmi citlivých k oxidační degradaci. Při oxidační degradaci se primární hydroxylová skupina (primární alkohol) oxiduje na aldehydickou skupinu a dále na karboxyl. Sekundární hydroxyl (sekundární alkohol) se oxiduje na keto-skupinu. Dusík v alkaloidech se často oxiduje na N-oxid nebo se ionizuje na $=N^+<$.

Příkladem je oxidační degradace vitamínu C (askorbové kyseliny), která je v praxi velmi sledovaným tématem. Degradace začíná oxidací askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou kyselinu, dále následuje hydrolýza na diketogulonovou kyselinu a konečně oxidace na šřavelovou kyselinu (Obr. 91). Degradace je však za běžných skladovacích podmínek velmi pomalá.

Dehalogenace a dehydrohalogenace

Dehalogenace znamená ztrátu halogenu a dehydrohalogenace ztrátu halogenvodíku. V literatuře je podrobně popsána debromace (α -bromiso-valeryl)močoviny na (3-methylbutyryl)močovinu, přičemž tato degradace může být i mikrobiálně katalyzovaná.

Dehydrochlorace se někdy může vyskytnout u hydrochloridů (např. u hydrochloridu kyseliny 4-aminosalicylové).

Dekarboxylace, deamidace, denitrogenace

Dekarboxylace znamená ztrátu oxidu uhličitého (např. u derivátů kyseliny malonové), deamidace ztrátu amidové skupiny (především u peptidů) a denitrogenace ztrátu dusíku (např. u diazoniových solí).

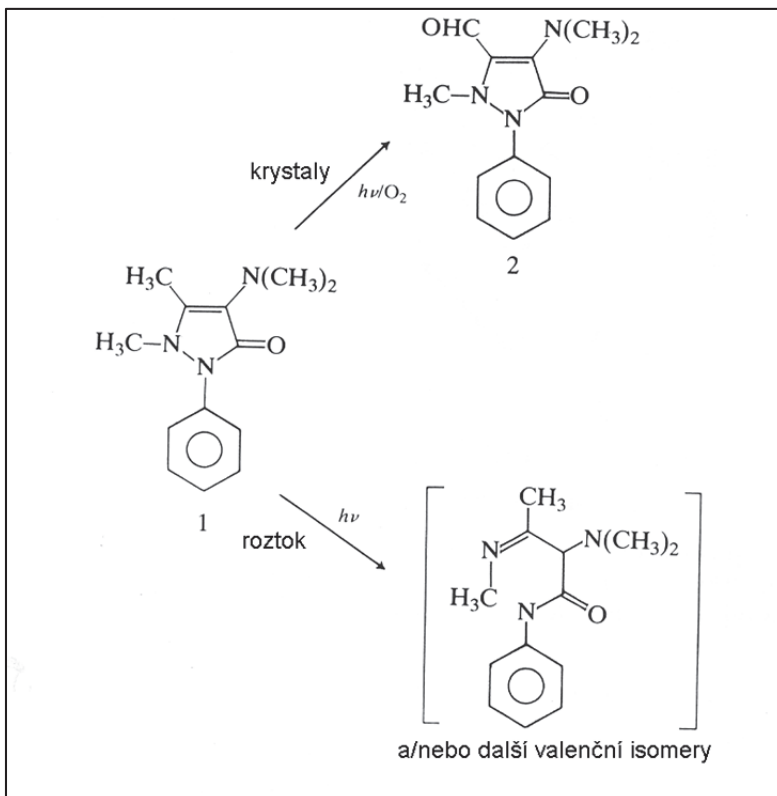
Fotodegradace

Degradace iniciované zářením (fotoiniciace) se nazývají fotodegradace. Nejdůležitější z nich jsou fotooxidace, fotoisomerizace, fotopolymerizace. Fotodegradace způsobuje jak viditelná, tak ultrafialová část spektra (obě složky obsahuje sluneční záření) a tato degradace je zvláště dobře pozorovatelná u textilií, kdy dlouhodobým působením světla dochází k blednutí barev. Z tohoto hlediska je fotostabilita organických sloučenin chápána jako odezva na působení světla, což nezahrnuje pouze fotodegradační reakce, ale i procesy vzniku radikálů, luminiscenci atd. Fotodegradační testy zahrnují ozařování vzorku viditelným i UV zářením a identifikaci a stanovení fotodegradačních produktů v porovnání se vzorkem uchovaným ve tmě. Fotodegradace probíhají pouze v povrchové vrstvě vzorku. Počet fotodegradovatelných substancí zahrnuje již řadu kategorií léčiv (Tab. 20):

Tab. 20: Fotonestabilní léčiva

Antibiotika	Tetracykliny, doxycyklin, rifampicin, rifamycin, cefalosporiny, chloramfenikol
Cytostatika	Daunorubicin, dacarbazine, vincristin, cisplatina, methotrexat
Chemoterapeutika	Mefloquin, sulfonamidy, nitrofurazon, ciprofloxacín,
Antagonisti Ca	Nifedipin, nitrendipin, nicarpidin, verapamil
Vasodilatátory	Molsidomin
Antihypertensiva	Nitroprussid, furosemid
Psychofarmaka	Fenothiazeny, haloperidol, benzodiazepiny
Dermatika	Kortikosteroidy, antimykotika
Ostatní	Dihydroergotamin mesylát, kolchicidin, emetin, ubidecarenon, vitamíny

Příkladem fotodegradace je oxidace aminofenazonu. Je zajímavé, že vznikají rozdílné degradační produkty při fotooxidaci v pevné fázi a v roztoku (Obr. 93). Fotodegradaci lze zmírnit vhodnými obaly, např. blistry nebo potahem tablet, které ovšem zcela neodstíní UV-složku záření.



