

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Veronika Barnetová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Studium růstu krystalů v amorfním léčivu Tadalafil  
Diplomová práce

2024

Bc. Veronika Barnetová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2023/2024

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Barnetová**  
Osobní číslo: **C22407**  
Studijní program: **N0531A130035 Fyzikální chemie**  
Téma práce: **Studium růstu krystalů v amorfním léčivu Tadalafil**  
Téma práce anglicky: **Crystal growth study in amorphous Tadalafil**  
Zadávající katedra: **Katedra fyzikální chemie**

### Zásady pro vypracování:

1. Proved'te literární rešerši týkající se zadaného tématu.
2. Připravte a charakterizujte vzorky amorfního Tadalafilu.
3. Změřte a analyzujte rychlosti růstu krystalů v připravených vzorcích s ohledem na dlouhodobou stabilitu amorfního léčiva.
4. Popište růst krystalů v daných vzorcích na základě současných růstových teorií.
5. Analyzujte vliv krystalické/amorfní fáze na disoluci daného léčiva.
6. Získané výsledky předložte ve formě diplomové práce.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jaroslav Barták, Ph.D.**  
Katedra fyzikální chemie

Datum zadání diplomové práce: **29. února 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v. r.  
děkan

L.S.

**doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

**Prohlašuji:**

Práci s názvem Studium růstu krystalů v amorfním léčivu Tadalafil jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 4. 2024

Bc. Veronika Barnetová, v. r.

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce, panu Ing. Jaroslavu Bartákovi, Ph.D. a také Ing. Kevinu Matzickovi, za jejich vedení, cenné rady a pomoc s experimenty.

Děkuji rovněž celé mé rodině za podporu v průběhu studia.

## **ANOTACE**

Tato diplomová práce se zabývá studiem rychlosti růstu krystalů v amorfním léčivu v závislosti na teplotě a stáří léčiva, a také zkoumá vliv amorfního stavu léčiva na jeho rozpustnost ve vodě. Předmětem zkoumání je léčivo tadalafil, které se používá k léčbě erektilní dysfunkce a zmírnění příznaků benigní hyperplazie prostaty. Růst krystalů v amorfní formě tadalafilu v oblasti podchlazené taveniny byl sledován pomocí optického mikroskopu. Rozpustnost léčiva v amorfní a krystalické podobě byla sledována pomocí disoluční studie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

tadalafil, amorfní léčiva, růst krystalů, mikroskopie, rozpustnost

## **TITLE**

Crystal growth study in amorphous Tadalafil

## **ANNOTATION**

The thesis focuses on temperature dependence of crystal growth rate in an amorphous drug. The study investigates long-term stability and its impact on crystal growth rate, as well as solubility of amorphous and crystalline form of the drug. The subject of investigation is the drug tadalafil, which is used to treat erectile dysfunction and relieve the symptoms of benign prostatic hyperplasia. Crystal growth in the amorphous form of tadalafil in the undercooled melt region was monitored using an optical microscope. The solubility of the drug in amorphous and crystalline form was monitored using a dissolution study.

## **KEYWORDS**

tadalafil, amorphous drugs, crystal growth, microscopy, solubility

# Obsah

Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	12
1.1. Sklo.....	12
1.2. Krystalizace.....	14
1.2.1. Nukleace.....	14
1.2.2. Růst krystalů.....	14
1.2.3. Metody studia krystalizace.....	18
1.3. Amorfni léčiva.....	19
1.3.1. Stabilita amorfniích léčiv.....	19
1.4. Tadalafil.....	22
1.5. <i>In vitro</i> disoluční studie.....	25
1.5.1. Vyhodnocení disoluční studie.....	26
2. Experimentální část.....	29
2.1. Studium růstu krystalů s ohledem na dlouhodobou stabilitu amorfniho léčiva.....	29
2.1.1. Příprava vzorků pro studium růstu krystalů a stabilitu léčiva.....	29
2.1.2. Mikroskopie.....	30
2.1.3. Vyhodnocení rychlosti růstu krystalů.....	32
2.2. <i>In vitro</i> disoluční studie rozpustnosti léčiva.....	35
2.2.1. Příprava vzorků pro disoluční studie.....	35
2.2.2. <i>In vitro</i> disoluční studie.....	36
2.2.3. Stanovení rozpuštěného množství léčiva.....	37
3. Výsledky a diskuze.....	40
3.1. Rychlost růstu krystalů.....	40
3.2. <i>In vitro</i> disoluční studie.....	54
4. Závěr.....	59
5. Seznam použité literatury.....	60



## Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1: závislost změny objemu sklotvorné taveniny na teplotě.....	13
Obrázek 2: závislost redukované rychlosti na podchlazení pro základní růstové modely .....	16
Obrázek 3: diagram znázorňující Kauzmannovu a fiktivní teplotu skladování léčiva .....	21
Obrázek 4: strukturní vzorec tadalafilu [18].....	22
Obrázek 5: temperační stůl s kelímkem a termočlánkem .....	30
Obrázek 6: optický mikroskop OLYMPUS BX 51 se zabudovanou kamerou DP72 a temperačním stolem Linkam .....	31
Obrázek 7: snímky kulatých krystalů ve vzorku při teplotě 210 °C a 100násobném zvětšení v čase: a) 80, b) 110, c) 140 a d) 170 sekund od začátku měření a názorná ukázka měření velikosti krystalů.....	32
Obrázek 8: snímky lineárních krystalů ve vzorku při teplotě 190 °C a 200násobném zvětšení v čase: a) 100, b) 200, c) 300 a d) 400 sekund od začátku měření a názorná ukázka měření velikosti krystalů.....	33
Obrázek 9: lineární grafická závislost velikosti krystalů na době temperace při teplotě 210 °C .....	34
Obrázek 10: amorfní vzorek TADA .....	35
Obrázek 11: amorfní vzorek TADA .....	36
Obrázek 12: zakrytalizovaný TADA připravený z amorfního vzorku.....	36
Obrázek 13: disoluční aparatura SOTAX AT7 Smart .....	37
Obrázek 14: naměřená absorpční křivka tadalafilu .....	38
Obrázek 15: kalibrační přímka TADA .....	39
Obrázek 16: lineární, lineárně větvené a kulaté krystaly .....	41
Obrázek 17: tvorba srostlých kulatých krystalů během temperace při teplotě 190 °C.....	41
Obrázek 18: závislost velikosti krystalů při teplotě temperace 190 °C a patrné zpomalení rychlosti růstu .....	42
Obrázek 19: naměřená data pro: a) 1 týdnů, b) 3 týdnech, c) 6 týdnech, d) 8 týdnech, e) 16 týdnů a f) 24 týdnech skladování v exsikátoru a lednici, v porovnání s daty naměřenými u nových vzorků.....	48
Obrázek 20: všechna naměřená data rychlosti růstu lineárních a kulatých krystalů v závislosti na teplotě temperace .....	49
Obrázek 21: určení aktivační energie růstu krystalů .....	50

Obrázek 22: určení parametru $\xi$ .....	51
Obrázek 23: závislost redukované rychlosti růstu krystalů na podchlazení .....	52
Obrázek 24: predikce modelu kolmého růstu krystalů .....	53
Obrázek 25: přepočtená data pro krystalický vzorek proložená Weibullovým modelem .....	54
Obrázek 26: přepočtená data pro amorfni vzorek proložená Weibullovým modelem .....	55
Obrázek 27: přepočtená data pro zakrytalizovaný amorfni vzorek proložená Weibullovým modelem.....	55
Obrázek 28: všechna data z disoluční studie TADA .....	57
Tabulka 1: specifická otáčivost tadalafilu <b>[18]</b> :.....	22
Tabulka 2: charakteristické vlastnosti tadalafilu .....	23
Tabulka 3: farmakokinetické vlastnosti TADA.....	23
Tabulka 4: hodnoty parametru n dle tvaru zkoumaného léčiva, mechanismus rozpouštění <b>[29]</b> .....	28
Tabulka 5: data pro čerstvě připravené vzorky.....	43
Tabulka 6: data pro 1 týden staré vzorky.....	44
Tabulka 7: data pro 3 týdny staré vzorky .....	44
Tabulka 8: data pro 6 týdnů staré vzorky .....	45
Tabulka 9: data pro 7 týdnů staré vzorky .....	45
Tabulka 10: data pro 8 týdnů staré vzorky .....	46
Tabulka 11: data pro 16 týdnů staré vzorky .....	46
Tabulka 12: data pro 17,5 týdnů staré vzorky .....	47
Tabulka 13: data pro 24 týdnů staré vzorky .....	47
Tabulka 14: parametry Weibullova modelu .....	56

## Seznam použitých symbolů

$a_0$	poloměr atomů/molekul účastnících se difúze
A	předexponenciální faktor
Ar	amorfní rozetřené léčivo
AK	amorfní zakrytalizované léčivo
b	burst efekt
B	parametr 2D povrchově nukleačního růstového modelu
$\beta$	parametr Weibullova kinetického modelu
C	parametr 2D povrchově nukleačního růstového modelu
D	difuzní koeficient
$\Delta G$	změna Gibbsovy energie
$\Delta H_{\text{tání}}$	změna entalpie tání
$\Delta S_f$	změna entropie tání
$\Delta T$	podchlazení
$E_A$	aktivační energie
$\eta$	dynamická viskozita
f	počet aktivních míst na povrchu krystalu
k	Boltzmanova konstanta
$k_0$	rychlostní konstanta modelu kinetiky 0. řádu
$k_1$	rychlostní konstanta modelu kinetiky I. řádu
$k_W$	konstanta Weibull modelu
$k_H$	konstanta Higuchiho modelu
$k_{KP}$	konstanta Korsmeyer-Peppas modelu
K	krystalické léčivo
$\xi$	koeficient v exponenciální závislosti rychlosti růstu na viskozitě

$M_t$	množství rozpuštěného léčiva v čase $t$
$M_\infty$	maximální rozpustitelné množství léčiva z lékové formy
$n$	parametr Korsmeyer-Peppasova kinetického modelu
$q$	rychlost chlazení
$R$	univerzální plynová konstanta
$t$	čas
$t_t$	časová prodleva od počátku testu
$T$	teplota
$T_f$	fiktivní teplota
$T_g$	teplota skelného přechodu
$T_k$	Kauzmannova teplota
$T_m$	teplota tání
$u$	rychlost růstu krystalů
$u_{kin}$	kinetický člen rychlosti růstu
$u_r$	redukováná rychlost růstu
$u_{smodch}$	směrodatná odchylka rychlosti růstu krystalů

## Seznam použitých zkratk

cGMP	cyklický guanosin-monofosfát
$C_{\max}$	maximální koncentrace léčiva
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DTA	diferenční termická analýza
ED	erektilní dysfunkce
FDA	americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HME	extruze horké taveniny
HPMC	hydroxypropylmethylcelulóza
PDE 5	fosfodiesteráza typu 5
PEG	polyethylenglykol
PVP	polyvinylpyrolidon
TADA	tadalafil
TMA	termomechanická analýza
UV–VIS	ultrafialové a viditelné záření

## Úvod

Mnohé studie poukazují na to, že se amorfní léčiva vyznačují mnohem lepší rozpustností a biologickou dostupností než léčiva krystalická. Díky tomu tak dojde k jejich rychlejšímu účinku. Vyznačují se však nižší stabilitou. Projevem nestability amorfních léčiv je například nežádoucí krystalizace, kdy se molekuly léčiva snaží stabilizovat tím, že se z metastabilní amorfní podoby přeuspořádají do krystalické formy. Nežádoucí krystalizace amorfního léčiva a studie rozpustnosti je předmětem výzkumu v této diplomové práci.

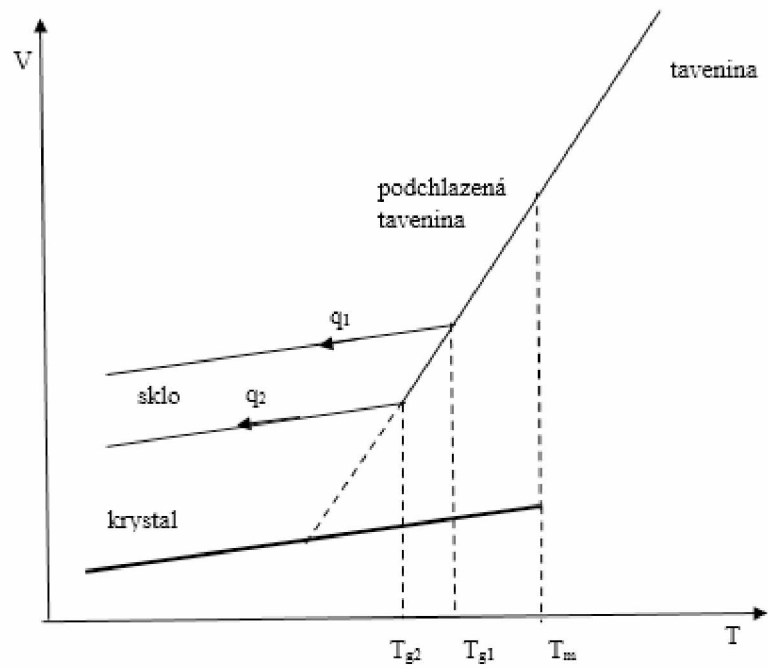
# 1. Teoretická část

## 1.1. Sklo

Sklo je materiál v amorfní formě. Lze jej připravit vícero způsoby. Jedním z hojně používaných způsobů je příprava z taveniny. Roztavenou taveninu musíme zchladit dostatečně rychle, abychom zamezili krystalizaci látky. Rychlost chlazení musí tedy převyšovat rychlost nukleace a následného růstu krystalů. Za těchto podmínek chlazení, je možné připravit skla z mnoha typů materiálu. [1]

Materiály ve formě skla jsou považovány za metastabilní. Znamená to, že nejsou v termodynamické rovnováze, avšak jsou poměrně stabilní díky velké energetické bariéře mezi tímto a rovnovážným stavem. Do stavu, který je blízko rovnováze, se sklo může dostat dvěma způsoby. Jedním z nich je krystalizace skelného materiálu a druhým je jeho relaxace. Oba tyto způsoby jsou silně ovlivnitelné zvýšením teploty. [1]

Významným znakem skel je teplota skelného přechodu ( $T_g$ ). Díky závislosti na rychlosti chlazení a stupni relaxace skla, nelze  $T_g$  považovat za materiálovou termodynamickou konstantu. Z grafické závislosti na Obrázku 1 je viditelný vliv rychlosti chlazení taveniny na vznik materiálu ve formě skla či v krystalické podobě. Při nízké rychlosti chlazení dojde při dosažení teploty tání ( $T_m$ ) k přeskupení jednotek do krystalické mřížky. Tento přechod se vyznačuje skokovou změnou objemu. Při vysoké rychlosti chlazení taveniny však materiál nebude mít dostatek času k tomuto přeuspořádání a dostaneme podchlazenou taveninu. Dalším chlazením podchlazené taveniny až k  $T_g$ , bude ve vzorku narůstat viskozita tak dlouho, než jednotky ve vzorku doslova zatuhnou a dojde k přeměně na sklo. V Obrázku 1 je patrné, že při různých rychlostech chlazení  $q$ , ( $q_1 > q_2$ ), dojde k přípravě skla v různých termodynamických stavech s rozdílnými hodnotami  $T_g$ . [1]



Obrázek 1: závislost změny objemu sklotvorné taveniny na teplotě



## 1.2. Krystalizace

Krystalizace se skládá ze dvou procesů: nukleace a růst krystalů. Těmto procesům bude věnována další část mé diplomové práce.

