

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

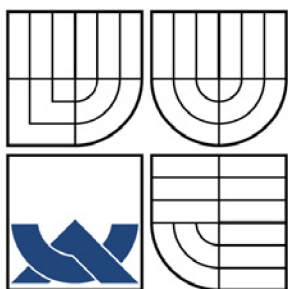
STUDIUM POLYMORFIE A OPTIMALIZACE KRYSTALIZACE
FARMACEUTICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

DIPLOMOVÁ PRÁCE
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

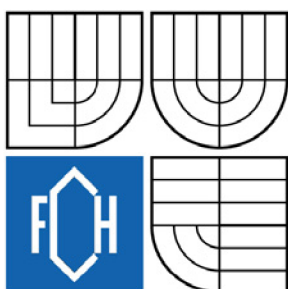
DAVID NOVÁK

BRNO 2007



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM POLYMORFIE A OPTIMALIZACE KRYSTALIZACE FARMACEUTICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

THE STUDY OF POLYMORPHISM AND OPTIMIZATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL
INGREDIENTS CRYSTALLISATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

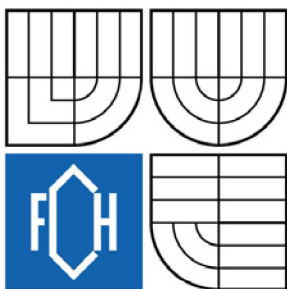
DAVID NOVÁK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

ING.ROMAN GABRIEL

BRNO 2007



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0077/2006	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	Novák David	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (M2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce		
Konzultanti diplomové práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	

Název diplomové práce:

Studium polymorfie a optimalizace krystalizace farmaceuticky aktivních látek

Zadání diplomové práce:

Literární část:

- Polymorfie farmaceutických substancí (API)
- Charakteristika zkoumaných substancí
- Stručné principy metod použitých v experimentální části

Experimentální část:

- Optimalizace krystalizace API použitím FBRM
- Příprava stabilních polymorfů

Termín odevzdání diplomové práce: 18.5.2007

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

David Novák
student(ka)

Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2006

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Aktivní farmaceutické substance (APIs) jsou velmi často pacientovi podávány v pevném stavu jako součást předepsané lékové formy (tablety, kapsle atd.). Pochopení a kontrola chemie substancí pevného stavu je proto důležitým aspektem ve vývoji léčiva. Substance se mohou vyskytovat v různých pevných formách, zahrnujících polymorfy, solváty, hydráty, směsné krystaly a také amorfnní formy. Každá forma vykazuje specifické fyzikálně-chemické vlastnosti, které mají významný vliv na biodostupnost, možnost zpracování, stabilitu a další chování charakteristické pro substanci.

Většina substancí je purifikována a izolována krystalizací z vhodného rozpouštědla, jako poslední operací ve farmaceutické výrobě. Hlavním cílem krystalizačního procesu je získání produktu s definovanými vlastnostmi jako je distribuce velikosti částic, tvar krystalu a jeho chemická a fyzikální čistota (polymorfie). Všechny farmaceutické substance v jakékoliv formě musí být vyráběny v reprodukovatelné kvalitě. Této kvality je docíleno jen v případě kontroly aktivní látky během procesu.

Pro on-line kontrolu krystalizací Quetiapinu Fumarátu za účelem dosažení požadované distribuční velikosti částic a nezměněných fyzikálně-chemických vlastností substance byla použita FBRM laserová metoda.

ABSTRACT

Active pharmaceutical ingredients (APIs) are frequently delivered to the patient in the solid-state as part of an approved dosage form (tablets, capsules, etc.). Understanding and controlling the solid-state chemistry of APIs is therefore an important aspect of the drug development process. APIs can exist in a variety of distinct solid forms, including polymorphs, solvates, hydrates, co-crystals and amorphous solids. Each form displays unique physicochemical properties that can profoundly influence the bioavailability, manufacturability, stability and other performance characteristics of the drug.

Most APIs are purified and isolated by crystallisation from an appropriate solvent during the final step in synthetic process. The main objective of a crystallisation process is to produce crystals with desired properties such as particle size distribution (PSD), shape and purity. All pharmaceutical dosage forms must be produced in uniform units, and good content of uniformity is only possible when the size of the active component is carefully controlled.

For on-line control of crystallisations of Quetiapine Fumarate to achieve desired PSD and no changed physicochemical purity was used the Lasentec Focus Beam Reflectance Measurement (FBRM) system.

KLÍČOVÁ SLOVA

krystalizace, polymorfismus, krystalizace APIs, optimalizace krystalizace, distribuce velikosti částic, Quetiapin Fumarát, Lasentec FBRM

KEYWORDS

crystallisation, polymorphism, crystallisation APIs, optimization of crystallisation, particle size distribution, Quetiapine Fumarate, Lasentec FBRM

NOVÁK, D. Studium polymorfie a optimalizace krystalizace farmaceuticky aktivních látek. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 91 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Roman Gabriel.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis diplomanta

Poděkování:

Děkuji všem, kteří přispěli k úspěšnému dokončení této diplomové práce, zejména Ing. Romanu Gabrielovi za celkovou spolupráci, dále svému zaměstnavateli firmě FARMAK, a. s. Olomouc za poskytnutí studijního volna během studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	3
1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Polymorfie.....	8
2.1.1 Charakteristika polymorfie APIs.....	8
2.1.2 Termodynamika polymorfie.....	10
2.1.3 Kinetika polymorfie.....	15
2.1.4 Strukturní rozmanitost.....	17
2.1.5 Analytické techniky ke studování a stanovení polymorfů.....	17
2.1.5.1 RTG difrakce.....	17
2.1.5.2 Termická analýza.....	17
2.1.6 Patentová ochrana APIs.....	18
2.2 Krystalizace APIs.....	19
2.2.1 Nukleace.....	21
2.2.2 Termodynamika krystalizace.....	21
2.2.3 Mechanismus růstu krystalu a jeho kinetika.....	22
2.2.4 Krystalizace polymorfů.....	23
2.2.5 Tvar krystalu.....	26
2.2.6 Distribuce velikosti částic (DVČ).....	27
2.3 Použité metody.....	29
2.3.1 FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement).....	29
2.3.1.1 Popis metody.....	29
2.3.1.2 Charakteristika dat.....	29
2.3.1.3 Možnosti systému.....	29
2.3.1.4 Vyhodnocení dat.....	30
2.3.2 Laserová difrakce.....	31
2.3.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie – kompenzační (DSC).....	32
2.3.4 Mikroskopie.....	33
2.4 Charakteristika zkoumané substance.....	35
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	36
3.1 Přístrojové vybavení.....	36
3.1.1 Systém Lasentec FBRM M 400 L, Mettler – Toledo, Inc.....	36
3.1.2 Optický mikroskop Olympus CX 41.....	37
3.1.3 Diferenciální skenovací kalorimetr , PYRIS Diamond DSC.....	38
3.1.4 Systém CILAS 930.....	39
3.1.5 Kapalinový chromatograf Agilent HPLC.....	40
3.2 Pomůcky.....	41
3.3 Seznam použitých chemikálií.....	41
3.4 Pracovní postupy.....	42
3.4.1 Přípravy Quetiapinu (QO).....	42
3.4.1.1 Příprava QO č. 1.....	42
3.4.1.2 Příprava QO č. 2.....	42
3.4.1.3 Příprava QO č. 3.....	42

3.4.1.4 Příprava QO č. 4.....	42
3.4.2 Stanovení čistoty Quetiapinu Oxalátu HPLC metodou.....	43
3.4.3 Stanovení teploty tání Quetiapinu Oxalátu.....	44
3.4.4 Přípravy Quetiapinu Fumarátu (QF).....	44
3.4.4.1 Příprava QF č. 1.....	44
3.4.4.2 Příprava QF č. 2.....	44
3.4.4.3 Příprava QF č. 3.....	45
3.4.4.4 Příprava QF č. 4.....	45
3.4.4.5 Příprava QF č. 5.....	46
3.4.4.6 Příprava QF č. 6.....	46
3.4.4.7 Příprava QF č. 7.....	46
3.4.5 Stanovení čistoty Quetiapinu Fumarátu HPLC metodou.....	46
3.4.6 Stanovení polymorfie Quetiapinu Fumarátu DSC kompenzační metodou.....	47
3.4.7 Stanovení DVČ Quetiapinu Fumarátu metodou laserové difrakce.....	48
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	49
4.1 Krystalizační přípravy Quetiapinu Oxalátu (QO).....	49
4.1.1 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 1.....	50
4.1.2 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 2.....	52
4.1.3 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 3.....	54
4.1.4 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 4.....	56
4.2 Vyhodnocení krystalizačních příprav Quetiapinu Oxalátu.....	58
4.3 Krystalizační přípravy Quetiapinu Fumarátu (QF).....	58
4.3.1 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 1.....	59
4.3.2 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 2.....	63
4.3.3 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 3.....	66
4.3.4 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 4.....	70
4.3.5 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 5.....	74
4.3.6 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 6.....	78
4.3.7 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 7.....	82
4.4 Vyhodnocení krystalizačních příprav Quetiapinu Fumarátu.....	86
5. ZÁVĚR	88
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	89
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	91

1. ÚVOD

Krystalizace je jedním ze základních procesů v přírodě a člověk se s ní poprvé setkal asi při odpařování moří nebo při mrznutí vody. Později ji začali lidé využívat ve výrobě. 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 fázi v určitých technologických stupních (vlhká granulace, mikronizace atd.) nebo výjimečně i při skladování léčiv. Sledovanými parametry výsledného produktu jsou: výtěžek, chemická a fyzikální (polymorfni) čistota krystalů, distribuce jejich velikostí, krystalový tvar a obsah zbytkových rozpouštědel [3].

Pojem polymorfie resp. polymorfismus (z řeckého: poly = mnohý, morph = tvar) použil poprvé, v krystalografické souvislosti, Mitscherlich v roce 1822. Všiml si, že u některých arseničnanů a fosforečnanů může jedna sloučenina, určitého chemického složení, vykristalovat ve více krystalových formách. Jako mnoho termínů v chemii, všeobjasňující teorie polymorfie neexistuje. McCrone definuje polymorfii jako schopnost dané sloučeniny v pevném stavu uspořádat molekuly v krystalové struktuře nejméně ve dvou formacích.

S polymorfii se můžeme potenciálně setkat u jakékoliv krystalické látky, včetně polymerů a kovů. Společně s polymorfii je kompletní morfologie materiálu popisována i jinými proměnnými, jako krystalový habitus, amorfni frakce a krystalografické defekty. Když se polymorfie vyskytuje jako výsledek rozdílného uspořádání molekul v krystalu mluvíme o pakovací polymorfii. Polymorfie může být také výsledkem existence rozdílných konformerů stejné molekuly v krystalu, v tomto případě mluvíme o konformační polymorfii. Jestliže anhydrátová, tzn. část krystalu bez solvátu je identická, ale krystalová forma se liší v množství vody/solventu v krystalové mřížce, mluvíme o pseudopolymorfii [4]. Zatímco u prvků a anorganických sloučenin existuje obvykle jen několik málo odlišných strukturních modifikací (alotropie), je u organických sloučenin výskyt pěti i více polymorfni forem celkem běžný. S polymorfii a polymorfni přeměnami se setkáváme u řady látek a tyto jevy musíme respektovat, protože polymorfy se liší v mnoha chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech [3].

2. TEORETICKÁ ČÁST

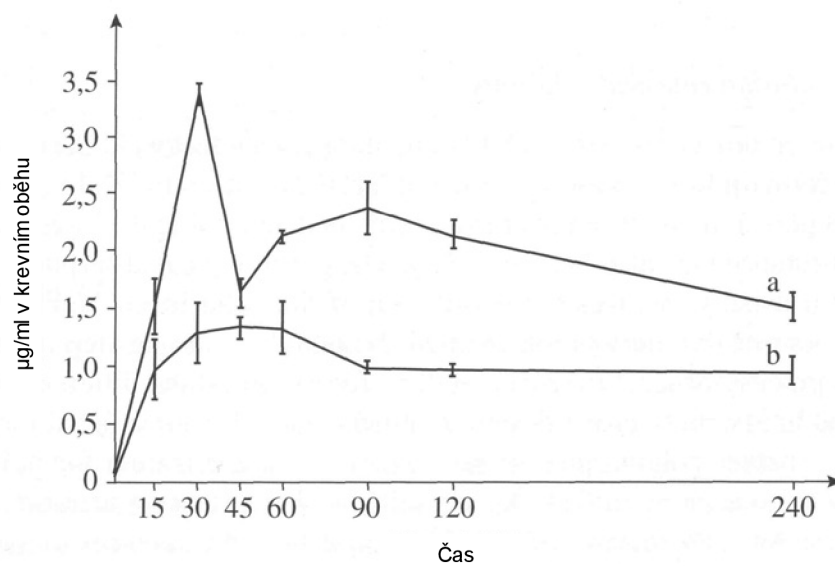
2.1. Polymorfie

2.1.1 Charakteristika polymorfie APIs

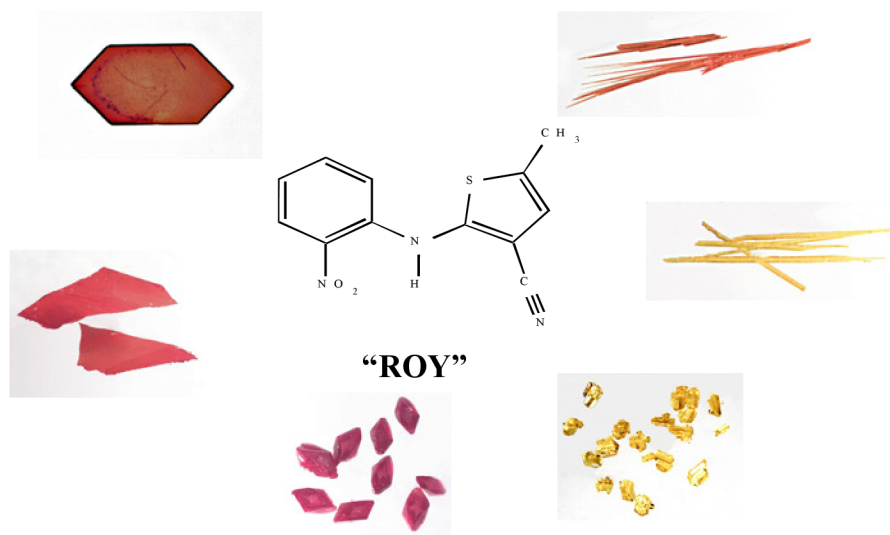
U farmaceuticky aktivních substancí (APIs), které jsou v drtivé většině organické molekuly, je zvykem hovořit o pevných formách příp. fázích, tím jsou míněny nejen krystalické polymorfy, ale také různé krystalické hydráty nebo solváty. Ačkoliv je biologický účinek aktivní substance vyvolán interakcí molekuly léčiva s cílovým receptorem (farmakodynamika), je velmi důležité, v jaké pevné formě je aktivní substance pacientovi podávána (farmakokinetika).

To znamená, že ve farmacii záleží nejenom na molekulové, ale i krystalové struktuře pevné aktivní substance. Protože různé formy jedné aktivní substance mají různou krystalovou strukturu a tvar krystalů (*obr. č. 2*), příp. jsou amorfní, musí se také lišit ve svých fyzikálních a biologických vlastnostech. Různá rozpouštěcí rychlost polymorfů a solvatomorfů v zažívacím traktu má za následek rozdílnou farmakokinetiku a biodostupnost (*obr. č. 1*). Vlastnosti pevných látek závisí na formě soli, velikosti částic a polymorfní formě. Pro farmaceuticky aktivní látky jsou u pevných látek důležité vlastnosti:

- rozpustnost,
- biodostupnost, toxicita,
- barva,
- habitus (morfologie),
- teplota tání,
- hygroskopičnost,
- hustota, tvrdost krystalu,
- čistota, výtěžnost,
- chemická stabilita,
- transformace během procesu,
- stabilita během skladování [4].



Obr. č. 1: Absorpční stupeň dvou polymorfů fenobarbitalu orálně podaných. Osa x, čas absorpce; Osa y, µg fenobarbitalu/ ml krve v krevním oběhu [1].



Obr. č. 2 : Šest polymorfních forem: 5-Methyl-2-[(2-nitrophenyl)amino]-3thiophencarbonitril [22].

2.1.2 Termodynamika polymorfie

Polymorfni struktury molekulárních krystalů jsou různými fázemi určitých molekulárních jednotek. K porozumění vzniku a vztahům mezi jednotlivými polymorfy můžeme použít fázové pravidlo.

$$F = C - P + 2$$

F = počet stupňů volnosti systému

C = počet složek systému

P = počet fází [1].

Fáze je definována jako homogenní část heterogenní soustavy oddělená od ostatních fází ostrým fázovým rozhraním. Uvnitř fáze jsou vlastnosti ve všech místech stejné nebo se mění bod po bodu spojitě. Na fázovém rozhraní se mění vlastnosti skokově [19]. Podle této definice existuje pro každou sloučeninu jedna plynná a jedna kapalná fáze, které jsou chemicky i fyzikálně homogenní. Každá krystalická forma vytváří individuální fázi, např. různé krystalické formy ledu. Směs dvou polymorfů obsahuje dvě pevné fáze, ale homogenní tuhý roztok, nebo slitina vzájemně mísitelných kovů je jen jednou fází. Problémy nastanou při posouzení zda systém vyhovuje definici „homogenní“. Na molekulární úrovni tato definice často selhává, a dokonce některé sloučeniny chovající se při X-ray difrakci jako jeden krystal (jedna fáze) mohou být při bližším pohledu charakterizovány jako nehomogenní směs krystalů nebo racemická směs. V jiných případech bylo potvrzeno, že jednotlivý krystal byl vlastně hybridem ve kterém koexistovaly dvě polymorfni formy.

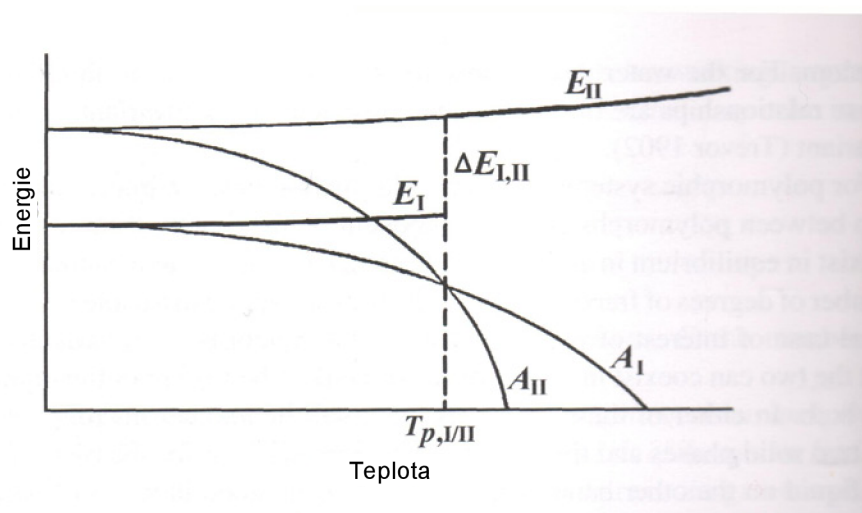
Počet složek C je minimální počet nezávislých látek definující složení všech fází v systému. Nejjednodušším a často uváděným příkladem je voda, která může existovat v různých rovnovážných stavech zahrnujících fázi pevnou, kapalnou i plynnou. V takovém systému je jen jedna složka. Podobně je tomu u kyseliny octové, ačkoli je tato kyselina ve všech svých fázích asociována do dimerů, může být jednoznačně určena jako molekula kyseliny octové. Důležitým faktorem je v tomto případě rychlost ustanovení rovnovážného stavu monomer-dimer. Rychlost ustanovení rovnováhy je vyšší než požadovaná rychlost k určení např. tlaku par nad kapalinou. V případech, kdy je rovnovážný stav ustaven pomaleji než je rychlost potřebná k fyzikálnímu měření, není tento stav jen funkcí teploty, ale také složením směsi, a k definování sloučeniny vyžaduje kinetický aspekt.

Počet stupňů volnosti F je počtem proměnných (teplota, tlak, koncentrace), které musí být dány k definování podmínek rovnovážného systému. Jednosložkový systém v jedné fázi (např. vodní pára) má dva stupně volnosti, jednosložkový systém ve dvou fázích (např. kapalina a plyn) má jeden stupeň volnosti a jednosložkový systém ve třech fázích nemá žádný stupeň volnosti. V polymorfním systému určité látky nás zajímá vztah mezi polymorfy jedné sloučeniny. V rovnovážném stavu mohou tedy koexistovat maximálně tři polymorfy s žádným stupněm volnosti. Mnohem obvyklejší případ je koexistence dvou polymorfů v systému s jedním stupněm volnosti v kapalně nebo plynné fázi, ale ne v obou. V těchto případech docílíme jiného trojného bodu pro dvě pevné fáze a kapalinu na jedné straně, nebo dvou pevných fází a plynu na straně druhé.

Relativní stabilita dvou polymorfů závisí na jejich volných energiích, nejstabilnější forma má nejmenší množství volné energie. Méně stabilní forma bude energeticky vedena k transformaci na stabilnější formu, i když kinetické faktory mohou této transformaci zabránit. Protože pracujeme s pevnými látkami, rozdíly v objemech dvou polymorfů jsou nepatrné, a můžeme je tudíž společně se změnami tlaku zanedbat. Za těchto podmínek tzn. konstantního tlaku a teploty, je volná energie A pevných látek reprezentována Helmholtzovým vztahem:

$$A = E - TS$$

E = vnitřní energie, T = absolutní teplota, S = entropie.



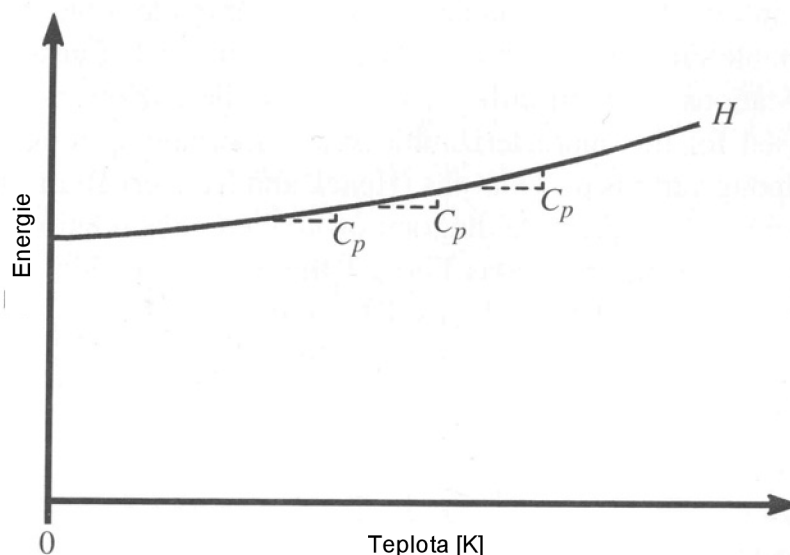
Obr. č. 3: Energetické vs teplotní křivky pro dva polymorfy I a II. A značí Helmholtzovu volnou energii a E je vnitřní energie. U formy I je předpoklad vyšší stability při pokojové teplotě [1].

Při teplotě 0 K , člen TS zmizí, a Helmholtzova volná energie je rovna energii vnitřní, někdy se také označuje jako energie mřížková, nebo strukturní. Důsledkem toho by nejstabilnější polymorf měl mít nejmenší vnitřní energii. Nad teplotou 0 K může dva polymorfy rozdělovat entropický člen. Chování volných energií jako funkcí teploty se může u různých polymorfů lišit, tak jak je to prezentováno (Obr. č. 3) u křivek A_I , A_{II} . Forma I je stabilnější při „absolutní nule“. Křivky se střetávají v bodě transformace $T_p\text{ I/II}$. Nad touto teplotou je stabilnější forma II. Při teplotě fázové přeměny mají oba polymorfy stejné množství volné energie, ale jelikož je vnitřní energie formy FI nižší než formy FII , množství energie potřebné k fázové přeměně je ΔE . Buerger (1951) také demonstruje endotermní povahu každé transformace, která nastává při zvyšování teploty.

Častěji než diagram na obrázku č. 3 bývají používány diagramy, kde je Helmholtzova volná energie A nahrazena Gibbsovou volnou energií G a vnitřní energie E je nahrazena enthalpií H . Data k těmto diagramům jsou experimentálně snadněji dosažitelná. Křivky enthalpie proti teplotě mohou být experimentálně vytvořeny určením tepelné kapacity C_p ze vztahu:

$$\left(\frac{\delta H}{\delta T}\right)_p = C_p$$

Třetí zákon termodynamiky říká, že tepelná kapacita ideálního krystalu je nulová při 0 K. Proto musí být sklon křivky v grafu (Obr. č. 4) při 0 K také nulový.



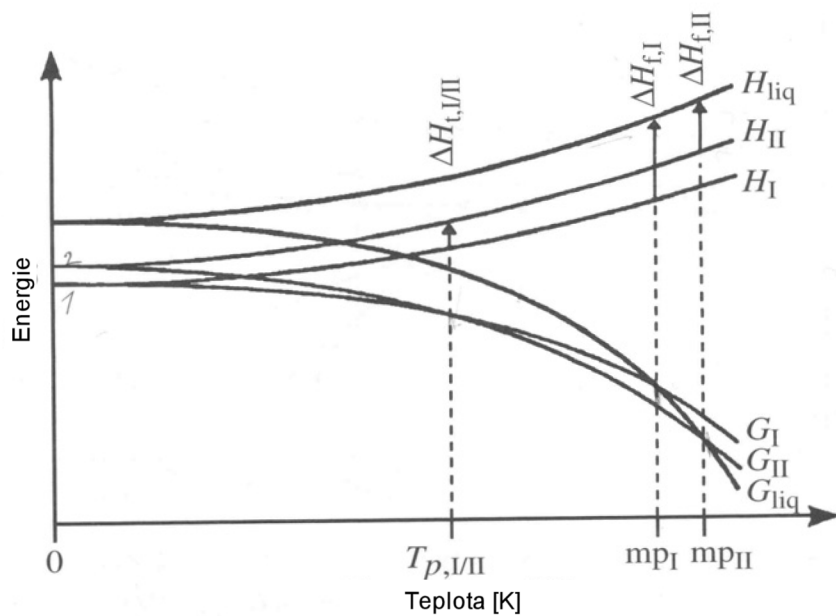
Obr. č. 4: Vynesení enthalpie H proti teplotě znázorňuje spojení s tepelnou kapacitou C_p [1].

Z termodynamického hlediska rozlišujeme dva typy polymorfie. První typ, který se nazývá enantiotropie, ve kterém dvě formy mohou přecházet reverzibilně fázovou přeměnou. Druhý typ, který se nazývá monotropie, je charakterizován přechodem jedné formy ireverzibilně fázovou přeměnou na formu druhou formu. Vzestup teploty vede k přeměně polymorfu na stabilnější formu. Hodně organických sloučenin krystalizuje z taveniny jako monotropní formy. Tyto sloučeniny vykazují nižší stabilitu a nižší teplotu tání.

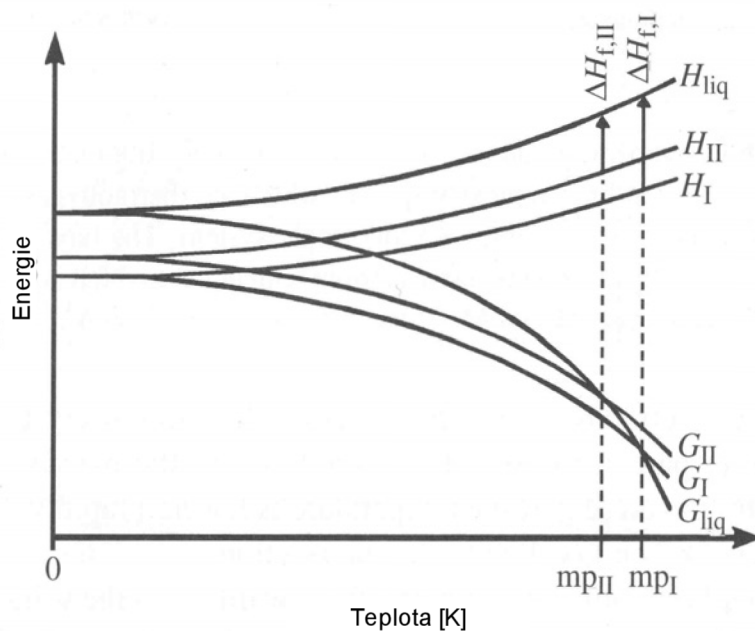
Z výrazu pro Gibbsovu volnou energii, parciální derivace zohledňující teplotu je:

$$\left(\frac{\delta G}{\delta T}\right)_p = -S$$

Protože S je vždy pozitivní, G je konstantně klesající funkcí. Isobary volných energií G mohou sledovat různé dráhy, a jejich spojnice reprezentují body přeměny T_p mezi fázemi (Obr. č. 5). Fyzikálně je možné jen jedno protnutí isobar [1].