Obr. 93: Oxidační fotodegradace aminofenazonu

10.4 Hygroskopicita

Hygroskopicita znamená nasákávání substance vodou, kterou adsorbuje ze vzdušné vlhkosti. Většinou se jedná o povrchový jev. Některé substance jsou však tak hygroskopické, že voda prostoupí (absorbuje se) celým objemem substance. Původně pevná substance se změní na pastovitou konzistenci nebo se dokonce ve vzdušné vlhkosti rozpustí. Tento mezní případ se nazývá **deliquescence** a tak se chová např. valproát sodný.

Při sorpci vody (adsorpci i absorpci) dochází ke zvýšení molekulární mobility substance, mohou se nastartovat fázové (polymorfni) transformace a chemické reakce (hydrolýza a hydratace). Tím se samozřejmě mění vlastnosti a podstata substance.

Hygroskopicita je pro farmaceutický vývoj jev nežádoucí. Snažíme se mu vyhnout výběrem substancí nehygroskopických nebo jen lehce hygroskopických nebo zabránit ve formulaci výběrem vhodných excipientů a volbou vhodných skladovacích podmínek.

Adsorpce vody

Hygroskopické látky adsorbují vodní páru ze vzduchu, ta kapilárně kondenzuje, což se projeví navlháním. Reverzní proces adsorpce se nazývá desorpce (molekuly vody opouští pevný povrch a vrací se do plynné fáze).

Při adsorpci mohou molekuly vody atakovat volný povrch dvěma způsoby: chemisorpcí (chemická adsorpce) a fyzisorpcí (fyzikální adsorpce). Charakteristiky obou procesů jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: Fyzisorpce a chemisorpce

	Fyzisorpce	Chemisorpce
Síla poutající molekuly k povrchu	van der Waals	H-můstky
Počet adsorbovaných vrstev molekul	několik	pouze jedna vrstva
Adsorpční teplo, ΔH_{ads}	nízké (10-40 kJ/mol)	vysoké (> 40 kJ/mol)
Selektivita	nízká	vysoká
Teplota vzniku	nízká	vysoká

Léčivo vystavené v uzavřeném prostoru tlaku vodní páry dosáhne po čase rovnováhy mezi adsorpcí a desorpcí – tzv. adsorpční rovnováhy. Pokud měříme adsorpční rovnováhu při různých tlacích, konstruujeme adsorpční izotermu (závislost adsorbovaného objemu vody na tlaku).

Při nízkých tlacích dochází k zaplňování mikropórů ($r < 20 - 50$ nm) v jedné vrstvě. Při stoupajícím tlaku dochází k vícevrstevné adsorpci vody na povrch substance, zaplňují se větší póry – mesopóry ($r < 200$ nm). Při dalším zvýšení tlaku dochází v pórech ke spontánní kondenzaci, makropóry ($r > 200$ nm) se plní kapalným adsorbátem (vodou).

Klasifikace hygroskopického chování substancí

Podle míry hygroskopicity rozdělujeme farmaceutické substance do 4 kategorií:

Nehygroskopické - v prostředí pod 90 % RH nedochází k adsorpci vody, nad 90 % RH je adsorpce menší než 20 % během jednoho týdne (pokojová teplota)