### 1.2.1. Nukleace

Prvním krokem před vlastním růstem krystalů je tvorba nukleí v metastabilní matečné fázi.

Jestliže je matečná fáze chemicky, strukturně i energeticky homogenní a neobsahuje-li žádné defekty, mohou nuklea vznikat zcela náhodně v celém objemu vzorku a hovoříme o homogenní nukleaci. V praxi je výskyt homogenní nukleace poměrně malý, jelikož připravené matečné fáze často obsahují defekty např. nečistoty, rýhy, rozhraní zrn. Častěji dochází k růstu nukleí v oblasti výskytu zmíněných poruch nebo na povrchu vzorku, jelikož jsou to energeticky výhodná místa. V tomto případě hovoříme o heterogenní nukleaci. [2]

Rychlost nukleace amorfních materiálů je pod  $T_g$  mimořádně pomalá vlivem velmi nízké molekulové mobility. Při zahřívání vzorku pak v okolí oblasti skelného přechodu rychlost nukleace obvykle dosahuje maximální hodnoty a následně opět klesá s dalším zvyšováním teploty. [3]

### 1.2.2. Růst krystalů

Po vzniku stabilního nuklea dochází k jeho růstu. Rychlost růstu krystalů může být řízena třemi ději:

- difúzí v tavenině na dlouhou i krátkou vzdálenost
- tokem latentního tepla od povrchu rostoucího krystalu
- procesy probíhajícími na fázovém rozhraní krystal-tavenina.

Jestliže si vyneseme grafickou závislost velikosti krystalu na čase a zjistíme, že krystaly rostou lineárně s časem, jedná se o proces řízený kinetikou růstu krystalů na rozhraní krystal-tavenina. Popis růstu krystalů na zmíněném fázovém rozhraní je možný pomocí tří základních modelů. První z nich je model kolmého růstu, druhý šroubovicově dislokační a dále pak 2D povrchově nukleační růstový model. [4, 5]

Jestliže krystaly rostou dle modelu kolmého růstu, znamená to, že na téměř jakémkoli místě ve vzorku může dojít k postupnému připojování atomů a molekul na povrch krystalu. Rozhraní krystal-tavenina roste všude stejně rychle a obsahuje velké množství aktivních center, na nichž jsou atomy a molekuly přednostně zabudovávány. [4, 5]

Rovnice 1 popisuje rychlost růstu krystalů modelem kolmého růstu:

$$u = \frac{kT}{3\pi\eta a_0^2} \left[ 1 - e^{\left(-\frac{\Delta S_f \Delta T}{RT}\right)} \right] \quad (1),$$

kde  $u$  je rychlost růstu krystalů,  $k$  Boltzmanova konstanta,  $T$  je teplota v Kelvinech,  $\eta$  je dynamická viskozita,  $a_0$  značí poloměr atomů/molekul účastnících se difúze,  $\Delta S_f$  je entropie tání,  $\Delta T$  je tzv. podchlazení, rozdíl  $T_m - T$ , a  $R$  univerzální plynová konstanta. [4, 5]

Pokud krystaly rostou převážně na dislokacích vzorku, jedná se o růst, jež můžeme popsat pomocí modelu šroubovicově dislokačního. Po navázání atomu či molekuly na dislokaci dochází k posunu této dislokace dále vzorkem, čímž dojde ke vzniku tzv. Archimedovy spirály. Tu můžeme pozorovat například pomocí elektronového mikroskopu. Rychlost růstu krystalů modelem šroubovicově dislokačním popisuje rovnice 2:

$$u = f \cdot \frac{kT}{3\pi\eta a_0^2} \cdot \left[ 1 - e^{\left(-\frac{\Delta S_f \Delta T}{RT}\right)} \right] \quad (2),$$

kde  $f$  je počet aktivních míst na povrchu krystalu. [4, 5]

O růstu 2D povrchově nukleačním hovoříme tehdy, když k růstu krystalů dochází na dvoudimenzionálních aktivních centrech, jimiž mohou být například 2D nuklea na rozhraní krystal-tavenina. Rychlost růstu krystalů dle modelu 2D povrchově nukleačního popisuje rovnice 3:

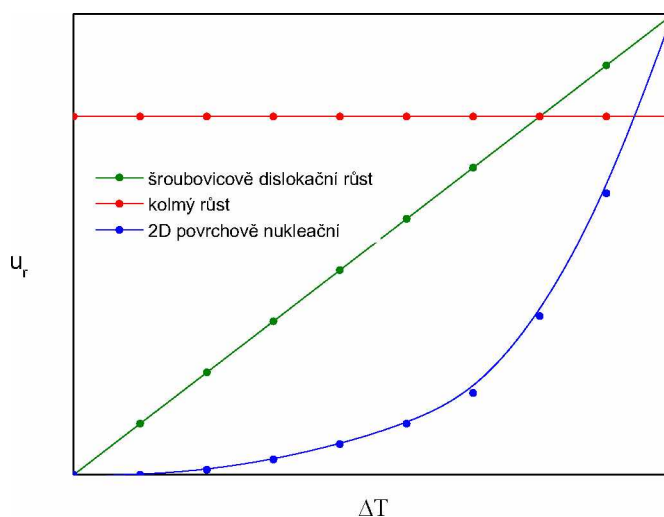
$$u = \frac{C}{\eta} \cdot e^{\left(-\frac{B}{T\Delta T}\right)} \quad (3),$$

kde  $C$  a  $B$  jsou parametry růstového modelu. [4, 5]

Vhodný růstový model je možné odhadnout dle redukované rychlosti růstu  $u_r$ , jejíž výpočet je zobrazen rovnicí 4:

$$u_r = \frac{u \cdot \eta}{1 - e^{\left(\frac{\Delta S_f \Delta T}{RT}\right)}} \quad (4).$$

Pro kolmý růst je závislost  $u_r$  na podchlazení konstantní, pro šroubovicově dislokační je lineární s kladnou směrnici a nulovým úsekem. Pro model 2D povrchově nukleačního růstu je závislost  $u_r$  na podchlazení nelineární a prochází počátkem, jak můžeme vidět na grafickém znázornění v Obrázku 2. [4, 5]



Obrázek 2: závislost redukované rychlosti na podchlazení pro základní růstové modely

### 1.2.2.1. Rychlost růstu krystalů

Rychlost růstu je možné ovlivnit například odvodem tepla na fázovém rozhraní, rychlostí transportu stavebních jednotek nebo také rychlostí zabudovávání jednotek do krystalové mřížky. [2]

Rychlost růstu krystalů  $u$  lze obecně popsat součinem termodynamického členu  $f(T)$  a kinetického členu  $u_{kin}(T)$ :

$$u = u_{kin}(T) \cdot f(T) \quad (5),$$

kde je termodynamický člen dán následující rovnicí:

$$f(T) = 1 - e\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) \quad (6),$$

kde  $\Delta G$  je změna Gibbsovy energie mezi amorfni a krystalickou fází,  $R$  je univerzální plynová konstanta. [2]

Kinetický člen popisuje rovnice 7, Stokes-Einsteinův vztah:

$$u_{kin} = D \approx \eta^{-1} \quad (7),$$

kde  $D$  je difúzní koeficient.

Standardní modely předpokládají spojitost kinetického členu s procesem přesunu materiálu z kapalné fáze na rozhraní podchlazená tavenina-krystal – tzv. proces vnitřní difúze. Při nízkém podchlazení lze teplotní závislost difúzního koeficientu  $D$  snadno nahradit převrácenou hodnotou viskozity  $\eta$ , což dobře popisuje Stokes-Einsteinův vztah. S rostoucím podchlazením však dochází ke změně úměrnosti mezi viskozitou a difúzním koeficientem  $D$ . Proto je při výpočtu kinetického členu  $u_{kin}$  u velmi podchlazených látek používán koeficient  $\zeta$  [6]:

$$u_{kin} \approx \eta^{-\zeta} \quad (8).$$

Rychlost růstu krystalů je značně závislá na teplotě. Závislost v úzkém teplotním intervalu vystihuje Arrheniova rovnice,

$$u = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (9),$$

kde  $u$  je rychlost růstu krystalů,  $A$  je předexponenciální faktor.  $E_A$  představuje zdánlivou aktivační energii, bariéru, kterou musí atomy překročit, aby došlo k jejich zabudování do krystalu a tím k jeho růstu.  $R$  je univerzální molární plynová konstanta. [6]

### 1.2.3. Metody studia krystalizace

Amorfni léčiva se vyznačují skvělou rozpustností a biologickou dostupností, avšak jejich velkou nevýhodou je nízká stabilita a snaha molekul přejít do stabilnějšího stavu, tedy zkrystalizovat. Povědomí o kinetice krystalizačního procesu v amorfních léčivech je důležité. Díky tomu jsme schopni zvolit vhodný způsob přípravy, uchovávání i případnou techniku stabilizace léčiva, a tak zabránit zmíněné nežádoucí krystalizaci. [7]

Studium krystalizace amorfních látek umožňují mnohé experimentální techniky, které dělíme na přímé a nepřímé.

Z přímých experimentálních technik je to například mikroskopie. Klasická optická mikroskopie umožňuje sledovat velikost, množství a tvar vzniklých krystalů. Také jsme schopni stanovit rychlost, kterou krystaly rostou. Můžeme také pozorovat, zda krystaly rostou na povrchu či v objemu sledovaného vzorku. [2, 8] Jestliže chceme sledovat vrstevnaté struktury vzorku, můžeme použít infračervený mikroskop. [9] Pro sledování vnitřního uspořádání částic ve vzorku nebo také povrchových detailů je vhodný spíše elektronový mikroskop. [10]

Nepřímo lze krystalizaci studovat pomocí mnohých metod termické analýzy. Mezi tyto metody patří například diferenční termická analýza (DTA), diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a termomechanická analýza (TMA). První dvě zmíněné metody sledují změnu tepelných vlastností zkoumané látky. TMA měří změnu velikosti či stupeň deformace vzorku při zatížení v závislosti na teplotě. [8]

Pomocí zmíněných technik je možné zjistit teplotu, při které dochází ke krystalizaci a rychlost, jakou krystaly rostou. Pomocí další analýzy dat také zjistíme zdánlivou aktivační energii, bariéru, jenž musí atomy překročit, aby došlo k jejich zabudování do krystalografické mřížky. [6] Znalost kinetických dat krystalizace amorfních léčiv nám rovněž může usnadnit volbu způsobu uchovávání a skladování léčiva a typ obalového materiálu. Také nám umožní ověřit stabilitu amorfního léčiva a stanovit dobu expirace léčivého přípravku, tedy dobu, po kterou je amorfni léčivo stabilní. [11]

### **1.3. Amorfni léčiva**

Léčivo v amorfni formě lze připravit vícero způsoby. Mezi nejčastěji používané způsoby patří roztavení vzorku a následné rychlé zchlazení taveniny, extruze horké taveniny a sprejové sušení. [7,12]

Takto připravená léčiva mají spoustu výhod, ale i nevýhod. Jejich výhodou je, že jsou velmi dobře rozpustná ve vodě, narušují od krystalických protějšků. Mají skvělou biologickou dostupnost a jsou dobře chemicky reaktivní. Jelikož je amorfni stav tzv. metastabilní, systém se snaží stabilizovat tím, že molekuly mají tendenci se přeuspořádat do pravidelné krystalické mřížky a zkrystalizovat. Zkrystalizováním však ztrácí své výhodné vlastnosti. Nevýhodou těchto léčiv je také kratší doba expirace amorfniích léčiv, špatná fyzikální, chemická a biologická stabilita. Rovněž to, že jsou hygroskopické, ochotně váží vodu, která může usnadnit proces krystalizace. Tuto nežádoucí krystalizaci můžeme zpomalit, či jí zcela zabránit stabilizací. [7]

#### **1.3.1. Stabilita amorfniích léčiv**

Stabilitu amorfniích léčiv můžeme rozdělit do tří druhů. První je fyzikální stabilita, která souvisí s pohyblivostí molekul. Druhá je chemická, která souvisí s tokem energie (tepla) a tepelným rozkladem léčiva. Třetí je biologická, jež souvisí s přítomností mikroorganismů v daném léčivu. [12]

Obecně můžeme stabilitu amorfniích léčiv ovlivnit mnoha způsoby. Jedním z nich je způsob přípravy amorfni formy léčiva. Dalšími způsoby jsou například tvorba koamorfniích směsí, pevných polymerních disperzí či zabudování amorfniho léčiva do mezoporézního materiálu. Vliv na stabilitu má také způsob skladování léčiv. [7, 12]

##### **1.3.1.1. Ovlivnění stability amorfniho léčiva pomocí způsobu přípravy**

Amorfni léčiva lze připravit vícero způsoby. Mezi tři nejčastěji používané techniky, pro přípravu amorfniích léčiv, patří příprava roztavením materiálu a rychlým zchlazením. Velkou roli při tomto způsobu přípravy hraje rychlost chlazení. S vyšší rychlostí chlazení dostaneme více stabilní léčiva. [7, 12]

Druhou nejpoužívanější technikou je tvorba extruze z horké taveniny (HME), kdy dostaneme produkt s nízkým specifickým povrchem a vysokou objemovou hustotou. Povrch extruze je však obvykle náchylný k absorpci vlhkosti, což může usnadňovat proces rekrystalizace léčiva. Při tvorbě extruze musíme dosáhnout vysokých teplot pro smísení léčiva

s polymerem. V ideálním případě dostaneme léčivo rovnoměrně rozptýlené v polymeru, což zvyšuje stabilitu extruze. [7, 12]

Třetí nejčastější technikou je příprava amorfních léčiv pomocí sprejového sušení. Produkt má vysoký specifický povrch a nízkou objemovou hustotu. Produkt je méně homogenní než z HME. Metoda je však vhodná i pro termolabilní léčiva, jelikož trvá krátkou dobu, nedojde k teplotní degradaci léčiva. [7, 12]

Mezi další techniky přípravy, pomocí nichž lze ovlivnit stabilitu léčiv, patří příprava koamorfních směsí dvou léčivých látek. Nejstabilnější jsou, dle studií, takové směsi, které obsahují amorfni léčivé látky v poměru 1:1 či 1:1,5. [7]