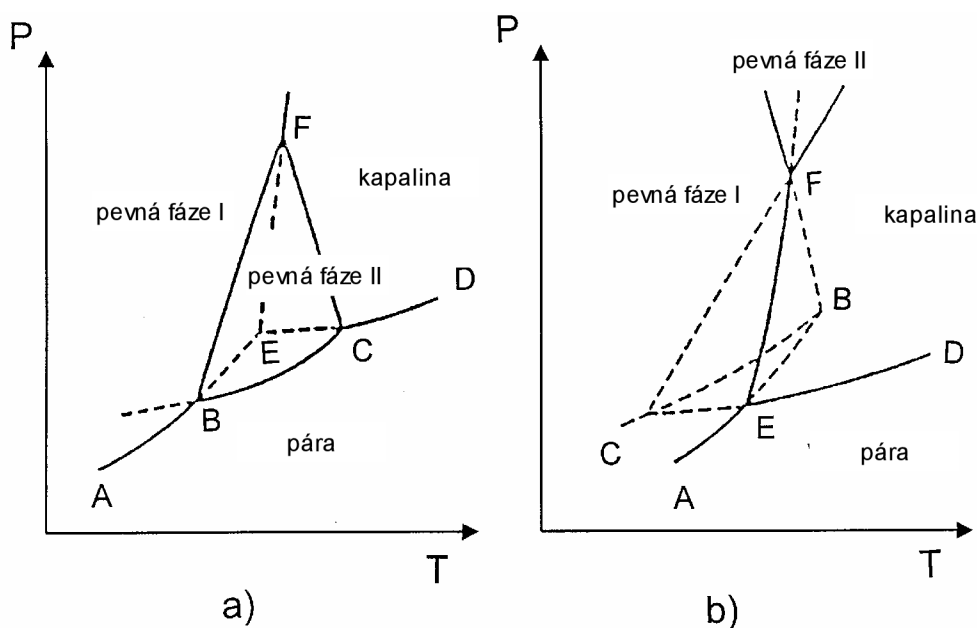


Obr. č. 5: *E/T diagram dimorfního systému. G značí Gibbsovu volnou energii a H enthalpii. Tento diagram znázorňuje situaci v enantiotropním systému v kterém je forma I stabilní pod bodem přeměny T_p , a pravděpodobně při pokojové teplotě [1].*



Obr. č. 6: *E/T diagram dimorfního systému. G značí Gibbsovu volnou energii a H enthalpii. Tento diagram znázorňuje situaci v monotropním systému v kterém je forma I stabilnější při všech teplotách. Spojnice křivek volných energií G_I , G_{II} (není znázorněna) bude nad teplotou tání pro obě formy [1].*

Protože jsou tlak a teplota dvě dobře experimentálně měřitelné veličiny, vztahy mezi parou, kapalinou a polymorfy substance jsou často vyjadřovány P/T diagramy (Obr. č. 7) [1].



Obr. č. 7: a) enantiotropní systém b) monotropní systém [4].

Obecná pravidla polymorfie:

V daném systému (např. T , P) je stabilní jen jedna forma polymorfu. Nejstabilnější polymorf má nejnižší rozpustnost. Hydráty mají vždy nižší rozpustnost v rozpouštědlech obsahujících vodu. Krystalická forma s nejvyšší hustotou je často nejstabilnější [5]. Termodynamická stabilita fází substancí závisí na :

- teplotě,
- tlaku,
- médiu obklopujícím krystal,
- vzduch : relativní vlhkost,
- solvent : rozpustnost,
- mechanických faktorech (mletí, sítování atd.).

Změna těchto parametrů vede často k metastabilním formám [2]. Při polymorfních transformacích je nutné brát v úvahu dynamickou povahu krystalizačního procesu, to jaká forma nakonec vznikne není dáno pouze termodynamikou, ale i kinetikou krystalizace [20].

2.1.3 Kinetika polymorfie

Kdyby byly fázové přeměny závislé čistě jen na termodynamických zákonech, vznikaly by stabilní krystalické formy poměrně snadno. S ohledem na kinetické faktory musíme počítat i se vznikem forem metastabilních. Přechod metastabilního stavu na stabilní vyžaduje překonání významné energetické bariéry. Aktivační energie E je spojena s rychlostní konstantou transformace k , v známém Arrheniově vztahu:

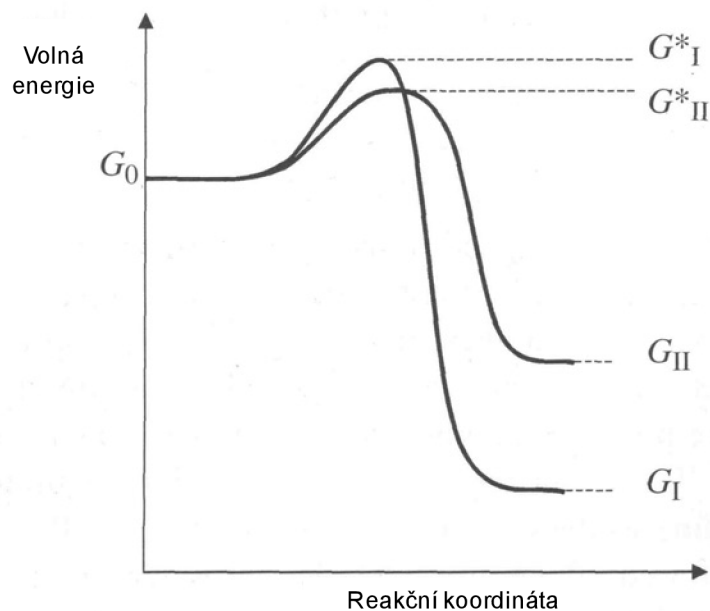
$$k = A e^{-E/RT}$$

A = frekvenční faktor spojený s entropií aktivace S

R = plynová konstanta

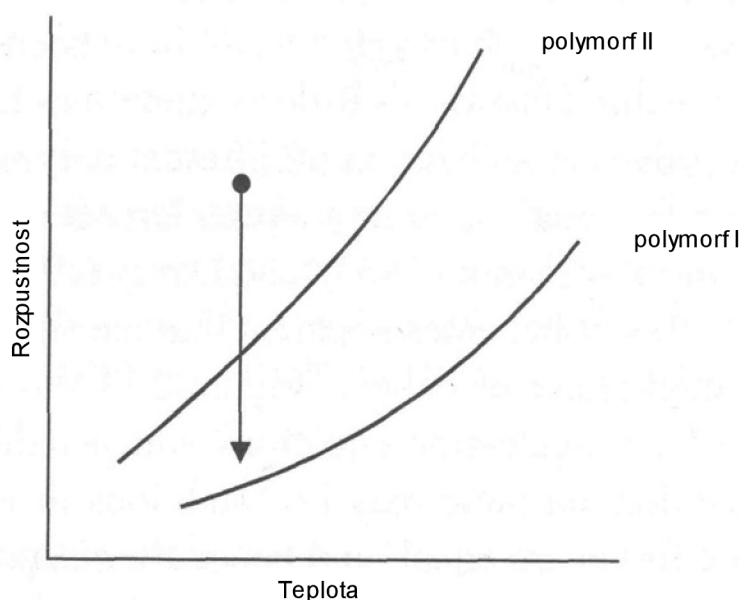
T = absolutní teplota (K)

Energetická bariéra může být snížena katalýzou, přítomností nečistot, a/nebo defekty v krystalové struktuře [21].



Obr. č. 8: Reakční koordináta pro krystalizaci v dimorfním systému ukazuje energetické bariéry pro formování polymorfu I a II [1].

Pro jednoduchost uvažujme monotropní dimorfní systém (Obr. č. 9). Je zřejmé, že v oblasti dané složením rozpouštědla a teplotním rozmezím, která leží mezi křivkami rozpustnosti krystalické formy I a II může vykristalizovat jen forma I. Výsledek krystalizace vedené za isotermních podmínek, které znázorňuje vektor (obr. č. 9) nebude tak zřejmý při počátečním přesycení roztoku. Termodynamické podmínky napomáhají vzniku formy I, zatímco kinetické podmínky (přesycení roztoku) naopak vzniku formy II. Skutečnost, že při krystalizaci z roztoku nebo taveniny vzniká nejdříve metastabilní forma, která se posléze transformuje na formu stabilní, je známa dlouho a německá technická literatura (1870 – 1914) popisuje mnoho experimentů na toto téma v organické i anorganické chemii [1].



Obr. č. 9: Soluční diagram pro dimorfní systém ukazuje hypotetickou krystalizační dráhu (vertikální šipka) při konstantní teplotě [1].

Vliv nuklea (očka krystalu) stabilní krystalické formy obsaženého ve formě metastabilní je demonstrován na následujícím příkladu. Dvě šarže stejné krystalické formy určité substance byly podrobeny stabilitním testům. Před zahájením testů byly šarže analyzovány metodou DSC a u šarže č. 2 byly detekovány stopy stabilní krystalické formy, zatímco u šarže č. 1 nikoli. Po pěti letech se zjistilo, že šarže č. 2 byla transformována na stabilní formu v závislosti na teplotě. U šarže č. 1 nebyla transformace při skladovacích teplotách pozorována. Transformace na stabilní formu může být urychlena přítomností rozpouštědla. Tato rozpouštědlem iniciovaná transformace bývá pozorována například při granulaci substance [1].

2.1.4 Strukturní rozmanitost

Struktura různých polymorfů, resp. forem aktivních substancí je dána především nekovalentními interakcemi mezi jejich molekulami. Krystaly organických látek které by byly drženy iontovými nebo kovalentními vazbami, se prakticky nevyskytují. Nekovalentními interakcemi v molekulárních krystalech jsou velice často vodíkové můstky, dále van der Waalsovy vazby, π - π interakce a zřídka i vazby „charge-transfer“ komplexů.

Různé krystalické formy určité molekuly vznikají často krystalizací z různých rozpouštědel (polárních nebo nepolárních), někdy záleží i na obsahu vody v rozpouštědle a samozřejmě na hodnotách teploty a tlaku při krystalizaci [3].

2.1.5 Analytické techniky ke studování a stanovení polymorfů

Analytické techniky k rozlišení a stanovení polymorfů jsou dány příslušnými směnicemi státních autorit. Podle uznávané směrnice FDA ICH Q6A – decision trees k nim patří:

- RTG prášková (fázová) analýza,
- Spektroskopie pevného stavu (NMR, IČ, Ramanova),
- Termická analýza (TGA, DSC, mikrokalorimetrie),
- Mikroskopie (optická, termooptická, SEM, AFM),
- Mikrometrie (granulometrie, povrch částic, porozita, hustota),
- Stanovení rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti,
- Sorpce/desorpce vlhkosti [31].

2.1.5.1 RTG difrakce

je zřejmě nejpoužívanější metodika, jejíž měřením lze zjistit krystalovou strukturu substance. Je založena na pružném rozptylu dopadajícího (primárního) RTG svazku na krystalové struktuře (trojrozměrně se opakující molekulární motiv). Rozptylovými centry jsou jednotlivé atomy, které jsou v krystalové struktuře charakterizované určitou pozicí vůči zvolenému počátku, a proto mají rozptýlené vlny neměnný fázový rozdíl [11].

2.1.5.2 Termická analýza

Metody termické analýzy jsou založeny na uvolňování nebo absorpci tepla při stavových změnách materiálu. Různé techniky termické analýzy jsou tedy zaměřeny na určení entalpie provázející stavové změny měřením rozdílů v tepelném toku mezi studovaným vzorkem a referenčním standardem [1].

2.1.6 Patentová ochrana APIs

Problémy spojené s polymorfií a solvatomorfií APIs jsou v centru pozornosti výrobců léčiv. Snahou etické farmaceutické firmy (originálního výrobce), která vyvinula určitou aktivní substanci, je patentově ochránit všechny její formy. Lze ovšem předpovědět všechny formy, které může aktivní molekula vytvořit? S tím také souvisí vývoj takové analytické metodiky, která je schopna všechny formy jednoznačně charakterizovat a rozlišit. To je nutné nejenom pro stanovení fázové (polymorfnií, solvatomorfnií) čistoty zvolené formy při výrobě, ale také při patentových sporech etických a generických firem (dalších výrobců). Nově vyvinuté látky si etické firmy obvykle chrání pomocí patentů. V závislosti na teritoriu je nová aktivní substance chráněna po určitou dobu prakticky nezpochybnitelnou látkovou ochranou. Spolu s tím je chráněn i způsob výroby, který již tak neotřesitelný není a ve většině případů jej lze obejít, zjednodušit nebo nalézt výhodnější meziprodukty. Tak lze pro jednu aktivní substanci posléze najít celou řadu patentů, obvykle pocházejících již od generických výrobců a popisujících nové způsoby výroby. V poslední době je nově využíván patentový trik, který spočívá v dodatečném objevení nové krystalové formy a jejím patentovém chránění. Vzhledem k tomu, že u léčiv je pro určitou lékovou formu někdy výhodnější rychle rozpustná krystalová forma a jindy naopak méně rozpustná, někdy přinášejí výhodu větší a stálější krystaly, jindy je naopak biodostupnost lepší u mikrokrytalických nebo amorfních fází. Protože jednotlivé formy se liší stálostí nebo obsahem zbytkových rozpouštědel, je prakticky téměř vždy možno nalézt alespoň jakousi virtuální výhodu nové krystalické formy, která patentování umožní. Tím vzniká prostor pro syntézu dosud nepopsaných a patentově nechráněných forem aktivních substancí a jejich farmaceutickou formulaci generickými firmami. Klíčovým důsledkem tohoto postupu je možnost prodloužení patentové ochrany např. i u látek, u nichž již pominula látková ochrana, a staly se tak generickými substancemi [3]. Nově vyvinutý polymorf může být efektivnější a vhodnější než originální produkt. Příkladem může být ranitidine hydrochlorid, lék proti vředům vyráběný firmou GlaxoSmithKline, známý jako Zantac. V polovině 90-tých let končila látková ochrana u této substance a ostatní firmy se chtěly co nejdříve dostat na trh s levnější generickou formou. Obchodováním se substancí, které skončila patentová ochrana se firmy vyhnou nejnákladnější fázi vývoje léku, která zahrnuje zkoušky na lidech. Firma Glaxo měla ovšem patent na druhý polymorf, který objevila brzy po zahájení výroby prvního, a tím si zachovala monopol na tuto substanci i po expiraci prvního patentu.

FDA (Food and Drug Administration) vyžaduje od všech výrobců registraci přesného polymorfu každého léku, který produkují. Farmaceutické společnosti musí také demonstrovat stabilitu a reprodukovatelnost daného polymorfu, jinak by bylo těžké stanovit efektivní dávku léku [23].

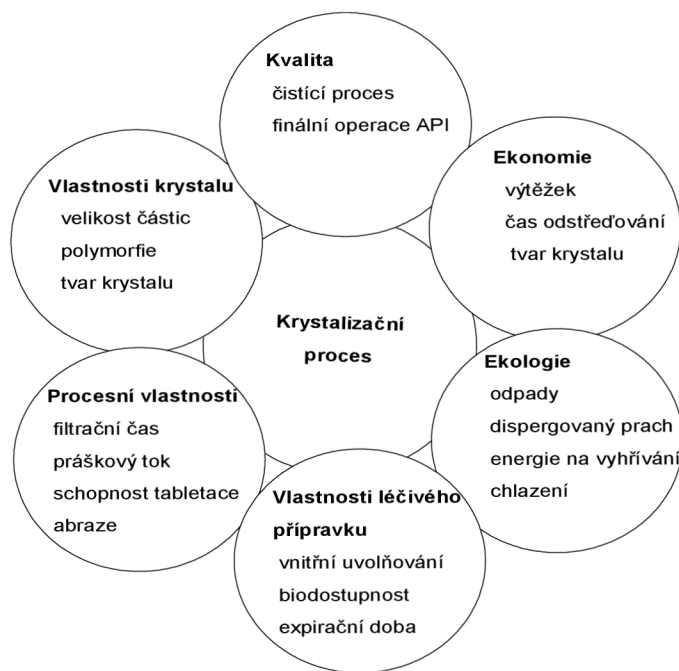
2.2 Krystalizace APIs

Klíčovým procesem při výrobě farmaceutických substancí (APIs) je krystalizace. Krystaly vznikají nejčastěji z kapalných roztoků, které jsou založeny na vytvoření přesyceného roztoku API. Při krystalizaci dochází k samouspořádacímu supramolekulárnímu procesu, při kterém se původně nahodile orientované molekuly skládají do vnitřně uspořádaných krystalů (supramolekuly). Ačkoliv je proces krystalizace znám dlouho, stále se ho nedaří v některých případech cíleně řídit. Těmito případy jsou ve farmaceutickém průmyslu krystalizace nestabilních polymorfů a jejich možné a nekontrolovatelné polymorfni přechody na stabilní fázi v určitých technologických stupních (vlhká granulace, mikronizace) nebo výjimečně i při skladování léčiv [21]. Krystalizace se skládá ze základních chemických, fyzikálních a technických procesů, které jsou navzájem propojeny a ovlivňují se. Z tohoto důvodu je navrhování krystalizačního procesu mezioborovým úkolem, kde odborníci z vývoje, technologie a kontroly kvality (QC) musí vzájemně spolupracovat. Krystalizace je většinou posledním krokem, kdy je API homogenním roztokem, proto je tento krok v centru zájmu kontroly jakosti (QA). Cílem je navrhnout proces krystalizace tak, aby bylo dosaženo čisté substance v požadované polymorfni formě, dobré výtěžnosti, reprodukovatelné distribuci částic a požadovaných fyzikálních vlastností.

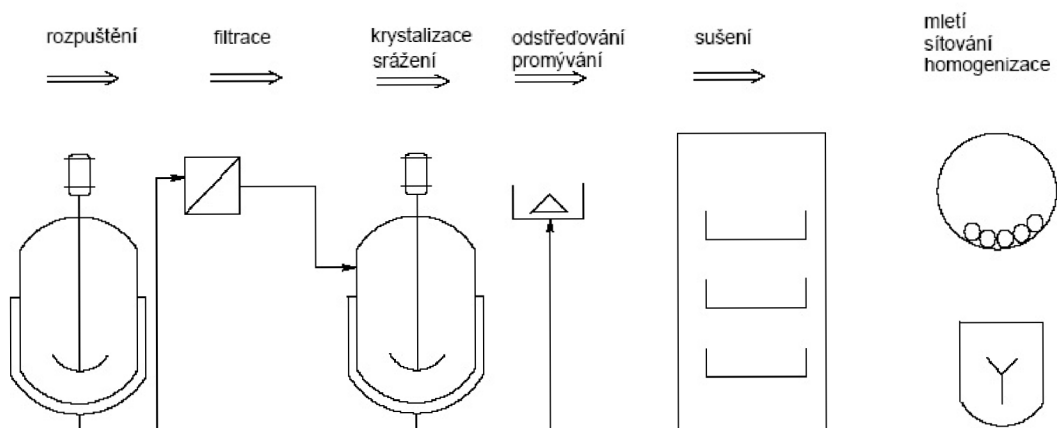
Velikost částic a polymorfie se staly velmi podstatnými charakteristikami pro finální kvalitu a použití API. Spolu s vytvořením složení jsou tyto faktory zodpovědné za výstupní profil léčivého přípravku. Zvyšující se zájem o krystalizační proces je pochopitelný, když uvážíme vliv na konečný léčivý přípravek a na celkový proces. Prvotně je krystalizace hlavní čistící operací chemických syntéz v provozním měřítku. Tak je krystalizační proces přímo spjat s profilem čistoty finálních APIs. Výtěžek a čas filtrace jsou hlavní faktory mající vliv na ekonomiku procesu. Navíc krystalizace určuje fyzikální parametry výsledných krystalů, které jsou významné pro následující výrobní procesy. Například velikost krystalů a jejich tvar přímo ovlivňují granulaci, schopnost lisování a drsnost výsledných tablet.

Tzv. screening polymorfni forem, solvátů a solí je konstruován k identifikaci a charakterizaci všech možných krystalických forem farmaceutické substance. Tento proces je realizován ve velmi malém měřítku. Cílem je následně provádět reprodukovatelný krystalizační proces vybrané formy ve velkém měřítku. Použití substance ve formě soli nebo solvátu je obvykle z důvodu horších vlastností této substance, jako je nedostatečná krystalinita, rozpustnost ve vodě nebo stabilita. Jestliže vykazuje substance horší rozpustnost, nabízí někdy amorfni forma lepší alternativu. Studium chemické a strukturní stability amorfni forem je jednou ze základních otázek během farmaceutického vývoje [17].

Abychom mohli krystalizaci řídit je nutné tento proces ovlivnit již v prvotním, tzv. prenukleačním stádiu. To znamená, že musíme ovlivnit jak termodynamiku – jaké krystalické fáze vzniknou za určitých podmínek, tak kinetiku – jak rychle se tvoří krystalové zárodky (nuklea) a jak rychle z nich rostou krystaly [21].



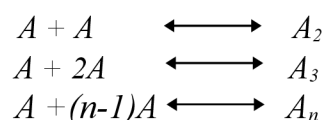
Obr. č. 10: Vliv krystalizace na přidružené aspekty



Obr. č. 11: Krystalizační proces, od začátku po finální produkt.

2.2.1 Nukleace

Krystalizace se skládá ze dvou hlavních kroků: nukleace a růstu krystalů. Jestliže k nukleaci nedojde, resp. koncentrace nukleí nepřekročí kritickou mez, vzniká při solidifikaci roztoku amorfni fáze. Nukleace může být buď primární (spontánní) nebo sekundární (ovlivněná přítomností pevné fáze). Homogenní nukleace je teoretický model, kdy se nuklea tvoří náhodnými srážkami molekul kdekoli v objemu krystalizujícího roztoku, bez přítomnosti pevné fáze. Sekvencí molekulárních adicí vznikají v přesyceném roztoku molekulární agregáty (klastry).



Roztok pak obsahuje agregáty různých velikostí, $A...A_n$, které mají tendenci se spontánně rozpadat, ovšem v důsledku vzájemných kolizí i rostou. Agregáty které dosáhnou tzv. kritické velikosti se nazývají nuklea a jsou schopné dalšího růstu (již se samovolně nerozpadají). Nukleus obsahuje (podle typu API) několik molekul až několik stovek molekul. Pokud je roztok ponechán spontánní nukleaci, znamená to nebezpečí, že vykrystalizuje nežádoucí produkt (polymorf). Ve farmaceutické výrobě se proto při řízené krystalizaci velmi často používá nukleace sekundární – očkovaná, právě z důvodu, že nelze zcela vyloučit polymorfni chování systému. Při očkování přidáváme k výchozímu roztoku krystalky (zárodky, očka) požadované fáze a tím zajistíme, že se vytvoří pouze tato fáze. Sekundární nukleace může být vyvolána i jinými, nechtěnými vlivy, např. pohybem míchadla krystalizátoru.

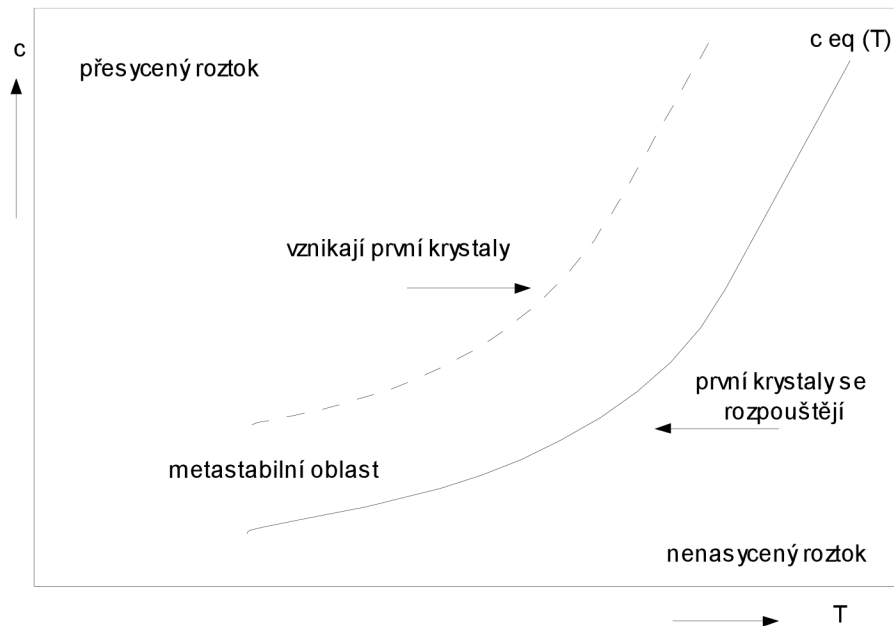
2.2.2 Termodynamika krystalizace

Krystaly mohou nukleovat a růst jen tehdy, když je roztok přesycený. Přesycení roztoku je vyjádřeno jako:

$$\Delta c = c_{pr} - c_{eq}$$

kde c_{pr} je koncentrace přesyceného roztoku a c_{eq} je koncentrace nasyceného roztoku. V grafu (Obr. č. 11) je plnou čarou znázorněna obecná rovnovážná křivka rozpustnosti [$c_{eq}(T)$ – závislost koncentrace krystalizující API na teplotě pro nasycený roztok]. Pod křivkou rozpustnosti leží oblast nenasyčeného roztoku. Pokud snižujeme teplotu, dostáváme se postupně z nenasyčeného roztoku přes roztok nasycený k přerušované křivce, která je zhruba rovnoběžná s křivkou rozpustnosti. Přerušovaná křivka, která odpovídá maximálnímu přesycení (začnou se vylučovat první krystaly), určuje spolu s křivkou rozpustnosti tzv. šířku metastabilní oblasti (zóny). Nad přerušovanou křivkou je oblast přesyceného roztoku, kde přednostně probíhá nukleace. Šířka metastabilní oblasti závisí na typu nukleace (heterogenní, homogenní, očkovaná), a především na přítomných nečistotách. Krystalizace API se musí provést právě v metastabilní oblasti (Obr. č. 12). V oblasti nenasyčeného roztoku už pevná fáze neexistuje. Z termodynamického hlediska dochází ke krystalizaci tehdy, když je chemický potenciál krystalizované složky v rovnovážném stavu (μ_{eq}) nižší než chemický potenciál této složky v přesyceném stavu (μ_{pr}). Hnací silou krystalizace je příslušný rozdíl:

$$\Delta \mu = \mu_{pr} - \mu_{eq}$$



Obr. č. 12: Obecná rovnovážná křivka rozpustnosti (plná čára), c – koncentrace, T – teplota. Přerušovaná čára odpovídá maximálnímu přesycení a vymezuje šířku metastabilní oblasti.

2.2.3 Mechanismus růstu krystalu a jeho kinetika

Růst krystalu znamená přirůstání dalšího materiálu k nukleu. Mechanismus růstu krystalů je komplikovaný proces, jehož detaily nejsou dosud zcela objasněny. Důvodem je, že přesycený roztok obsahuje celou škálu stavebních jednotek (atomy, ionty, molekuly, dimery, trimery, polymery, agregáty a jejich solvované formy atd.) jejichž struktura je někdy nejasná. Při růstu krystalu převažuje rychlost toku stavebních jednotek nad jejich odtokem. Výsledkem růstu krystalu je krystalová plocha. Soubor všech krystalových ploch určuje morfologii krystalu neboli jeho habitus. Podle podmínek krystalizace nemusí všechny krystalové plochy habitu vždy stejnoměrně vyrůst, konstantní však zůstávají vždy úhly mezi plochami (tzv. Stenův zákon). V konečném výsledku je krystalový habitus tvořen plochami, které rostou nejpomaleji a mají tudíž nejmenší energii. Plochy s nejmenší energií mají největší hustotu obsazení stavebními částicemi. Nejrychleji rostoucí plochy (s největší energií) většinou zarůstají. Krystalová plocha však nenarůstá přísunem stavebních jednotek pravidelně, ale růstovými mechanismy. Z energetického hlediska se stavební jednotky nejnáze připojují ke zlomům krystalové plochy, méně ochotně k hranám a nejhůře k hladké ploše.

Aby krystal v přesyceném roztoku rostl, musí být rozpuštěná složka transportována objemem matečného roztoku k povrchu nuklea. Tam je následně ukotvena do krystalové struktury. Podle klasické představy transport probíhá přes tenkou vrstvu roztoku (film). Vrstva filmu je v dynamické rovnováze jak s povrchem krystalu na jedné straně, tak s kapalnou 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 kapalné (roztokové) fáze do vrstvy filmu obklopující krystalickou fází,
- difuze složky přes vrstvu filmu,
- orientace a zabudování stavební částice do krystalové struktury,
- odvedení krystalizačního tepla do matečného roztoku.

Celkovou kinetiku krystalizace určuje nejpomalejší tzv. řídicí děj. V nemíchaném roztoku to bude zřejmě difuze, v míchaném roztoku to bude pravděpodobně zorientování a zabudování částice do krystalu. Zabudování do krystalu je zpomaleno pokud je molekula konformačně flexibilní.