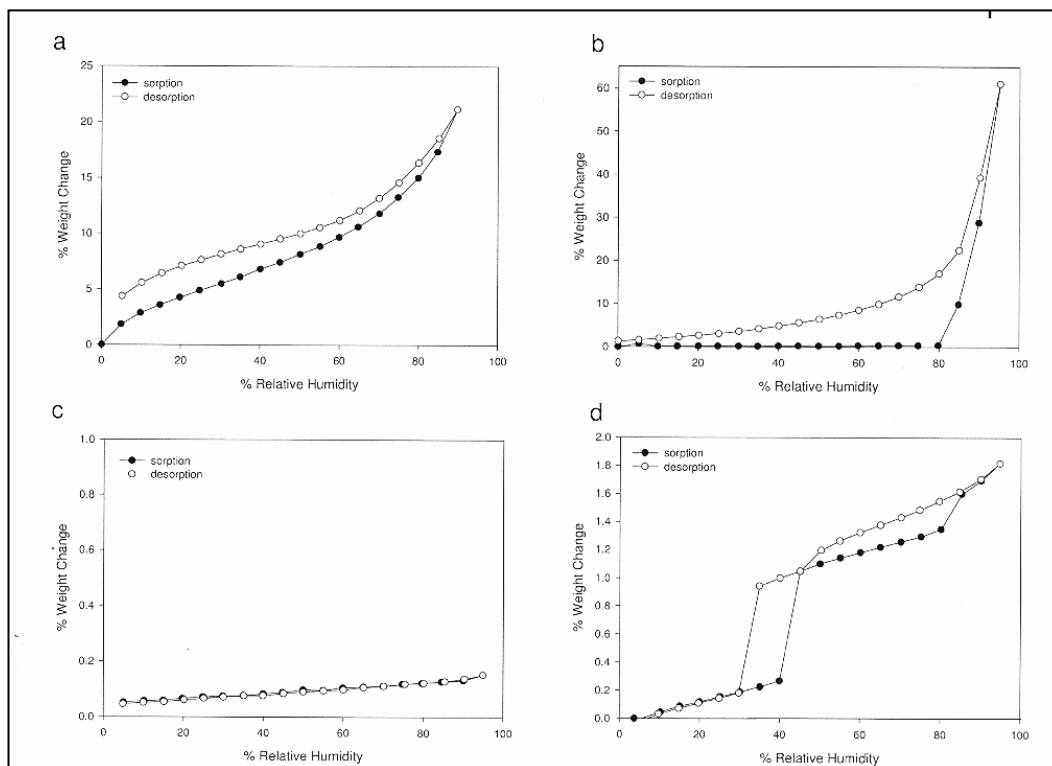
Lehce hygroskopické - v prostředí pod 80 % RH nedochází k adsorpci vody, nad 80 % RH je adsorpce menší než 40% během jednoho týdne (pokojová teplota)

Středně hygroskopické - v prostředí pod 60 % RH je adsorpce vody menší než 5 %, v prostředí nad 80% RH je adsorpce vody menší než 50% během jednoho týdne (pokojová teplota)

Velmi hygroskopické - v prostředí 40 – 50 % RH nastává adsorpce vody, v prostředí 90 % RH je adsorpce vody větší než 20 % během jednoho týdne (pokojová teplota)

Relativní vlhkost vzduchu (RH) udává poměr mezi okamžitým množstvím vodních par ve vzduchu a množstvím par, které by měl vzduch o stejném tlaku a teplotě při plném nasycení. Udává se v procentech (%). Relativní vlhkost se též někdy označuje jako poměrná vlhkost.

Měření míry hygroskopicity substancí lze provést v izolované cele, ve které měníme hodnotu RH a sledujeme hmotnostní změny vzorku Δw v % (Obr. 94). V režimu sorpce Δw stoupá v závislosti na rostoucí RH a v režimu desorpce Δw klesá v závislosti na klesající RH. Křivku sorpce měříme první a v konečném bodě pak zpětnou křivku desorpce.



Obr. 94: Sorpční a desorpční křivky pro: amorfni substanci (a), navlhající, velmi hygroskopickou substanci (b), perfektně krystalickou, nehygroskopickou substanci (c), substanci tvořící stechiometrický hydrát (d)

Otázky:

Jakým degradačním reakcím je léčivý přípravek vystaven a k čemu mohou vést?

Jak se obecně zabraňuje reakcím v pevné fázi?

Mohou excipienty reagovat s API?

11. PATENTOVÁ OCHRANA LÉČIV

Vývoj nového léčivého přípravku je dlouhá a nákladná záležitost. Celý tento proces trvá nyní v průměru 12 let a stojí okolo 1 miliardy dolarů. Vzhledem k rostoucí konkurenci se doba vývoje stále zkracuje, ale náklady a regulační požadavky rostou. Originální výrobce se proto snaží blokovat generické firmy, které generikum uvedou na trh za zlomek nákladů a času tím, že ochrání léčivý přípravek různými typy patentů.

11.1 Co je to patent?

Patent je právní titul, který po omezenou dobu chrání zákonem vynález, který je tvůrčím řešením určitého problému. Patentovat lze pouze věci, které jsou světově nové a průmyslově využitelné. Patent de facto umožňuje realizovat návratnost ceny vývoje prostřednictvím monopolní ceny produktu po dobu platnosti patentu. Z toho je zřejmé, že rovněž postrádá smysl chránit cokoli co není spojeno s prodejem jakýchkoli produktů. Tedy přinejmenším si je třeba představit, co by ten komerční produkt být mohl, aby třeba měla nějaká firma zájem patent odkoupit. Nelze patentovat např. vědecké teorie a poznatky základního výzkumu, věci již známé či publikované. Hlavními atributy patentu je novost, nezřejmost a prokázání výhod vůči předchozím řešením. Přihláška, která nespĺňuje tyto atributy je při řízení zamítnuta a patent udělen není. Původcem patentu je **autor** (autoři), **přihlašovatel patentu** je jeho pozdější vlastník, který za udržování patentu platí každoročně patentové poplatky. Majitel patentu má výlučné právo vynález využívat, poskytovat souhlas k využívání jiným osobám (na základě licenční smlouvy) a má i právo převést patent na jinou osobu. V případě porušení patentu se jeho vlastník brání právní cestou. Soudní spor je však pouze posledním, avšak méně obvyklým způsobem ochrany a ve většině případů dochází z mimosoudní dohodě firem. Právo ochrany nabývá platnosti až udělením patentu, např. u evropských nebo amerických dokumentů poznáme přihlášky podle písmena A za číslem přihlášky, po udělení patentu je v dokument za číslem písmeno B.