Připravit můžeme také pevné polymerní disperze. Smícháním léčiva s polymerem dojde ke zpomalení či k úplné inhibici krystalizace léčiva, jelikož má polymer větší afinitu k vlhkosti než léčivo. Mezi nejpoužívanější polymery patří hydroxypropylmethylcelulóza (HMPC), polyvinylpyrolidon (PVP), močovina, lze použít rovněž různé cukry nebo polyethylenglykol (PEG). [7]

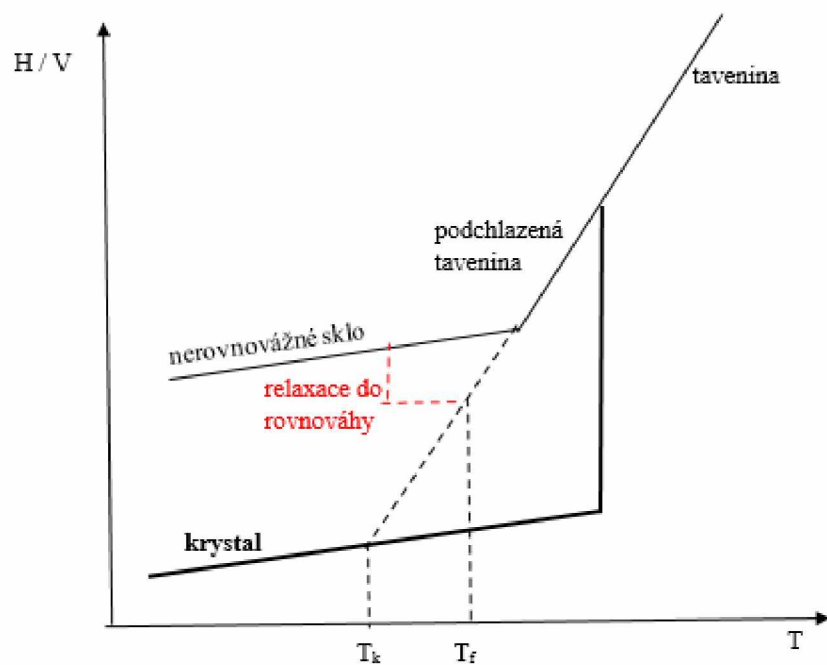
Amorfni léčivo můžeme také zabudovat do mezoporézního materiálu, jímž může být křemík, oxid křemičitý či křemičitany. Dojde tak k přechodu léčiva do stavu s nižší volnou energií, a tak ke zvýšení jeho stability. Nežádoucí krystalizaci totiž brání nejen energeticky stabilnější stav, tak i to, že je prostor v póru omezen a nedojde zde k tvorbě kriticky velkého nuklea potřebného pro zahájení krystalizace. [7]

### **1.3.1.2. Ovlivnění stability amorfního léčiva pomocí způsobu skladování**

Způsob skladování má velký vliv na stabilitu amorfního léčiva.

Pro zvýšení stability můžeme léčiva skladovat například v průtoku suchého dusíku a v prostorech s nízkým obsahem vlhkosti. Vhodné je také skladování při teplotě o 50 K nižší, než je teplota skelného přechodu  $T_g$  daného léčiva, kdy má většina léčiv omezenou molekulovou pohyblivost. Některé však krystalizují i při těchto podmínkách, a tak bylo navrženo skladování při Kauzmannově teplotě  $T_k$ .  $T_k$  je teplota, která je na průsečíku extrapolované rovnovážné křivky podchlazení taveniny a křivky krystalu (Obrázek 3). Tyto podmínky umožňují i dlouhodobé skladování léčiv, avšak pouze pro teoretickou přechlazenou kapalinu, která je v rovnováze se svým okolím. [7, 12, 13]

Pro reálná skla byla navržena fiktivní teplota skladování  $T_f$ . Při  $T_f$  má amorfni látka stejnou strukturou, entalpii, jakou má rovnovážná podchlazená tavenina. Obě posledně zmíněné teploty skladování jsou zobrazeny v Obrázku 3. [7, 12, 13]



Obrázek 3: diagram znázorňující Kauzmannovu a fiktivní teplotu skladování léčiva

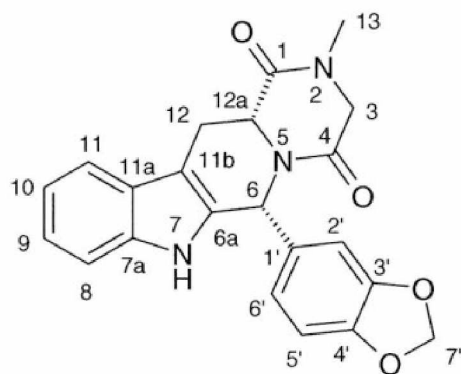


## 1.4. Tadalafíl

Tato diplomová práce je zaměřena na studium růstu krystalů a rozpustnosti léčivé látky tadalafíl 1 (TADA). V další části této práce je shrnuto využití v medicíně a vlastnosti TADA.

TADA byl poprvé registrován na Úřadě pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) ve Spojených státech amerických pod obchodním názvem Cialis<sup>®</sup> v roce 2003. [14] Od té doby je po téměř celém světě užíván při léčbě erektilní dysfunkce. Později se tadalafíl začal používat i pro úlevu od příznaků nemoci dolních močových cest spojené s tzv. benigní hyperplazií prostaty. Princip účinku toho léčiva spočívá ve vratné inhibici fosfodiesterázy typu 5 (PDE 5), která je specifická pro cyklický guanosin-monofosfát (cGMP). [15]

TADA je bílá krystalická látka s bodem tání 301 °C [16, 17] a má heterocyklickou chemickou strukturu, Obrázek 4. [18]



Obrázek 4: strukturní vzorec tadalafílu [18]

Jelikož TADA obsahuje dvě chirální centra v konfiguraci 6R, 12aR, jedná se o opticky aktivní sloučeninu. V Tabulce 1 jsou zobrazeny zjištěné hodnoty specifické otáčivosti pro vzorek TADA. [18]

Tabulka 1: specifická otáčivost tadalafílu [18]

látka	specifická otáčivost [°]
tadalafíl	+71
(-)-tadalafíl	-71
(+)-trans-tadalafíl	+297
(-)-trans-tadalafíl	-293

Charakteristické vlastnosti TADA obsahuje Tabulka 2 a farmakokinetické vlastnosti Tabulka 3.

Tabulka 2: charakteristické vlastnosti tadalafilu

molekulová hmotnost [19]	389,41 g/mol
hustota [20]	1,375 g/cm <sup>3</sup> (při T = 19,85 °C)
teplota skelného přechodu $T_g$ [21]	147 °C
teplota tání $T_m$ [17]	301 °C
$\Delta H_{\text{tání}}$	103,39 J/g (měřeno v této práci) 114,52 J/g [22]
rozpustnost ve vodě [21]	málo rozpustný (3 mg/l)
rozpustnost v methanolu [15, 23]	mírně rozpustný
pKa [24]	16,68
distribuční koeficient oktanol/voda [24]	2,5
počet krystalických polymorfů [24]	4

Tabulka 3: farmakokinetické vlastnosti TADA

zdánlivý distribuční objem léčiva [15]	63 l
distribuce léčiva [15]	především do tkání
$c_{\text{max}}$ dosaženo [25]	za 2 hodiny
navázání léčiva v těle [15]	na plazmatické proteiny
metabolizace pomocí [15]	cytochrom P450
eliminační poločas [15, 25]	17,5 h
clearance [15]	2,5 l/h

Limitující vlastností léčiva TADA je jeho velmi špatná rozpustnost ve vodě. Patří do II. třídy dle bioklasifikačního systému léčiv (BCS) – léčivo s nízkou rozpustností, a naopak vysokou gastrointestinální prostupností (permeabilita). [26] Do této třídy léčiv spadá až 40 % léčivých látek, jež se užívají ústy. [27] Léčiva s těmito vlastnostmi jsou pro organismus špatně biologicky dostupná, proto se vědci celého světa zabývají zvýšením jejich rozpustnosti. Z hodnoty  $pK_a$  (16,68) a hodnoty distribučního koeficientu oktanol/voda (2,5) plyne, že je léčivo tadalafil ionizované v rozmezí fyziologického pH. Ionizace a ani tvorba solí tedy nejsou vhodnou technikou pro zvýšení rozpustnosti. Vhodnějším způsobem pro zvýšení rozpustnosti je například amorfizace léčiva. [24]

Studiem krystalizace a disolučních vlastností tadalafilu se zabývali například v roce 2018 čínští vědci. Vědomi si toho, že je toto léčivo možné připravit v amorfní formě, tak i ve 4 polymorfních formách, sledovali vliv polymorfismu na krystalizaci, stabilitu a rozpustnost léčiva. [24]

Pomocí skenovacího elektronového mikroskopu zjistili, že v jednotlivých polymorfních formách rostou krystaly jiného typu, což může ovlivňovat biologickou aktivitu léčiva. [24]

Při dlouhodobé studii stability, při níž bylo amorfní léčivo skladováno po dobu 3 měsíců při laboratorní teplotě, vědci přišli na to, že léčivo zůstalo téměř bez změn, nebo částečně zakrystalizovalo do formy TADA-I. Můžeme si to vysvětlit tím, že má TADA poměrně vysokou hodnotu  $T_g$ ,  $T_g$  je 147 °C, a v této formě jsou molekuly léčiva málo mobilní a samovolná krystalizace je tak dobře inhibována. Zvýšením teploty nad  $T_g$  však mobilita molekul roste a nukleace a následná krystalizace je naopak urychlena. [21, 24]

Během disolučního testu rozpustnosti léčiva ve vodě vědci zjistili, že má léčivo v amorfní formě 6–9krát lepší rozpustnost než léčivo v kterékoliv z krystalických polymorfních forem. Lepší rozpustnost je způsobena například tím, že je povrch amorfního léčiva mnohem lépe hydratován okolní vodou než látka v krystalické podobě. Rychlost rozpouštění pak byla u jednotlivých krystalických polymorfů téměř stejná, v rozmezí 0,0011–0,0017 min<sup>-1</sup> a pro amorfní léčivo 0,0042 min<sup>-1</sup>. Během disoluční studie bylo také zjištěno, že jednotlivé polymorfní formy nejsou zcela stabilní a dochází k transformaci polymorfů TADA-II, III a IV na typ polymorfu TADA-I, jenž je nejstabilnější. Amorfní léčivo zůstalo ve stejné podobě po celou dobu testu. Ze studie plyne, že je vhodné v komerčně dostupných přípravcích obsahujících TADA v krystalické formě, používat léčivo ve formě polymorfu TADA-I. [24]

## 1.5. *In vitro* disoluční studie

Disoluční studie jsou vhodné pro zjištění rychlosti a mechanismu uvolňování léčivé látky z pevné lékové formy (například tablety, tobolky, dražé, kapsle) v disolučním médiu v závislosti na čase. Používají se také k hodnocení kvality léčivých přípravků, odhadu biodostupnosti a tzv. bioekvivalence (shody účinku) generických léčiv s originálními léčivy. Pomocí disoluce můžeme získat i tzv. rozpouštěcí profil léčiva v různých podobách - amorfni/krytalické, nebo také mnohé farmakokinetické vlastnosti léčiv v pevné formě. [28]

Český lékopis rozlišuje čtyři typy základní uspořádání aparatury pro *in vitro* disoluční test, a to uspořádání s pádly, košíčky, případně s vrtaným válcem nebo průtokovou celou. Navrhuje také složení disolučního média, aby bylo svým pH, iontovou silou a přítomností enzymů srovnatelné se simulovanou oblastí trávicího traktu, kde bude léčivo vstřebáváno. [28] Důležité je také brát zřetel na objem disolučního média, na jeho teplotu, viskozitu, osmotický tlak či přítomnost povrchově aktivních látek. [29] Mezi další faktory disoluční studie patří rychlost otáček míchadla/košíčků a časové intervaly odběru disolučních vzorků. Tyto parametry je nutné optimalizovat v souladu s fyzikálně-chemickými vlastnostmi testované lékové formy. [28]

Vzorky disolučního média bývají odebírány ručně, zejména pokud se jedná o odběr malého počtu vzorků v širokých časových intervalech. V případě většího počtu odběrů je vhodné použít automatický odběr vzorku média pomocí čerpadla. Objem odebraného disolučního vzorku lze kompenzovat náhradou za čerstvé disoluční médium, případně je nezbytné ve výpočtu koncentrace uvolněného množství účinné látky provést korekci. Odebrané disoluční vzorky jsou filtrovány, a to obvykle již během samotného odběru. Detekce uvolněného množství léčiva je nejčastěji prováděna pomocí UV-VIS spektrofotometrie nebo například pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (s UV-VIS detekcí). [28]

### 1.5.1. Vyhodnocení disoluční studie

Výsledkem disolučního testu je tzv. disoluční profil, závislost množství rozpuštěného (uvolněného) léčiva na čase. Statistickým zpracováním a nelineární regresní analýzou lze získat cenné informace týkající se mechanismu uvolňování léčiva z lékové formy. Pro tyto účely je vhodný například program Origin či GraphPad Prism a další [28].

Prvním krokem při vyhodnocení disolučního profilu, je posouzení tvaru křivky. Jestliže je její průběh lineární, uvolněné množství léčiva lineárně roste s časem, je vhodné použít lineární regresi. Model kinetiky 0. řádu vyjadřuje rovnice 10 [29]:

$$M_t = k_0 \cdot t \quad (10),$$

kde  $M_t$  značí množství uvolněného (rozpuštěného) léčiva z lékové formy v čase  $t$ ,  $k_0$  je rychlostní konstanta 0. řádu a má rozměr množství léčiva·čas<sup>-1</sup>.

Pokud disoluční profil prochází počátkem na ose x, ale neprotíná nulovou hodnotu na ose y, je tedy přítomen tzv. „burst efekt“, dochází na počátku testu k rychlejšímu uvolňování léčiva než v dalším průběhu, můžeme použít rovnici 11 vyjadřující model kinetiky 0. řádu s „burst efektem“ [29]:

$$M_t = k_0 \cdot t + b \quad (11),$$

kde  $b$  značí „burst efekt“.

Pokud nedojde k vhodnému proložení dat modely kinetiky 0. řádu, je vhodné použít model kinetiky I. řádu, rovnice 12:

$$M_t = M_\infty \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \quad (12),$$

kde  $M_t$  značí množství uvolněného (rozpuštěného) léčiva z lékové formy v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je maximální uvolnitelné (rozpusťitelné) množství léčiva z lékové formy,  $k_1$  je rychlostní konstanta I. řádu s rozměrem čas<sup>-1</sup>. [29]

Jestliže nelze spolehlivě proložit disoluční profil modely kinetiky 0. či I. řádu, znamená to, že v případě uvolňování (rozpuštění) našeho léčiva z lékové formy do disolučního média dochází k rozpuštění jiným mechanismem, například difúzí nebo erozí, případně kombinací více mechanismů rozpuštění. Při vyhodnocení je pak vhodné použít jiné kinetické modely.