2.2.4 Krystalizace polymorfů

V polymorfním systému je za daných podmínek vždy jeden polymorf (solvát) stabilní a ostatní metastabilní, tzn. z termodynamického hlediska nestabilní. I metastabilní polymorfy mohou být stálé a hodit se pro lékovou formulaci. Stabilní polymorf je charakterizován:

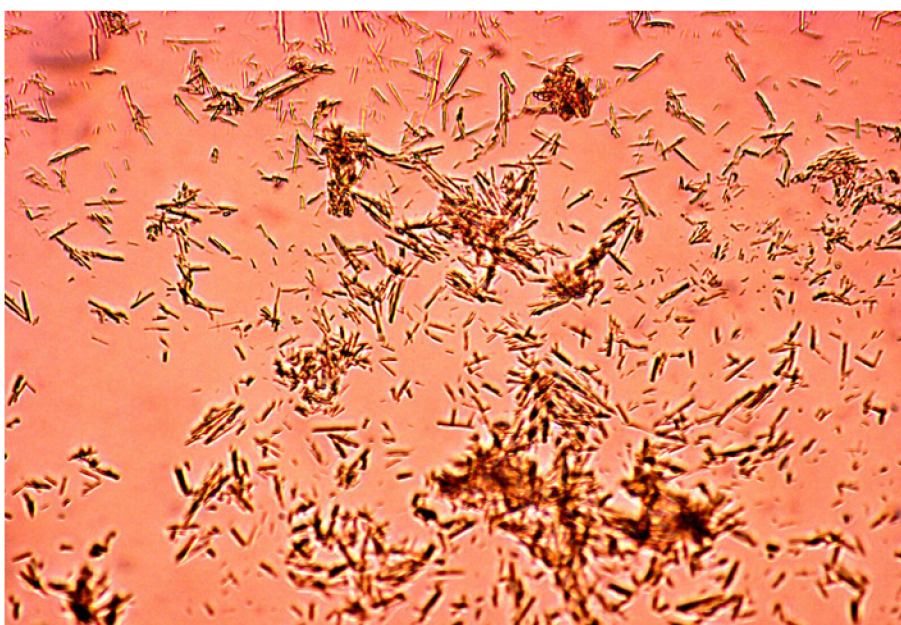
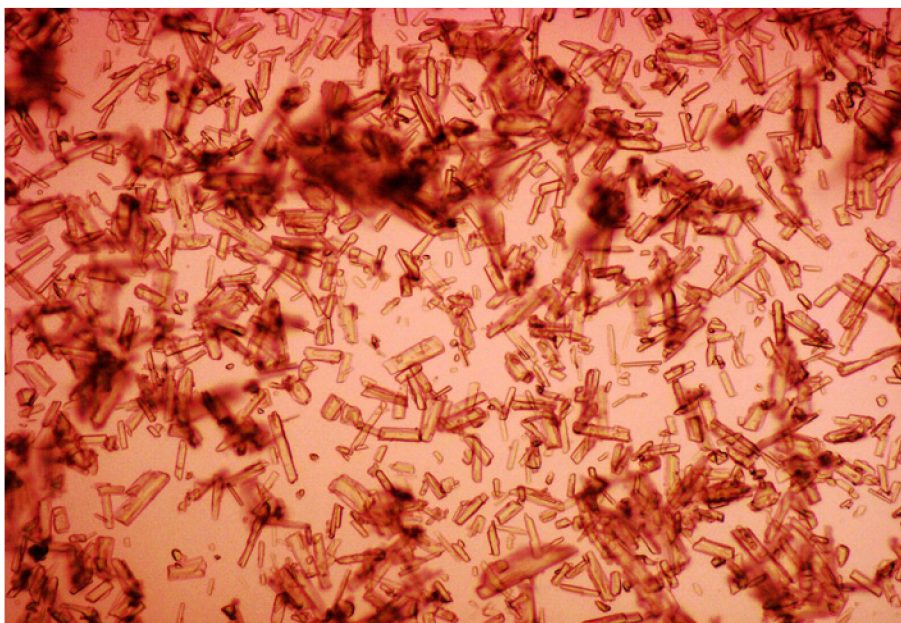
- nejnížší Gibbsovou energií,
- nejnížší rozpustností v libovolném rozpouštědle,
- nejnížší rozpouštěcí rychlostí,
- nejnížší biodostupností,
- nejnížší reaktivitou,
- nejnížším parciálním tlakem,
- nejvyšším bodem tání.

Originální farmaceutická firma k výrobě zpravidla vybere termodynamicky stabilní polymorf (hydrát, jiné solváty se používají pouze jako možné prekurzory), u kterého je zaručena reprodukovatelnost výrobních šarží a stabilita jak při formulaci, tak do expirace lékové formy. Generické firmy, např. z důvodu obejití patentové ochrany nebo terapeutických výhod, volí nestabilní polymorf (hydrát). Pro cílenou výrobu nestabilního polymorfu (hydrátu) se používá očkovaná krystalizace. Problém nastává, když není k dispozici krystalizační očko, protože univerzální technika, jak usměrnit polymorfní chování určité API žadaným směrem, tj. robustně a reprodukovatelně vyrábět určitý polymorf neexistuje. To souvisí se současnou absencí fundamentální teorie polymorfismu. O tom jaký polymorf vykrytalizuje se rozhoduje v prenukleačním stádiu, tedy u molekulárních agregátů, na základě kompetice kinetických a termodynamických faktorů. Vzhledem k tomu, že energetické rozdíly mezi polymorfy jsou velmi malé, snadno se může stát, že vykrytalizuje jiný polymorf, než si přejeme. Faktorů, které ovlivňují krystalizaci (nukleaci), zrovna tak jako možných metod krystalizace polymorfů je celá řada. Některé jsou velmi subtilní, a je těžké je mít 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 prenuklea jiného polymorfu, která kontaminují krystalizační zařízení, příp. jsou přítomna ve vzduchu, a tak může tvrdošijně krystalizovat vždy nechťený polymorf a pokusy vykrytalizovat jiný na stejném místě jsou dlouhodobě neúspěšné.

Známým příkladem je nezvládnutelné dimorfní chování ritonaviru (inhibitor HIV–proteasy, léková forma Norvir, Abbott Laboratories). V roce 1996 bylo toto léčivo uvedeno na trh, přičemž ritonavir byl znám pouze v jedné formě. Po dvou letech prodeje, v roce 1998, najednou přestaly u vyráběných šarží souhlasit disoluční testy a z polotuhého léčiva začala vypadávat substance. Výzkumem se zjistilo, že se jedná o nový stabilní polymorf, později označovaný jako forma *II*, přičemž původně vyráběná forma byla označena jako forma *I*. Forma *II* záhy kontaminovala výrobu a veškeré vyrobené šarže formy *I* přecházely samovolně na formu *II*. Je zajímavé, že před rokem 1998 nebyla forma *II* v šaržích vůbec detekována. K vyřešení dimorfie ritonaviru byla nasazena značná výzkumná kapacita, ovšem problém se nepodařilo uspokojivě zvládnout, takže firma Abbot byla nucena v roce 1999 přeformulovat Norvir na roztok [24].

Tabulka č. 1: Faktory ovlivňující, který polymorf (solvát) vykrystalizuje z roztoku, a metody transformace na jiný polymorf :

Faktory	Metody
teplota a tlak při krystalizaci	sublimace
rychlost ochlazování nebo odpařování roztoku	ochlazování taveniny
stupeň přesycení roztoku	desolvatace (dehydratace)
zvolené rozpouštědlo (srážedlo)	rekrytalizace z jiného rozpouštědla respektive ze směsi rozpouštědel
obsah vody (jiného kosolventu) ve finálním rozpouštědle	změna pH
přítomnost nečistot, aditiv v roztoku	rekrytalizace v suspenzi
rychlost dosažení přesyceného roztoku	zahřívání při (enantiotropii)
doba stání produktu v matečném roztoku	lyofilizace
intenzita míchání roztoku	
koncentrační a teplotní gradienty v roztoku	
zvukové, ultrazvukové, mikrovlnné, laserové, akustické nebo jiné rázy	

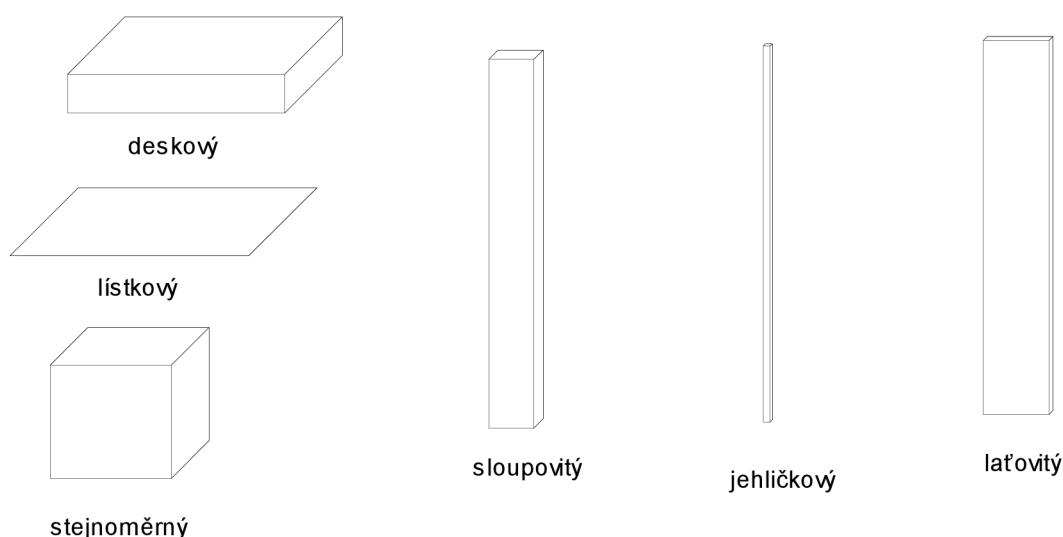


Obr. č. 13, 14: Dvě modifikace stejného produktu. Alfuzosin hydrochlorid bezvodý (nahore) je termodynamicky stabilní, krystaly jsou dobře definované. Alfuzosin hydrochlorid dihydrát (dole) tvoří jemné jehličky, předpokládá se horší manipulace s produktem.

2.2.5 Tvar krystalu

Vnější tvar, nebo-li habit krystalu je vymezen jeho vnitřní strukturou. Krystalografové vytvořili nomenklaturu pro popsání mnoha rozdílných forem a tvarů, které se vyskytují v každém ze sedmi krystalových systémů. Termín habit má specifický význam, je používán k popsání vnějšího vzhledu krystalu a zahrnuje skupinu symetricky podobných krystalových ploch. Pro rutinní mikroskopické pozorování ve farmacii není praktické identifikovat všechny tyto formy (ortorombickou, tetragonální, kubickou atd.). Platí to obzvláště pro krystaly, které mají rozdílný tvar v důsledku deformací způsobených nestejným vývojem určitých krystalových ploch během růstu. K popisu tvaru krystalu se používají mnohem jednodušší termíny, které jsou vhodné pro sledování rozdílů mezi jednotlivými šaržemi farmaceutické substance.

Tvar krystalů ovlivňuje také farmaceutické chování látky (např. disoluční vlastnosti). Popsáno je šest základních tvarů, a krystaly mající některý z těchto tvarů jsou zařazeny do jednoho ze sedmi krystalových systémů.

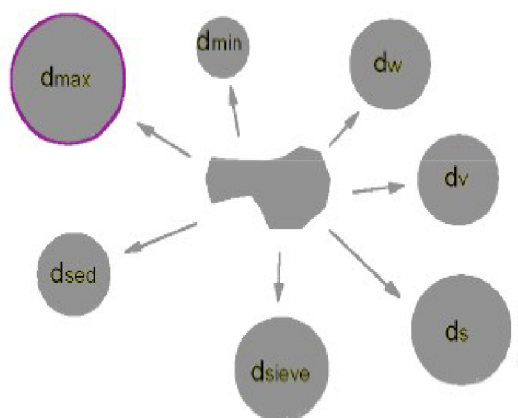


Obr. č. 15: Nákres znázorňující šest základních tvarů krystalu [25].

Některé krystaly mívají velmi zřetelný a přesný geometrický tvar, podobný např. tvaru diamantu. Tento jev se objevuje zvláště u deskových a lístkových krystalů, kde jsou hrany krystalu definovány úzkými plochami. V takových případech si můžeme dovolit označovat krystaly podle těchto tvarů [25].

2.2.6 Distribuce velikosti částic (DVČ)

Cílem všech technik pro měření velikostí částic je poskytnout jen jedno číslo, které by tuto částici charakterizovalo. Částice jsou ovšem tři dimenzionální objekty, pro které potřebujeme k jejich úplnému popisu tři parametry (délku, výšku, šířku). Většina technik pro měření velikosti částic proto předpokládá tvar měřeného materiálu kulovitý, a výsledná velikost částic je potom průměr „ekvivalentní koule“, která by poskytla stejný výsledek jako měřená částice. Způsob aproximace částice na ekvivalentní kouli je znázorněn na obrázku č. 16. Průměr určený pro tuto částici bude záležet na fyzikální vlastnosti měřené zvolenou technikou. V případě laserové difrakce musíme k dobré aproximaci vzít v úvahu všechny aspekty zobrazené na obrázku č. 16 [29].

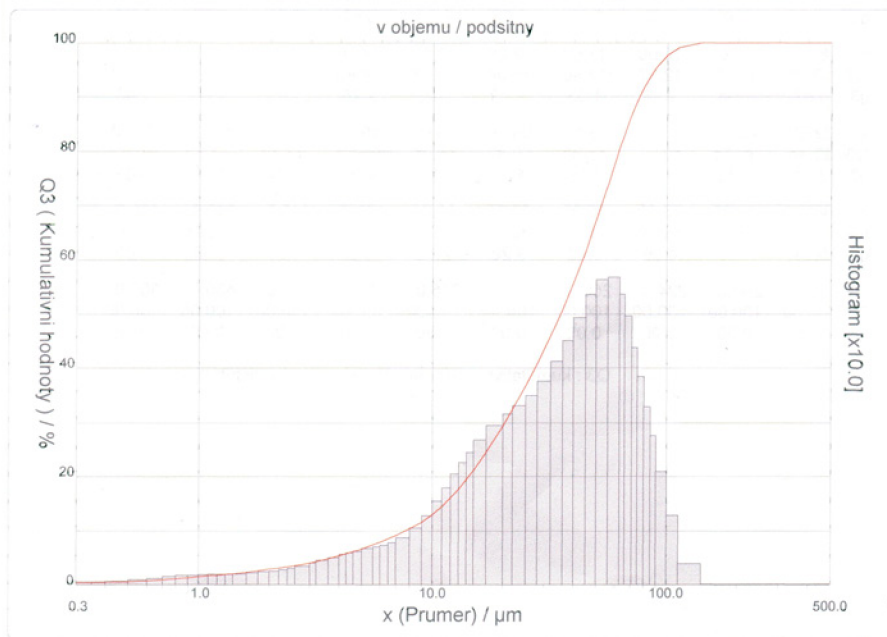


Obr. č. 16: Částice a přiřazené „ekvivalentní koule“: d_{max} , koule o průměru shodném s maximálním rozměrem částice; d_{min} , koule o průměru shodném s nejmenším rozměrem částice; d_v , koule o stejném objemu jako částice; d_w , koule o stejné hmotnosti; d_s , koule o stejném povrchu; d_{sed} , koule se stejnou usazovací rychlostí.

Výsledky měření částic mohou být prezentovány v grafické podobě jako distribuční křivky (histogramy – viz. obr. č. 17).

Statistické hodnoty:

- Modus (Mode) – hodnota, která má nejvyšší četnost v daném souboru.
- Medián (Median) – hodnota která soubor rozděluje na dvě části.
- Střední hodnota (Mean) – aritmetický průměr daného souboru hodnot [30].



Obr. č. 17: Grafické vyjádření distribuce velikosti částic měřené laserovou difrakcí. Horizontální osa x zobrazuje průměrnou velikost částic [μm]; vertikální osa Q_3 zobrazuje kumulativní (relativní) četnost souboru částic o určité velikosti [%].

2.3 Použité metody

2.3.1 FBRM (Focused Beam Reflectance Measurement)

2.3.1.1 Popis metody FBRM

Sonda využívající technologii FBRM (*Obr. č. 18*) se vloží do proudícího média libovolné koncentrace nebo viskozity. Laserový paprsek se promítá přes safírové okénko čidla a je fokusován těsně za jeho vnější stěnu. Ohnisko takto zaostřeného paprsku se pohybuje po obvodu okénka čidla. Rychlost pohybu zmíněného zaostřeného paprsku je vysoká – od 2 m/s do 8 m/s podle typu aplikace – takže pohyb částic je pro měření nevýznamný.

Jakmile částice prochází kolem povrchu okénka, fokusovaný paprsek narazí na její okraj. V tom okamžiku částice začne odrážet světlo a odraz trvá do okamžiku, kdy paprsek dosáhne opačného konce částice. Odražené světlo je shromažďováno optikou FBRM a je konvertováno na elektronický signál.

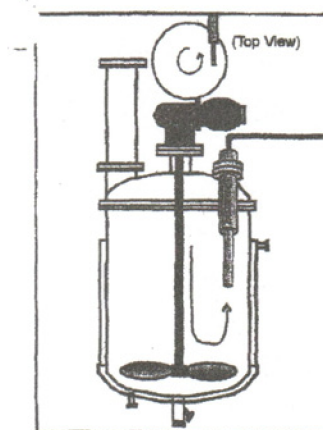
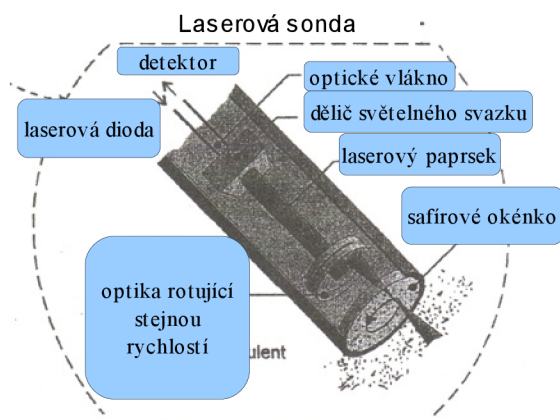
Metoda FBRM využívá unikátní diskriminační obvod, který umožňuje hodnotit časový interval trvání zpětného odrazu v průběhu pohybu paprsku od jednoho konce částice k protilehlému. Tento časový interval se násobí skenovací rychlostí a výsledkem je délka. Délka měřená metodou FBRM je nazývána tětiová délka (chord length). Tato tětiová délka je délka přímky mezi kterýmikoliv dvěma body nacházejícími se na okraji částice nebo aglomerátu. Systém měří desítky tisíc tětiových délek za sekundu, což poskytuje mohutný zdroj dat pro vyhodnocení distribuce tětiových délek (hodnoty naměřené v průběhu jedné sekundy se třídí podle délek tětivy lineárně do 1400 tříd.

2.3.1.2 Charakteristika dat

Distribuce tětiových délek je v podstatě unikátní pro každou jednotlivou distribuci velikosti a tvaru částic. Za předpokladu, že průměrný tvar pro více než jeden milion částic je konstantní, je možno změny v distribuci tětiových délek považovat za funkci změny velikosti a počtu částic.

2.3.1.3 Možnosti systému

- Systém poskytuje v reálném čase údaj o velikosti a koncentraci pevných částic ve zvoleném místě procesního proudu.
- Měří částice v rozsahu velikostí od 0,5 μm do 2,5 mm. Metoda FBRM nepředpokládá sférický tvar částic.
- Poskytuje ve dvousekundových intervalech údaj o distribuci velikosti a o počtu částic v každé velikostní kategorii.
- Umožňuje monitorování počtu částic ve specifických oblastech velikosti (jemné, hrubé atd.).

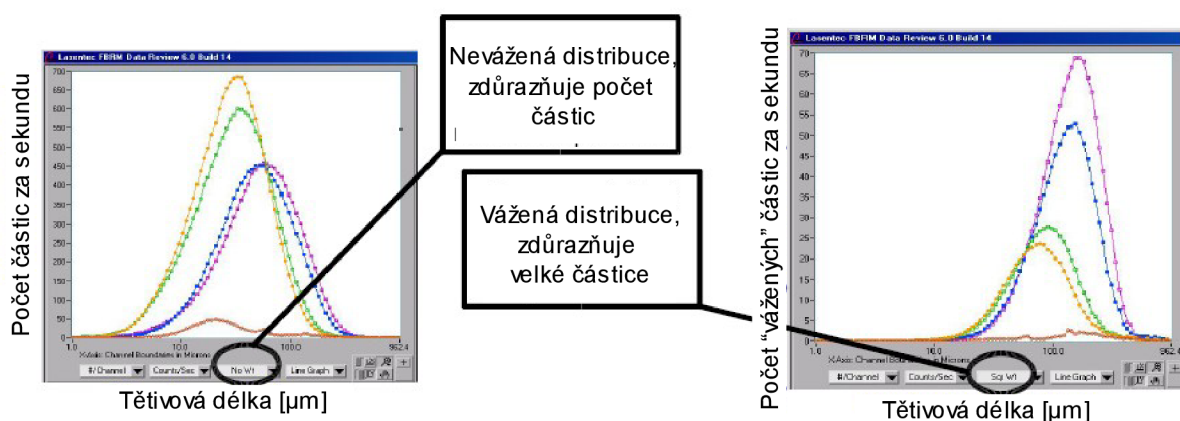


Obr. č. 18: Popis laserové sondy (vlevo). Možnost využití FBRM v provozním měřítku (vpravo).

2.3.1.4 Vyhodnocení dat

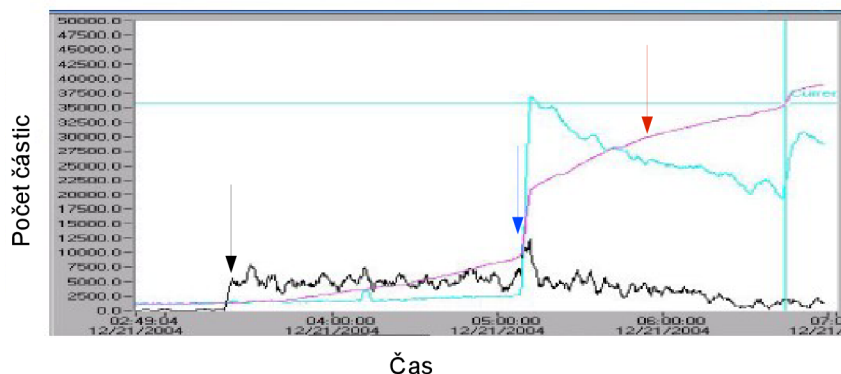
Data můžou být zobrazena ve dvou modulech:

- Modul akvizice dat (Distribution Compare): Umožňuje porovnání FBRM distribucí a kvantifikuje nastalé změny v počtu a velikosti částic. Na obrázku č. 18 jsou znázorněna dvě možná zobrazení dat. Vlevo vidíme tzv. neváženou distribuci (no weighted distribution), která zdůrazňuje počet částic, což je užitečné pro detekci procesu nukleace. Vpravo je zobrazena tzv. vážená distribuce (square weighted distribution), která se používá k zvýraznění velkých částic, což je významné pro sledování růstu krystalů.



Obr. č. 19: Distribuční porovnání: Osa X – počet částic změřených za sekundu; Osa Y – velikost částic v mikrometrech.

- Modul přehledu dat (Data Review): Zobrazuje, a to z jednotlivého datového souboru, trendy analogových vstupů spolu s časově souběžnou distribucí tětíkových délek v každém jednotlivém bodě trendu (Obr. č. 20).

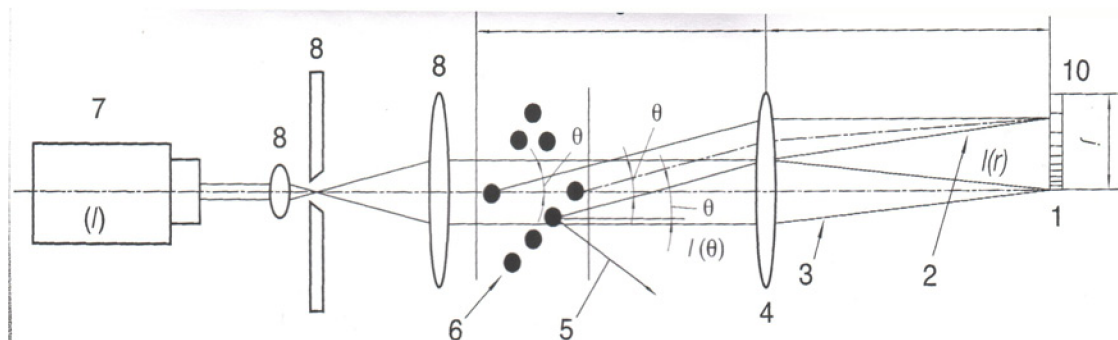


Obr. č. 20: Typický graf modulu „přehled dat“. Osa X – čas krystalizace; Osa Y – počet částic. Černá šipka ukazuje na oblast kde se začali objevovat velké částice ($293 - 1000 \mu\text{m}$) po přidání antisolventu. Modrá šipka ukazuje vzrůst počtu částic ($86 - 185 \mu\text{m}$) po prvním očkování. Červená šipka ukazuje částice o velikosti ($1 - 46 \mu\text{m}$) [27].

2.3.2 Laserová difrakce

Technika laserové difrakce se používá k určení distribuční velikosti částic. Analýza pomocí laserové difrakce je založena na skutečnosti, že částice při kolizi s laserovým paprskem rozptylují světlo pod úhlem, který souvisí s jejich velikostí. S klesající velikostí částice se logaritmicky zvětšuje úhel odrazu. Intenzita odraženého světla souvisí také s velikostí částic. Velké částice odráží světlo pod úzkým úhlem s vyšší intenzitou, zatímco malé částice odráží světlo pod širším úhlem s menší intenzitou. Technika nemůže rozlišovat mezi jednotlivými částicemi a aglomeráty nebo agregáty. Laserová difrakce měří v rozsahu $0,1 \mu\text{m} - 3 \text{mm}$. Typický systém (obr. č. 21) sestává ze zdroje laserového paprsku, Fourierových čoček, systému zajišťujícího průchod vzorku paprskem a série fotocitlivých detektorů. K vyhodnocování údajů jsou v současné době používány dva teoretické modely rozptylu světla částicemi. Starší Fraunhoferova teorie a nová Mie teorie.

Výstupní data jsou obvykle prezentována jako souhrnná distribuce pod sítem a/nebo jako distribuce objemová. Symbol x je používán k označení velikosti částice, která je definována jako průměr ekvivalentní koule. $Q_3(x)$ označuje objemovou frakci pod sítem o určité velikosti x . V grafickém vyjádření je x zaneseno na ose X v závislosti na proměnné Q_3 na ose Y . Obvyklejší je vyjádření distribuční velikosti částic pomocí interpolace. Symboly x_{10} , x_{50} a x_{90} vyjadřují 10%, 50% a 90% podíl částic pod sítem o určité velikosti x . Symbol x může být nahrazen symbolem d , který se často k označení velikosti částic používá [26].

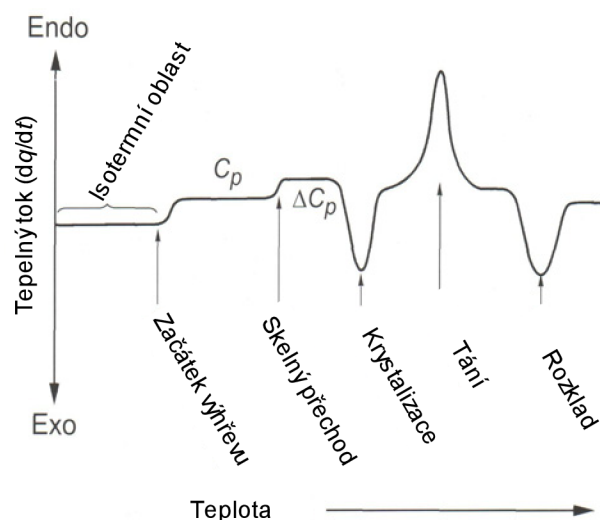


Obr. č. 21: Příklad uspořádání laserového difraktografu: 1, stínítko detektoru; 2, rozptýlený paprsek; 3, přímý paprsek; 4, Fourierova čočka; 5, rozptýlené světlo nedopadající na čočku; 6, částice; 7, zdroj laserového paprsku; 8, procesní jednotka; 9, pracovní vzdálenost čoček; 10, multiprvkový detektor; 11, ohnisková vzdálenost.

2.3.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie – kompenzační (DSC)

Pomocí DSC kompenzační metody se měří množství tepla (energie) uvolněné nebo absorbované vzorkem v průběhu kontrolovaného ohřevu, chlazení nebo udržování konstantní teploty. Kompenzační systém využívá dvou nezávislých termočlánků připojených ke dvěma kalorimetřům (měrná a referenční cely) a v průběhu teplotního programu reaguje na výchylku v měrné cele proti referenční teplotě okamžitou kompenzací energie proti této výchylce, tedy udržuje systém v tepelně ustáleném tzv. „thermal null“ stavu [28].

Když prochází vzorek fyzikální transformací (fázovou přeměnou), potřebuje dodat více či méně tepla v porovnání s referenčním celou při stejné teplotě. Velikost tepelného toku závisí na tom, zda je proces exotermní nebo endotermní. Například při přeměně pevného vzorku na kapalinu (tání), je potřeba dodat vzorku více tepla ke zvýšení jeho teploty stejnou rychlostí jako u referenční cely, to je důsledek absorpce tepla vzorkem během fázové přeměny. Podobně, když vzorek prochází exotermním procesem (např. krystalizací), je potřeba méně tepla ke zvýšení jeho teploty. Porovnáním rozdílů v tepelných tocích mezi vzorkem a referenční celou můžeme pomocí DSC kompenzační techniky měřit množství absorbovaného nebo uvolněného tepla během fázových přeměn. Výstupem DSC experimentu jsou křivky výhřevu a křivky chladnutí (obr. č. 22). Tyto křivky mohou být použity k výpočtu entalpií fázových přeměn. To se provádí integrací piků korespondujících s danou přeměnou [12].