Patent je udělován patentovým úřadem (v ČR je to Úřad průmyslového vlastnictví, **Evropský patent** je udělován Evropským patentovým úřadem) a datum podání je rozhodující pro právo přednosti a dobu platnosti patentu. **Patentová přihláška**, která se skládá z vyplněného formuláře a z dokumentace, je potom zpracována na úřadě a obvykle po 12-18 měsících (tento proces ale může trvat i několik let) patentový úřad vydává rozhodnutí o udělení patentu a patent je uveřejněn. Po dobu, kdy je patentová přihláška zpracovávána na úřadě, je předmět vynálezu utajen a nelze jej prezentovat veřejnosti (publikace článků, vědecké přednášky, sociální sítě), jinak může patentový úřad patent zamítnout s tím, že vynález je veřejně známý (porušení atributu novosti). Po udělení patentu platí jeho ochrana pouze v zemích, kde byl patent udělen (na základě přihlášky). Patentovou ochranu lze rozšířit podáním přihlášky v jednotlivých zemích či využitím nadnárodních smluv. Samozřejmě, každé rozšíření je zpoplatněno a evropský či světový patent je i několikanásobně dražší než národní, je proto nasnadě uvážit reálný zisk z použití či licencování patentu a návratnost takové investice.

Evropský patent má stejnou účinnost jako národní patent kterékoliv země, která je členem Evropské patentové organizace (EPO, širší než EU) a lze jej transformovat do národního patentu, který pak podléhá zvyklostem národního patentového úřadu, ovšem platnost a omezení patentu je v různých zemích (teritoriích) různé. Např. v Británii je patentovatelný pouze takový polymorf, u kterého původce vynálezu prokáže, že se nejedná „o zřejmou variantu již známého materiálu“ a vykazuje vůči němu nějakou výhodu (chemickou, fyzikální, biologickou, technologickou). **Evropská patentová přihláška** se podává v úředních jazycích: angličtina, francouzština, němčina.

Význam patentových informací

Patenty slouží jako zdroj technických informací. Patent uvádí příklady použití, které musí vést ke schopnosti výsledek nezávisle a jednoznačně reprodukovat. Příklady však nemusí reprezentovat nejlepší způsob provedení. Na druhé straně nepřesné uvedení podmínek a nemožnost příklad reprodukovat v celém rozsahu podmínek může později vést k jeho zneplatnění. Pomocí patentů lze sledovat vývoje produktů, technologií a zároveň zamezit duplicitě ve výzkumu a vývoji. Patenty mohou inspirovat i při řešení vlastních problémů. Zároveň jsou významným zdrojem obchodně – ekonomických informací, lze sledovat aktivity konkurence, využít licenčních příležitostí či naopak zajistit vlastní patenty proti možnému narušení jinými subjekty.

Originální vs. generické léčivé přípravky

Originálním léčivým přípravkem se rozumí první zaregistrovaný lék s konkrétní účinnou látkou, který je na trhu představen po úspěšných klinických zkouškách. Na trh jej zavádí originální (inovativní) firma. Jeho exkluzivní postavení na trhu umožňuje výrobcí prodávat jej za vysokou cenu, proto je pro pacienta žádoucí eventuální vstup konkurence, která cenu přípravku snižuje. Ve farmaceutickém průmyslu se pro kopii originálního (patentovaného) přípravku používá označení **generický přípravek** či generikum. Generikem se rozumí léčivý přípravek, který obsahuje stejnou účinnou látku o stejné síle a shodnou lékovou formu s referenčním léčivým přípravkem a jehož bioekvivalence s referenčním léčivým přípravkem (= originální léčivý přípravek) byla prokázána příslušnými bioekvivalenčními studiemi (BES, studie biologické dostupnosti). Složení pomocných látek se u generika může lišit. V případě bioléciv, jsou jejich generické varianty označovány termínem „biosimilars“.

Zásadní vliv na vývoj generických kopií originálních přípravků měl soudní spor mezi firmami Roche Products a Bolar Pharmaceuticals, který se odehrál v roce 1984 v USA. Originátor Roche Products napadl generickou firmu Bolar Pharmaceuticals za narušení patentu, protože firma Bolar vyvíjela šarže s patentovaným lékem za účelem registrace. Soud rozhodl ve prospěch originální firmy. Následně v témže roce připravili američtí poslanci Waxman a Hatch zákon, podle kterého vývoj generického přípravku pro registraci není porušením patentových práv originátora (výroba látky, vývoj přípravku včetně procesních validací a stabilitních studií, předklinické a klinické testování, předložení žádosti o registraci včetně vzorků a získání registrace). Hatchův-

Waxmanův zákon doplnil v USA stávající Federální zákon o potravinách, léčivech a kosmetice a kodifikoval postup generických výrobců při tzv. zkráceném řízení (ANDA, Abbreviated New Drug Application) o schválení generické verze originálního léčiva u Food and Drug Administration (FDA). I Evropa převzala tento princip ve svém zákonu o léčivech.