Jedním z nich je model Weibullův, pomocí něhož můžeme jednoznačně potvrdit či vyvrátit přítomnost „burst“ či „lag time“ efektu při rozpuštění našeho léčiva. Pokud je přítomen „burst efekt“, dochází na počátku testu k rychlejšímu uvolňování léčiva než v dalším průběhu. Přítomnost „lag time“ se vyznačuje tím, že dochází k uvolňování léčiva z lékové formy až po uplynutí určité doby od zahájení disolučního testu, např. až po dvou hodinách, a ne již od úplného počátku testu. [29]

Rovnice 13 vyjadřuje Weibullův model v základním tvaru, rovnice 14 pak tvar rozšířený o zmíněné efekty. [29]

$$M_t = M_\infty \cdot (1 - e^{-k_W \cdot t^\beta}) \quad (13),$$

kde  $k_W$  označuje konstantu Weibullova modelu s rozměrem čas<sup>-β</sup> a parametr  $\beta$  charakterizuje tvar exponenciální křivky.

$$M_t = M_\infty \cdot (1 - e^{-k_W \cdot (t-t_i)^\beta}) \quad (14),$$

kde  $t_i$  vyjadřuje časovou prodlevu, než dojde k uvolňování (rozpuštění) léčiva od počátku disolučního testu.

Jestliže je hodnota  $t_i$  záporná, je prokázán tzv. „burst efekt“, pokud je hodnota  $t_i$  kladná, je prokázán „lag time“. Jestliže zjistíme, že je parametr  $\beta$  roven 1 a zároveň je časová prodleva  $t_i$  nulová, mohli bychom naše data formálně proložit i modelem kinetiky I. řádu. [29]

V případě, že chceme znát mechanismus uvolňování léčiva, použijeme model Korsmeyer-Peppasův, buďto v základním tvaru, rovnice 15, nebo ve tvaru s „burst efektem“, rovnice 16:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t^n \quad (15),$$

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t^n + b \quad (16),$$

kde  $k_{KP}$  je konstanta s rozměrem  $\text{čas}^{-n}$ ,  $n$  je parametr Korsmeyer-Peppasova modelu, z jehož hodnoty můžeme odhadnout transportní mechanismus léčiva z lékové formy a  $b$  je „burst efekt“. Důležité je říci, že tento model je použitelný pouze pro data do 60 % maximálního rozpuštěného množství léčiva z lékové formy. [29]

Hodnoty  $n$  a druh mechanismu uvolňování léčiva dle druhu tvaru zkoumaného léčiva, jsou uvedeny v Tabulce 4. [29]

Tabulka 4: hodnoty parametru  $n$  dle tvaru zkoumaného léčiva, mechanismus rozpouštění [29]

$n$			mechanismus uvolňování léčiva
tenká vrstva	cylindrická geometrie	kulová geometrie	
0,5	0,45	0,43	Fickova difúze
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Anormální transport (eroze+difúze)
1	0,89	0,85	Case-II transport (rozvolnění, změna struktury)

Pakliže je z hodnoty  $n$  patrný jako mechanismus rozpouštění Fickova difúze, můžeme ji ověřit pomocí Higuchiho modelu, rovnice 17. Pokud tento model spolehlivě prokládá naše data, je prokázána Fickova difúze.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad (17),$$

kde  $k_H$  je tzv. Higuchiho konstanta s rozměrem  $\text{čas}^{-0,5}$ . Součástí této konstanty je i difúzní plocha, difúzní koeficient léčiva a také počáteční koncentrace léčiva či rozpustnost léčiva, nejedná se tedy o rychlostní konstantu jako takovou. [29]

## 2. Experimentální část

V experimentální části mé diplomové práce se budeme zabývat způsobem přípravy amorfních vzorků pro studium růstu krystalů a stability léčiva tadalafilu. Také technikou, jež byla použita pro analýzu a vyhodnocení rychlosti růstu krystalů s ohledem na dlouhodobou stabilitu amorfního léčiva.

Budeme se zabývat rovněž způsobem přípravy vzorků a disoluční studií, pomocí níž byl sledován vliv amorfní/krystalické fáze léčiva na jeho rozpustnost. Součástí experimentální části je také vyhodnocení testů rozpustnosti.

### 2.1. Studium růstu krystalů s ohledem na dlouhodobou stabilitu amorfního léčiva

#### 2.1.1. Příprava vzorků pro studium růstu krystalů a stabilitu léčiva

Pro přípravu vzorků tadalafilu (TADA) (>97 % čistoty HPLC, Acros Organics) byl použit temperační stolek s termočlánkem, Obrázek 5. Byl vyhřátý nad teplotu tání tadalafilu ( $T_m \approx 301 \text{ °C}$ ), konkrétně na teplotu  $360 \text{ °C}$ . Do hliníkového kelímku byla vložena čistá podložní sklíčka, na ně nasypáno malé množství krystalického vzorku TADA. Sklíčka se vzorkem byla překryta druhým kelímek a oba byly vloženy na kelímek, jež byl vyhřát na temperačním stolku. Vzorky byly taveny po dobu jedné minuty a následně prudce zchlazeny na kovovém bloku, čímž byl získán TADA v amorfní formě. Jednotlivá sklíčka se vzorkem byla rozřezána na několik částí a analyzována.

Polovina vzorků byla skladována v lednici při teplotě  $1\text{--}3 \text{ °C}$  a vlhkosti RH 37 % a druhá část vzorků v exsikátoru při laboratorní teplotě  $24\text{--}26 \text{ °C}$  a vlhkosti RH 17 %.





Obrázek 5: temperační stolek s kelímkem a termočlánkem

## 2.1.2. Mikroskopie

Studie růstu krystalů v amorfním TADA byla provedena pomocí optického mikroskopu OLYMPUS BX51 s kamerou DP72 a se zabudovaným temperačním stolkem Linkam, Obrázek 6. Všechny vzorky byly pozorovány tzv. in-situ, během temperace, za průchodu světla.

Jednotlivé vzorky byly temperovány v temperačním stolku podle teplotního programu nastaveného v programu LINKSYS 32. K co nejrychlejšímu dosažení zvolené teploty experimentu byla nastavena rychlost ohřevu 150 °C/min. Po celou dobu měření pak byla zvolená hodnota teploty udržována konstantní.

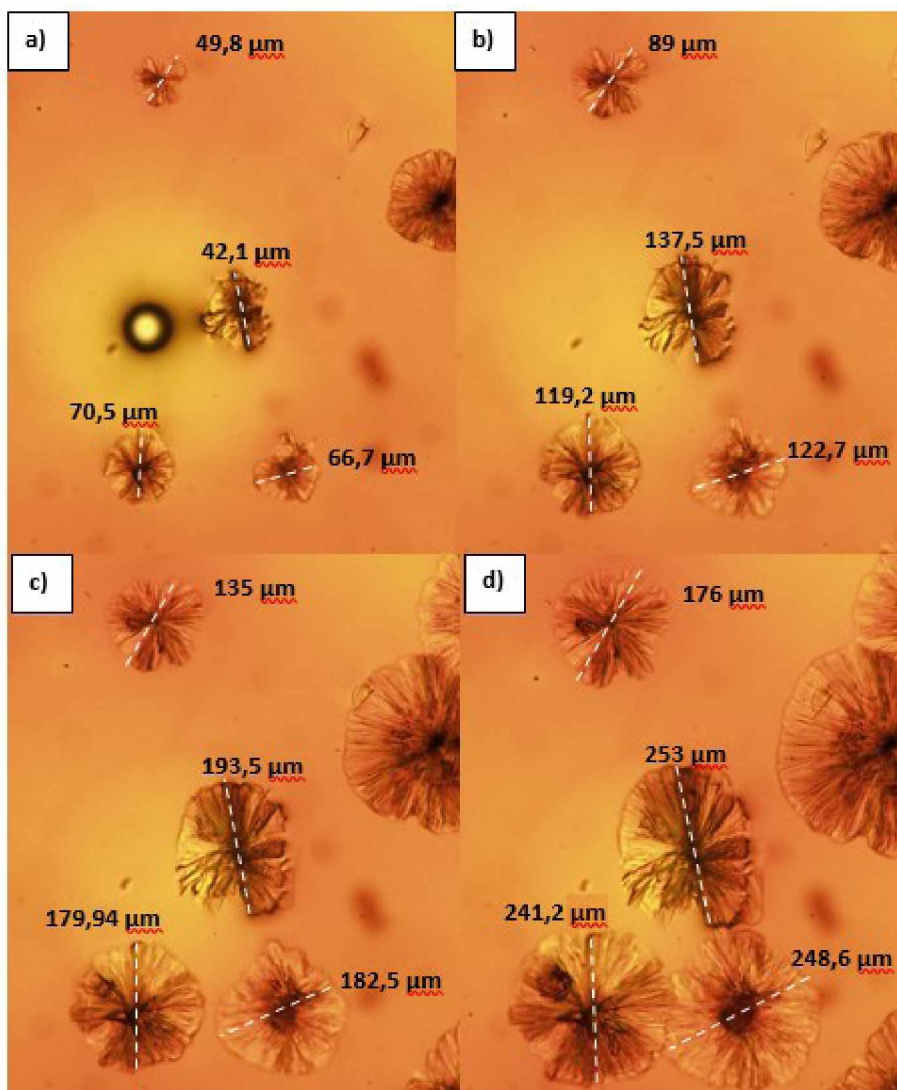
Proces krystalizace v amorfním TADA byl sledován v intervalu teplot 160–250 °C. Byl pozorován také vliv „stáří“ vzorku, 0–6 měsíců, a způsobu skladování na krystalizaci amorfních vzorků. V průběhu zahřívání vzorku při zvolené teplotě byl vzorek snímán kamerou. S využitím programu QuickPHOTO Industrial 2.3. byly dle nastaveného časového intervalu pořizovány snímky rostoucích krystalů. V závislosti na teplotě experimentu se měnila doba potřebná k zakrystalizování vzorku. Pro teploty nad 200 °C stačilo pár vteřin, pro experiment prováděný při teplotě 160 °C byly potřeba 2 hodiny.



*Obrázek 6: optický mikroskop OLYMPUS BX 51 se zabudovanou kamerou DP72 a temperačním stolkem Linkam*

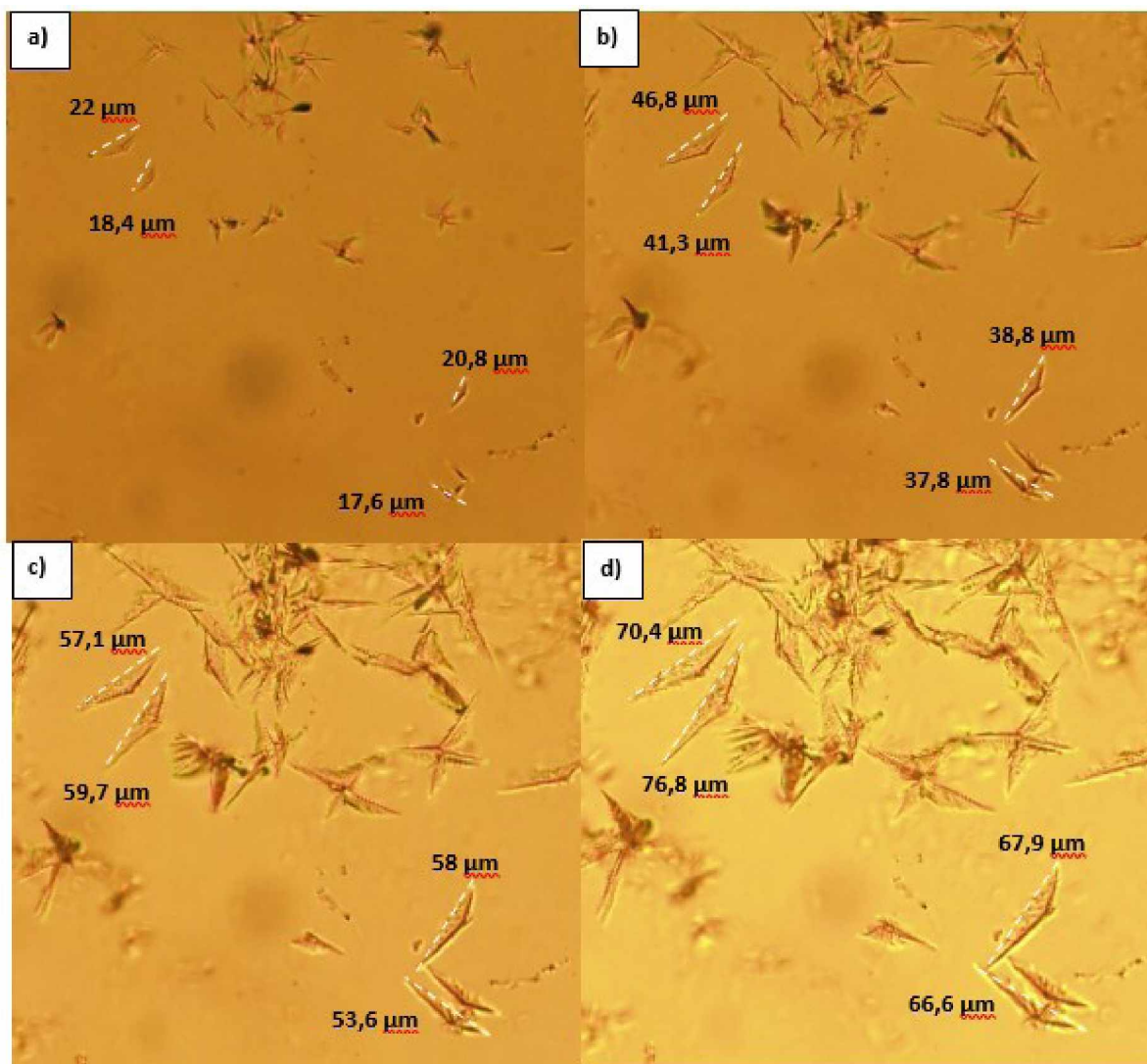
### 2.1.3. Vyhodnocení rychlosti růstu krystalů

Růst krystalů byl sledován v průběhu temperace vzorků. Pro každé měření při dané teplotě bylo vybráno obvykle 10 snímků zachycujících celý proces krystalizace. Snímky byly následně vyhodnoceny pomocí programu Image J. Pokud docházelo k růstu dvou typů krystalů, rostly krystaly kulaté a lineární (Obrázky 7 a 8), byly na snímcích vybrány vždy alespoň 4 krystaly od každého typu. Byla měřena velikost vybraných krystalů v závislosti na čase. Velikost krystalu byla měřena pomocí úsečky, jako délka lineárního, případně jako průměr u kulatého krystalu. Velikosti krystalů byly vyneseny do grafu v závislosti na čase temperace. Lineární část růstu krystalů byla proložena přímkou. Rychlost růstu krystalů je v rovnici uvedena jako hodnota směrnice. Snímky kulatých krystalů tadalafilu při 100násobném zvětšení a teplotě 210 °C v čase a) 80 s, b) 110 s, c) 140 s a d) 170 s od zahájení experimentu a názornou ukázkou měření velikosti kulatých krystalů zachycuje Obrázek 7.