Obr. č. 22: Teoretický DSC výstup ukazuje charakteristické křivky fázových přeměn v pevné látce (isotermní úsek, začátek výhřevu, skelný přechod, krystalizace, tání, rozklad). Tepelný tok dq/dt (heat flow) je v grafu vyneseno proti teplotě, která vrůstá konstantní rychlostí dT/dt [21].

$$dq/dt = C_p (dT/dt) + f(T, t)$$

dq/dt = tepelný tok (heat flow)

C_p = tepelná kapacita vzorku

dT/dt = rychlost ohřevu (heating rate)

$f(T, t)$ = tepelný tok jako důsledek kinetiky procesu – pro každý proces specifický

2.3.4 Mikroskopie

Světelná mikroskopie je zavedená metoda pro měření velikosti částic od $1 \mu\text{m}$ do $400 \mu\text{m}$. Při porovnávání velikosti částic je v některých případech tato metoda dostačující. Částice které jsou dispergovány v kapalině mohou být pozorovány při různých zvětšeních. Velikost nejmenších a největších částic je zaznamenána a potom je odhadnuta průměrná hodnota. Ačkoli není tato metoda příliš přesná, s dostatkem zkušeností operátora může být rychlá, jednoduše reprodukovatelná a použitelná k pozorování podstatných rozdílů mezi jednotlivými vzorky. Manuální způsob určování distribuční velikosti částic je pomalý a není moc přesný, protože může být změřeno jen malý počet částic. Z tohoto důvodu je efektivnější použití automatického analyzátoru. V tomto případě je přesnost výsledku závislá na přípravě vzorku. Jednotlivé částice by se neměly překrývat nebo být vzájemně slepeny. K statisticky

průkaznému výsledku je nutné změřit tisíce částic. Většina DVČ analýz ve farmaceutickém průmyslu je v současné době prováděna jinými technikami, ale světelná mikroskopie je stále ceněná jako metoda podpůrná [25].

2.4 Charakteristika zkoumané substance

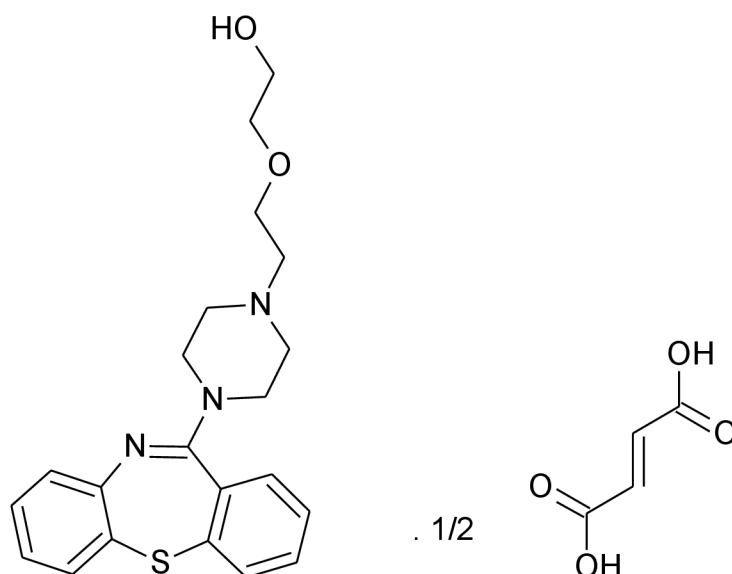
Quetiapin Fumarát

$C_{21}H_{25}N_3O_2S \cdot \frac{1}{2} C_4H_4O_4$

CASRN [111974-72-2]

$C_{21}H_{25}N_3O_2S$ (báze)

Chemický název: 2-[2-(4-Dibenzo[b,f][1,4]thiazepin-11-yl)-1-piperazinyl]ethoxyethanol
11-[4-[2-(2-hydroxyethoxy)ethyl]-1-piperazinyl]dibenzo[b,f][1,4]thiazepin



Obr. č. 23: Quetiapin Fumarát

Quetiapin se chemickou strukturou řadí mezi dibenzothiazepiny. Dle mechanismu účinku patří do skupiny multireceptorových antagonistů – MARTA (Multi-Acting Receptor Targeted Antipsychotics). Quetiapin je antagonist serotoninových receptorů 5-HT_{1A}, 5-HT_{2a}, 5-HT_{2C} a dopaminových D₁- a D₂- receptorů. V léčbě schizofrenie se používají antipsychotika (dříve neuroleptika), z nichž jsou dle doporučení expertů tzv. nová (atypická) antipsychotika léky první volby. V roce 1999 bylo v ČR registrováno nové antipsychotikum Quetiapin [16].

Literatura popisuje tři krystalické formy Quetiapinu Fumarátu, základní formu která byla pojmenována jako Forma I a při diferenciální skenovací kalorimetrii (DSC) vykazuje charakteristický endotermický pik při teplotě okolo 173 °C. Tato forma krystalizuje většinou z alkoholů. Další forma, nazývaná jako Forma II vykazuje při DSC analýze dva endotermické píky při teplotách okolo 130 °C a 166 °C. Tato forma se může vyskytovat jako solvát chloroformu nebo dichlormetanu. Poslední krystalická forma QF (Forma III) vykazuje při DSC analýze tři endotermické píky při teplotách okolo 111 °C, 142 °C a 167 °C a může se stejně jako Forma II vyskytovat ve formě solvátu chloroformu [32].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojové vybavení

3.1.1 Systém Lasentec FBRM M 400 L, Mettler – Toledo, Inc.

Systém pro měření velikosti a počtu částic

- 0,5 L skleněný krystalizátor s duplikací, skleněné míchadlo,
- termostat Huber,
- laserová sonda FBRM z nerezové oceli, provozní teplota od -20°C do 120°C,
- software : Lasentec Control Interface version 6.7.0.



Obr. č. 24: Systém pro měření velikosti a počtu částic Lasentec FBRM M 400 L, Mettler-Toledo, Inc.

3.1.2 Optický mikroskop Olympus CX 41

- optická soustava UIS (Universal Infinity systém – univerzální soustava s mezizobrazením v nekonečnu. Celkové zvětšení 40x, 100x, 400x, 600x,
- software – analySIS Soft Imaging systém.



Obr. č. 25: Optický mikroskop OLYMPUS CX 41.

3.1.3 Diferenciální skenovací kalorimetr, PYRIS Diamond DSC

- kompenzační DSC princip,
- dvě nezávislé platino-iridiové pícky s odporovým výhřevem a teplotními senzory,
- platinové odporové teploměry,
- teplotní rozmezí $-170^{\circ}\text{C} - 730^{\circ}\text{C}$,
- přesnost $0,01^{\circ}\text{C}$,
- skenovací rychlost $0,01^{\circ}\text{C} - 500^{\circ}\text{C}/\text{min}$.



Obr. č. 26: Diferenční skenovací kalorimetr, PYRIS Diamond DSC.

3.1.4 Systém CILAS 930

Laserový analyzátor distribuční velikosti částic (DVČ)

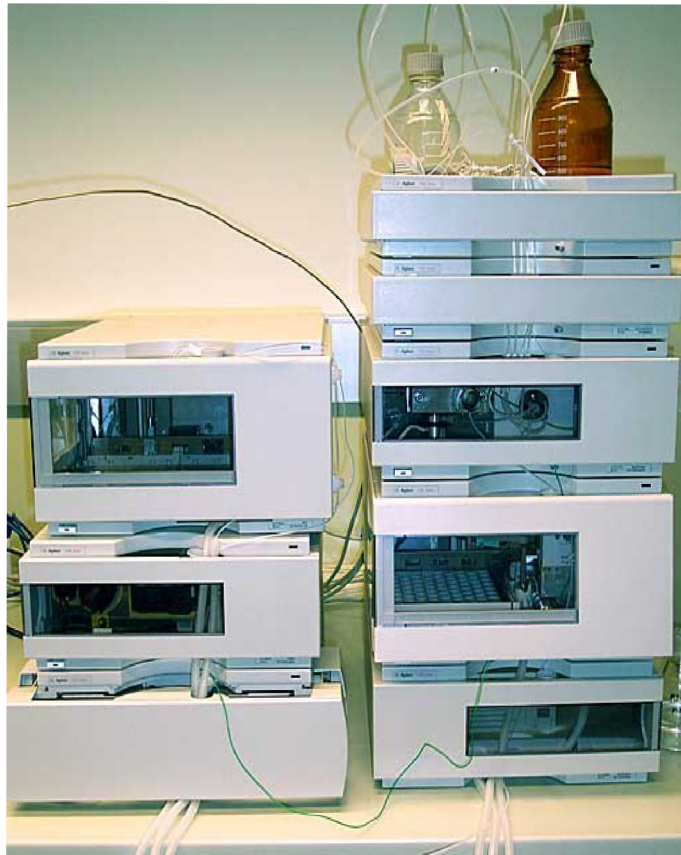
- laserové zdroje – nízkovýkonové laserové diody, výkon 3mW, vlnová délka 830 nm,
- měřicí kyveta umístěná mezi optickým systémem a detektorem je sestavena ze dvou skleněných destiček vzdálených od sebe 1mm,
- detekční systém – čočka, multi-prvkový křemíkový detektor fotodiodového typu se třemi doplňkovými snímači,
- jednotka pro zpracování signálu – deska předzesilovače, deska zesilovače, deska zpracování dat, deska ovladače.
- Venturiho trubice, vysavač
- rozptylová (vibrační) násypka vzorku



Obr. č. 27: Laserový analyzátor distribuční velikosti částic CILAS 930.

3.1.5 Kapalinový chromatograf Agilent HPLC

- kolona – Hypersil BDS C18, 100 mm x 4,6 mm, 3 μm,
- mobilní fáze – Acetonitril gradient grade : 0,05 M CH₃COOHNH₄ v poměru 80:20,
- detektor UV 255 nm.



Obr. č. 28: HPLC, kapalinový chromatograf 1100 s UV detektorem.

3.2 Pomůcky

- Elektronické váhy, KERN (váživost 4200 g, přesnost 0,01 g)
- Elektromagnetická míchačka, IKA Labor technik, RTC basic (0 – 1500 ot./min.)
- Laboratorní motorová míchačka, IKA Werke Eurostar (0 – 2000 ot./min.)
- Teplovzdušná sušárna, Tesur (20 – 200 °C)
- Běžné laboratorní sklo.

3.3 Seznam použitých chemikálií

- Kyselina fumarová USP, Sigma-Aldrich CR s.r.o
- Čpavková voda, BorsodChem MCHZ Ostrava s.r.o.
- Aceton, Brenntag CR s.r.o
- Toluén, DEZA Valašské Meziříčí a.s.
- Metanol, VIA – REK Rájec s.r.o
- Etanol, Moravský lihovar Kojetín a. s.
- Demineralizovaná voda, Farmak a. s.
- Aktivní uhlí Norit A Supra, Norit Nederland BV
- Imersní olej, Olympus Optical Co. Ltd. Japan

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Přípravy Quetiapinu Oxalátu (QO)

3.4.1.1 Příprava QO č. 1

15,0 g Quetiapin báze (Q) bylo rozpuštěno v 85 cm³ acetonu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Roztok byl vyhřát k refluxu (56,6 °C) a potom bylo zahájeno připouštění suspenze kyseliny šťavelové, předem připravené z 30 cm³ acetonu a 5,45 g kyseliny. Po připuštění (10 min.) byl roztok vyhřát na 56,6 °C, a udržován 180 min. na této teplotě. Následně byl roztok vychlazen během 30 min. na 30 °C. Na této teplotě byla suspenze QO za míchání ponechána 120 min. krystalizovat. Potom byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QO byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 50 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75°C.

3.4.1.2 Příprava QO č. 2

15,0 g Quetiapinu báze bylo rozpuštěno v 85 cm³ acetonu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Roztok byl vyhřát k refluxu (56,6 °C) a potom bylo zahájeno připouštění suspenze kyseliny šťavelové, předem připravené z 30 cm³ acetonu a 5,45 g kyseliny. Po připuštění (10 min.) byl roztok vyhřát na 56,6 °C a udržován 180 min. na této teplotě. Následně byl roztok vychlazen během 60 min. na 20 °C. Na této teplotě byla suspenze QO za míchání ponechána 240 min. krystalizovat. Potom byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QO byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 50 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.1.3 Příprava QO č. 3

15,0 g Quetiapinu báze bylo rozpuštěno v 85 cm³ acetonu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Roztok byl vyhřát k refluxu (56,6 °C) a potom bylo zahájeno připouštění suspenze kyseliny šťavelové, předem připravené z 30 cm³ acetonu a 5,45 g kyseliny. Po připuštění (10 min.) byl roztok vyhřát na 56,6 °C a udržován 60 min. na této teplotě. Následně byl roztok vychlazen během 15 min. na 20 °C. Na této teplotě byla suspenze QO za míchání ponechána 90 min. krystalizovat. Potom byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QO byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 50 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.1.4 Příprava QO č. 4

15,0 g Quetiapin báze (Q) bylo rozpuštěno v 85 cm³ acetonu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Roztok byl vyhřát k refluxu (56,6 °C) a potom bylo zahájeno připouštění suspenze kyseliny šťavelové, předem připravené z 30 cm³ acetonu a 5,45 g kyseliny. Po připuštění (10 min.) byl roztok vyhřát na 56,6 °C, a udržován 90 min. na této teplotě. Následně byl roztok vychlazen během 90 min. na 10 °C. Na této teplotě byla suspenze QO za míchání ponechána 180 min. krystalizovat. Potom byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QO byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 50 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.2 Stanovení čistoty Quetiapinu Oxalátu HPLC metodou

Podmínky:

- Mobilní fáze: B: Acetonitril gradient grade : 0,05M CH₃COONH₄ v poměru 80 : 20
C: Acetonitril gradient grade : 0,05M CH₃COONH₄ v poměru 20 : 80
- Gradient: 0 min. 20 % B 80 % C
25 min. 75 % B 25 % C
35 min. 90 % B 10 % C
- Rozpouštědlo: Acetonitril : Voda v poměru 30 : 70
- Průtok: 0,6 cm³/min.
- Kompressibilita 80.10⁻⁵ Mpa⁻¹
- Délka analýzy: 40 min.
- Ekvilibrace: 12 min.
- Nástřík: 10 μm
- Teplota kolony: 35 °C
- Detekce: UV 255 nm
- Retenční časy: Kyselina šťavelová 1,6 min.
Quetiapin 11,8 min.
Nečistota X (piperazinethanol derivát) 11,1 min.
- Roztok standartu: Asi 4,0 mg standartu se rozpustí s pomocí ultrazvuku v 10,0 cm³ rozpouštědla.
- Roztok vzorku: Asi 4,0 mg vzorku se rozpustí s pomocí ultrazvuku v 10 cm³ rozpouštědla.

Provedení:

1. kondicionace kolony do ustálení nulové linie
2. 1 x nástřík slepého vzorku (rozpouštědla)
3. 1 x nástřík roztoku standartu z jedné navážky
4. 2 x nástřík vzorku z jedné navážky

Vyhodnocení: Metodou vnitřní normalizace. Pík kyseliny šťavelové se do integrace nezahrnuje.

3.4.3 Stanovení teploty tání Quetiapinu Oxalátu

Podmínky:

- Přístroj Pyris Diamond DSC, Perkin Elmer
- Inertní dusíková atmosféra, průtok 20 cm³/min.
- Teplotní program 50 – 200 °C při nárůstu 10 °C/min.

Bylo naváženo 3 mg vzorku QO, který byl vložen na pánvičku Aluminium standart pan, a po nastavení teplotního programu bylo zahájeno měření.

3.4.4 Přípravy Quetiapinu Fumarátu (QF)

3.4.4.1 Příprava QF č. 1

36,2 g Quetiapinu oxalátu (QO) bylo rozpuštěno v 360 cm³ D – vody. Následně byly přidány 3 g CX aktivního uhlí, a po 15 minutovém míchání byl roztok zfiltrován. K filtrátu bylo přidáno 30 cm³ 25% čpavkové vody a 180 cm³ toluenu. Za míchání došlo k přeměně QO na bázi Quetiapinu (Q), a přechodu do organické vrstvy toluenu. Po 10 min. míchání byly vrstvy ponechány 15 min. stát bez míchání, tím došlo k jejich dokonalému rozdělení. Vodná vrstva byla vypuštěna a zlikvidována. Toluenný roztok Q byl oddestilován na odparek. K 30,9 g odparku Q bylo přidáno 250 cm³ acetonu a takto vzniklý roztok byl zchlazen na 20 °C. Roztok báze byl dán do krystalizátoru a za míchání byl vyhřát na 56,6 °C. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Po dosažení teploty byla přidána suspenze kyseliny fumarové, předem připravená z 40 cm³ acetonu a 4,7 g kyseliny fumarové. Asi po 2 minutách byl pozorován vznik krystalů QF. Po 5 min. míchání bylo zahájeno chlazení na 0 °C. Po vychlazení během 30 min. byla suspenze ponechána 90 min. krystalizovat za míchání a udržování teploty 0 °C. Potom byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír a promyta 2 x 40 cm³ vychlazeného acetonu. Po odsátí promývacího acetonu byl produkt 6 hod. sušen v teplotně sušárně při 75 °C.

3.4.4.2 Příprava QF č. 2

Postup přípravy Quetiapinu báze byl stejný jako u přípravy QF č. 1. 30,1 g odparku báze Quetiapinu bylo rozpuštěno v 250 cm³ acetonu. Roztok byl nalit do krystalizátoru a vyhřát k varu (56,6 °C). Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Po 5 min. refluxu byl přidána suspenze kyseliny fumarové, předem připravené z 40 cm³ acetonu a 4,7 g kyseliny fumarové. Téměř okamžitě byl pozorován vznik krystalů. Po 15 min. varu bylo zahájeno chlazení na 20 °C. Doba chlazení byla 20 minut. Suspenze byla dále udržována na teplotě po dobu 90 min. a následně přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QF byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 2 x 40 cm³ vychlazeného acetonu. Po odsátí promývacího acetonu byl produkt sušen 6 hod. v teplotně sušárně při 75 °C

3.4.4.3 Příprava QF č. 3

Do 1000 cm³ baňky bylo naváženo 37,5 g Quetiapinu Oxalátu, přidáno 375 cm³ D-vody a 250 cm³ toluenu. Do směsi bylo naráz přidáno 31,3 g čpavkové vody (23,4%). Po kontrole pH (>10), byla směs 20 min. míchána, přičemž došlo k přechodu Quetiapinu do toluenu. Směs byla přelita do 2000 cm³ dělicí nálevky, a ponechána 10 min. k dělení. Spodní vodná vrstva byla oddělena do chemické kanalizace. Horní organická vrstva byla vyčištěna 2 x 100 cm³ D-H₂O, nalita do 1000 cm³ destilační baňky a oddestilována na vakuové odparce na sirupovitý odparek. K odparku bylo přidáno 156 cm³ acetonu. Roztok byl vyhřát k refluxu do rozpuštění.

Do 1000 cm³ destilační baňky bylo dáno 156 cm³ acetonu a 4,88 g kyseliny fumarové. Směs byla vyhřáta k varu. K suspenzi kyseliny fumarové byl naráz připuštěn roztok Quetiapinu. Byla pozorována okamžitá tvorba krystalů QF. Směs byla 10 min. míchána za refluxu, a poté rychle ochlazená pod tekoucí vodou na 30 °C. Po vychlazení byla suspenze zfiltrována za vakua přes papírový filtr.

Do 500 cm³ krystalizátoru bylo připraveno 190 cm³ metanolu a následně přidáno 42,3 g vlhkého QF. Suspenze byla vyhřáta k varu (64 °C) otáčky míchadla byly nastaveny na 200 ot./min. Pro úplné rozpuštění QF, bylo postupně (po 10 cm³) přidáno celkem 100 cm³ metanolu, a roztok byl ponechán 1 hod. na refluxu. Potom byl roztok během 2 hod. vychlazen na teplotu 5 °C. V průběhu chlazení byl pozorován vznik krystalů. Okamžitě po zchlazení byla suspenze přefiltrována za vakua přes papírový filtr a promyta 2 x 40 cm³ vychlazeného acetonu. Po odsátí promývacího acetonu byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.4.4 Příprava QF č. 4

Do 1000 cm³ baňky bylo naváženo 37,5 g Quetiapinu Oxalátu, přidáno 375 cm³ D-vody a 250 cm³ toluenu. Do směsi bylo naráz přidáno 31,3 g čpavkové vody (23,4 %). Po kontrole pH (>10), byla směs 20 min. míchána, přičemž došlo k přechodu Quetiapinu do toluenu. Směs byla přelita do 2000 cm³ dělicí nálevky, a ponechána 10 min. k dělení. Spodní vodná vrstva byla oddělena do chemické kanalizace. Horní organická vrstva byla vyčištěna 2 x 100 cm³ D-H₂O, nalita do 1000 cm³ destilační baňky a oddestilována na vakuové odparce na sirupovitý odparek. K odparku bylo přidáno 156 cm³ acetonu a roztok byl vyhřát k refluxu do rozpuštění. Do 1000 cm³ destilační baňky bylo dáno 156 cm³ acetonu a 4,88 g kyseliny fumarové. Směs byla vyhřáta k varu. K suspenzi kyseliny fumarové byl naráz připuštěn roztok Quetiapinu. Byla pozorována okamžitá tvorba krystalů QF. Směs byla 10 min. míchána za refluxu, a poté rychle ochlazená pod tekoucí vodou na 30°C. Po vychlazení byla směs zfiltrována za vakua přes papírový filtr.

Do 500 cm³ krystalizátoru bylo připraveno 250 cm³ metanolu a následně přidáno 43,4 g QF. Směs byla vyhřáta k varu (64 °C), otáčky míchadla byly nastaveny na 200 ot./min. Pro úplné rozpuštění QF, bylo postupně (po 10 cm³) přidáno celkem 60 cm³ metanolu a roztok byl ponechán 1 hod. na refluxu. Potom byl roztok během 4 hod. vychlazen na teplotu 5° C. V průběhu chlazení byl pozorován vznik krystalů. Okamžitě po zchlazení byla směs přefiltrována za vakua přes papírový filtr a promyta 2 x 40 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.4.5 Příprava QF č. 5

Do krystalizátoru bylo dáno 410 cm³ etanolu a 20,0 g Quetiapinu Fumarátu. Suspenze byla míchána vyhřáta na 78 °C a ponechána 15 min. refluxovat do úplného rozpuštění. Po kontrole rozpuštění QF bylo zahájeno chlazení na 1 °C během 7 hod. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Po vychlazení, byla suspenze ponechána 120 min. krystalizovat za udržování teploty 1 °C. Následně byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QF byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 2 x 50 cm³ vychlazeného acetonu a produkt byl 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.4.6 Příprava QF č. 6

Do krystalizátoru bylo dáno 370 cm³ etanolu a 20,0 g Quetiapinu Fumarátu. Suspenze byla za míchání vyhřáta na 78 °C a ponechána 25 min. refluxovat do úplného rozpuštění. Po kontrole rozpuštění QF bylo zahájeno chlazení na 1 °C během 25 min. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Po vychlazení, byla suspenze ponechána 6 hod. krystalizovat za míchání a udržování teploty 1 °C. Následně byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QF byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 2 x 50 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.4.7 Příprava QF č. 7

Do krystalizátoru bylo dáno 360 cm³ etanolu a 20,0 g Quetiapinu Fumarátu. Suspenze byla za míchání vyhřáta na 78 °C a ponechána 25 min. refluxovat do úplného rozpuštění. Po kontrole rozpuštění QF bylo zahájeno chlazení na 20 °C během 1 hod. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Po vychlazení, byla suspenze ponechána 3 hod. krystalizovat za míchání a udržování teploty 20 °C. Následně byla suspenze přefiltrována za vakua přes filtrační papír. Krystaly QF byly po dokonalém odsátí matečného roztoku promyty 2 x 50 cm³ vychlazeného acetonu. Nakonec byl produkt 6 hod. sušen v teplovzdušné sušárně při 75 °C.

3.4.5 Stanovení čistoty Quetiapinu Fumarátu HPLC metodou

Podmínky:

- Mobilní fáze: B: Acetonitril gradient grade : 0,05M CH₃COONH₄ v poměru 80 : 20
C: Acetonitril gradient grade : 0,05M CH₃COONH₄ v poměru 20 : 80
- Gradient: 0 min. 20 % B 80 % C
25 min. 75 % B 25 % C
35 min. 90 % B 10 % C
- Rozpouštědlo: Acetonitril : Voda v poměru 30 : 70
- Průtok: 0,6 cm³/min.
- Kompressibilita 80.10⁻⁵ Mpa⁻¹
- Délka analýzy: 40 min.

- Ekvilibrace: 12 min.
- Nástřik: 10 μm
- Teplota kolony: 35 $^{\circ}\text{C}$
- Detekce: UV 255 nm
- Retenční časy:

Kyselina fumarová	1,6 min.
Quetiapin	11,8 min.
Nečistota X (piperazinethanol derivát)	11,1 min.
- Roztok standartu: Asi 4,0 mg standartu se rozpustí s pomocí ultrazvuku v 10,0 cm^3 rozpouštědla.
- Roztok vzorku: Asi 4,0 mg vzorku se rozpustí s pomocí ultrazvuku v 10 cm^3 rozpouštědla.

Provedení:

1. kondicionace kolony do ustálení nulové linie
2. 1 x nástřik slepého vzorku (rozpouštědla)
3. 1 x nástřik roztoku standartu z jedné navážky
4. 2 x nástřik vzorku z jedné navážky

Vyhodnocení: Metodou vnitřní normalizace. Pík kyseliny fumarové se do integrace nezahrnuje.

3.4.6 Stanovení polymorfie Quetiapinu Fumarátu DSC kompenzační metodou:

Podmínky:

- Přístroj Pyris Diamond DSC, Perkin Elmer
- Inertní dusíková atmosféra, průtok 20 cm^3/min .
- Teplotní program 50 – 200 $^{\circ}\text{C}$ při nárůstu 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Provedení:

Bylo naváženo 3 mg vzorku QF, který byl vložen na pánvičku Aluminium standart pan, a po nastavení teplotního programu bylo zahájeno měření.

3.4.7 Stanovení DVČ Quetiapinu Fumarátu metodou laserové difrakce

Podmínky:

- Systém CILAS 930
- Laserová dioda – vlnová délka 830 nm

Provedení:

Bylo naváženo 250 mg vzorku QF a zapnuto odsávání. Vzorek byl vložen do vibrační násypky odkud byl automaticky nasát přes Venturiho trubici a měřící celu do vaku vysavače.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Krystalizační přípravy Quetiapinu Oxalátu (QO)

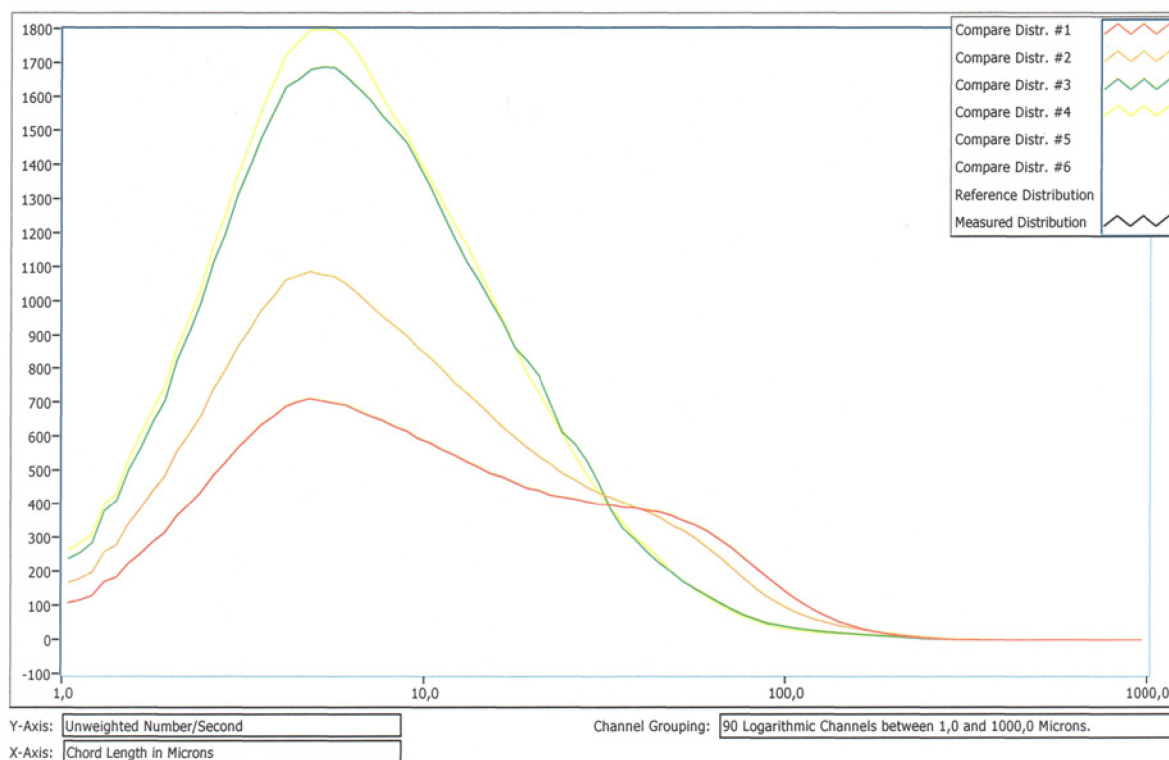
Cílem této diplomové práce byla laboratorní příprava krystalických forem solí farmaceutické substance Quetiapinu, vyhovujících polymorfií, chemickou čistotou, tvarem krystalu a distribučním rozdělením částic dalšímu zpracování (mletí, sítování), nebo přímo použitelných k prodeji výrobci lékové formy.

Jako soli Quetiapinu byly připravovány Quetiapin Oxalát (QO) a Quetiapin Fumarát (QF). QO není používán k výrobě lékových forem, ale slouží jako meziprodukt při výrobě QF. Tímto krokem se zvyšuje chemická čistota výsledné substance.