Žadatel o registraci generického přípravku v EU tak nemusí dokládat výsledky předklinických zkoušek a klinických hodnocení, pokud může prokázat, že je přípravek generikem referenčního léčivého přípravku, který je nebo byl registrován v členském státě nebo ve společenství EPO po dobu nejméně osmi let (viz dále model 8+2+1+0,5). Namísto klinických zkoušek musí být prokázána bioekvivalence s referenčním přípravkem.

Při registraci generického přípravku v USA, ve zkráceném řízení ANDA, lze žádat o registraci, přičemž žadatelé nepředkládají výsledky klinických studií, ale prokazují bioekvivalenci se zavedeným originálem.

Je zřejmé, že generické firmy nejsou nuceny financovat rozsáhlé klinické studie, čímž výrazně snižují náklady a mohou nabídnout cenu přípravku nižší než je cena originálního léku.

Co lze patentovat u léčiv?

Ve farmaceutickém průmyslu je patentová strategie zcela nezbytnou součástí vývoje léčivého produktu. Originální (inovativní) firmy vynakládají obrovské částky na vývoj léčivého přípravku a díky patentům získávají možnost zúročit tyto investice časově omezeným monopolem na trhu.

Patentová ochrana trvá 20 let od podání přihlášky. Originální firma má tak ideálně 10 let na vývoj a uvedení na trh léčivého přípravku a dalších 10 let na trhu bez konkurenční kopie, neboli generika.

Patentovat lze novou léčivou látku (API, *active pharmaceutical ingredient*), tento patent bývá označován jako základní patent, jeho součástí bývá indikace a syntéza API. Během klinických testů může být nalezena nová významná indikace, která může prodloužit účinnost základního patentu nebo může být patentována samostatně. Např. je-li lék určen k léčbě vysokého krevního tlaku a je zjištěn i další přínos např. při léčbě anginy pectoris. V případě sildenafilu, API v léku Viagra, byly objeveny jeho erektilní účinky až během klinického hodnocení, původně byl vyvíjen k léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Základní a indikační patenty podává originální firma.

Další patenty, tzv. způsobové, může podávat originální i generická firma. Může jít o jinou syntézu API, jinou (lepší?) krystalovou formu: polymorf, amorf, semikrystal, soli, hydrát, solvát, kokrystal atd., důležité výrobní/čistící kroky v technologii, podmínky krystalizace (procesní patenty). Velmi důležité je i navržené složení pomocných látek - excipientů (formulační patent). Těmito vlastními postupy (patentovanými) se generické firmy vyhýbají licencování postupů originálního výrobce (viz Tab. 22).

Originální firma často rozvrhuje patenty tak, aby pokryly co nejdelší časový úsek exkluzivity a komplikovaly vstup produktu konkurence na trh. Generické firmy proto

přichází s vlastními procesními a formulačními patenty, aby mohly vstoupit na trh již po vypršení základního patentu.

Tab. 22: Co lze patentovat a kým

Produkt (API)	Typ firmy	Proces	Typ firmy
Sloučenina	Originální firma	Syntéza	Orig./Gener.
Indikace	Originální firma	Krystalizace	Orig./Gener.
Pevná forma	Orig./Gener.	Štěpení racemické směsi	Orig./Gener.
Velikost částic	Orig./Gener.	Katalytické podmínky reakce	Orig./Gener.
Složení excipientů	Orig./Gener.	Formulace	Orig./Gener.

Další formy legislativní ochrany léčiv

Po legislativním usnadnění cesty generik na trh byly podpořeny i inovativní firmy, aby byla zachována rovnováha, a aby zůstávala motivace k vývoji originálních přípravků.

Dodatkové ochranné osvědčení

S rostoucími regulačními požadavky se uvedení léčivých přípravků na trh opožděje, proto kvůli posílení patentových práv lze využít i dodatková ochranná osvědčení na léčiva (SPC Supplementary Protection Certificate). Doba trvání SPC se vypočítá tak, že se o pět let zkrátí doba od podání přihlášky vynálezu do udělení první registrace přípravku v EU (maximálně však 5 let patentové ochrany navíc). Dostane-li se přípravek na trh dříve než za 5 let od podání patentu, SPC nelze udělit, protože má sloužit především jako kompenzace za dlouhý vývoj. SPC se uděluje pouze v EU a o udělení SPC se musí žádat v každém státě zvlášť.

Ochrana (exkluzivita) klinických dat

Model 8 + 2 (+1 + 0,5) chrání investice originátora do nejnákladnější části vývoje: do klinického hodnocení.