Obrázek 7: snímky kulatých krystalů ve vzorku při teplotě 210 °C a 100násobném zvětšení v čase: a) 80, b) 110, c) 140 a d) 170 sekund od začátku měření a názorná ukázkou měření velikosti krystalů

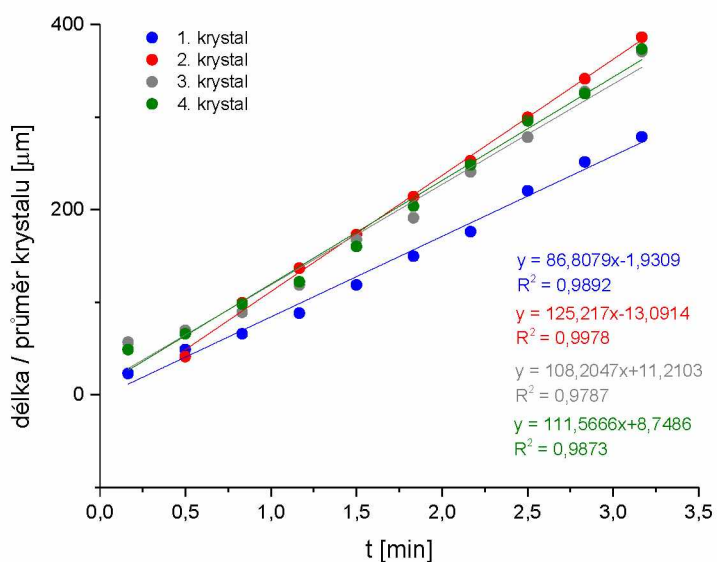
Snímky lineárních krystalů ve vzorku tadalafilu, který byl skladován půl roku v lednici, při 200násobném zvětšení a teplotě 190 °C v čase a) 100 s, b) 200 s, c) 300 s a d) 400 s od zahájení experimentu a názornou ukázkou měření velikosti těchto lineárních krystalů zachycuje Obrázek 8.



Obrázek 8: snímky lineárních krystalů ve vzorku při teplotě 190 °C a 200násobném zvětšení v čase: a) 100, b) 200, c) 300 a d) 400 sekund od začátku měření a názorná ukáзка měření velikosti krystalů

Pokud by ve vzorku rostly zároveň kulaté i lineární krystaly, byla by rychlost růstu určena pro každý druh zvlášť.

Obrázek 9 zobrazuje grafickou závislost velikosti krystalů na době temperace vzorku při teplotě 210 °C a 100násobném zvětšení. Každý krystal byl měřen zvlášť a hodnoty vyneseny do grafu a následně proloženy přímkou. Směrnice této přímky zachycuje rychlost růstu krystalu. Výsledná rychlost růstu pro zvolenou teplotu experimentu byla vypočtena jako průměrná hodnota ze 4 hodnot pro 4 různé měřené krystaly.



Obrázek 9: lineární grafická závislost velikosti krystalů na době temperace při teplotě 210 °C

## 2.2. *In vitro* disoluční studie rozpustnosti léčiva

### 2.2.1. Příprava vzorků pro disoluční studie

Amorfní vzorek tadalafilu byl připraven roztavením krystalického prášku TADA (>97 % čistoty HPLC, Acros Organics) v hliníkovém kelímku na plotýnce nahřáté na 360 °C, kde se taval po dobu 1 min a následně byl kelímek s obsahem prudce zchlazen na kovovém bloku. Amorfní vzorek, Obrázek 10, byl z kelímku seškrábnut, rozetřen v třecí misce s tloučkem, převeden do mikrozkušavky a zvážen, Obrázek 11.



*Obrázek 10: amorfní vzorek TADA*

Zakryštalizovaný vzorek byl připraven z amorfního vzorku, kdy byl kelímek se vzorkem rozstříhán na malé čtverečky a umístěn na 70 min do pícky předehřáté na 190 °C. Úplné zakryštalizování vzorku bylo ověřeno pomocí optického mikroskopu. Vzorek byl seškrábnut, rozetřen v třecí misce s tloučkem, převeden do mikrozkušavky a zvážen, Obrázek 12.



Obrázek 11: amorfni vzorek TADA



Obrázek 12: zakrytalizovaný TADA připravený z amorfniho vzorku

### 2.2.2. *In vitro* disoluční studie

TADA patří do třídy BCS II, do skupiny špatně rozpustných léčiv. [26] Hodnota jeho rozpustnosti ve vodě se pohybuje kolem 3 mg/l. [21]

Rozpustnost léčiva TADA byla studována pomocí disoluční aparatury SOTAX AT7 Smart (Obrázek 13) v uspořádání s pádly. Jako disoluční médium byla zvolena redestilovaná voda o teplotě 37 °C a rychlost otáček pádel byla nastavena na 75/min. Odběry vzorků byly časově rozvrženy tak, aby pokryly celý čas disoluce.

Studie byla provedena pro tři typy vzorku: krystalický TADA od výrobce, amorfni vzorek připravený roztavením a rychlým zchlazením, a také zakrytalizovaný amorfni vzorek. Byly porovnány výsledky všech vzorků a zjištěna míra vlivu amorfizace pro zlepšení rozpustnosti TADA ve vodě.

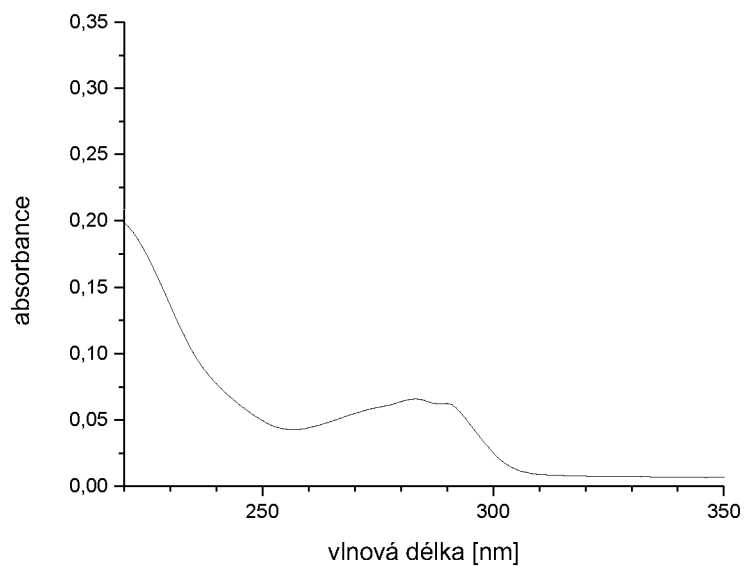


*Obrázek 13: disoluční aparatura SOTAX AT7 Smart*

### **2.2.3. Stanovení rozpuštěného množství léčiva**

Abychom mohli pomocí UV-VIS spektrofotometru měřit absorbance jednotlivých odebraných vzorků disolučního média, je nejprve nutné změřit absorpční křivku léčiva TADA. Pro měření absorpční křivky je nezbytné připravit zásobní roztok léčiva. Roztok byl připraven rozpuštěním 3 mg TADA v litru redestilované vody a ponechán v ultrazvuku s vodní lázní o teplotě 37 °C po dobu cca 24 h, pro důkladné rozpuštění léčiva. Následně bylo proměřeno absorpční spektrum TADA, Obrázek 14. Ve spektru je patrné absorpční maximum TADA na hodnotě vlnové délky 283 nm a také dva sedlové body na vlnové délce 257 nm a 320 nm.





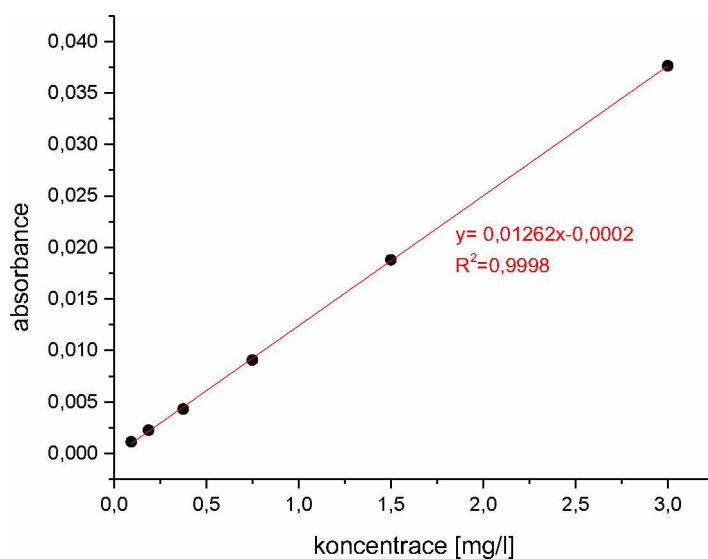
Obrázek 14: naměřená absorpční křivka tadalafilu

Pro stanovení rozpuštěného množství léčiva ve vzorku disolučního média potřebujeme znát rovnici kalibrační přímky, která nám umožní naměřené hodnoty absorbance přepočítat na koncentraci léčiva.

Ze zásobního roztoku o koncentraci 3 mg/l byla připravena řada kalibračních roztoků o koncentraci:

- 3 mg/l
- 1,5 mg/l
- 0,75 mg/l
- 0,375 mg/l
- 0,1875 mg/l
- 0,09375 mg/l.

Pro měření absorbance s tříbodovou korekcí pozadí, byla zvolena vlnová délka absorpčního maxima zjištěná z absorpční křivky, 283 nm, a dva sedlové body 257 nm a 320 nm. Absorbance vzorků byla měřena v intervalu 200–400 nm. Následně byla sestrojena grafická závislost absorbance-koncentrace a zjištěna rovnice kalibrační přímky, potřebná pro vyhodnocení dílčích studií, Obrázek 15.



Obrázek 15: kalibrační přímka TADA

Absorbance byla poté pro každý vzorek přepočtena pomocí rovnice kalibrační přímky na koncentraci rozpuštěného léčiva v objemu média a sestrojena grafická závislost koncentrace-čas disoluce. Jednotlivé grafické závislosti pro konkrétní druh vzorku byly následně proloženy Weibull modelem (rovnice 13) a stanoveny hodnoty jeho parametrů  $M_{\infty}$ ,  $\beta$  a  $k_W$ .

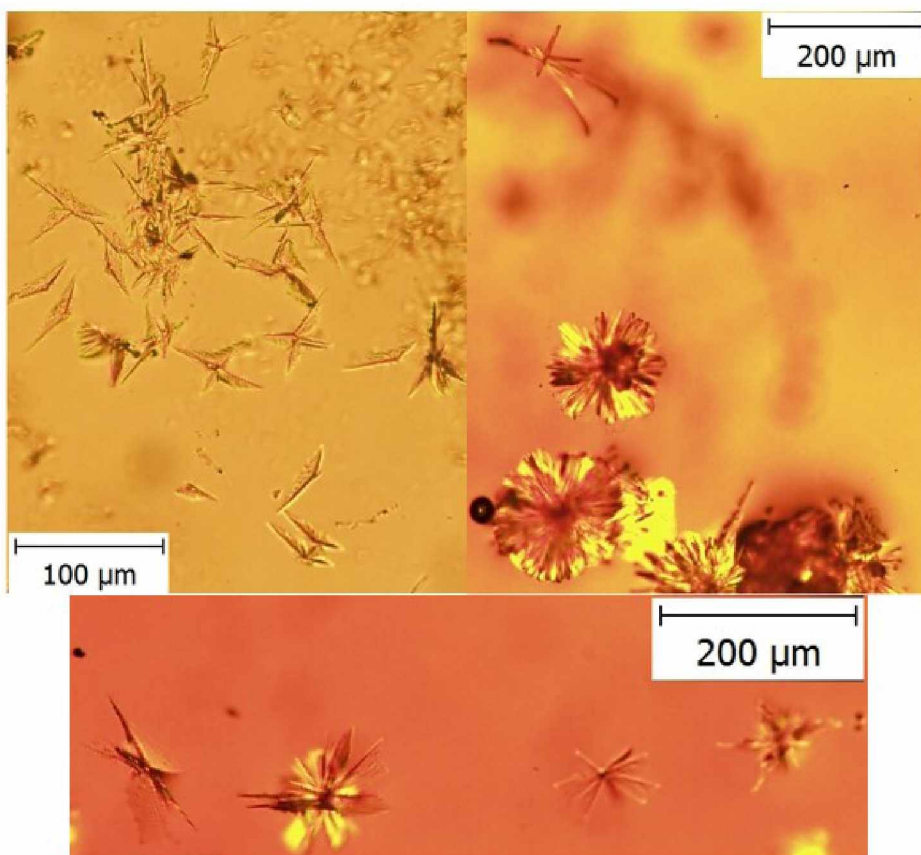
### 3. Výsledky a diskuze

#### 3.1. Rychlost růstu krystalů

S využitím optického mikroskopu a jeho příslušenství byl sledován proces krystalizace v amorfních vzorcích TADA a velikost krystalů v závislosti na čase. Rovněž byla sledována stabilita amorfních vzorků v závislosti na stáří a způsobu skladování.

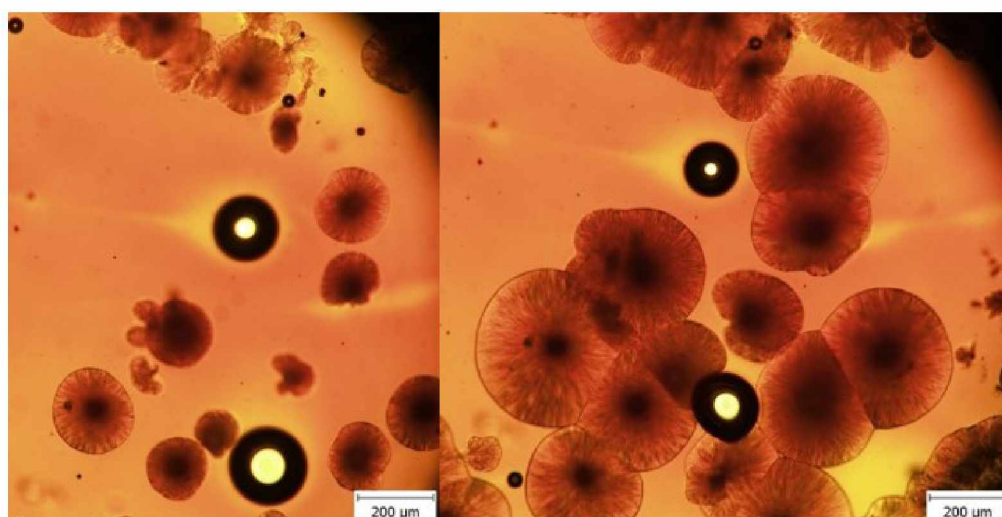
Při experimentech prováděných za nízkých teplot temperace, 160–170 °C, docházelo k pomalému růstu malého počtu nukleí, jež následně rostly. Za vyšších teplot, nad 180 °C, se obvykle v celém objemu vzorku tvořil větší počet krystalů, které rostly rychleji. Občas byl pozorován i růst většího počtu krystalů blízko sebe. To bylo nejspíše následkem přítomnosti např. dislokace nebo rýhy, tzn. že zde bylo energeticky výhodné místo pro růst krystalu. Krystaly pak díky malému prostoru srůstaly ve větší celky a jejich růst byl v průběhu temperace zpomalován i vlivem úbytku materiálu v daném místě.