QO byl krystalizován z acetonu ve čtyřech přípravách. Výchozí surovinou byl sirupovitý odparek báze Quetiapinu, který byl posléze rozpuštěn v acetonu a přiveden k varu. K roztokům byla potom vždy stejnou rychlostí připuštěna suspenze kyseliny šťavelové, a otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min. Proměnnou procesní funkcí byl teplotní režim chlazení. Quetiapin Oxalát se používá jako meziprodukt při výrobě Quetiapinu Fumarátu, proto u této látky nebyla prováděna diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) k stanovení krystalické formy. Tvar a velikost částic byl vyhodnocován mikroskopicky a ke sledování růstu krystalů a jejich počtu přímo v krystalizačním procesu byla použita metoda FBRM. Chemická čistota byla kontrolována metodou HPLC. Ke každé přípravě QO jsou přiloženy výstupy měření a fotka krystalů z optického mikroskopu. Celkové zhodnocení krystalizací QO je níže v kapitole 4.2.

4.1.1 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 1

Acetonový roztok QO byl chlazen z teploty 56,6 °C rychlostí 0,87 °C/min. na teplotu 30 °C a na této teplotě byla potom krystalická suspenze 2 hodiny udržována.



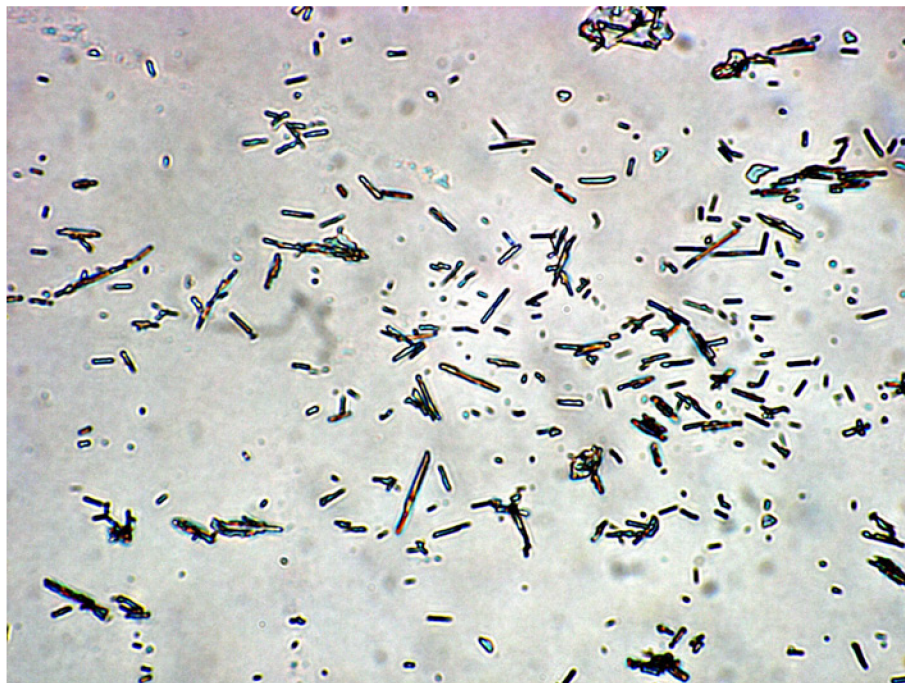
Obr. č. 29: FBRM. Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 2: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

	po 20 min.	po 60 min.	po 90 min.	po 120 min.
#/sec. (1-5 μm)	8553	13066	19773	20816
#/sec. (10-23 μm)	5482	7332	11026	11103
#/sec. (29-86 μm)	4741	4416	2953	2940
#/sec. (100-251 μm)	583	453	227	186
#/sec. (293-1000 μm)	4	5	4	2
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	19,82	15,42	10,93	10,51

Tabulka č. 3:

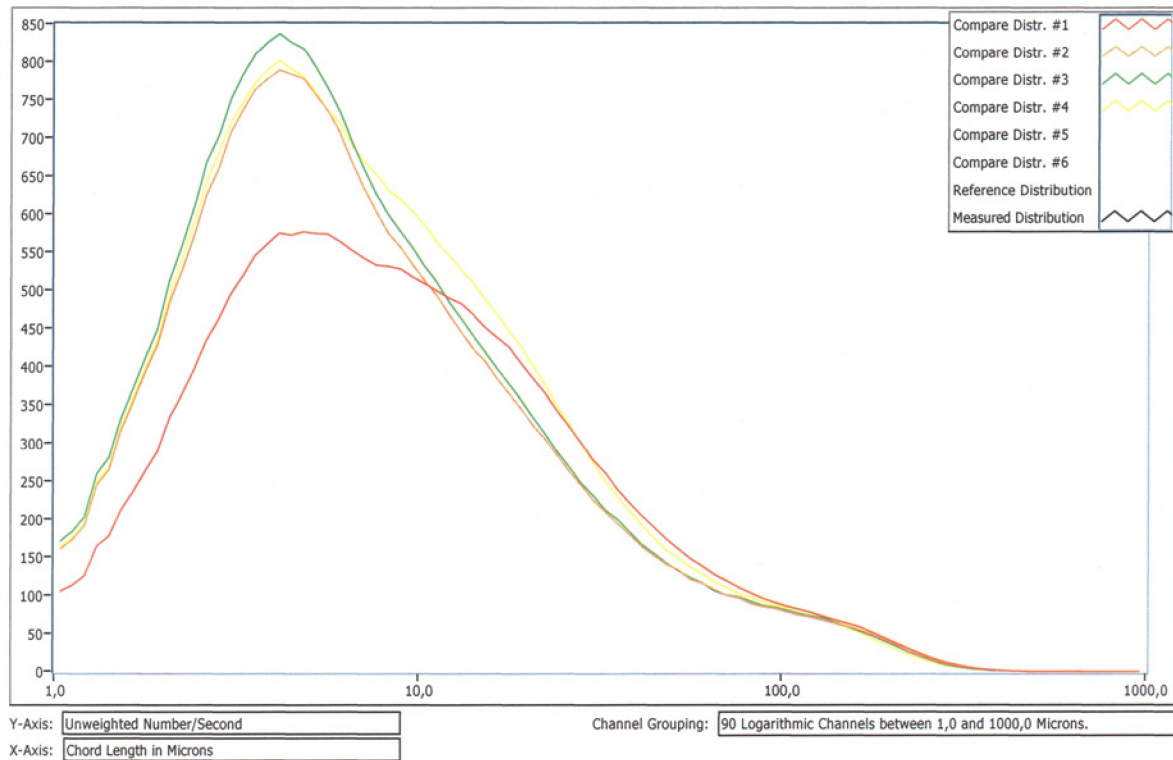
HPLC [%]	T _i [°C]	Výtěžek [g]
99,66	147,6	14,60



Obr. č. 30: 600x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 6,04 μm .

4.1.2 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 2

Acetonový roztok QO byl chlazen z teploty 56,6 °C rychlostí 0,61 °C/min. na teplotu 20 °C a na této teplotě byla potom krystalická suspenze 4 hodiny udržována.



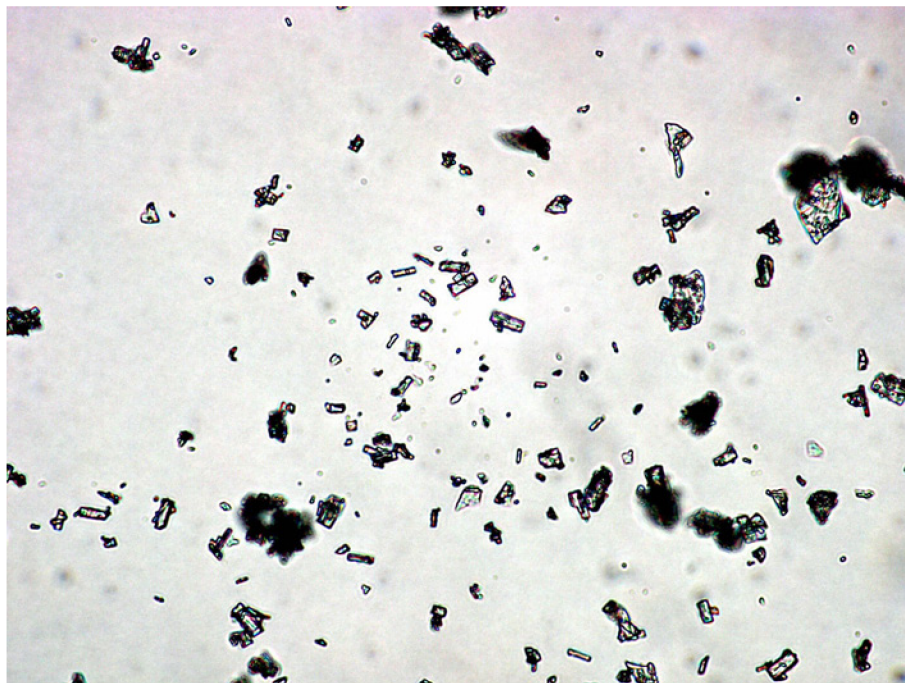
Obr. č. 31: FBRM. Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 4: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

	po 30 min.	po 120 min.	po 210 min.	po 300 min.
#/sec. (1-5 μm)	7516	10726	11361	10901
#/sec. (10-23 μm)	4915	4470	4626	5327
#/sec. (29-86 μm)	2472	2027	2055	2323
#/sec. (100-251 μm)	698	644	643	616
#/sec. (293-1000 μm)	23	19	16	12
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	19,07	15,55	15,11	15,42

Tabulka č. 5:

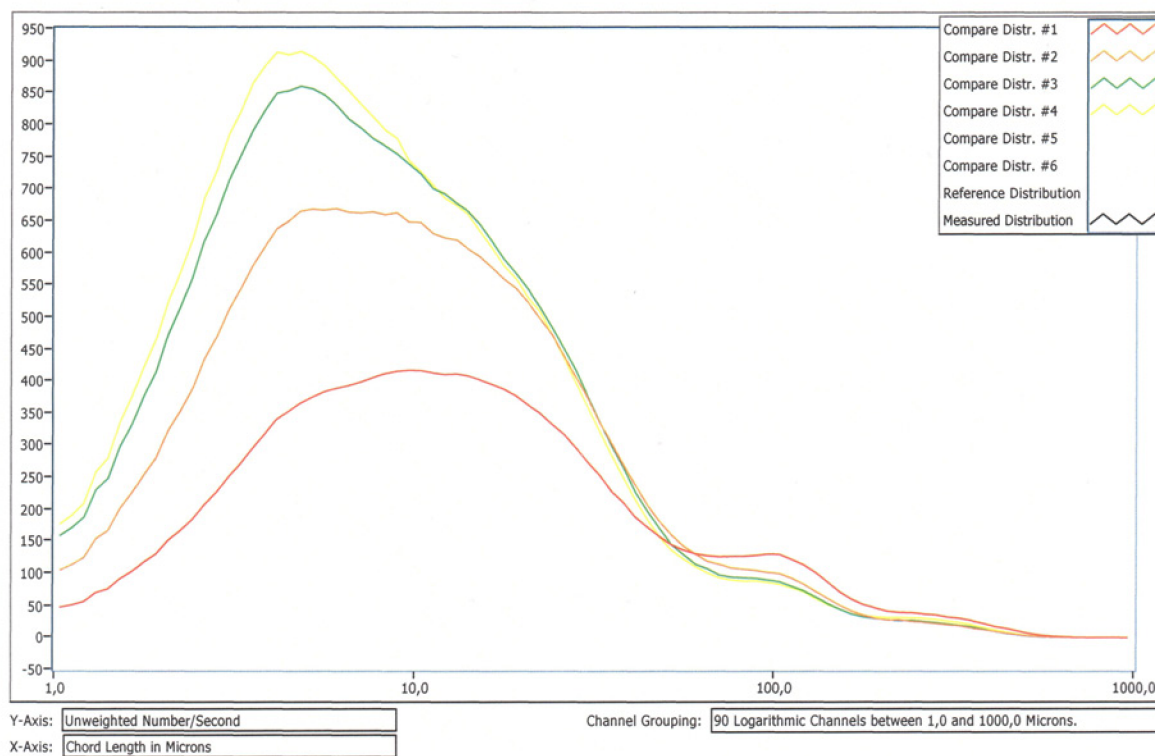
HPLC [%]	T _i [°C]	Výtěžek [g]
99,73	151,69	13,43



Obr. č. 32: 400x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 7,30 μm.

4.1.3 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 3

Acetonový roztok QO byl chlazen z teploty 56,6 °C rychlostí 2,44 °C/min. na teplotu 20 °C, a na této teplotě byla potom krystalická suspenze 1,5 hodiny udržována.



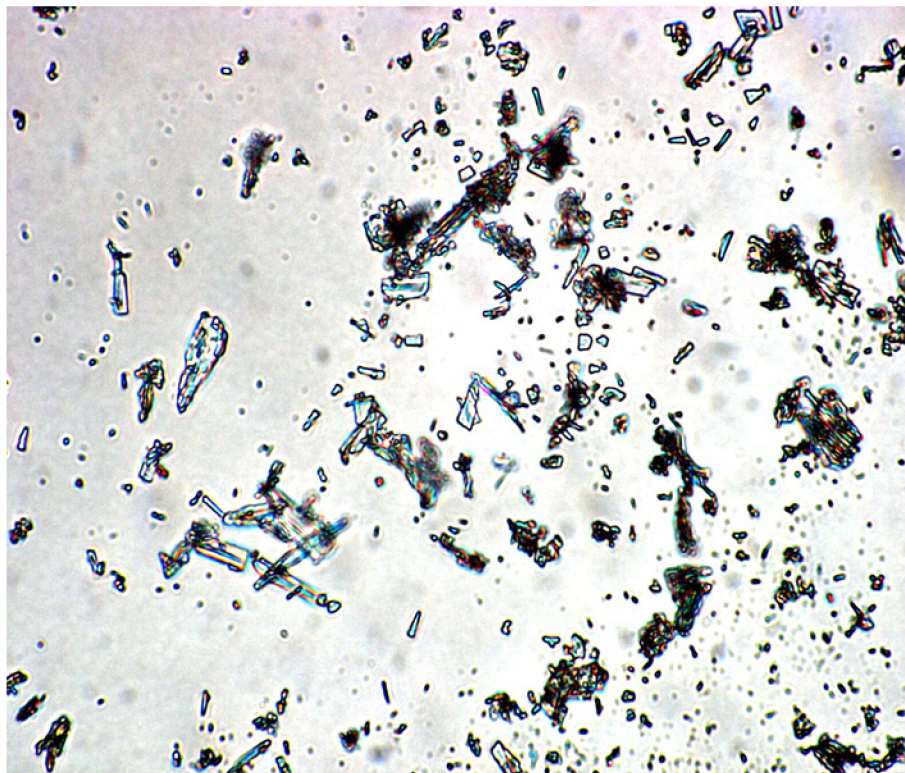
Obr. č. 33: FBRM. Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 6: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

	po 20 min.	po 40 min.	po 70 min.	po 105 min.
#/sec. (1-5 μm)	3856	7764	10867	11917
#/sec. (10-23 μm)	4326	6410	6932	6856
#/sec. (29-86 μm)	2394	2776	2638	2490
#/sec. (100-251 μm)	897	642	576	575
#/sec. (293-1000 μm)	162	89	576	575
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	29,23	19,23	16,48	16,04

Tabulka č. 7:

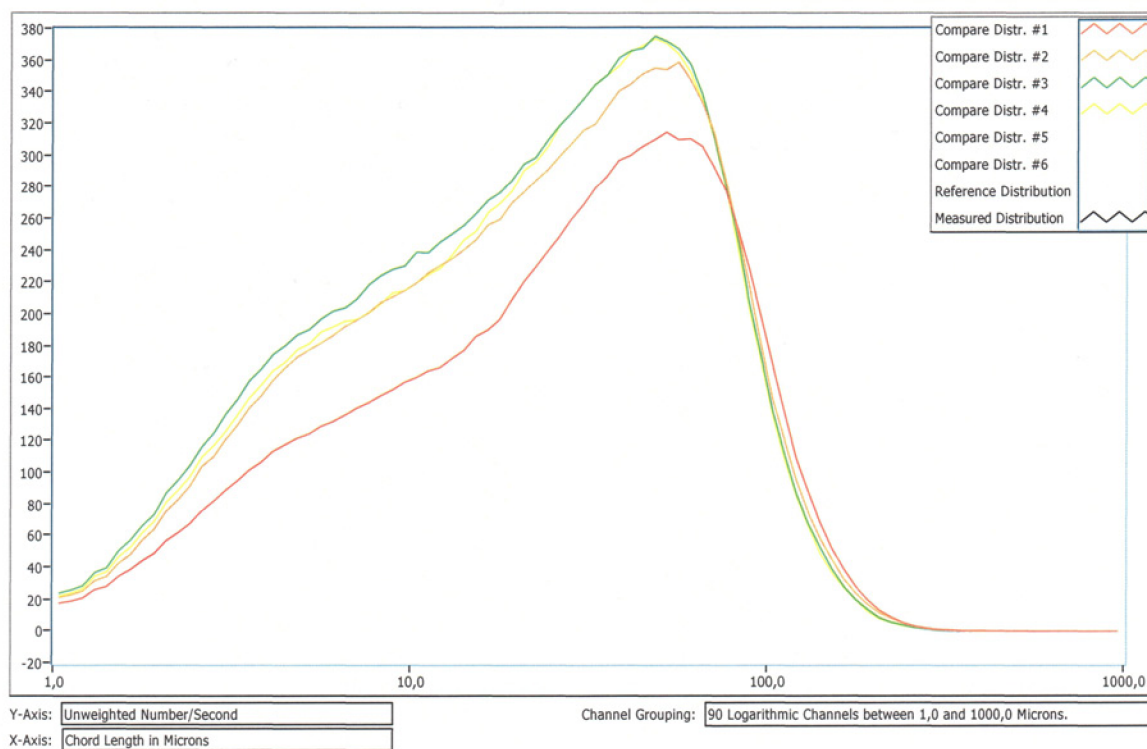
HPLC [%]	T _i [°C]	Výtěžek [g]
99,59	150,86	15,28



Obr. č. 34: 600x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 4,00 μm .

4.1.4 Výsledky krystalizační přípravy QO č. 4

Acetonový roztok QO byl chlazen z teploty 56,6 °C rychlostí 0,52 °C/min. na teplotu 10 °C, a na této teplotě byla potom krystalická suspenze 3 hodiny udržována.



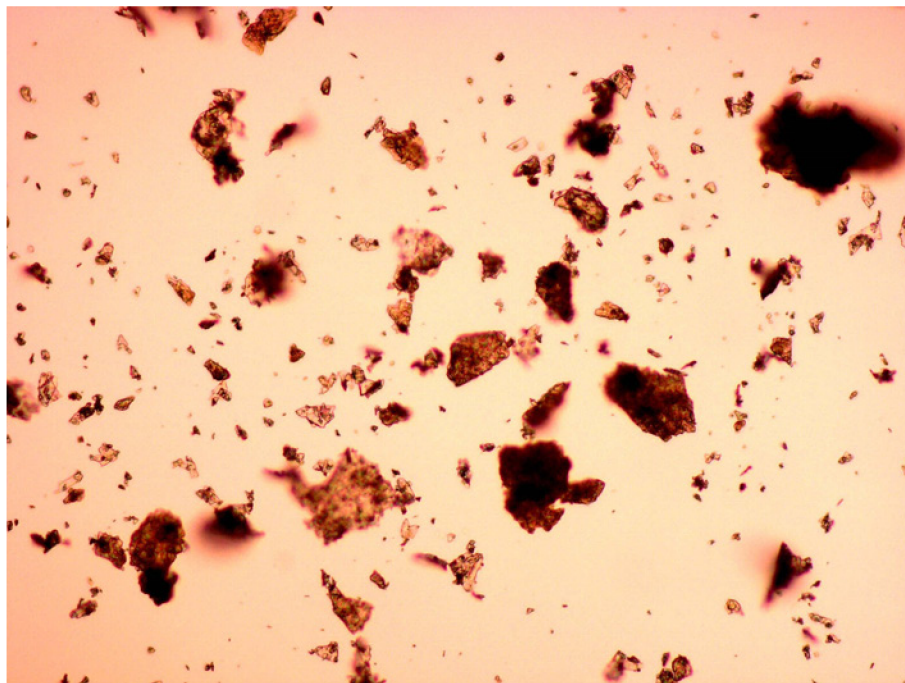
Obr. č. 35: FBRM. Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 8: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

	po 20 min.	po 40 min.	po 140 min.	po 270 min.
#/sec. (1-5 μm)	1362	1842	2077	1937
#/sec. (10-23 μm)	2069	2740	2917	2802
#/sec. (29-86 μm)	4106	4597	4775	4743
#/sec. (100-251 μm)	733	635	575	552
#/sec. (293-1000 μm)	4	2	1	1
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	39,17	34,61	32,99	33,40

Tabulka č. 9:

HPLC [%]	T _i [°C]	Výtěžek [g]
99,59	150,47	15,82



Obr. č. 36: 600x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 19,86 μm .

4.2 Vyhodnocení krystalizačních příprav Quetiapinu Oxalátu (QO)

Chemická čistota Quetiapinu Oxalátu nebyla u těchto čtyř krystalizací ovlivněna, výtěžkové rozdíly byly zanedbatelné. Největší velikosti částic 19,86 μm (*obr. č. 36*) bylo dosaženo při nejpomalejší rychlosti chlazení (0,52 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), tak jak se dalo předpokládat. Získaný tvar krystalů (jehličkový – *obr. č. 30*; destičkový – *obr. č. 32, 34, 36*) není nejvhodnější pro následné operace (filtrace, sušení). Možnost použití jiných rozpouštědel by byla zajímavá, ale z praktického hlediska neekonomická. Taková změna by vyžadovala novou registraci a uvedení tohoto faktu do Drug Master File (DMF) dokumentace, což by bylo efektivní jen při nastalých problémech ve výrobě. K lepšímu vyhodnocení vlivu teplotního režimu na průběh krystalizace a výslednou kvalitu QO by bylo zapotřebí provést více krystalizačních pokusů.

4.3 Krystalizační přípravy Quetiapinu Fumarátu (QF)

Krystalizace farmaceutické substance QF byly zaměřeny na specifický požadavek finálního výrobce lékové formy QF. Zákazník požadoval distribuční velikost částic $D(10)$ ne menší než 5 μm , $D(50)$ v rozmezí 20 – 40 μm a $D(90)$ menší než 150 μm . V provozním měřítku QF krystalizuje nejdříve z acetonu a po filtraci se bez izolačního kroku přidá horký (60 $^{\circ}\text{C}$) metanol. OF se v metanolu nerozpouští zcela a krystalizace tak proběhne jen částečně. Po 60 minutovém míchání v metanolu za udržování teploty se suspenze vychladí během 3 hod. na teplotu 10 – 0 $^{\circ}\text{C}$. Technologie nám tímto postupem poskytuje DVČ, $D(10) \approx 3 \mu\text{m}$, $D(50) \approx 15 \mu\text{m}$ a $D(90) \approx 27 \mu\text{m}$. Cílem krystalizačních příprav tedy bylo získání hrubších krystalů. Chemická čistota byla kontrolována metodou HPLC, požadovaná krystalická forma (Forma I) byla sledována diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC). Distribuční velikost částic (DVČ) byla vyhodnocována metodou laserové difrakce, jako doplňková metoda byla použita optická mikroskopie. Průběh krystalizačního procesu byl vyhodnocován pomocí metody FBRM.

K vyřešení problému byla nejdříve provedena série laboratorních pokusů bez kontroly krystalizací metodou FBRM (*tab. č. 10*). Následně byl QF krystalizován v sedmi přípravách.

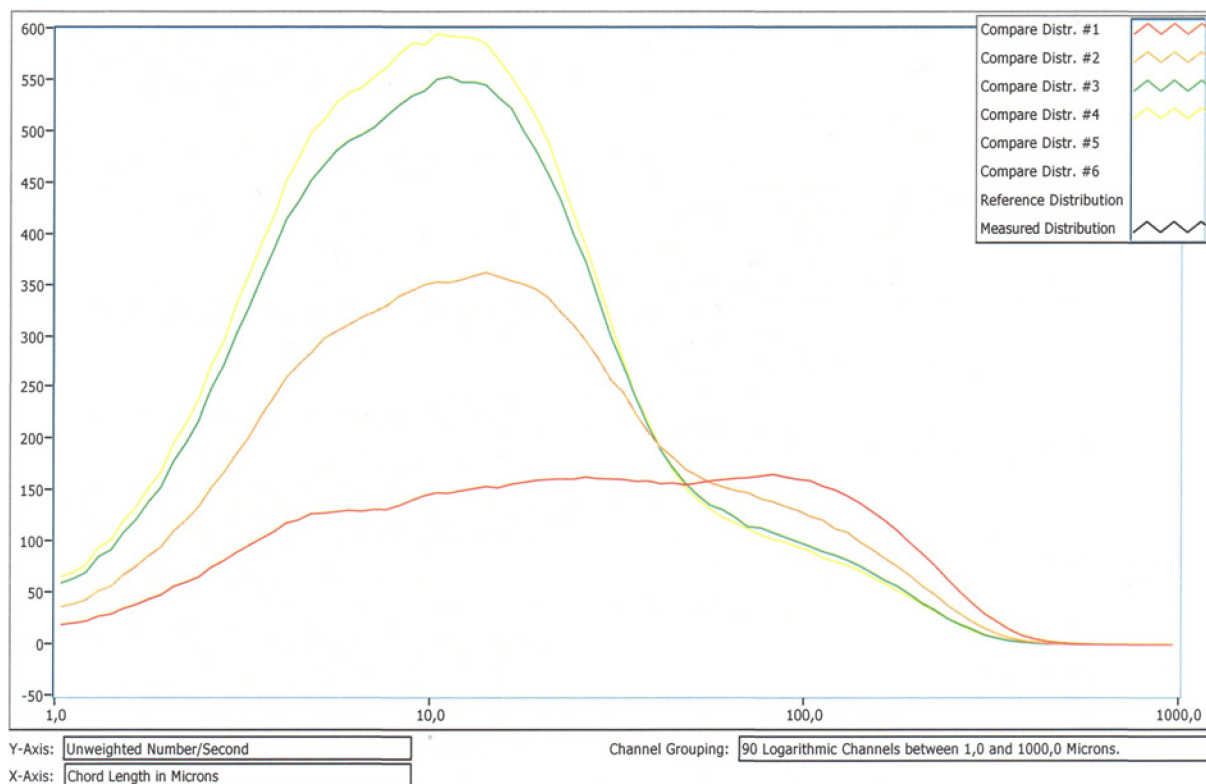
Ke každé přípravě QF jsou přiloženy výstupy měření a fotka krystalů z optického mikroskopu. Celkové zhodnocení krystalizací QF je níže v kapitole 4.4., a přehledný souhrn výsledků v tabulce č. 25.

Tabulka č. 10: Ovlivnění DVČ Quetiapinu Fumarátu úpravou reakčních podmínek. DVČ [μm]

č.	popis pokusu	D(10)	D(50)	D(90)	průměr
1	standardní postup	3,3	36,8	95,9	44,1
2	po vymíchání v MeOH samovolné chlazení	4,3	37,2	91,2	43,3
3	po vymíchání v MeOH samovolné chlazení a dále hlubší chlazení na - 5 °C	4,3	34,2	81,4	39,5
4	po vymíchání v MeOH rychlé chlazení	5,4	40,0	96,9	46,7
5	při vymíchání v MeOH ponechán aceton 1:1 (vůči QF)	5,8	39,7	94,4	46,0
6	při vymíchání v MeOH ponechán aceton 2:1 (vůči QF)	5,4	37,8	88,5	43,3
7	standardní postup – Kyselina fumarová se lila do odparku Quetiapinu (Q), ponecháno refluxovat	2,6	19,3	66,2	27,8
8	pomalé dávkování Kyseliny fumarové k Q	2,7	15,5	61,6	24,8

4.3.1 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 1

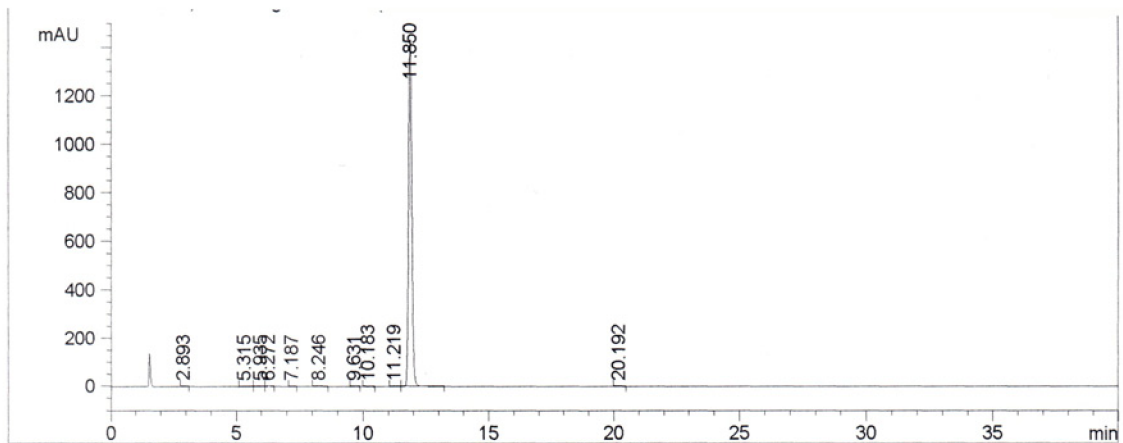
Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Oxalát, který byl převeden na bázi Quetiapinu. Tato báze byla rozpuštěna v acetonu, roztok byl přiveden k varu (56,6 °C) a okamžitě byla připuštěna suspenze kyseliny fumarové v acetonu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 0 °C byla 1,89 °C/min. Na této teplotě byla krystalická suspenze udržována 1,5 hod.