V zákoně o léčivech §27 je stanoveno, že žadatel o registraci není povinen předložit výsledky předklinických zkoušek a klinických hodnocení, pokud může prokázat, že léčivý přípravek je generikem referenčního léčivého přípravku, který je nebo byl registrován po dobu nejméně 8 let v členském státě EU. Generikum registrované podle tohoto ustanovení nesmí být uvedeno na trh, dokud neuplyne 10 let od první registrace referenčního přípravku (po 8 letech lze požádat o registraci, pak jsou 2 roky „rezervovány“ pro vyřízení registračního řízení, aby přesně po 10 letech mohlo generikum na trh). Tato lhůta se prodlužuje nejvýše na 11 let, jestliže je v průběhu prvních 8 let získána registrace pro jednu nebo více indikací s významným klinickým přínosem a o 6 měsíců vložím pediatrických dat.

Exkluzivita dat 8+2 (+1+0,5) vyplývá ze zákona o léčivech a je to jiná forma ochrany než patent; je sledována regulačními autoritami při registraci generického přípravku. V praxi to znamená, že i když vyprší patentová ochrana nebo přípravek patentem chráněn nebyl, platí-li exkluzivita dat, výrobce generika se nemůže odvolávat na klinická data od originálního přípravku a prokázat bioekvivalenci, nemůže dostat registraci ani vstoupit na trh.

Jak patent vypadá

Na první straně patentu je uveden název a jsou vyplněny základní bibliografické informace (číslo přihlášky, datum atd.), následuje popis současného stavu (dosavadní stav techniky, angl. „state of the art“) a potom detailně podrobný popis podstaty vynálezu a výhody, které přináší ve srovnání se stávajícím stavem. Dále je nutné formulovat nároky (claims), ve kterých je stanoven rozsah ochrany, a co považují předkladatelé za svůj vynález. Dobře formulované nároky jsou stěžejní částí patentu, protože, co není popsáno, nemůže být posléze nárokováno. Dále přihláška zahrnuje přehled obrázků, seznam analytických metod a příklady provedení (examples), což jsou konkrétní návody k reprodukování. Součástí dokumentu jsou i doprovodné obrázky (RTG difrakční záznamy, IČ a Ramanova spektra, zobrazení struktury, schémata, tabulky, grafy, fotografie).

Náležitosti patentu

Nepřehlednosti některých patentových klastrů se patentové úřady brání prohlášením, podle kterého by měl patent, vedle formální stránky, splňovat několik základních obsahových požadavků.

Přehlednost (Clarity): patent by měl být jasný, aby nebylo pochyb, co se nárokuje. Např. pro popis nové pevné fáze je vhodné uvést její fyzikálně-chemické vlastnosti, které byly určeny pomocí RTG difrakce (vyřešená struktura z dat z monokrystalové difrakce či pouze práškový difrakční záznam), infračervené, Ramanovy a ¹³C-NMR spektroskopie či z termických analýz (bod tání, DSC, termogravimetrie).

Podstata vynálezu (Disclosure of Invention): vynález musí být jasně a dostatečně popsán, aby mohl být reprodukován kvalifikovanou osobou (odborníkem v oboru). Použité analytické metody a experimentální podmínky musí být jasně uvedeny.

Jednotnost (Unity of Invention): patent musí popisovat pouze jeden vynález.

Novost (Novelty): patent musí být nový, přehled dosavadního stavu techniky před vynálezem by měl být uveden a vymezení nového přínosu by mělo být definováno. U polymorfů se porovnávají nové formy se stávajícími známými formami, čímž se potvrzuje novost. K porovnání se používají výsledky analýz pevné fáze, porovnávají se pozice uvedených reflexí v RTG difrakčních záznamech všech forem, posuny charakteristických pásů v IČ a Ramanových spektrech a body tání z DSC.

Použitelnost v průmyslu (Industrial Applicability). Očekává se, že se patentuje vynález, který povede k uvedení do praxe ve formě výrobku, přestože některé patenty firmy udržují pouze k zablokování konkurence.

Inovativní krok (Inventive Step): doporučovaný je přístup jako při řešení konkrétního problému, kdy vynálezce musí inovativně řešit stávající problém (např. špatně rozpustná známá forma API), tak aby řešení nebylo zřejmé kvalifikované osobě bez použití patentu.

Doposud byla příprava nové pevné formy považována za tvůrčí řešení, např. příprava amorfni API s vyšší rozpustností oproti krystalické API. V současné době se vývoj nového polymorfu přestává považovat za tvůrčí řešení problému nevýhodných vlastností API a do budoucna bude možné patentovat pouze nové polymorfy s neočekávatelnými vlastnostmi (doposud stačilo vylepšení fyzikálně-chemických vlastností oproti původní formě). Příprava nové formy s podobnými vlastnostmi jako původní forma neřeší daný technický problém, a proto není považována za inovativní.