Přestože byly všechny amorfní vzorky TADA připravovány identickým způsobem, docházelo k tvorbě více typů krystalů. Při teplotě okolo 160 °C rostly krystaly ve tvaru lineárních řetízků či krystaly lineárně větvené. Při vyšších teplotách experimentů (170 °C a více) rostly jak krystaly lineární a lineárně větvené, tak krystaly kulatého tvaru. Někdy však docházelo prvně k tvorbě jednoho typu (obvykle krystaly lineární či lineárně větvené) a následně v průběhu temperace pak ke tvorbě druhého typu (kulaté). Výjimečně rostly krystaly pouze jednoho typu. Zástupce jednotlivých typů krystalů lze vidět na Obrázku 16.



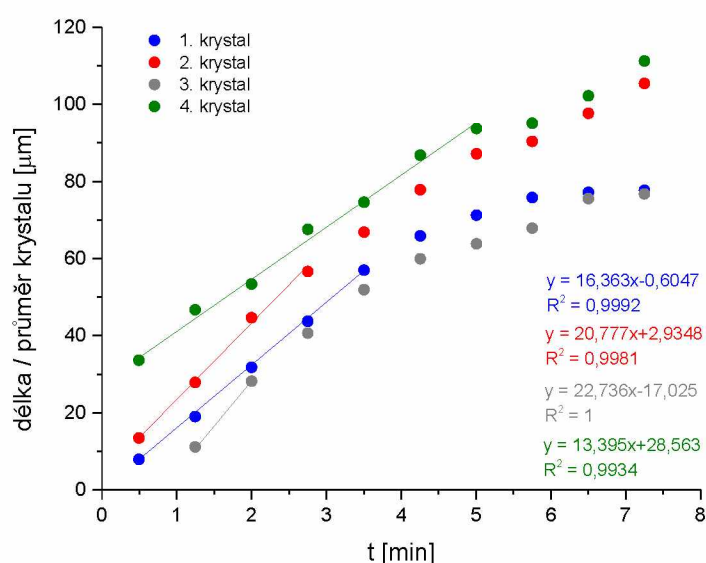
Obrázek 16: lineární, lineárně větvené a kulaté krystaly

V průběhu zahřívání amorfních vzorků TADA občas docházelo k postupnému spojení krystalů, jenž rostly v blízkosti, či k tvorbě velkých shluků, Obrázek 17.



Obrázek 17: tvorba srostlých kulatých krystalů během temperace při teplotě 190 °C

V těchto případech pak bylo možné pozorovat, že krystaly, jejichž změna velikosti byla na počátku experimentu lineární s časem, začaly v průběhu temperace růst pomaleji, resp. změna jejich velikosti s časem již nebyla lineární. Zpomalení růstu si lze vysvětlit například sníženým množstvím amorfního vzorku v blízkosti krystalů. Může to být také následek pomalejší rychlosti přesunu strukturních jednotek na rozhraní krystal-podchlazená tavenina. V případě, že docházelo ke zpomalování rychlosti růstu krystalů, byla rychlost růstu vyhodnocena pouze z nejstrmější lineární části křivky závislosti velikosti krystalu na době temperace, jelikož odpovídá nejvyšší rychlosti růstu krystalů, Obrázek 18.



Obrázek 18: závislost velikosti krystalů při teplotě temperace 190 °C a patrné zpomalení rychlosti růstu

Rychlost růstu krystalů byla sledována a následně vyhodnocována u všech krystalů, přestože docházelo k tvorbě vícero typů krystalů. Hodnoty rychlostí růstu krystalů při daných teplotách byly odečteny z hodnoty směrnice přímky, jež prokládala lineární část závislosti velikosti krystalu na čase.

Data rychlostí růstů krystalů a směrodatné odchylky rychlosti růstu naměřená pro čerstvě připravené vzorky a data naměřená během stárnutí vzorků shrnují Tabulky 5-13.

Tabulka 5: data pro čerstvě připravené vzorky

čerstvě připravené vzorky					
lineární (lin. větvené) krystaly			kulaté krystaly		
T [°C]	u [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ]	u <sub>smodch</sub> [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ]	T [°C]	u [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ]	u <sub>smodch</sub> [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ]
160	0,11	0,04	180	5,36	1,01
160	0,40	0,22	190	7,41	1,49
160	0,91	0,37	190	21,42	4,17
160	1,00	0,18	190	21,96	2,68
170	1,74	0,45	200	14,19	6,92
180	2,32	0,5	200	14,13	5,19
190	4,49	2,47	210	89,36	49,89
190	5,82	1,11	210	130,48	14,72
190	14,47	2,95	210	160,50	39,53
200	14,18	5,55	210	107,95	13,77
200	11,74	3,67	220	184,63	3,51
210	47,00	18,37	220	142,23	29,78
210	51,57	6,67	220	60,99	12,76
210	96,38	20,91	230	318,37	47,36
220	159,59	54,72	230	421,14	88,56
220	94,83	6,03	230	188,24	96,13
220	53,58	13,28	230	112,23	18,36
230	293,05	66,48	240	895,35	64,94
230	171,72	32,76	240	314,78	44,2
240	65,03	9,54	240	934,80	350,52
250	593,71	154,18	250	858,19	203,52
250	392,57	193,73	250	381,20	177,8
250	197,86	63,24	250	436,47	171,7
			250	1029,19	700,96

Tabulka 6: data pro 1 týden staré vzorky

1 týden staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	0,28	0,06	-	
170	0,32	0,24	-	
190	8,74	2,51	11,91	2,90
190	5,51	2,17	-	
210	43,28	3,32	15,54	2,24
210	135,02	12,68	75,24	6,41
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	0,67	0,24	0,83	0,10
170	0,28	0,13	-	
190	9,53	1,31	13,84	1,40
190	6,33	2,53	21,01	5,58
210	51,65	9,93	-	

Tabulka 7: data pro 3 týdny staré vzorky

3 týdny staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	0,96	0,16	1,57	0,28
170	0,26	0,12	-	
190	10,48	2,34	12,62	1,34
190	14,51	2,38	14,03	4,75
210	164,88	11,81	189,87	24,44
210	136,68	5,87	-	
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	-		-	
170	-		-	
190	7,13	3,14	12,21	2,48
190	9,68	1,22	-	
210	58,30	29,71	164,90	18,33
210	-		69,60	25,61

Tabulka 8: data pro 6 týdnů staré vzorky

6 týdnů staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]
170	0,50	0,16	0,35	0,06
170	0,93	0,68	0,98	0,14
190	6,33	1,72	10,23	1,68
190	-		5,39	0,93
210	137,34	21,02	149,16	33,92
210	146,35	34,19	165,21	41,85
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]
170	4,28	1,59	1,02	0,27
170	2,36	0,13	0,96	0,00
190	7,24	1,30	26,32	4,79
190	-		9,39	2,00
210	104,79	34,85	56,85	13,29

Tabulka 9: data pro 7 týdnů staré vzorky

7 týdnů staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]
170	0,86	0,23	0,69	0,35
170	0,33	0,04	0,44	0,27
190	9,45	1,36	11,50	3,35
190	7,06	1,25	11,16	1,80
210	68,80	3,27	103,79	12,27
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodeh</sub> [μm/min]
170	0,44	0,19	0,34	0,08
170	1,30	0,59	0,22	0,00
190	32,61	17,00	14,92	3,04
190	7,83	3,88	-	
210	3,34	0,97	-	
210	153,82	129,19	-	



Tabulka 10: data pro 8 týdnů staré vzorky

8 týdnů staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	0,55	0,28	0,24	0,07
190	2,83	1,16	4,75	1,33
190	2,72	0,75	5,13	0,93
210	80,84	9,49	85,78	15,29
210	162,27	24,24	194,34	30,17
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	-		-	
170	-		-	
190	2,39	1,54	-	
190	5,40	1,79	-	
210	38,71	12,55	-	
210	22,95	6,87	-	

Tabulka 11: data pro 16 týdnů staré vzorky

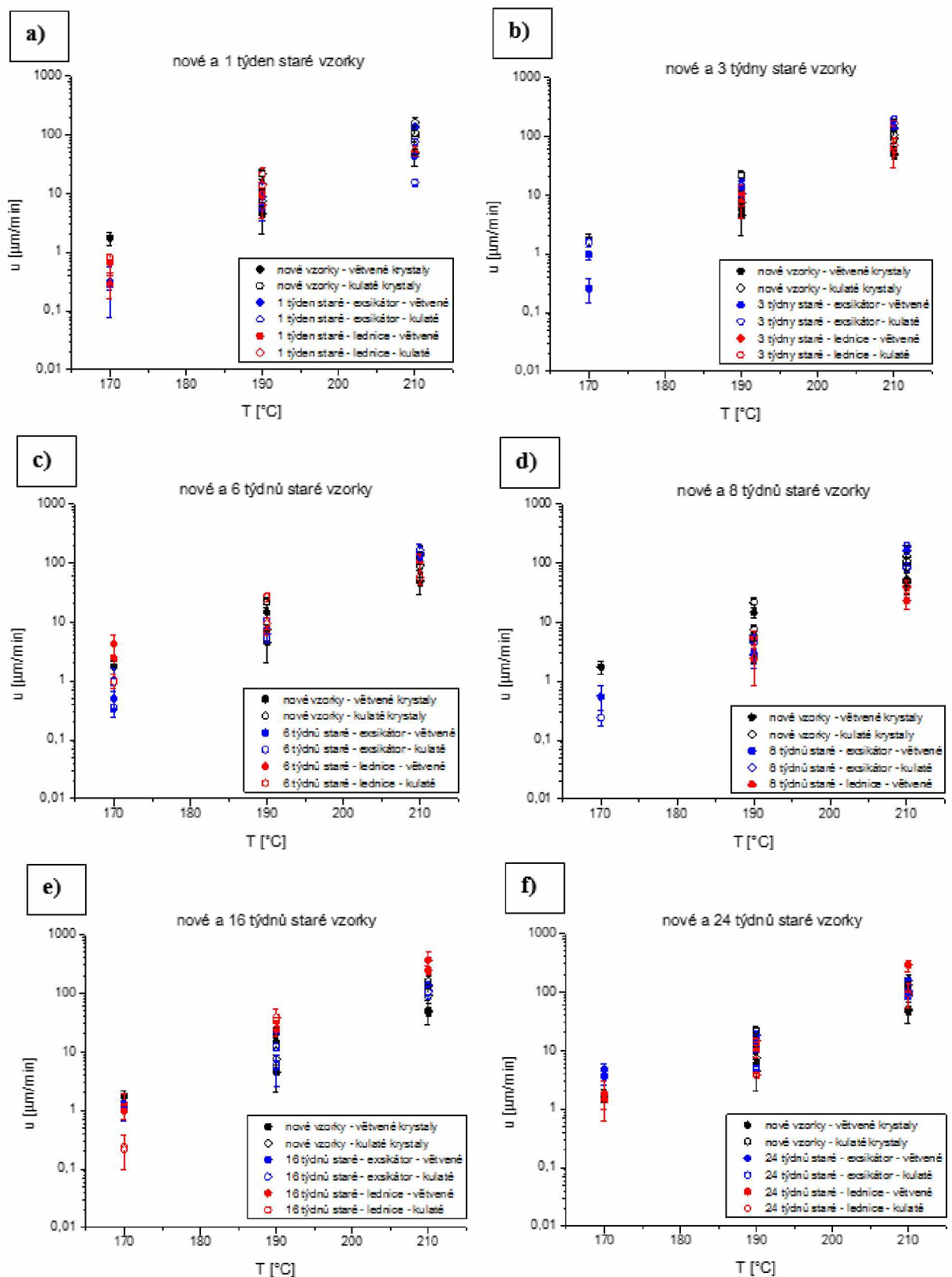
16 týdnů staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	1,08	0,41	1,28	0,10
190	5,57	3,07	12,10	1,81
190	21,36	2,87	6,02	1,02
210	136,75	12,11	112,98	17,63
210	110,35	22,17	102,88	25,70
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	0,99	0,28	0,24	0,14
170	1,30	0,59	0,22	0,00
190	32,90	6,23	38,47	14,26
190	23,90	5,81	-	
210	244,77	43,34	-	
210	366,60	129,33	-	

Tabulka 12: data pro 17,5 týdnů staré vzorky

17,5 týdnů staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	1,26	0,49	1,07	0,51
170	-		0,73	0,08
190	20,70	3,12	8,71	0,40
190	18,14	5,46	10,23	0,90
210	101,82	21,83	112,86	11,82
210	138,32	19,03	108,95	21,93
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	2,71	0,85	3,12	0,83
170	3,06	0,25	-	
190	68,30	15,77	-	
190	32,05	5,67	-	
210	61,67	27,54	-	
210	119,72	21,44	-	

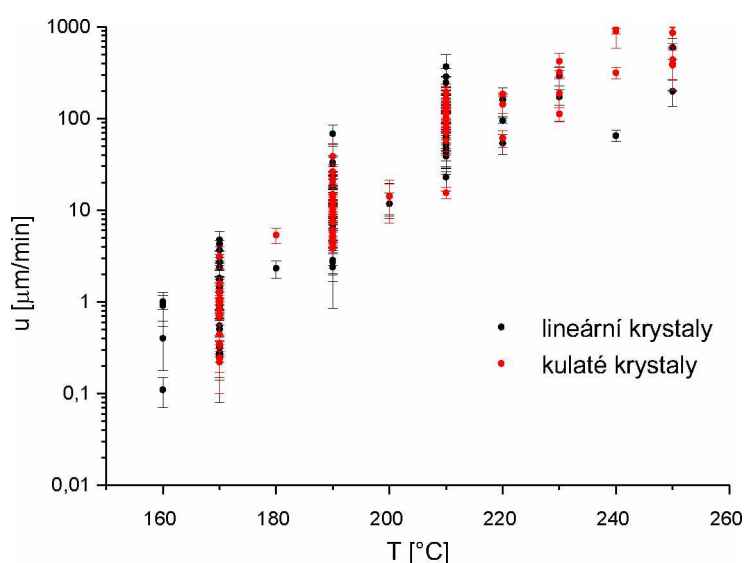
Tabulka 13: data pro 24 týdnů staré vzorky

24 týdnů staré vzorky				
vzorky skladované v exsikátoru				
	lineární (lin. větvené) krystaly		kulaté krystaly	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	4,75	1,11	-	
170	3,66	1,04	-	
190	11,26	1,89	4,81	0,42
190	18,32	3,66	5,27	0,51
210	106,81	27,08	99,50	12,99
210	155,90	22,11	84,29	9,80
vzorky skladované v lednici				
	lineární (lin. větvené)		kulaté	
T [°C]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]	u [μm/min]	u <sub>smodch</sub> [μm/min]
170	1,43	0,44	-	
170	1,82	1,19	-	
190	14,58	2,05	3,80	0,00
190	9,99	2,63	4,07	0,10
210	284,67	65,48	-	
210	95,11	41,33	-	



Obrázek 19: naměřená data pro: a) 1 týdnů, b) 3 týdnech, c) 6 týdnech, d) 8 týdnech, e) 16 týdnech a f) 24 týdnech skladování v exsíkátoru a lednici, v porovnání s daty naměřenými u nových vzorků

Obrázek 19 zobrazuje naměřená data pro nové vzorky v porovnání s daty naměřenými pro: a) 1 týden, b) 3 týdny, c) 6 týdnů, d) 8 týdnů, e) 16 týdnů a f) 24 týdnů staré vzorky. Je nutno říci, že ne vždy docházelo při všech teplotách experimentů k tvorbě obou typů krystalů. Z Obrázku 19 je patrné, že je rozdíl v rychlosti růstu krystalů v dlouhodobě skladovaných a nových vzorcích, s ohledem na směrodatné odchylky, poměrně malý. Vliv způsobu a délky skladování amorfních vzorků je tedy zanedbatelný vzhledem k samotnému rozptylu růstových dat při dané teplotě. Amorfní vzorky léčiva tadalafil lze tedy považovat za poměrně dobře stabilní a veškerá data budou dále analyzována souhrnně.