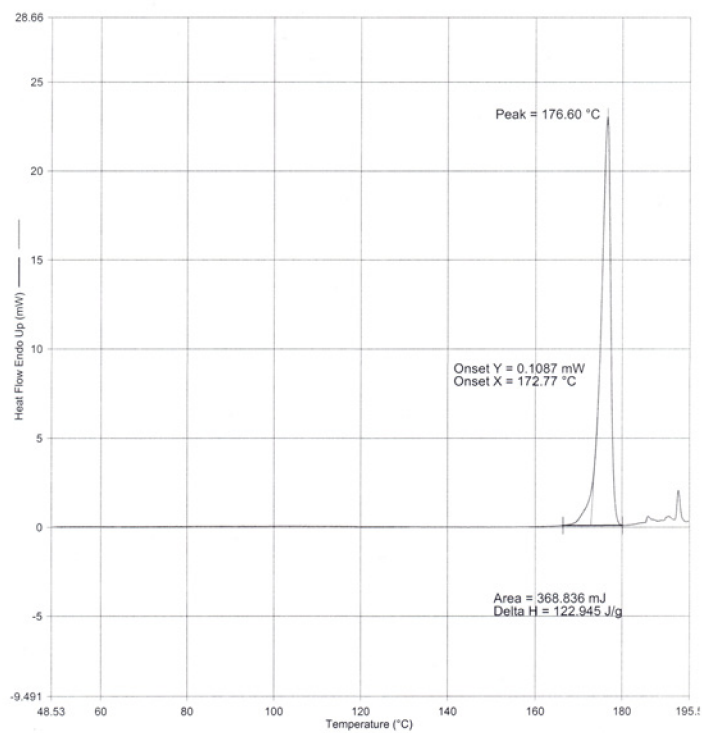
Obr. č. 37: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 11: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

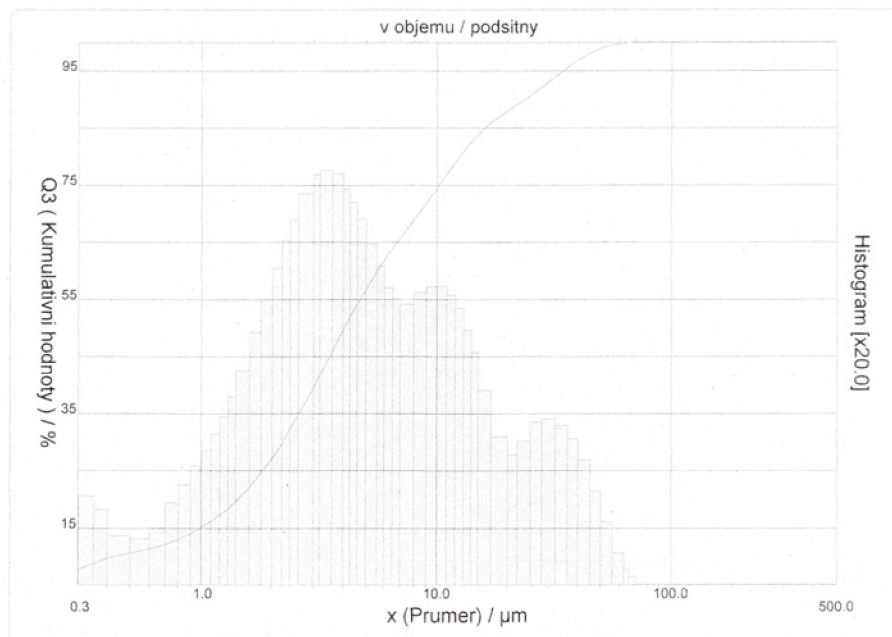
	po 20 min.	po 40 min.	po 90 min.	po 120 min.
#/sec. (1-5 μm)	1379	2888	4667	5102
#/sec. (10-23 μm)	1693	3845	5669	6060
#/sec. (29-86 μm)	2233	2525	2419	2390
#/sec. (100-251 μm)	1428	1024	763	713
#/sec. (293-1000 μm)	86	40	23	21
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	25,13	24,18	21,05	20,75



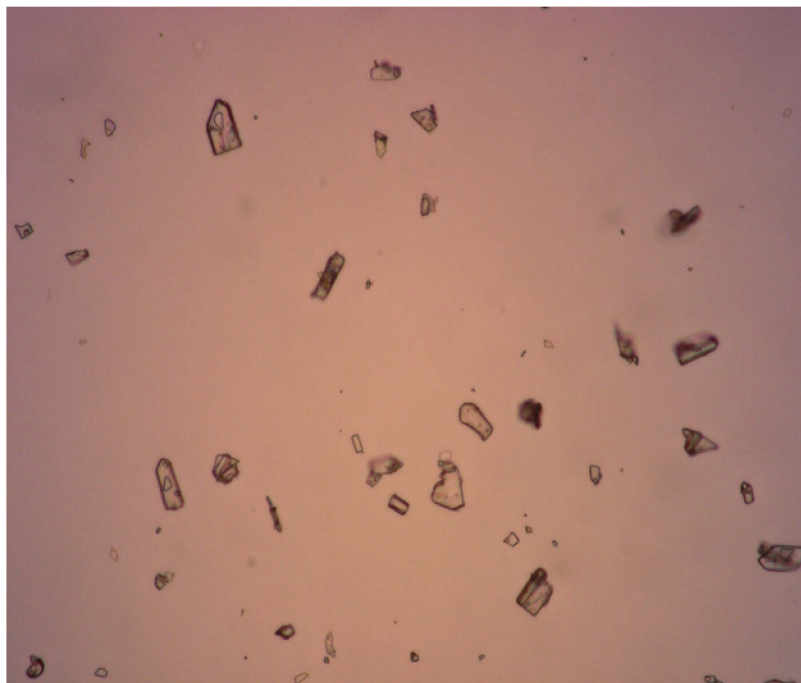
Obr. č. 38: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



Obr. č. 39: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 40: DVČ – Laser difrakce, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



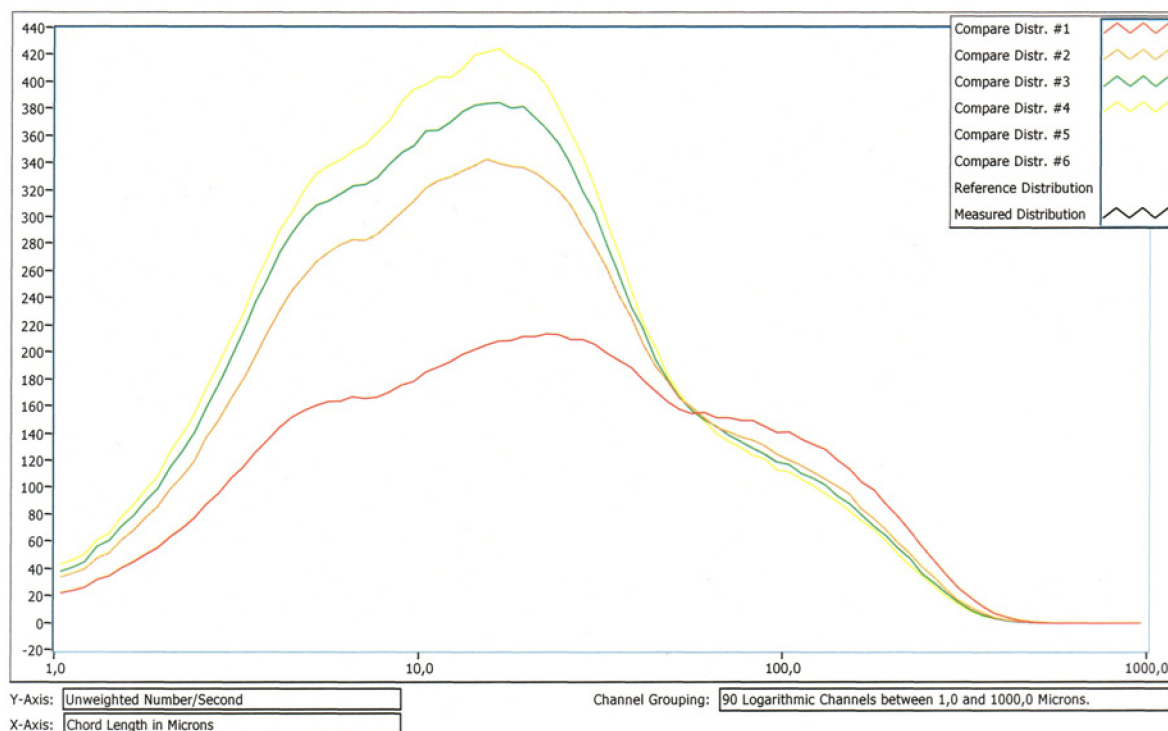
Obr. č. 41: 400x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 9,9 μm .

Tabulka č. 12:

HPLC [%]	T _i [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVČ [μm]	
				D (10)	D (50)
99,62	176,60	122,95	30,00	D (90)	2,67
				D (50)	12,93
				D (10)	38,46
				průměr	8,44

4.3.2 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 2

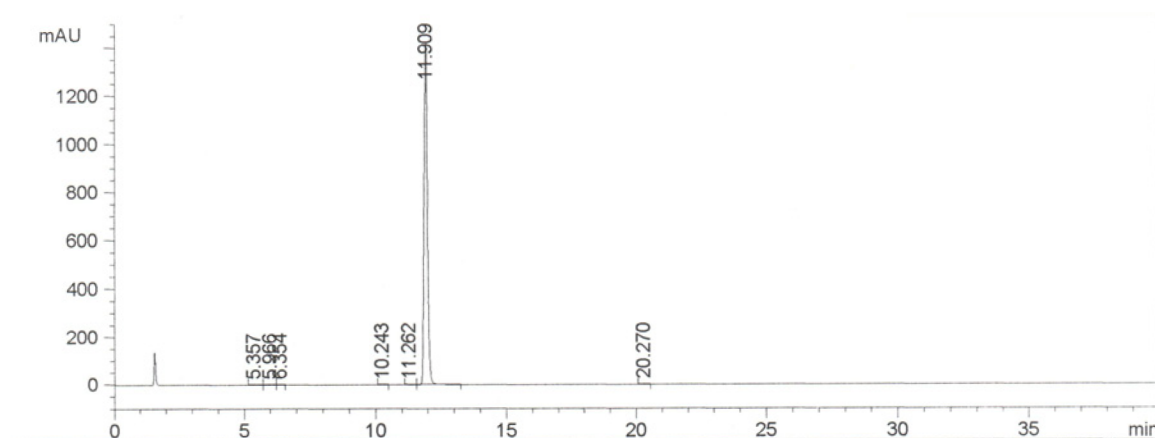
Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Oxalát, který byl převeden na bázi Quetiapinu. Tato báze byla rozpuštěna v acetonu, roztok byl přiveden k varu (56,6 °C) a byla připuštěna suspenze kyseliny fumarové v acetonu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 20 °C byla 1,83 °C/min. Na této teplotě byla krystalická suspenze udržována 1,5 hod.



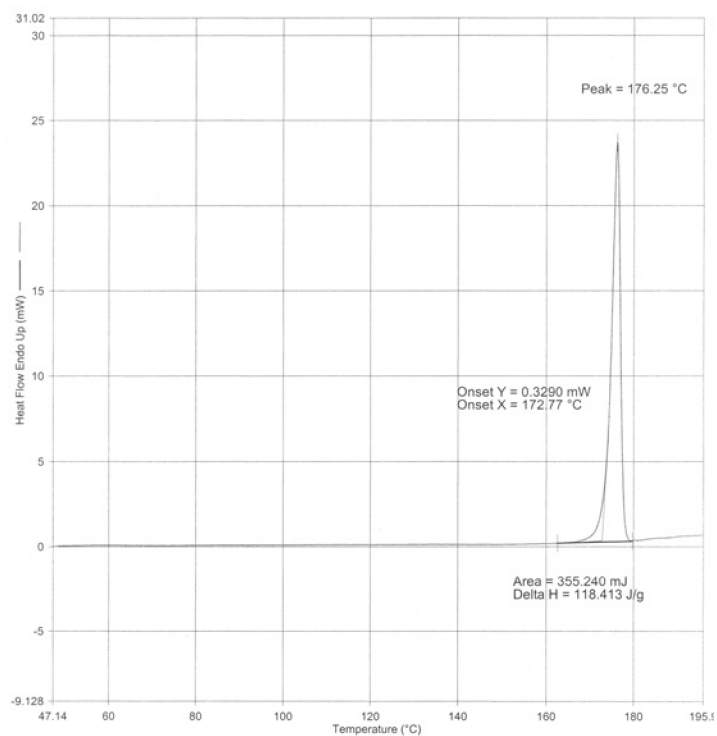
Obr. č. 42: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 13: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

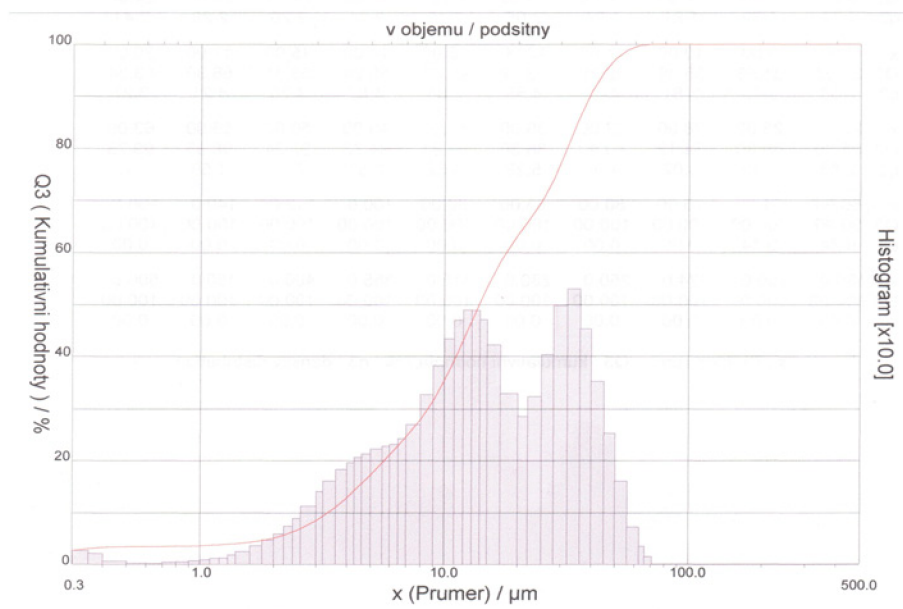
	po 20 min.	po 60 min.	po 80 min.	po 130 min.
#/sec. (1-5 μm)	1033	2158	2812	3322
#/sec. (10-23 μm)	1073	3077	3869	4507
#/sec. (29-86 μm)	1786	2529	2653	2748
#/sec. (100-251 μm)	1442	1124	1005	918
#/sec. (293-1000 μm)	130	54	41	33
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	45,12	32,45	29,56	27,80



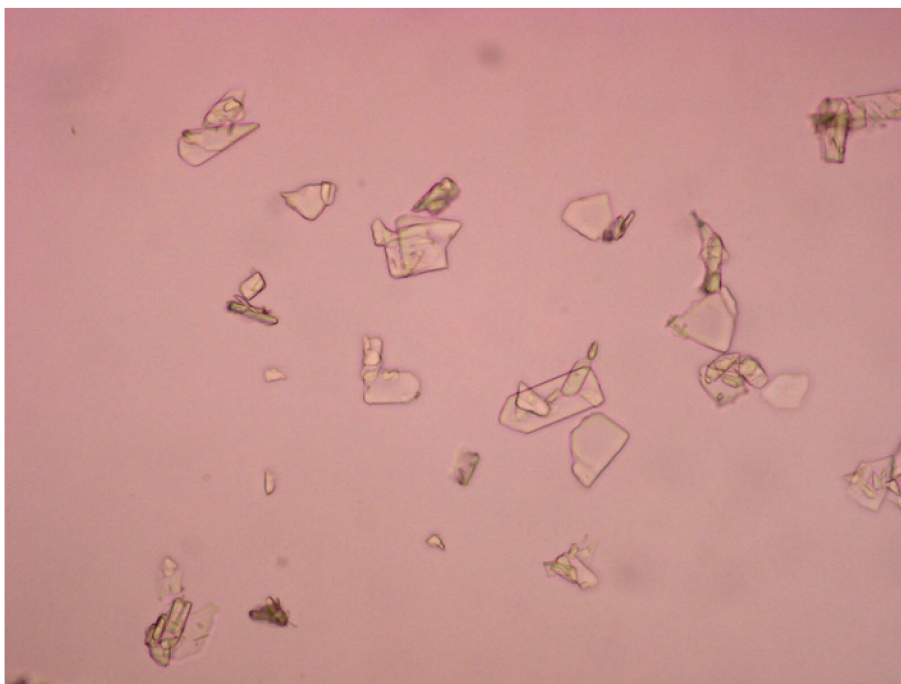
Obr. č. 43: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



Obr. č. 44: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 45: DVČ – Laser difrakce, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



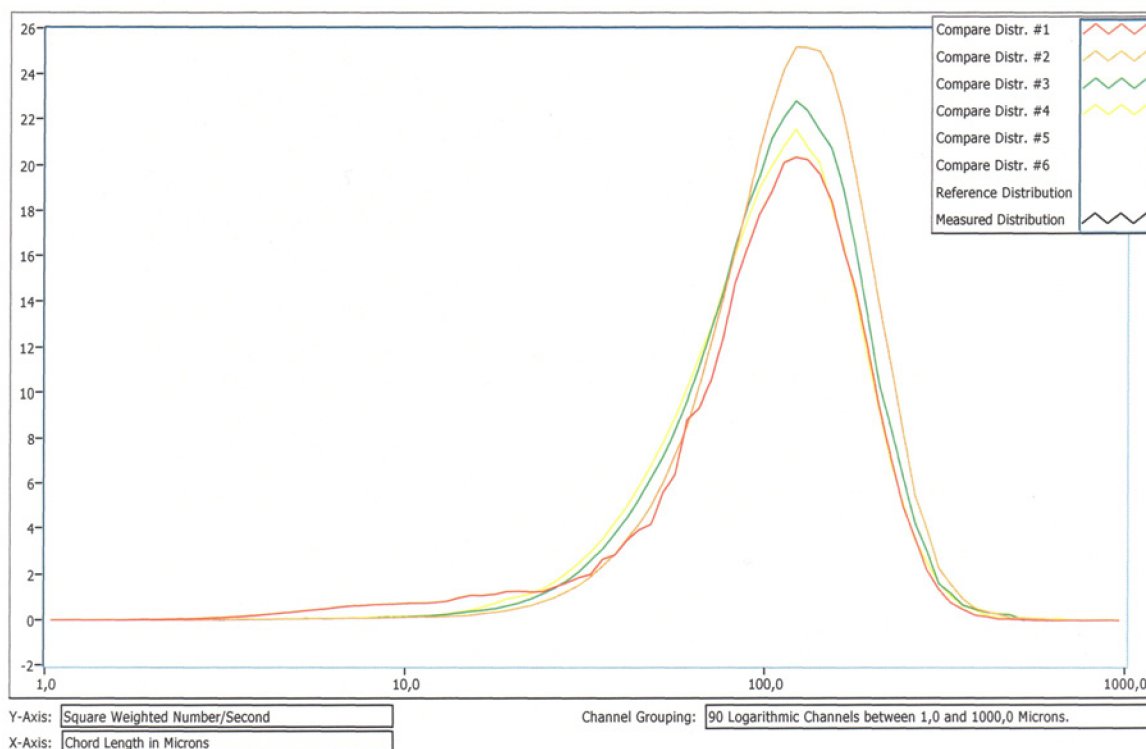
Obr. č. 46: 200x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 15,41 μm.

Tabulka č. 14:

HPLC [%]	T _i [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVČ [μm]	
99,72	176,25	118,41	28,30	D (10)	3,34
				D (50)	13,93
				D (90)	39,25
				průměr	18,39

4.3.3 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 3

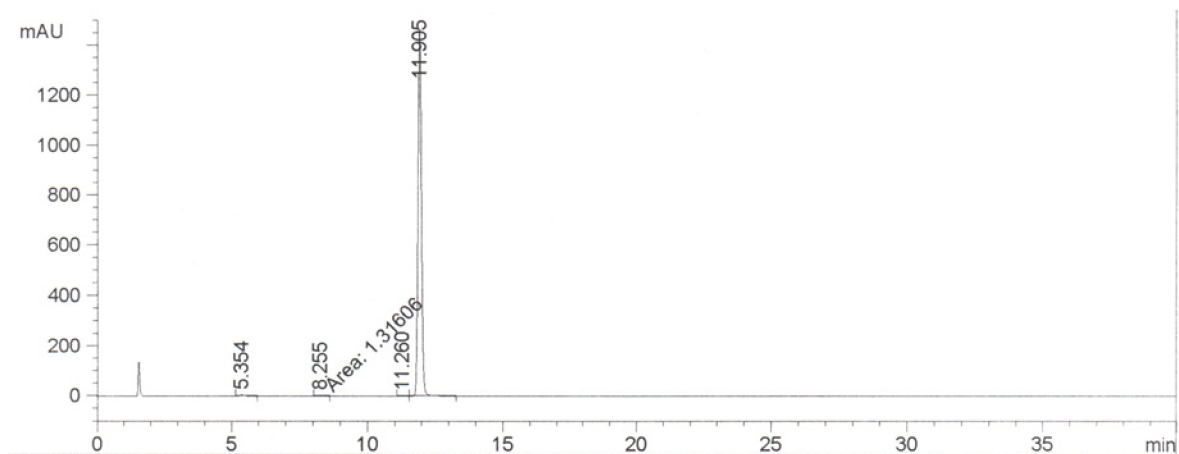
Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Oxalát, který byl převeden na bázi Quetiapinu. Tato báze byla rozpuštěna v acetonu, roztok byl přiveden k varu a byla připuštěna suspenze kyseliny fumarové v acetonu. Quetiapin fumarát se po vychlazení na 30 °C izoloval filtrací, a potom byl rozpuštěn za varu (65 °C) v metanolu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 5 °C byla 0,49 °C/min. Na této teplotě byla krystalická suspenze udržována 2 hod.



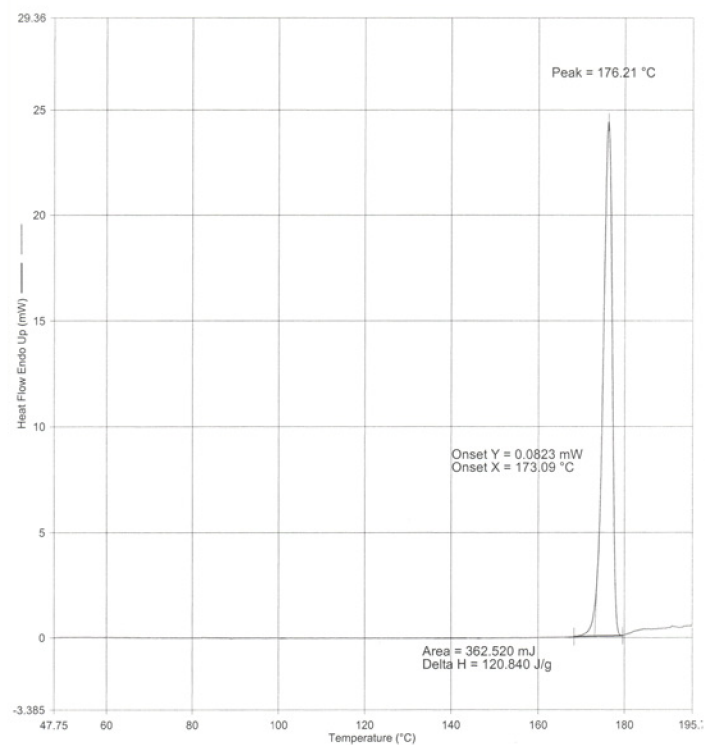
Obr. č. 47: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 15: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, Sqr Wt („vážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na hrubé částice .

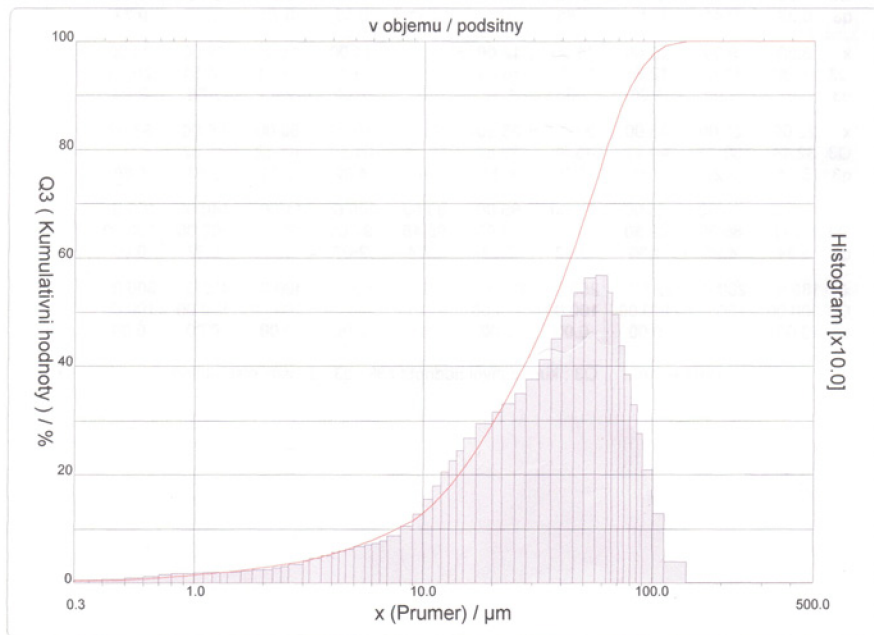
	po 70 min.	po 90 min.	po 110 min.	po 120 min.
#/sec. (1-5 μm)	12547	1685	1521	1383
#/sec. (10-23 μm)	3522	841	1233	1481
#/sec. (29-86 μm)	2081	2167	2572	2781
#/sec. (100-251 μm)	688	872	769	707
#/sec. (293-1000 μm)	2	4	3	3
Mean, Sqr Wt [μ](1-1000 μm)	115,69	128,56	120,35	115,34



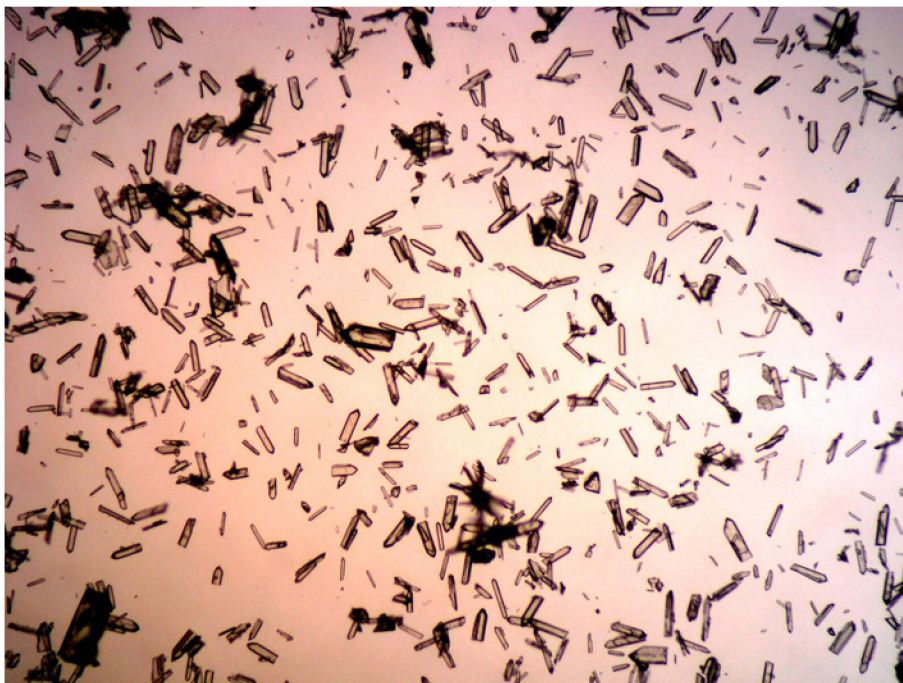
Obr. č. 48: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



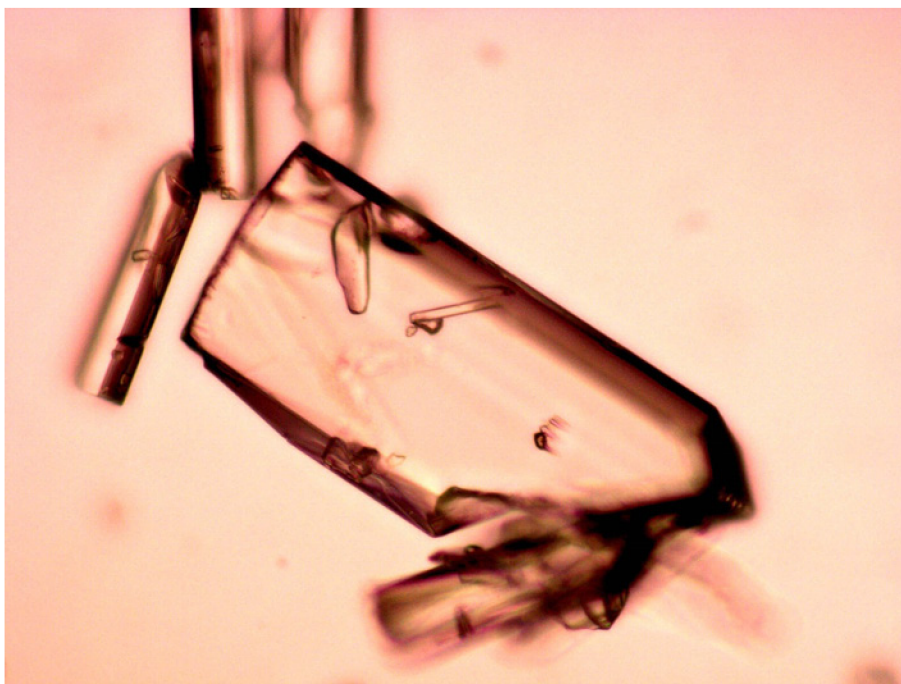
Obr. č. 49: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 50: DVČ – Laser difrakce, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



Obr. č. 51: QF, 40x zvětšeno; průměrná velikost krystalů 109,65 μm.