Jiné pevné formy (kokrystaly, disperzní systémy) mohou, ale zatím nemusí, tento trend následovat. Podle směrnice FDA z dubna 2013 jsou kokrystaly intermediátem API, což je staví do zcela jiné pozice, než jsou jim tolik podobné soli. Oproti tomu, od roku 2014 Evropská léková agentura EMA považuje kokrystaly za alternativní formu API, stejně jako solváty. V případě solí se postoj národních agentur různí, v EU jsou soli považované za ekvivalentní API, i když např. ve Francii na rozdíl od originálních přípravků generické soli neproplácí zdravotní pojišťovna, takže lze očekávat jejich velmi nízký prodej. V USA jsou soli považované za jiné aktivní substance a je nutné doložit výsledky klinických studií (nejnákladnější část vývoje léku, generické přípravky tuto část nahrazují předložením bioekvivalenčních studií, které jsou výrazně levnější).

„Evergreening“ a „lifecycle management“

Originální firmy se vstupu konkurence na trh brání i méně etickými prostředky a napadají generické firmy za porušení patentů často bezdůvodně. Vyvolaný soudní spor pak pouze zdržuje uvedení generického přípravku na trh, originálním firmám se ale pozdržení o několik měsíců i přes soudní výlohy může vyplatit, zvláště u tzv. „blockbusterů“ neboli „trháků“ s největšími zisky.

Tato praktika je součástí strategie prodloužení exkluzivity přípravku na trhu a vžila se pod pojmem „evergreening“ (originální firmy dávají přednost termínu „product lifecycle management“ neboli správa životního cyklu výrobku). Koncept „evergreening“ také zahrnuje patentování derivátů účinné látky, jednotlivých isomerů či jejich směsí, nových způsobů podání léčiva, zavádění na trh stejného léčiva s řízeným uvolňováním či prodlouženým účinkem nebo s účinnějším enantiomerem (cetirizin – levocetirizin, citalopram – escitalopram).

Monopolní postavení výrobku na trhu umožňuje inovativním firmám prodávat jej za vyšší cenu a zdravotní systém je tak zatěžován proplácením dražších léků. V některých zemích se proto regulační autority snaží evergreening legislativně potlačovat a urychlit vstup levnějších generických kopií na trh.

V březnu 2013 vypršel v EU základní patent firmy Pfizer na přípravek Viagra s účinnou látkou sildenafil, předepisovaný k léčbě erektilní dysfunkce a v současné době lze proto koupit levné generické kopie. V USA je ale Pfizer stále jediným výrobcem díky vyhrané soudní bitvě s firmou Teva. Soud prodloužil platnost patentu do

roku 2020. Díky veřejnosti dobře známému názvu Viagra, ale Pfizer pevně věří v pokračující úspěch originálního „brandu“ (značkového přípravku) i v Evropě.

11.2 Patentové spory

Podání patentové přihlášky, patentové spory a vše okolo patentů řeší právní oddělení farmaceutické firmy. Lze si též najmout externí právnické firmy, které se specializují na patenty. Patentové firmy si ze svých nejlepších expertů vybírají tým „rozbíječů patentů“ – lidí, kteří nalézají cesty, jak patent obejít.

Patentový dokument je většinou koncipován tak, aby nebyl příliš přehledný a nedal se jednoduše reprodukovat (přestože to je jeden z požadavků k udělení patentu). Musí být však koncipovaný tak, aby obstál v patentovém sporu. V patentovém sporu většinou originální firma žaluje pro porušení patentu generickou firmu a žádá většinou zastavení výroby či zničení zásob s hlavním cílem získat čas a eliminovat konkurenci. Ve skutečnosti je však řešení celá řada a výsledek jednání mezi firmami je zcela neveřejný.

Patentové spory také zpochybňují zavedené postupy a nutí autority legislativně reagovat na vývoj ve farmaceutickém průmyslu (viz Waxmanův-Hatchův zákon v reakci na spor Roche-Bolar).

Příčinou patentových sporů v případě polymorfů je často nedostatečná analytická identifikace (často chybí údaj o krystalové struktuře – jako jednoznačném rozlišení polymorfů jedné API). Generické firmy zase napadají originální po vypršení patentu, např. když se ukáže, že v patentu popsany výrobní postup nevede k přípravě správné formy API.

Příklady patentových sporů

Prvním příkladem je patentový spor firem Monsanto a Ajimoto o krystalový tvar aspartamu (dipeptid kys. asparagové a fenylalaninu), který je v potravinářství používán jako umělé sladidlo (100-200x sladší než sacharóza). Originální výrobce, firma Monsanto, produkovala aspartam pod komerčním názvem Nutra-Sweet[®], který obsahoval tenké jehličkovité krystaly, délky několika mm, které měly tendenci se rozpadat na velmi jemný prach. To samozřejmě způsobovalo problémy s filtrací a sušením produktu, který byl v této formě nepříliš vhodný k tabletaci. Konkurenční výrobce, firma Ajimoto zjistila, že ochlazením vodného roztoku bez míchání vznikají snopkovité krystaly aspartamu, které mají daleko lepší technologické parametry než konvenční jehličkovité krystaly firmy Monsanto. Podstatou vyvolaného patentového sporu bylo rozhodnout, zda produkty firem Monsanto a Ajimoto jsou stejné, nebo nikoliv. Po několika letech sporů vydala v roce 1997 Apelační rada Evropského patentového úřadu rozhodnutí, kde uznala technologii firmy Ajimoto při produkci krystalů aspartamu za nový, patentově chráněný postup.