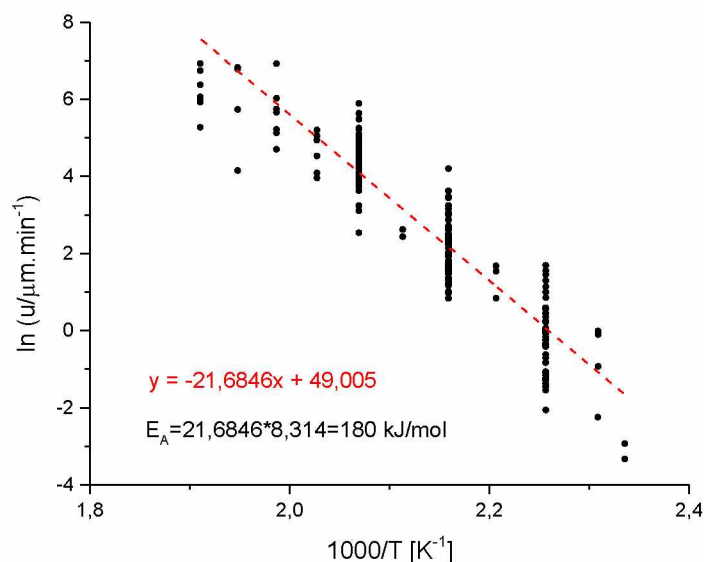
Obrázek 20: všechna naměřená data rychlosti růstu lineárních a kulatých krystalů v závislosti na teplotě temperace

Obrázek 20 zobrazuje všechna naměřená data rychlostí růstu krystalů v závislosti na teplotě temperace během stabilitní studie. Z Obrázku 20 je zřejmý velký rozptyl hodnot rychlostí růstu krystalů, dokonce rozdíl až dvou řádů. Přesná příčina tohoto rozptylu není přesně známa.

První možnou příčinou rozptylu dat by mohly být dva typy rostoucích krystalů. To však nepotvrzuje vizualizace v Obrázku 20, kde je vidět, že jednotlivé typy krystalů mají podobný rozptyl rychlostí růstu. Druhým důvodem by mohl být způsob přípravy amorfních vzorků. Přestože probíhala vždy stejným způsobem, mohlo dojít k drobným odchylkám naneseného množství materiálu na sklíčko, prodloužení či zkrácení doby tavení materiálu, nebo také

k fluktuaci teploty na temperačním stolku. Tyto drobné odchylky by mohly způsobit malou změnu struktury materiálu, například povrchové defekty nebo vyšší pnutí v materiálu, a ovlivnit tak celý proces krystalizace. Vzorky připravené ve stejnou chvíli, které byly podrobeny experimentům při dlouhodobém skladování, však tyto rozptyly dat vykazují také, jak je vidět v Obrázku 19.

Vzhledem k velkému rozptylu dat a tomu, že nebyly pozorovány významné změny v rychlostech růstu krystalů s dobou skladování připravených skelných vzorků, byla všechna získaná růstová data podrobena analýze jako jeden komplexní soubor dat. Z naměřených dat byla dle Arrheniovy rovnice (rovnice 9) vypočtena zdánlivá aktivační energie růstu krystalů, Obrázek 21. Hodnota aktivační energie je  $180 \pm 5$  kJ/mol. Jelikož prací zabývajících se touto problematikou u léčiva tadalafil není mnoho, můžeme tuto hodnotu porovnat například s hodnotou naměřenou v mé bakalářské práci [30], v níž byla hodnota zjištěna v rozmezí 95–182 kJ/mol. Na rozdíl od bakalářské práce zde však nerostlo tolik typů krystalů a nebyl patrný dvojitý trend rychlostí růstu krystalů. To může být způsobeno použitím vstupního materiálu od jiného výrobce a o jiné čistotě.



Obrázek 21: určení aktivační energie růstu krystalů

K analýze růstových dat na základě klasických růstových modelů popsaných v kapitole 1.2.2., je zapotřebí získat povědomí o změně Gibbsovy energie mezi krystalickou a amorfni fází, viskozitě a parametru  $\zeta$ .

Změnu Gibbsovy energie lze dopočítat ze znalosti entalpie tání (103,39 J/g, tato práce) a teploty tání (301 °C [17]) pomocí zjednodušeného Turnbullova modelu, rovnice 18 [31]:

$$\Delta G = \frac{\Delta H_{\text{tání}}(T_m - T)}{T_m} \quad (18).$$

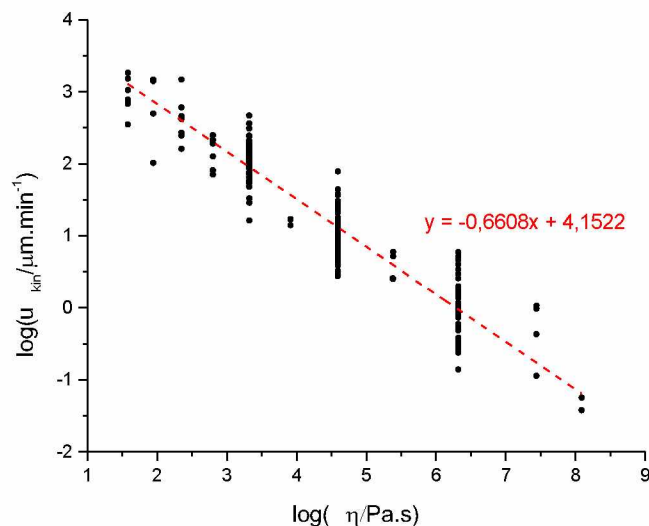
Hodnoty dynamické viskozity byly nalezeny v práci Štefánské [32] a lze je popsat následujícím vztahem:

$$\log \eta = -5 + \frac{1257}{T[\text{K}] - 332,1} \quad (19).$$

Pro zjištění hodnoty parametru  $\zeta$ , jehož hodnotu získáme z poupravené závislosti uvedené v rovnici 8, je nejprve potřeba vypočítat hodnoty kinetického členu rychlosti růstu:

$$u_{\text{kin}} = \frac{u}{1 - e\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)} \quad (20).$$

Sestrojením grafické závislosti logaritmu kinetického členu rychlosti růstu na logaritmu dynamické viskozity a následným proložením dat přímkou, získáme hodnotu parametru  $\zeta$ , jak je zobrazeno na Obrázku 22. Hodnota parametru  $\zeta$  je 0,6608.



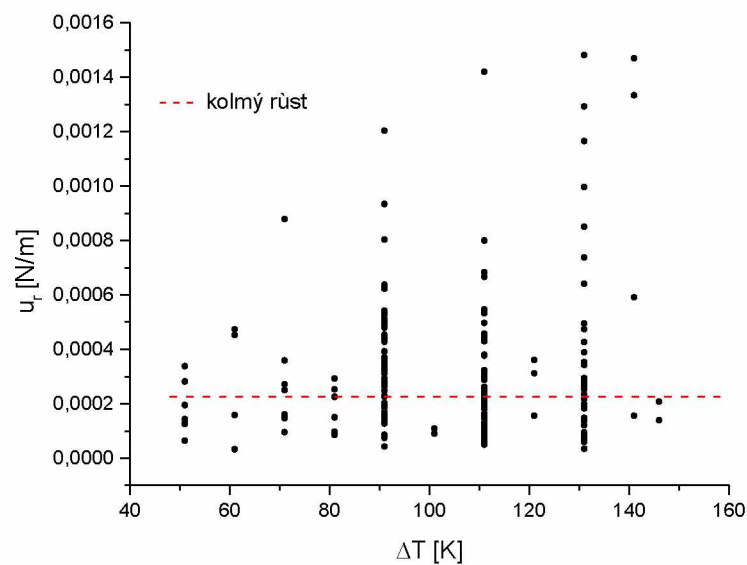
Obrázek 22: určení parametru  $\zeta$

Další analýzou naměřených dat může být určení, dle jakého kinetického modelu rostou krystaly v léčivu TADA. Pro to je potřeba vypočítat ještě redukovanou rychlost růstu, což umožňuje vztah uveden v rovnici 21:

$$u_r = \frac{u \cdot \eta^\xi}{1 - e\left(\frac{-\Delta G}{RT}\right)} \quad (21).$$

Dále potřebujeme znát hodnotu tzv. podchlazení  $\Delta T$ , které lze vypočítat jako rozdíl  $T_m$  tadalafilu a  $T$  při experimentu.

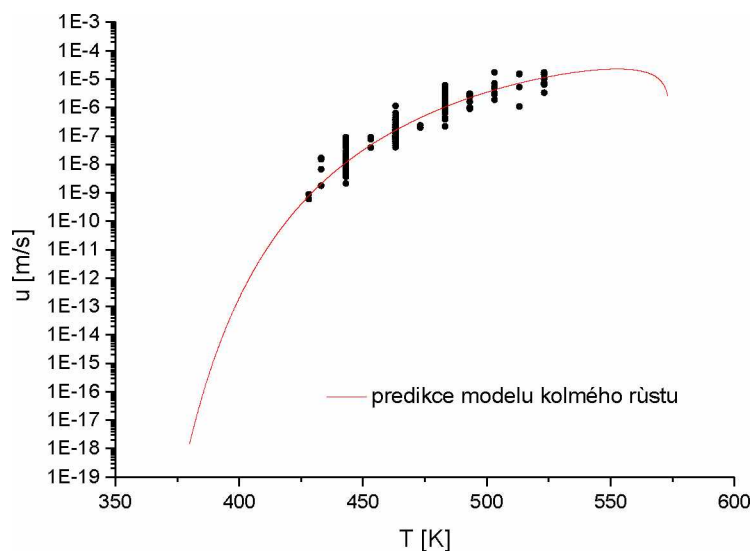
Závislost redukované rychlosti růstu na podchlazení je ukázána na Obrázku 23. Vzhledem k obrovskému rozptylu dat nelze úplně určit vhodný model. Po zvážení všech odchylek získaných dat lze ale předpokládat, že redukovaná rychlost prakticky nezávisí na podchlazení systému, a tudíž lze data proložit modelem kolmého růstu.



Obrázek 23: závislost redukované rychlosti růstu krystalů na podchlazení

Proložením dat kinetickým modelem kolmého růstu, jenž je znázorněno na Obrázku 24, můžeme predikovat, jak se bude měnit rychlost růstu krystalů v závislosti na teplotě. Na základě modelu kolmého růstu krystalů byla určena hodnota parametru  $a_0$ , jenž značí poloměr atomů/molekul účastnících se difúze. Poloměr těchto molekul je 1,79 nm.

V práci Miclause a kolektivu [33] lze pro monoklinický TADA nalézt hodnoty mřížkových parametrů:  $a = 9,894 \text{ \AA}$ ,  $b = 7,782 \text{ \AA}$  a  $c = 12,395 \text{ \AA}$ . Námi zjištěná hodnota parametru  $a_0$  odpovídá těmto mřížkovým parametrům. Lze tak předpokládat, že při růstu krystalů v amorfním TADA jsou strukturní jednotky připojovány po jednotlivých molekulách tadalafilu.



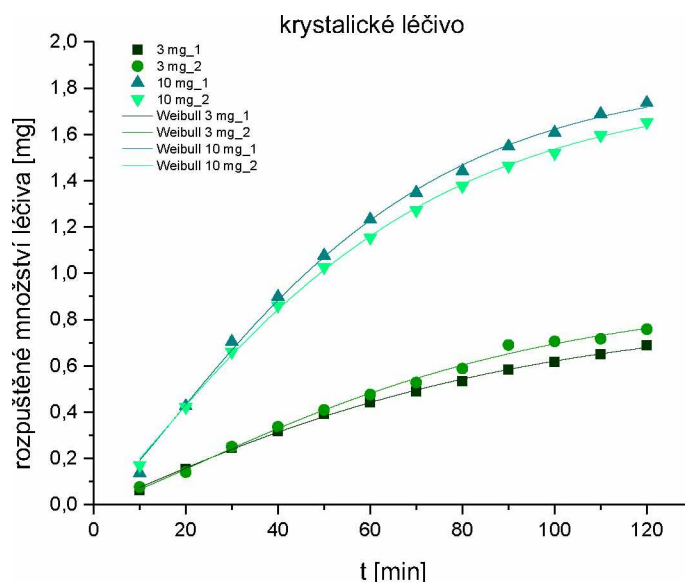
Obrázek 24: predikce modelu kolmého růstu krystalů



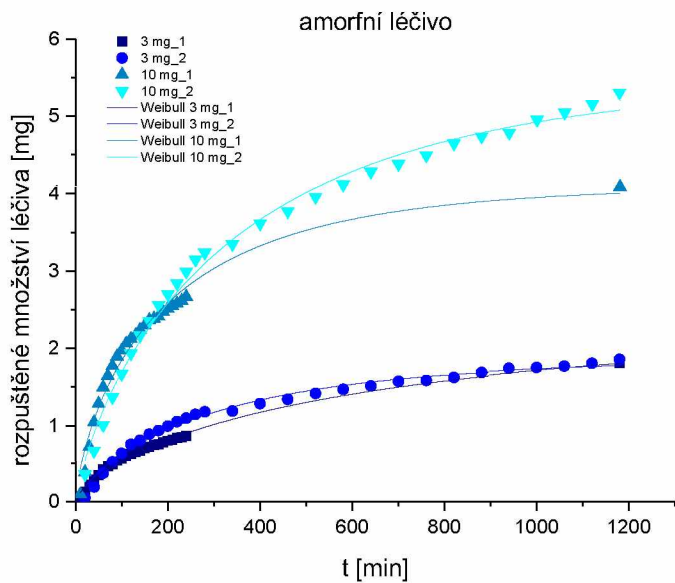
### 3.2. *In vitro* disoluční studie

Disoluční studie rozpustnosti léčiva tadalafil byla provedena pomocí aparatury SOTAX AT7 Smart. Byla provedena studie pro tři typy vzorku: krystalický vzorek od výrobce (>97 % čistoty HPLC, Acros Organics), amorfní a zakrystalizovaný vzorek připravený v laboratoři. Ve zvolených časových intervalech byly přístrojem z disolučních nádob odebírány vzorky média a ty následně proměřeny pomocí UV-VIS spektrofotometru při vlnové délce 283 nm s tříbodovou korekcí pozadí.