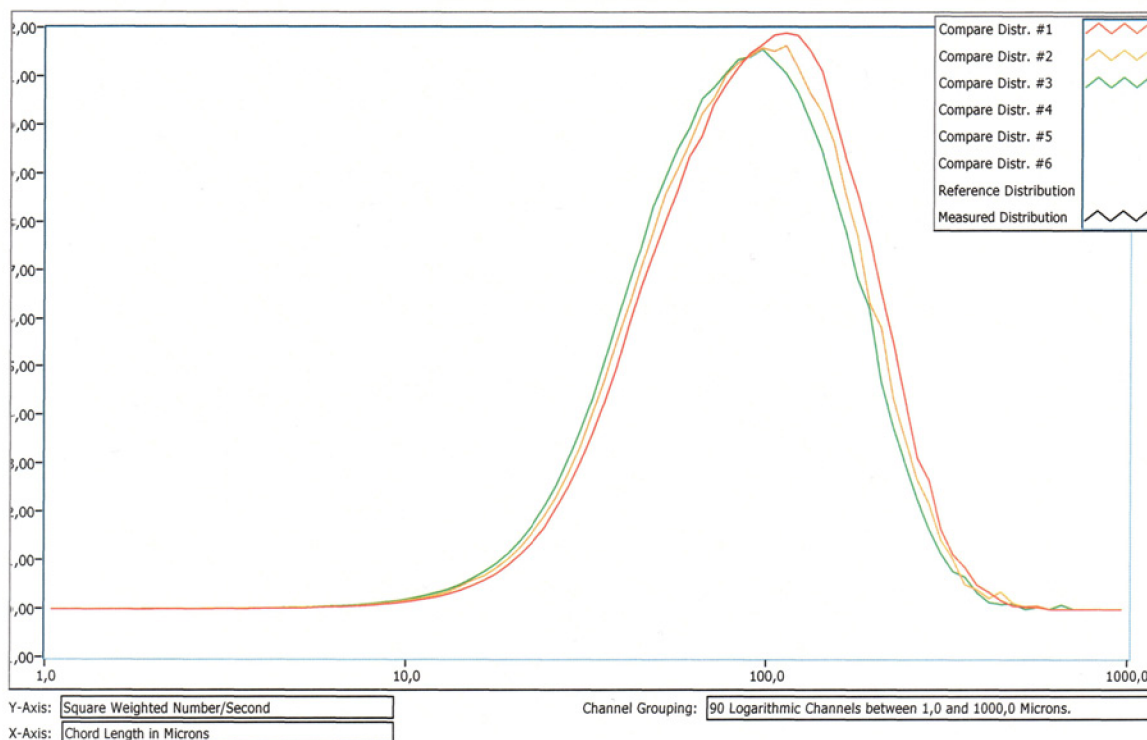
Obr. č. 52: QF, 400x zvětšeno.

Tabulka č. 16:

HPLC [%]	T _t [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVČ [μm]	
99,54	176,21	120,84	25,00	D (10)	7,68
				D (50)	35,30
				D (90)	76,36
				průměr	39,34

4.3.4 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 4

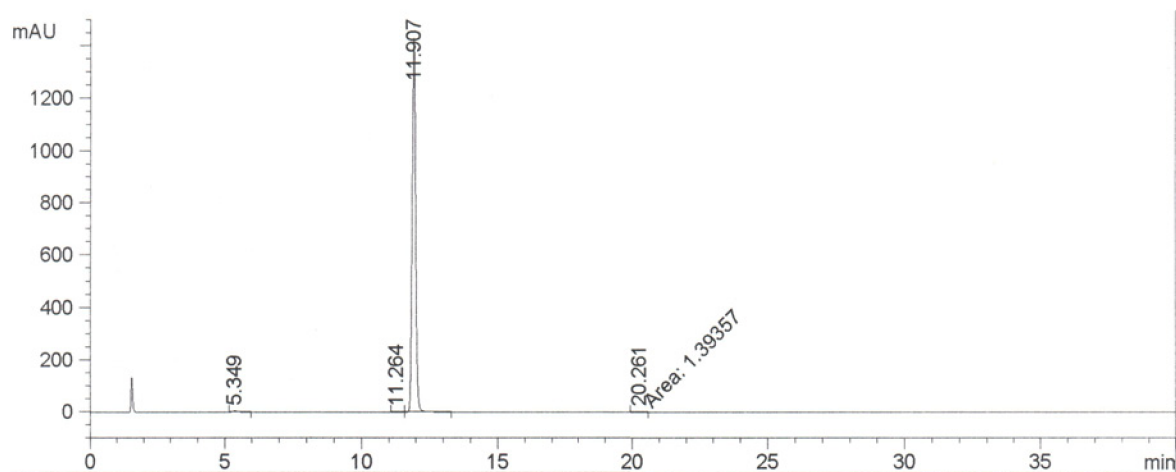
Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Oxalát, který byl převeden na bázi Quetiapinu. Tato báze byla rozpuštěna v acetonu, roztok byl přiveden k varu a byla připuštěna suspenze kyseliny fumarové v acetonu. Quetiapin fumarát se po vychlazení na 30 °C izoloval filtrací, a rozpustil za varu (65 °C) v metanolu. Otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 5 °C byla 0,25 °C/min. Po vychlazení byla suspenze ihned přefiltrována.



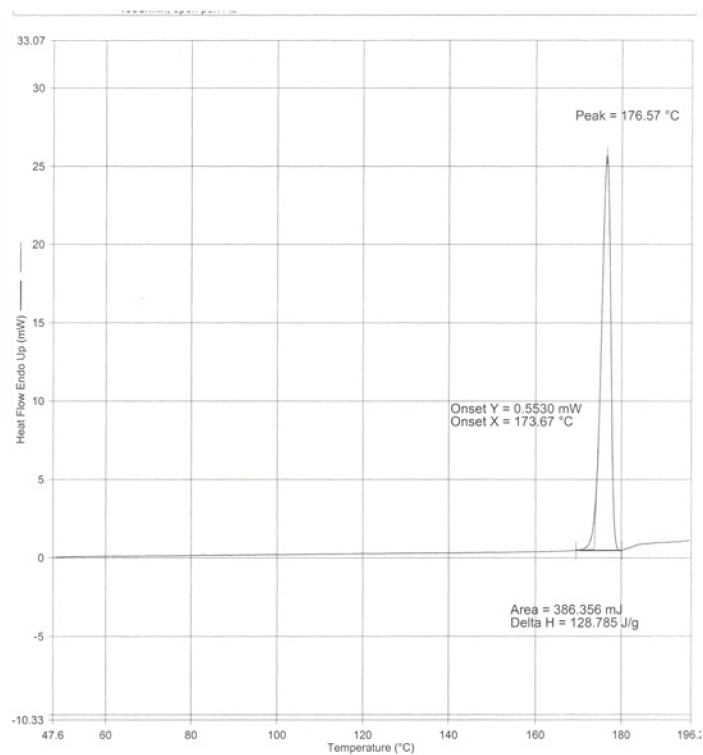
Obr. č. 53: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 17: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, Sqr Wt [μ](1-1000 μm) („vážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na hrubé částice.

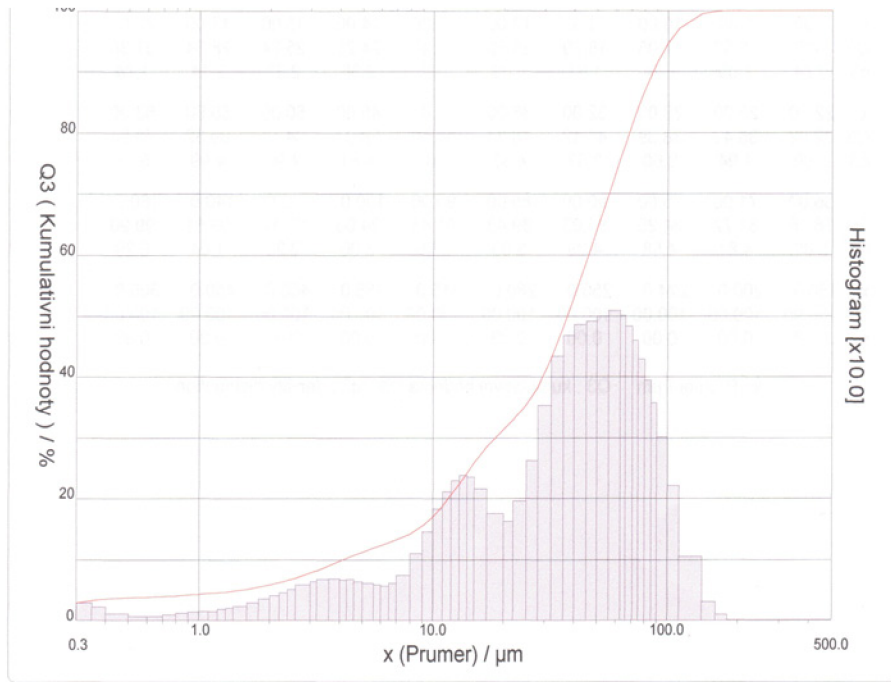
	po 180 min.	po 200 min.	po 240 min.
#/sec. (1-5 μm)	694	795	887
#/sec. (10-23 μm)	1661	1928	2151
#/sec. (29-86 μm)	2844	3042	3215
#/sec. (100-251 μm)	410	384	361
#/sec. (293-1000 μm)	3	3	2
Mean, Sqr Wt [μ](1-1000 μm)	109,11	103,69	98,94



Obr. č. 54: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



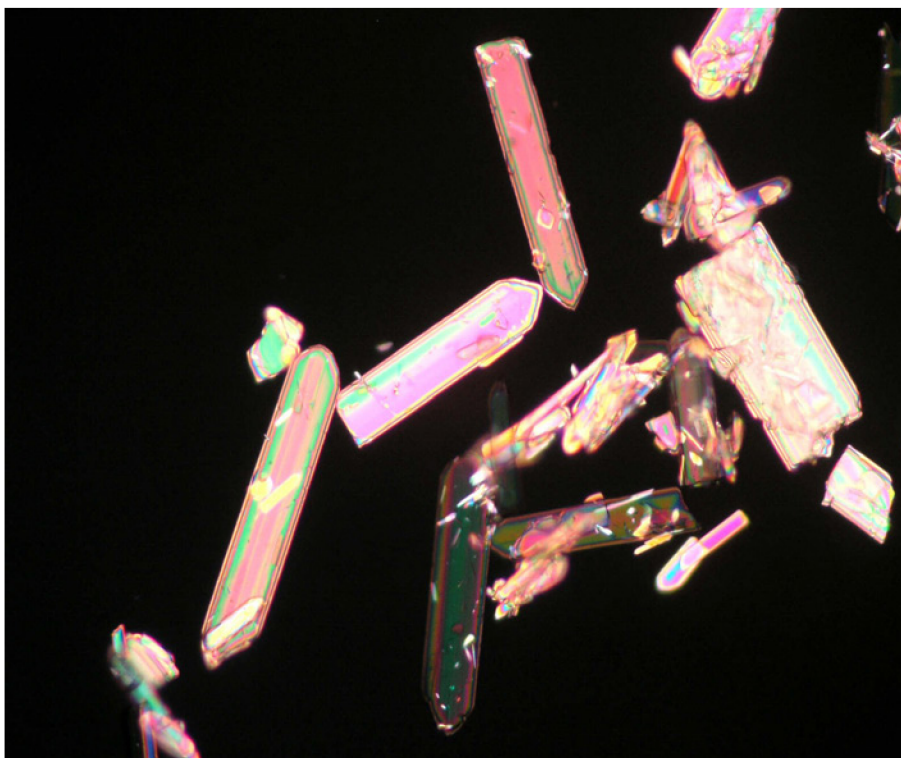
Obr. č. 55: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 56: DVČ, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



Obr. č. 57: 40 x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 95,44 μm.



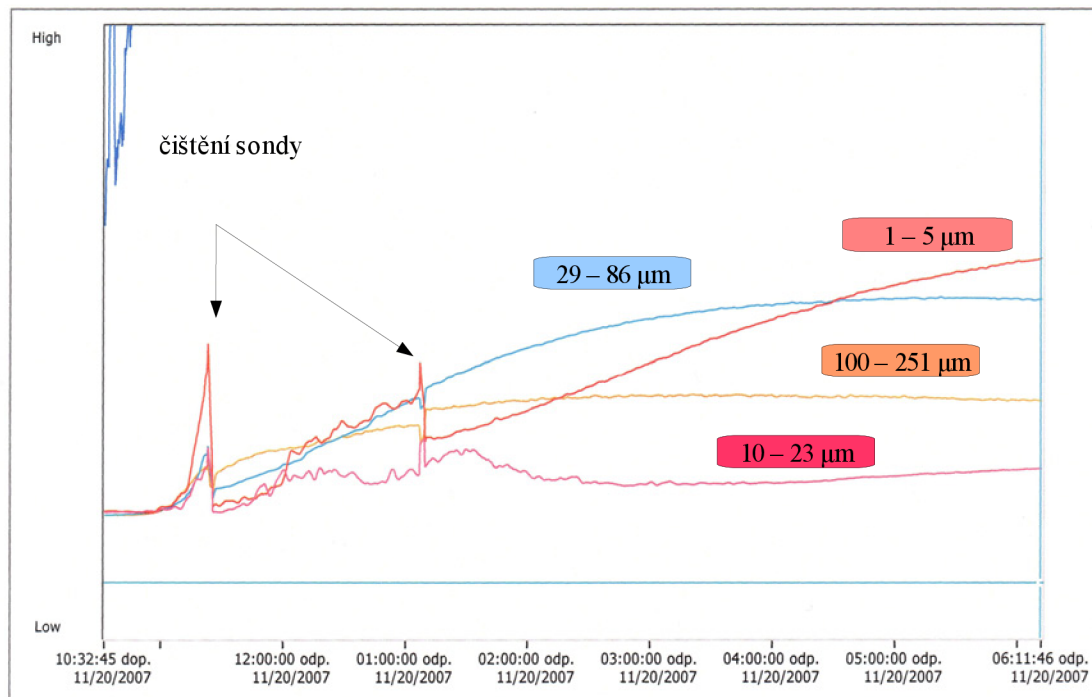
Obr. č. 58: 400 x zvětšeno, polarizace.

Tabulka č. 18:

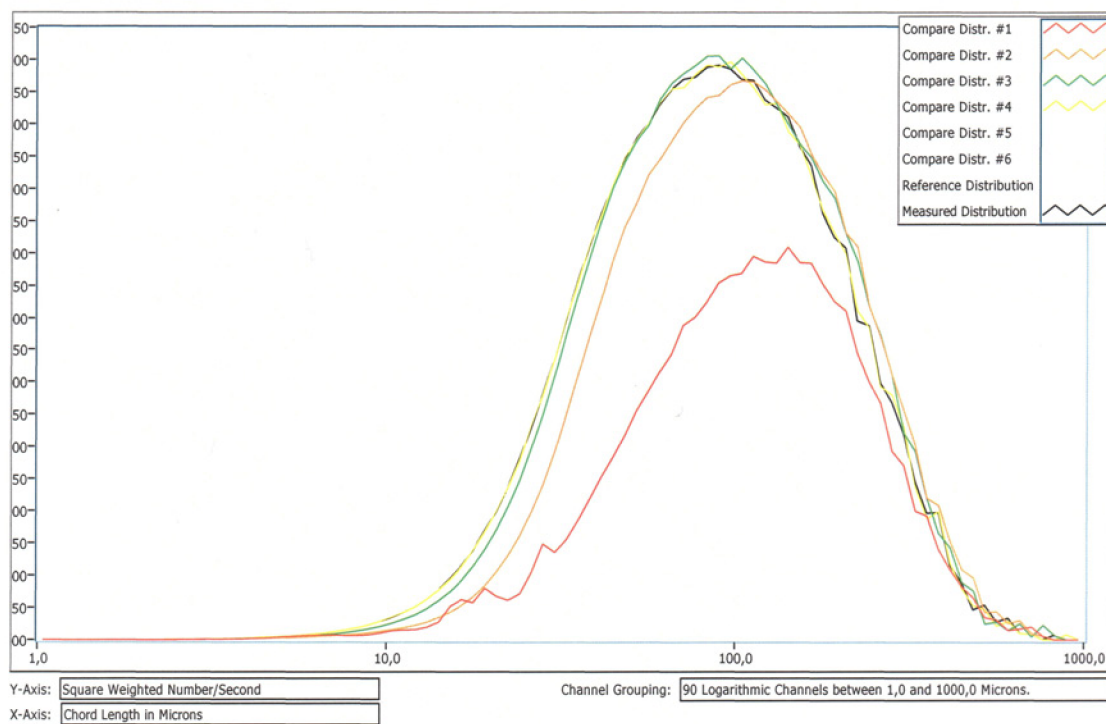
HPLC [%]	T _t [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVČ [μm]	
				D (10)	D (50)
99,47	176,57	128,79	24,20	D (90)	4,13
				D (50)	37,37
				D (90)	86,36
				průměr	42,06

4.3.5 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 5

Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Fumarát, byla provedena tzv. rekrystalizace (opakovaná krystalizace) z etanolu. QF byl za varu (78 °C) rozpuštěn v etanolu, otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 1 °C byla 0,18 °C/min. Na této teplotě byla krystalická suspenze udržována 2 hod.



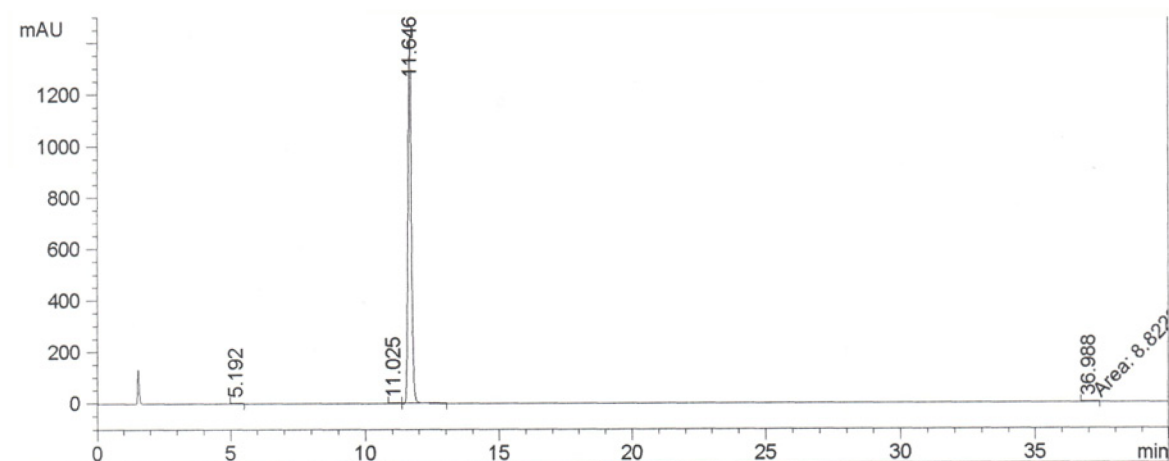
Obr. č. 59: Průběh krystalizace v čase. Nárůst a pokles množství částic určitého velikostního rozmezí [μm].



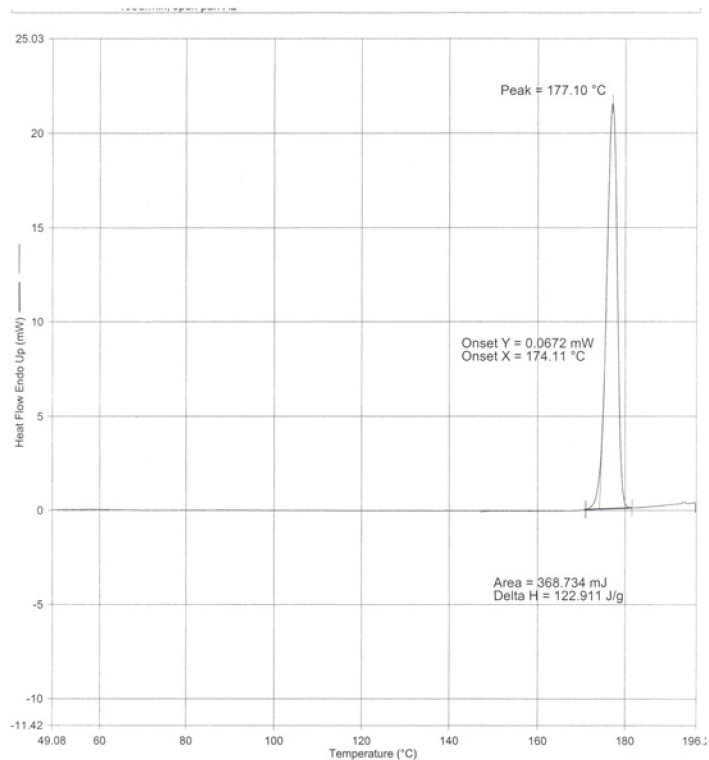
Obr. č. 60: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 19: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, Sqr Wt [μ] („vážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na hrubé částice.

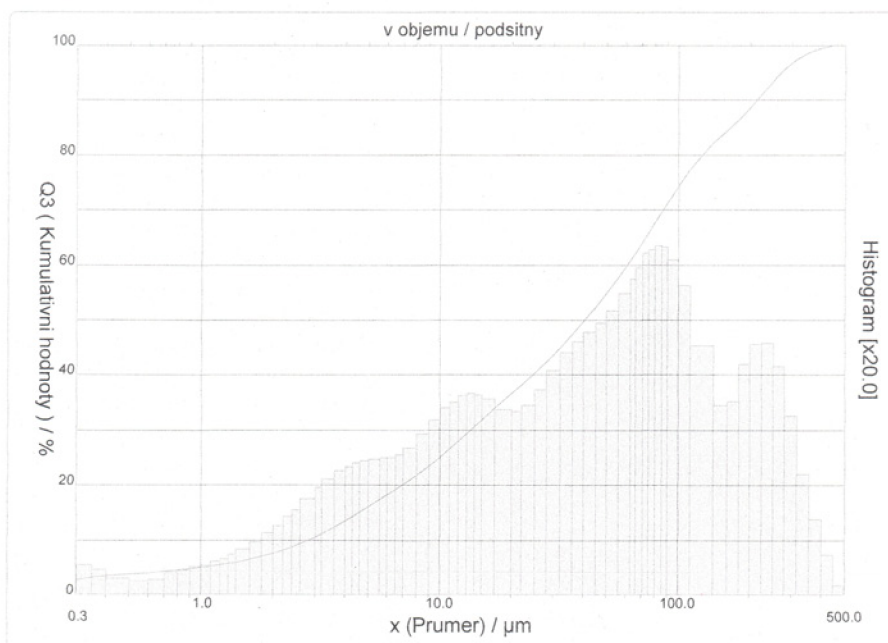
	po 120 min.	po 200 min.	po 450 min.	po 570 min.
#/sec. (1-5 μm)	882	969	916	1254
#/sec. (10-23 μm)	1270	1527	2585	3199
#/sec. (29-86 μm)	1260	2500	3034	3089
#/sec. (100-251 μm)	225	315	317	306
#/sec. (293-1000 μm)	6,5	8,77	7,96	7,44
Mean, Sqr Wt [μ](1-1000 μm)	138	128	118	114



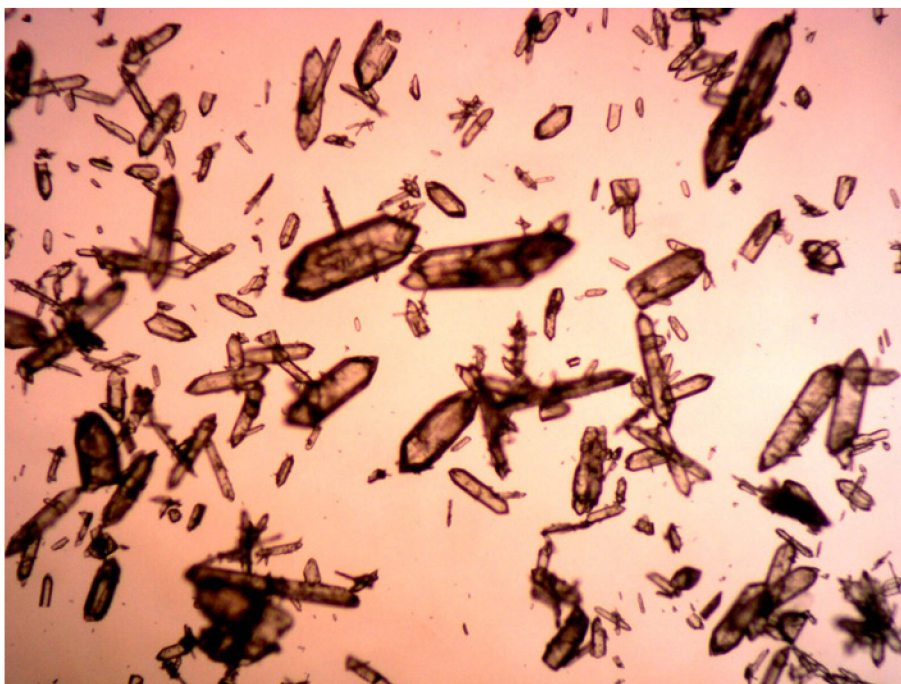
Obr. č. 61: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



Obr. č. 62: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 63: DVČ – Laser difrakce, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



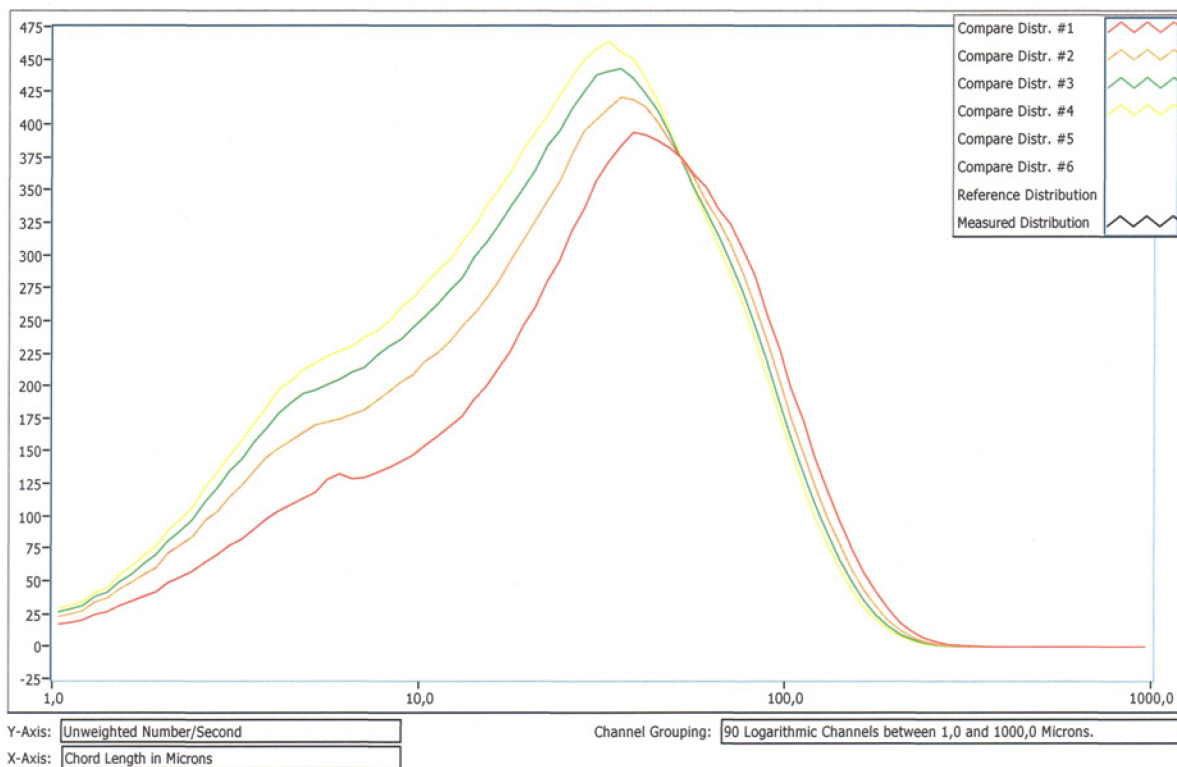
Obr. č. 64: 400 x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 148,12 μm.