Příkladem, který naznačuje, že věda je v případě patentových sporů až na posledním místě je patentový spor firem GlaxoSmithKline (GSK) a Sandoz o význam výrazu „at around“. GSK jako originátor nosního spreje k léčbě alergické rýmy Veramyst[®] (v EU pod názvem Avamys[®], s léčivou látkou flutikason furoát) napadl firmu Sandoz, která požádala o registraci generického ekvivalentu, za porušení GSK patentů. Sandoz

kontroval napadením nároků jednoho z těchto patentů, konkrétně popisu difrakčních záznamů patentovaných forem, ve kterém jsou reflexe „okolo“ vypsány stupňů 2θ , což odkazuje na rozsah $\pm 0,2^\circ 2\theta$, běžně zavedený v kontextu RTG difrakce. Sandoz poukázal, že některé reflexe jsou zároveň rozlišeny s přesností $0,2^\circ 2\theta$, takže tolerance chyby by měla být spíše $\pm 0,1^\circ 2\theta$. V březnu 2013 dal soudce Andrews za pravdu firmě Sandoz a výraz „okolo“ se tedy vztahuje k chybě $\pm 0,1^\circ 2\theta$. Význam rozsudku pro další řízení ještě není jasný, ale Sandoz může tímto způsobem dále zpochybňovat platnost patentu GSK, a tím si usnadnit vstup na trh s generickým přípravkem.

Další příklad se týká přípravku Copaxone®, který produkuje firma Teva a používá se k léčbě roztroušené sklerózy. Účinnou látkou je zde kopolymer-1, neboli glatiramer acetát, polypeptid, který se skládá ze čtyř aminokyselin: alaninu, glutamové kyseliny, lysinu a tyrosinu. Kopolymer-1 je směs polymerních řetězců jednotlivých molekul s různými molekulovými hmotnostmi. Proto je uváděna průměrná molekulová hmotnost. Sandoz napadl nároky patentů právě kvůli nejednoznačnému uvedení výpočtu průměrné molekulové hmotnosti, protože existují nejméně 3 způsoby jejího výpočtu. Soudce uznal platnost nároků, ve kterých je výpočet blíže definován a Teva valnou většinu svých nároků v patentu uhájila.

11.3 Patenty a věda

Připomeňme si, že dobré vědecké výsledky lze uveřejnit patentováním či publikováním ve vědeckých časopisech. Patenty se přihlašují přednostně za účelem zisku a s finanční stránkou vstupují do hry regulační autority a právníci. Vědu s finančním potenciálem je proto nutné podpořit kvalitně sepsaným patentem.

Podstatným rozdílem mezi publikací a patentem je to, že patent je právním dokumentem. Ačkoli vědci bývají ve svých objevech inovativní až geniální, neplatí to, že každý vědec je zároveň právník. Je třeba si všimnout, že vědecké instituce nejsou určeny k výrobě a prodeji a v dalším kroku vývoje léčiva ani nejsou schopny zainvestovat a řídit klinické studie. Ačkoli tedy tento stav nevylučuje možnost, aby si každý vědec formuloval vlastní patent, v reálném světě je daleko lépe začít včas, tedy v době mezi podáním přihlášky patentu a jeho finální formulací, jednat na principu dohod o utajení s firmami, které by mohly patent využít a finální formulaci patentu ponechat právnímu oddělení příslušných firem. Solidní firmy nemají žádný zájem původce vynálezu obejít a často je stanoven i jasný rámec vyrovnání s autory a vědeckými institucemi. V opačném případě dochází k častému jevu, že patent může být autorovi sice udělen, ale jeho právní formulace jej není schopna účinně bránit proti využití třetí osobou (enforcement).

Při přihlášení je patent posuzován úředníkem, který má k dispozici pouze podaný text. Nelze očekávat, že popsané experimenty úředník ověří v laboratoři, posuzuje proto především formální stránku dokumentu, případně vlastní rešerší ověří novost (např. na základě popisu dosavadního stavu techniky, který je součástí patentu).

Otázky:

Čím se liší generikum od originálního léčivého přípravku z hlediska složení a formy?

Jak se liší jejich uvedení na trh, co je na trhu dříve a jaké zkoušky je potřeba doložit k získání registrace originálního a generického přípravku v EU?

Jak se nazývají farmaceutické regulační autority v ČR, EU a USA?

Co je model 8+2+1+0,5 ?

Přináší každý patent zisk?

**prof. RNDr. Bohumil Kratochvíl, DSc., Ing. Lenka Seilerová,
Ing. Veronika Sládková, Ing. Michal Šimek**

CHEMIE A FYZIKA PEVNÝCH LÉČIV

Vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 5, 166 28 Praha 6
Počet stran: 158
Počet obrázků: 94
Vydání: první, elektronické