Tabulka č. 20:

HPLC [%]	T _i [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVC [μm]	
99,87	177,10	122,91	14,20	D (10)	2,78
				D (50)	40,49
				D (90)	213,95
				průměr	74,66

4.3.6 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 6

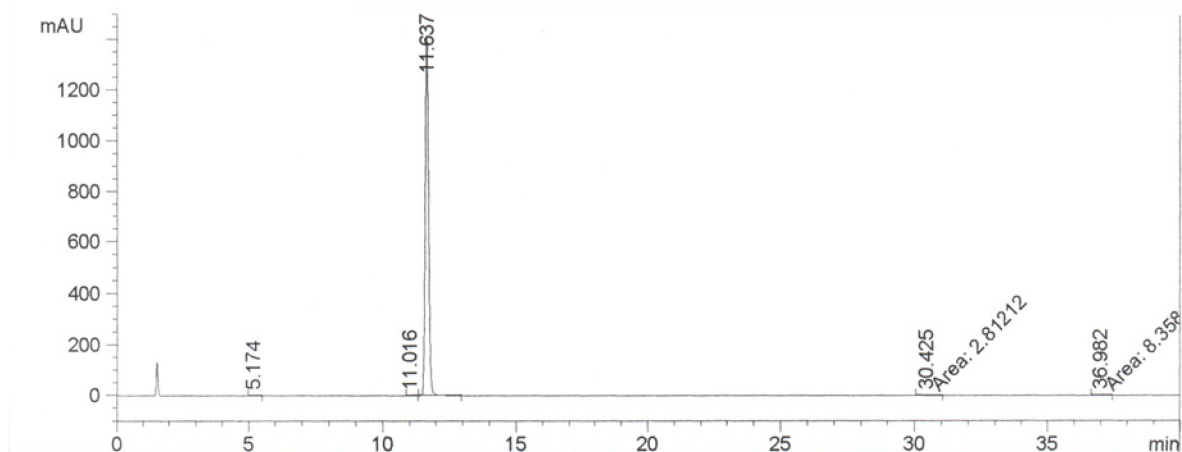
Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Fumarát, byla provedena tzv. rekrystalizace (opakovaná krystalizace) z etanolu. QF byl za varu (78 °C) rozpuštěn v etanolu, otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 1 °C byla 3,08 °C/min. Na této teplotě byla krystalická suspenze udržována 6 hod.



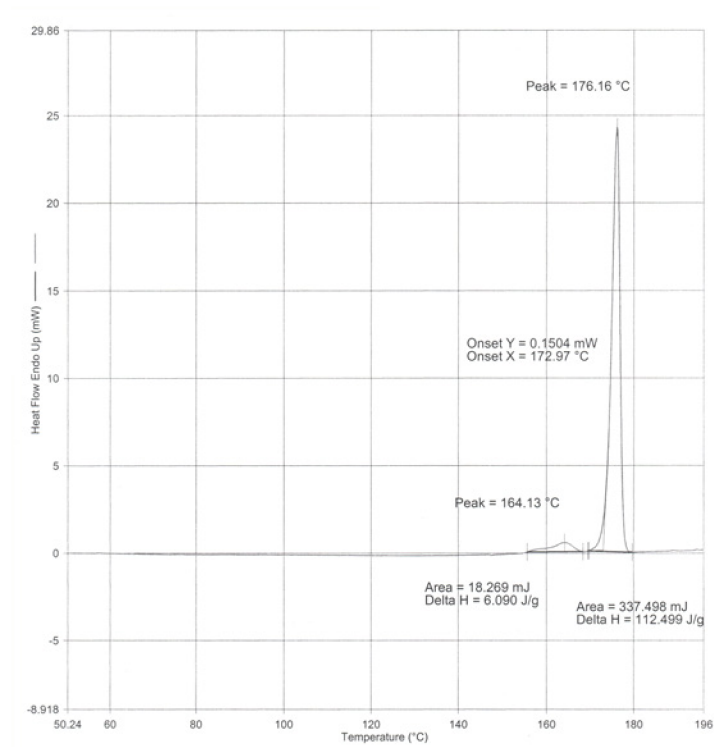
Obr. č. 65: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 21: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

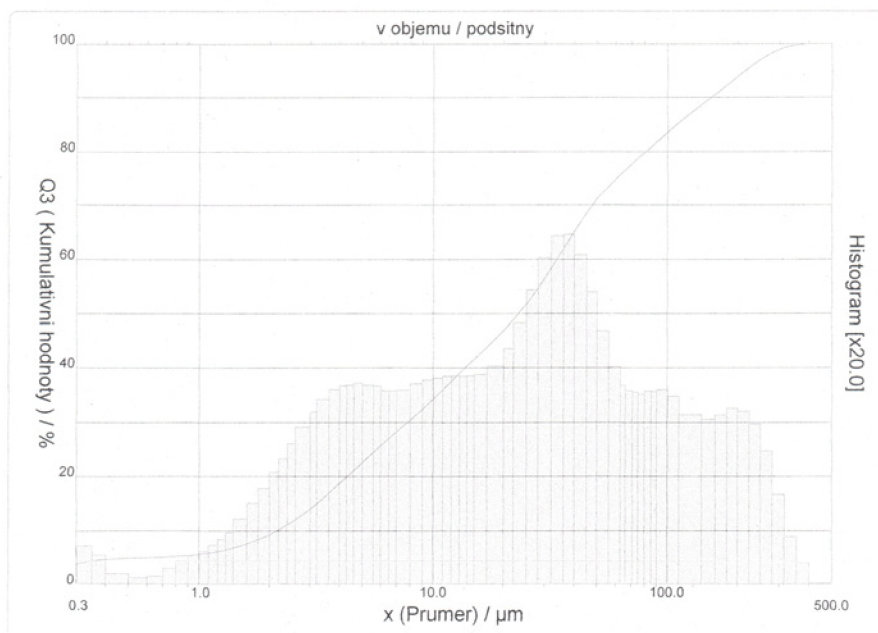
	po 120 min.	po 210 min.	po 300 min.	po 390 min.
#/sec. (1-5 μm)	1219	1778	2066	2262
#/sec. (10-23 μm)	2277	3002	3442	3728
#/sec. (29-86 μm)	5001	5111	5168	5212
#/sec. (100-251 μm)	970	800	699	629
#/sec. (293-1000 μm)	2	1	1	0
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	42	36	33	31



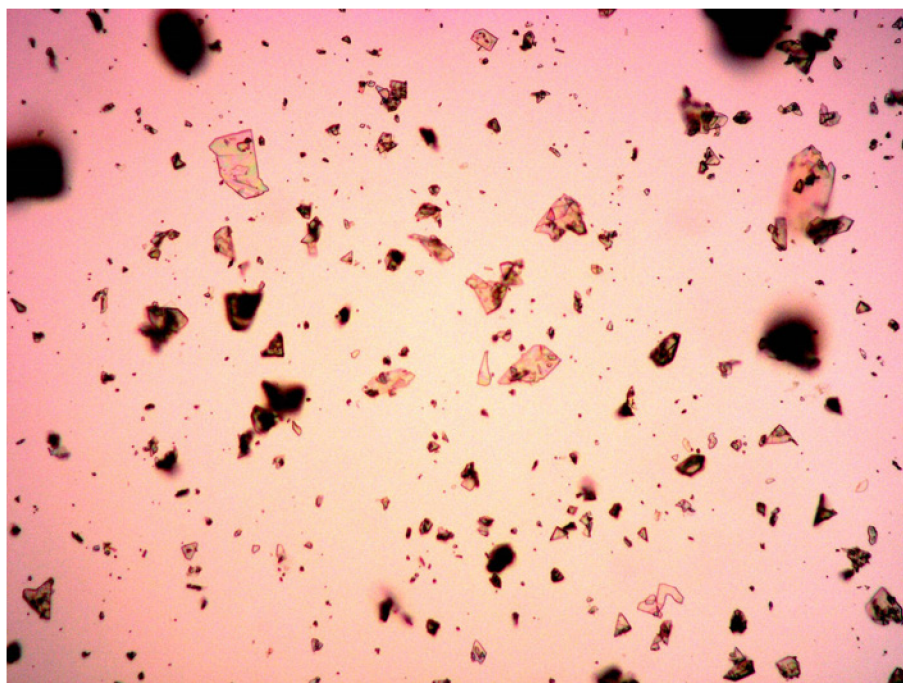
Obr. č. 66: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



Obr. č. 67: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 68: DVČ – Laser difrakce, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



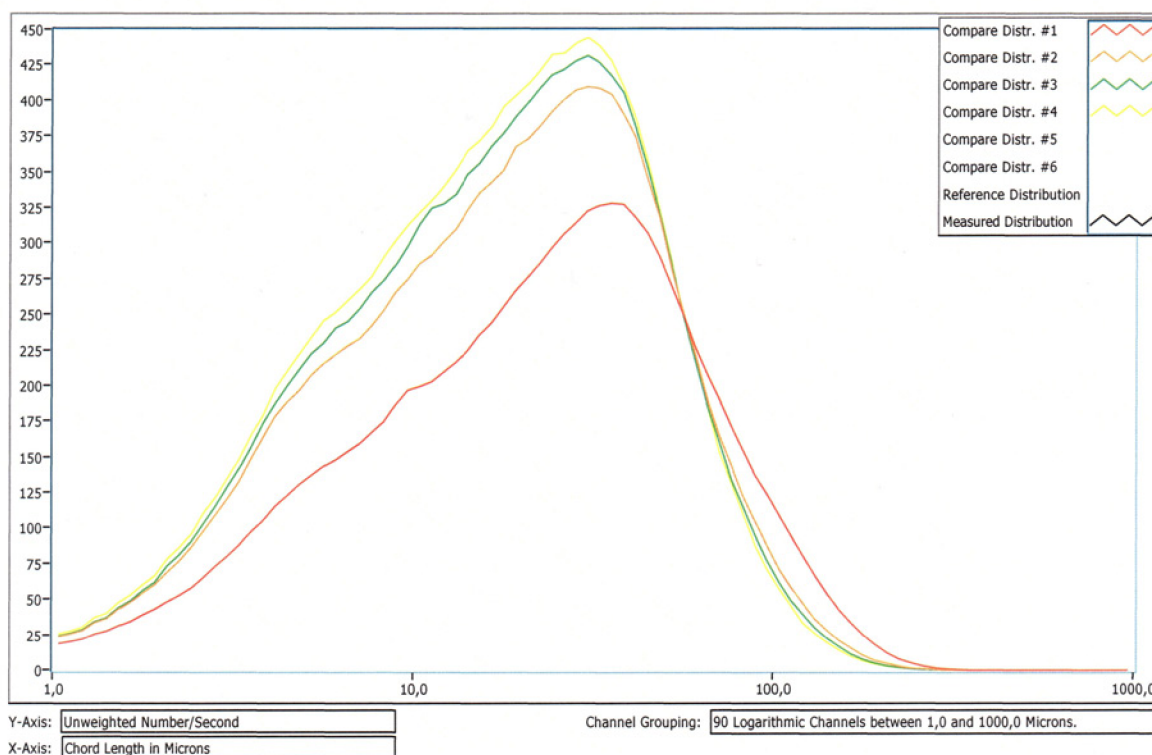
Obr. č. 69: 400 x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 19,15 μm .

Tabulka č. 22:

HPLC [%]	T _t [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVČ [μm]	
				D (10)	D (50)
99,82	176,16	122,49	18,50	D (90)	2,16
				D (50)	23,11
				D (10)	153,83
				průměr	50,76

4.3.7 Výsledky krystalizační přípravy QF č. 7

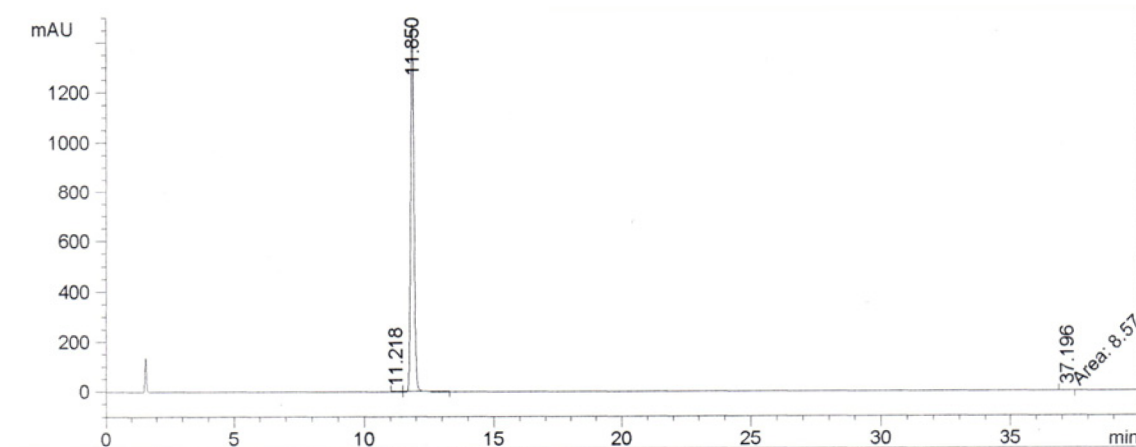
Výchozí surovinou u této přípravy byl Quetiapin Fumarát, byla provedena tzv. rekrystalizace (opakovaná krystalizace) z etanolu. QF byl za varu (78 °C) rozpuštěn v etanolu, otáčky míchadla byly nastaveny na hodnotu 200 ot./min., rychlost chlazení na konečnou teplotu 20 °C byla 1,28 °C/min. Na této teplotě byla krystalická suspenze udržována 3 hod.



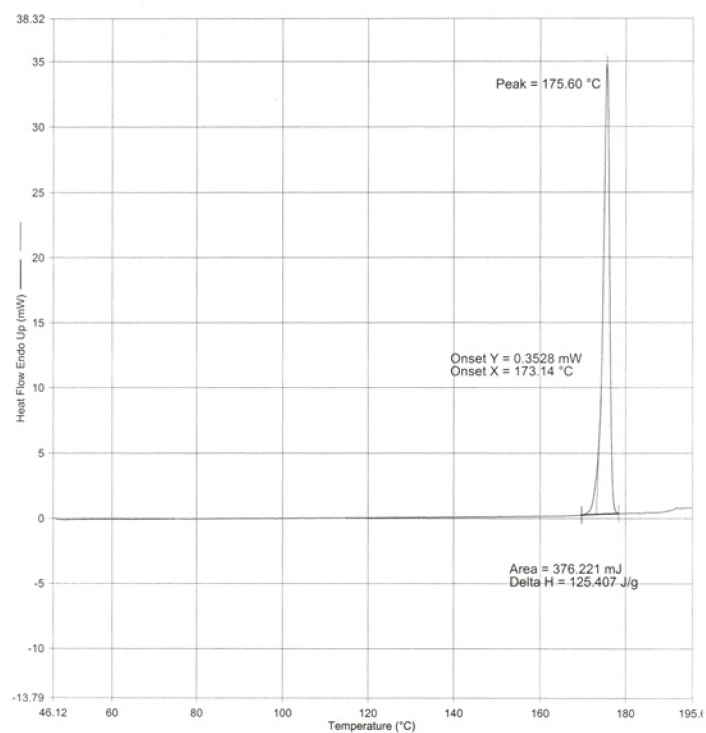
Obr. č. 70: FBRM, Osa X – velikost částic v mikrometrech; Osa Y – počet částic změřených za sekundu. Jednotlivé barevné křivky znázorňují velikostní rozložení částic v čase.

Tabulka č. 23: Počet částic za sekundu (#/sec.) v určitém rozmezí (μm) měřených v průběhu krystalizace. Mean, No Wt [μ] („nevážená distribuce“) vyjadřuje průměrnou velikost částic se zaměřením na jemné částice.

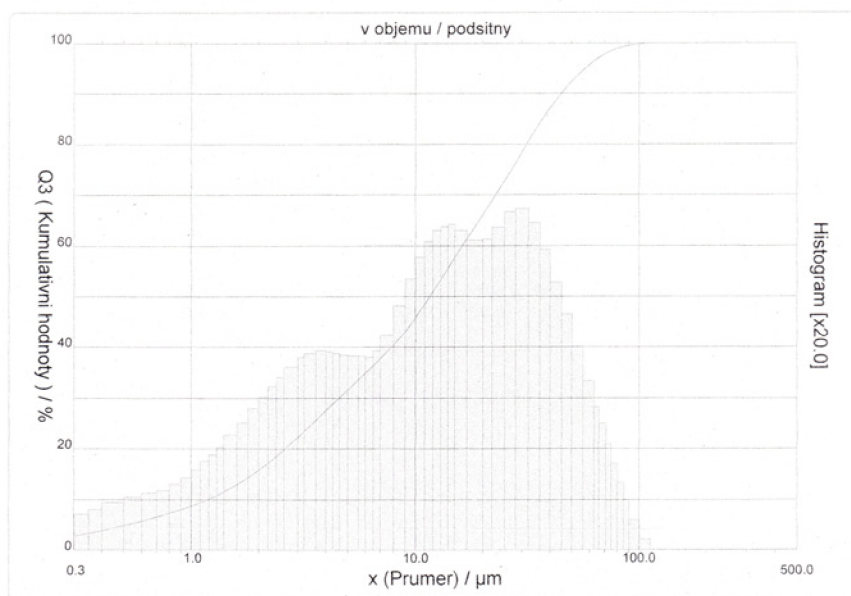
	po 60 min.	po 160 min.	po 240 min.	po 300 min.
#/sec. (1-5 μm)	882	969	916	1254
#/sec. (10-23 μm)	1270	1527	2585	3199
#/sec. (29-86 μm)	1260	2500	3034	3089
#/sec. (100-251 μm)	225	315	317	306
#/sec. (293-1000 μm)	6,5	8,77	7,96	7,44
Mean, No Wt [μ] (1-1000 μm)	138	128	118	114



Obr. č. 71: HPLC, Osa X – čas [min.]; Osa Y – absorbance [mAU].



Obr. č. 72: DSC, Osa X – teplota [°C]; Osa Y – tepelný tok (heat flow) [mW].



Obr. č. 73: DVČ – Laser difrakce, Osa X – velikost částic [μm]; Osa Y – kumulativní hodnota [%].



Obr. č. 74: 200 x zvětšeno, průměrná velikost krystalů 29,10 μm.

Tabulka č. 24:

HPLC [%]	T _t [°C]	ΔH [J/g]	Výtěžek [g]	DVČ [μm]	
				D (10)	D (90)
99,88	175,60	125,41	18,70	D (10)	1,17
				D (50)	11,62
				D (90)	44,86
				průměr	18,06

4.4 Vyhodnocení krystalizačních příprav Quetiapinu Fumarátu (QF)

U provedených laboratorních krystalizací Quetiapinu Fumarátu (QF) bez měření pomocí FBMR metody (*viz. tabulka č. 10*) byly z hlediska zákazníkem požadované distribuční velikosti částic nejlépe hodnoceny pokusy č. 4 a č. 5. Ve větším měřítku (1000 L procesní filtr) se ale tyto výsledky nepodařilo reprodukovat.

U všech následně provedených krystalizací QF (č. 1 – 7) kontrolovaných pomocí FBMR metody bylo dosaženo vysoké chemické čistoty produktu (obsah QF $\approx 99,50\%$), výtěžky byly v mezích normy a krystalická forma (Forma I) zůstala zachována.

Krystalizačním postupem č. 3 se podařilo dosáhnout zákazníkem specifikovanou distribuci velikosti částic. QF zde krystalizoval z horkého metanolu (65 °C) a režim chlazení byl nastaven na 0,49 °C/min. Suspenze byla udržována na výsledné teplotě 2 hodiny. Oproti zavedenému postupu se zvýšilo množství rozpouštědla tak, aby byl roztok za varu přesycen a upravil se teplotní režim krystalizace. Po odzkoušení postupu v provozním měřítku byly výsledky stejně uspokojivé. Produkt nevyžadoval následné finální úpravy (homogenizace, mletí) a i sloupovitý tvar krystalu (*viz. obr. č. 51, 52*) nezpůsobil problémy při filtraci. U krystalizační přípravy č. 4 bylo dosaženo podobných výsledků, produkt nevyhovoval jen v jednom parametru distribuční velikosti částic $D(10) = 4,13 \mu\text{m}$. I v tomto případě krystalizoval QF z metanolu, oproti postupu č. 3 bylo zvoleno pomalejší chlazení (0,25 °C/min) a produkt byl okamžitě po vychlazení na 5 °C izolován filtrací. Tvar krystalů (*viz. obr. č. 57, 58*) byl také vhodný pro další zpracování.

U krystalizací QF (č. 2 a č. 3) z acetonu nebylo dosaženo požadovaného tvaru a velikostní distribuce krystalů ani při laboratorních pokusech bez měření FBMR, proto bylo po dvou krystalizačních přípravách rozpouštědlo změněno.

U krystalizačních příprav QF č. 5 – 7 byl jako rozpouštědlo použit etanol. Krystalizace č. 5 byla chlazená pozvolna rychlostí 0,18 °C/min, krystaly měly pěkný sloupovitý tvar (*viz. obr. č. 64*), ale velké distribuční rozpětí (2,78 – 213,95 μm), takže nevyhovující specifikaci. U krystalizace QF č. 6 byla průměrná velikost částic stanovena laserovou difrakcí na 50,76 μm . Při mikroskopickém pozorování byly, ale zjištěny klastry vzniklé spojením částic destičkového tvaru. Po úpravě vzorku, byly tyto částice změřeny pod mikroskopem, a jejich velikost byla stanovena na 19,15 μm . Na obrázku č. 73 je vidět částice jak destičkového tak částečně sloupovitého tvaru, zde krystalizoval QF v přípravě č. 7 z etanolu rychlostí 1,28 °C/min. U krystalizace z tohoto rozpouštědla se nepodařilo získat produkt vyhovující DVČ.

U rychle chlazených krystalizací se jasně ukázalo, že krystalový habitus potřebuje ke svému vytvoření delší dobu. Výsledkem těchto krystalizací byly bez tvaré částice, které vytvářely shluky, což následně způsobovalo potíže při měření DVČ laserovou difrakcí. Sledování krystalizace pomocí metody FBMR nesloužilo k přesnému stanovení velikostního rozdělení částic v systému, ale výsledek měření může být použit jako tzv. „otisk prstu“ šarže pro porovnání s jinými.

K hlubšímu vyhodnocení vlivu procesních proměnných na krystalizaci QF by bylo stejně jako u krystalizace QO potřeba provést více krystalizačních pokusů. To ovšem v některých případech není možné z kapacitních, časových a jiných důvodů.

Tabulka č. 25: Přehled krystalizačních příprav Quetiapinu Fumarátu

krystalizace QF č.	rozpouštědlo	rychlost chlazení [°C/min]	konečná teplota [°C]	tvár krystalu	průměrná velikost krystalu [μm]
1	aceton	1,89	0	destičkový	8,44
2	aceton	1,83	20	destičkový	18,39
3	metanol	0,49	5	sloupovitý	39,34
4	metanol	0,25	5	sloupovitý	42,06
5	etanol	0,18	1	sloupovitý	74,66
6	etanol	3,08	1	destičkový	50,76
7	etanol	1,28	20	destičkový /sloupovitý	18,06

5. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce v literární rešerži řeší velmi rozšířený jev polymorfismu ve farmaceutickém průmyslu. Jev, který ovlivňuje fyzikální a biologické vlastnosti pevných látek. I když originální firmy věnují značné úsilí k predikci všech krystalických forem určité aktivní substance, není problém polymorfismu v současnosti zcela objasněn.

S polymorfii je úzce spjatý proces krystalizace. Vzhledem k rozdílným a zvyšujícím se požadavkům jednotlivých výrobců léčivých přípravků na “fyzikální kvalitu” farmaceutických substancí je pro generickou firmu nutností věnovat tomuto procesu velkou pozornost. Zvládnutí krystalizace tzn. schopnost tuto dynamickou operaci řídit umožňuje úsporu nemalých finančních prostředků.

Experimentální část práce byla zaměřena na získání vhodného tvaru krystalů Quetiapinu Oxalátu (QO), který je předstupněm (meziproduktem) při výrobě farmaceutické substance Quetiapinu Fumarátu (QF). QO byl krystalizován z acetonu ve čtyřech přípravách. U těchto krystalizací se nepodařilo dosáhnout jiného tvaru krystalů než jehličkového a destičkového. Tyto tvary krystalů nám poskytuje i současná technologie, ale zaměření se na tuto oblast a provedení více krystalizačních pokusů by mohlo vést k získání tvaru krystalů, který by měl příznivý vliv na ekonomiku a kvalitu následných výrobních operací.

Dalším cílem experimentů bylo dosažení zákazníkem (výrobcem lékové formy) specifikované distribuční velikosti částic (DVČ) u Quetiapinu Fumarátu úpravou krystalizačních podmínek. V rámci diplomové práce bylo zjištěno, že nejvhodnějším postupem byla příprava QF č. 3. V tomto případě krystalizoval QF z přesyceného metanolického roztoku, rychlost chlazení byla nastavena na 0,49 °C/min a krystalická suspenze byla udržována na konečné teplotě 5 °C 2 hodiny. Tento postup se později osvědčil i v makroskopickém (výrobním) měřítku, a byl tak získán produkt použitelný bez dalších fyzikálních úprav k přímému prodeji. Při použití acetonu jako rozpouštědla bylo dosaženo jen destičkového tvaru krystalů QF. U pomalu chlazené krystalizace QF kde byl jako rozpouštědlo použit etanol (příprava č. 6) vykrytalizovaly tvarově dobře definované krystaly, ale velikostní rozložení částic bylo široké, a tedy nevyhovující dané specifikaci.

Ve studiu krystalizace těchto farmaceuticky aktivních látek by bylo vhodné pokračovat. Provedením více krystalizačních pokusů za různých podmínek může být proces optimalizován a získaná data použita i v případě neočekávaných změn v požadavcích na fyzikální kvalitu produktu.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Bernstein, J.: Polymorphism in molecular crystals (2002)
- [2] Lorenz, C.: v prezentaci The effect of process parameters on achievability of polymorphs or pseudopolymorphs. Odborná konference Frankfurt 2004: Polymorphism & Crystallisation
- [3] Kratochvíl, B., Hušák M., Jegorov, A.: Chem. Listy 96, 330-335 (2002)
- [4] Dr. Giron, D.: v prezentaci Thermodynamic and kinetic factors to be considered in chemical development, Polymorphism&Crystallisation, IPQC Conference, Frankfurt (2004)
- [5] <http://www.pharmacy.utah.edu/pharmaceutics/pdf/Crystalline.pdf>
- [6] Československý časopis pro fyziku 6/2005.
- [7] Ostwald, W.: The formation and changes of solids. 1897. Z. Physik. Chem. 22, 289 – 330
- [8] http://www.siegfried.ch/images/stories/pdf/NLe_2005_03.pdf
- [9] Wiley, J.: Polymorphism and Polytypism in Crystals, New York, 1966.
- [10] http://us.mt.com/mt/ed/appEdStyle/M-2-001_application_note_Editorial-Generic_1147991111616.jsp
- [11] Kratochvíl, B.: RTG difrakční metody ve studiu polymorfismu pevných substancí, 3. Odborná konference VÚFB Praha, 12. – 13.11.2003
- [12] Höhne, G.: Differential Scanning Calorimetry.
- [13] Merck Index 13 Edition, Merck 2001
- [14] Drugs of the Future 1996, 21 (5), 483 – 489
- [15] Drug of the Future 2003, 28 (11), 1141 – 1142
- [16] Kopeček, M.: Quetiapin, REMEDIA č. 6 (2000)
- [17] Lasentec. com 1999, prezentace CD: Method of Measurement
- [18] <http://www.novasep.com/technologies/Crystallization-pharmaceutical-products.asp>
- [19] Klouda, P.: Fyzikální chemie 1997

- [20] Borchardt, R. T.: Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery for Lead Selection (2004)
- [21] Stahl, H. P., Wermuth, G. C.: Handbook of Pharmaceutical Salts Properties, Selection and Use (2002)
- [22] J. Am. Chem. Soc. 122 (2000) 585-591
- [23] <http://www.sciencenews.org/articles/20040821/bob9.asp>
- [24] Kratochvíl, B.: Chem. Listy 101, 3-12 (2007)
- [25] Hilfiker, R.: Polymorphism in Pharmaceutical Industry (2006)
- [26] European Pharmacopoeia 6.0 (2007)
- [27] METTLER TOLEDO: Návod k použití sondy Lasentec D 600 (2004)
- [28] http://las.perkinelmer.com/content/relatedmaterials/brochures/bro_pyrisdiamonddsc.pdf
- [29] http://www.malvern.com/LabEng/technology/laser_diffraction/what_is_particle_size.htm
- [30] Allen, T.: Particle Size Measurement and Distribution (1997)
- [31] http://www.avcr.cz/data/vzdelavani/dsc/udeleni/kratochvil_teze_dsc.pdf
- [32] <http://www.freepatentsonline.com> US Patent 7238686

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

APIs.....	Active pharmaceutical ingredients
CASRN.....	Chemical Abstract Services Registry Number
FDA.....	Food and Drug Administration
QA.....	Quality assurance
QC.....	Quality control
AFC.....	Atomic force microscope
DSC.....	Differential scanning calorimetry
FBRM.....	Focused Beam Reflectance Measurement
HPLC.....	High performance liquid chromatography
IČ.....	Infračervená spektroskopie
NMR.....	Nuclear magnetic resonance
SEM.....	Scanning electron microscope
MEOH.....	Metanol
Q.....	Quetiapin (báze)
QO.....	Quetiapin Oxalát
QF.....	Quetiapin Fumarát
DVČ.....	Distribuční velikost částic
PSD.....	Particle size distribution
MARTA.....	Multi-Acting Receptor Targeted