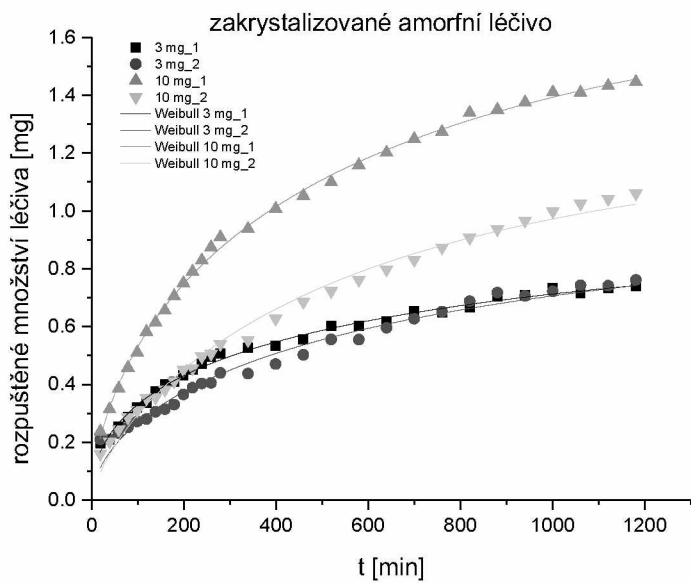
Jednotlivá změřená data absorbance byla přepočtena dle rovnice kalibrační přímky na množství rozpuštěného léčiva a vynesena v závislosti na době experimentu. Závislosti byly poté proloženy pomocí Weibullova modelu (rovnice 13). Obrázky 25-27 zachycují grafické závislosti pro každý typ vzorku.



Obrázek 25: přepočtená data pro krystalický vzorek proložená Weibullovým modelem



Obrázek 26: přepočtená data pro amorfní vzorek proložená Weibullovým modelem



Obrázek 27: přepočtená data pro zakrytalizovaný amorfní vzorek proložená Weibullovým modelem

Parametry Weibullova modelu pro všechny typy vzorků zobrazuje Tabulka 14.

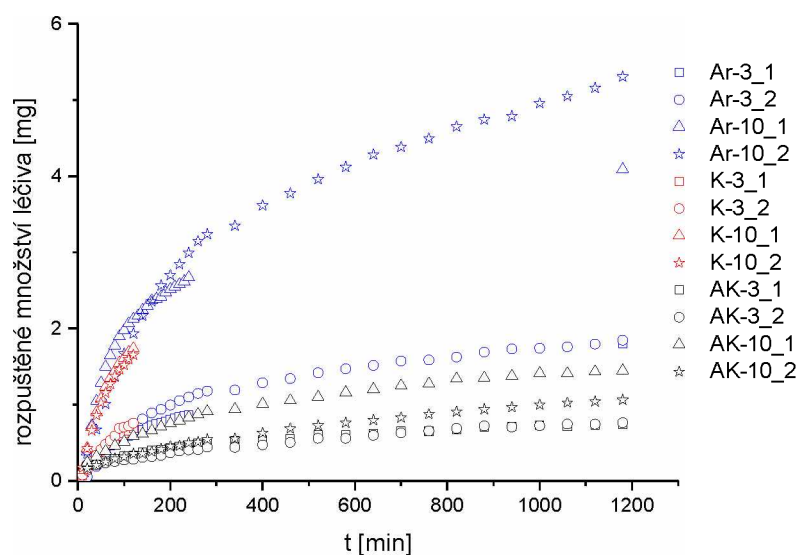
Tabulka 14: parametry Weibullova modelu

Weibull model: $M_t = M_\infty \cdot (1 - e^{-k_w \cdot t^\beta})$						
teoretická navážka vzorku = 3 mg						
typ vzorku	reálná navážka vzorku [mg]	$M_\infty$ [mg]	$\beta$	rychlost rozpouštění $k_w$ [ $\text{min}^{-\beta}$ ]	$M_\infty/m$ [%]	přesnost proložení dat $R^2$
Krystalický (K)	1,73	$0,69 \pm 0,031$	$1,39 \pm 0,058$	0,01767	39,78	0,9924
	2,31	$0,76 \pm 0,045$	$1,53 \pm 0,084$	0,01738	32,82	0,9882
	průměr	0,72	1,46	0,01753	36,3	0,9903
Amorfní (Ar)	3,52	$2,26 \pm 0,151$	$0,71 \pm 0,031$	0,00162	64,11	0,9928
	3,37	$1,85 \pm 0,063$	$0,82 \pm 0,051$	0,00336	54,87	0,9853
	průměr	2,05	0,76	0,00249	59,49	0,9891
Zakrystalizovaný amorfní (AK)	2,74	$1,02 \pm 0,095$	$0,49 \pm 0,029$	0,00148	37,09	0,9931
	3,4	$1,02 \pm 0,012$	$0,59 \pm 0,019$	0,00134	30,02	0,9975
	průměr	1,02	0,54	0,00141	33,56	0,9953
teoretické množství vzorku = 10 mg						
typ vzorku	reálná navážka vzorku [mg]	$M_\infty$ [mg]	$\beta$	rychlost rozpouštění $k_w$ [ $\text{min}^{-\beta}$ ]	$M_\infty/m$ [%]	přesnost proložení dat $R^2$
Krystalický (K)	8,52	$1,84 \pm 0,051$	$1,29 \pm 0,056$	0,01793	21,65	0,9974
	9,23	$1,80 \pm 0,038$	$1,22 \pm 0,035$	0,0172	19,46	0,9989
	průměr	1,82	1,25	0,01757	20,56	0,9982
Amorfní (Ar)	9,81	$4,11 \pm 0,187$	$0,74 \pm 0,047$	0,00495	41,89	0,9723
	9,96	$5,50 \pm 0,184$	$0,79 \pm 0,038$	0,00282	55,18	0,9922
	průměr	4,80	0,76	0,00389	48,54	0,9823
Zakrystalizovaný amorfní (AK)	9,67	$1,83 \pm 0,068$	$0,62 \pm 0,018$	0,00179	18,89	0,9981
	9,82	$1,27 \pm 0,010$	$0,74 \pm 0,017$	0,00165	12,95	0,9896
	průměr	1,55	0,68	0,00172	15,92	0,9939

Rozdílnost teoretické a reálné navážky byla způsobena ulpěním vzorku na stěně lékovky, z níž byl vzorek vysypán do disoluční nádoby při zahájení disoluční studie.

Z Tabulky 14 je patrné, že při studii menší navážky vzorku, 3 mg léčiva, došlo vždy k rozpuštění více procent léčiva ve vodě než při navážce 10 mg léčiva. Můžeme si to vysvětlit tím, že při menším množství léčiva se léčivo rovnoměrně rozprostře po hladině disolučního média, a naopak v případě vsypání větší navážky vzorku může dojít k shluknutí práškového vzorku, a tak se zmenší styčná plocha mezi léčivem a médiem. Pro tento typ špatně rozpustného léčiva by bylo vhodnější použít disoluční aparaturu v uspořádání s vratným válcem či průtokovou celou.

Obrázek 28 je shrnutím všech naměřených dat během disoluční studie rozpustnosti TADA ve vodě.



Obrázek 28: všechna data z disoluční studie TADA

Výsledky disoluční studie naznačují, že je zde patrné zvýšení rozpustnosti léčiva po jeho amorfizaci. Pokud amorfní vzorek podrobíme krystalizaci, je z dat viditelné, že je zde zhoršená rozpustnost oproti amorfnímu léčivu a rozpustí se podobné množství léčiva jako z krystalického vzorku léčiva od výrobce.

Při porovnání průměrných hodnot:

- z **amorfního rozetřeného** vzorku (Ar) se rozpustilo až 2,8x více léčiva než z **krystalického** (K). Procentuální porovnání uvádí o 23-28 % více rozpuštěného léčiva v případě Ar oproti K. Rychlost rozpouštění je však řádově vyšší u krystalického léčiva.

Nižší rychlost rozpouštění Ar oproti K může být způsobena například tím, že během přípravy amorfního vzorku mohlo během tavení dojít k teplotní degradaci léčiva, či tvorbě nespecifikovaného produktu, který následně ovlivňuje rychlost rozpouštění amorfního vzorku.

- při porovnání **krystalického** (K) a **zakrytalizovaného amorfního** (AK) léčiva, je rozpuštěné množství K při nižší navážce menší, při vyšší navážce nepatrně větší než rozpuštěné množství AK. Z navážky K se rozpustilo o 3-5 % více léčiva než z AK. Rychlost rozpouštění K je řádově větší než AK.

Vliv na všechny hodnoty může mít také to, že při studiích docházelo k přilepení práškového vzorku k pádélkům přístroje, nebo vzorek plaval na hladině či naopak u dna nádoby.

V žádném experimentu nedošlo k úplnému rozpuštění veškerého množství vzorku. Během studií došlo v redestilované vodě k rozpuštění maximálně 60 % navážky, a to v případě studie amorfního rozetřeného vzorku. Mějme „fiktivního pacienta“, jenž má v žilách místo krve a v žaludku místo kyseliny chlorovodíkové a dalších látek, pouze redestilovanou vodu. Tento pacient by užíval léčivo TADA. Takový pacient by musel pro dosažení terapeuticky účinné koncentrace léčiva v krvi (v našem případě redestilované vodě) požit větší množství léčiva, než bylo vsypáno do skleněného žaludku. Při užití stejného množství, jako bylo vsypáno do žaludku, by pravděpodobně vůbec nedošlo k požadovanému účinku léčiva, vlivem nedostatečné koncentrace léčiva v krvi (redestilované vodě).

V článku publikovaném Wei a kol. [24] se uvádí, že pro krystalický TADA byla zjištěna rychlost rozpouštění  $0,0011-0,0017 \text{ min}^{-1}$  a pro amorfní TADA  $0,0042 \text{ min}^{-1}$ . V naší studii se krystalické léčivo od výrobce rozpouští rychlostí  $0,0172-0,01793 \text{ min}^{-\beta}$ , amorfní rozetřené léčivo  $0,00162-0,00495 \text{ min}^{-\beta}$ , zakrytalizovaný amorfní vzorek  $0,00134-0,00179 \text{ min}^{-\beta}$ . Z výsledků provedené disoluční studie plyne, že rychlost rozpouštění amorfního vzorku zakrytalizovaného léčiva odpovídá datům ve studii Wei a kol. Proč se původní krystalické léčivo rozpouští rychleji však není známo.

## 4. Závěr

V této diplomové práci byl studován růst krystalů v amorfní formě léčiva tadalafil, a také stabilita léčiva v závislosti na způsobu a době skladování. Rovněž byl studován vliv amorfizace vzorku na jeho rozpustnost v redestilované vodě. Výsledky této práce lze uvést v několika bodech:

- I přes identický způsob přípravy všech amorfních vzorků TADA, se v průběhu temperace za různých teplot tvořily dva typy krystalů.
- Změna velikosti krystalů byla na počátku experimentů lineární s časem, během temperace poté občas docházelo k odchylce od lineárního průběhu. Ať už vlivem tvorby shluků krystalů, sníženým množstvím vzorku, nebo z důvodu pomalejšího přesunu strukturních jednotek na rozhraní krystal-podchlazená tavenina.
- S využitím optického mikroskopu a grafické závislosti velikosti krystalů na čase temperace při dané teplotě, byly ze směrnice lineárních částí v nejstrmější části závislosti určeny rychlosti růstu krystalů.
- Pomocí Arrheniovy závislosti rychlosti růstu na teplotě, byla vypočtena aktivační energie růstu krystalů. Hodnota aktivační energie je  $180 \pm 5$  kJ/mol.
- Ze závislosti redukované rychlosti růstu na podchlazení bylo určeno, že krystaly v tomto léčivu zřejmě rostou tzv. kolmým růstem a data lze proložit kinetickým modelem kolmého růstu a predikovat tak, jak budou krystaly růst v širokém teplotním intervalu.
- Stabilitní studie ukázala, že vliv způsobu a délky skladování je zanedbatelný vzhledem k samotnému rozptylu růstových dat při dané teplotě. Amorfní vzorky TADA lze považovat za poměrně dobře stabilní.
- S využitím disoluční aparatury SOTAX AT7 Smart byly provedeny disoluční studie pro 3 typy vzorku léčiva TADA: vzorek krystalický, amorfní a zakrystalizovaný amorfní. Pomocí fitování naměřených dat v programu Origin kinetickým Weibull modelem, byly zjištěny parametry  $M_{\infty}$ ,  $\beta$  a  $k_w$ .
- Z disolučních studií plyne, že ačkoliv je rychlost rozpouštění amorfního léčiva v redestilované vodě řádově pomalejší než léčiva krystalického, ve výsledku dojde k rozpouštění až téměř trojnásobně většímu množství léčiva.
- V této práci se krystalické léčivo rozpouští rychlostí  $0,0172\text{--}0,01793 \text{ min}^{-\beta}$ , amorfní rozetřené léčivo  $0,00162\text{--}0,00495 \text{ min}^{-\beta}$  a zakrystalizovaný amorfní vzorek  $0,00134\text{--}0,00179 \text{ min}^{-\beta}$ .

## 5. Seznam použité literatury

- [1] FRUMAR, M. *Chemie pevných látek*. Pardubice: VŠCHT, 1992, ISBN 80-85113-41-4.
- [2] STRNAD, Z. *Skelně krystalické materiály*, Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1983.
- [3] SHI, Q., LI, F., WANG, Y. a XIN, J.. Physical stability of amorphous pharmaceutical solids: Nucleation, crystal growth, phase separation and effects of the polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020, 590, 119925.
- [4] JACKSON, K.A., UHLMANN, D.R. a HUNT, J.D.. On the nature of crystal growth from the melt. *Journal of Crystal Growth* 1. 1967, 1-36.
- [5] KIRKPATRICK, R. J.. Crystal Growth from the Melt: A Review. *American Mineralogist*. 1975, 60, 798-814.
- [6] EDIGER, M.D.; HARROWELL, P. a LIAN, Y. Crystal growth kinetics exhibit a fragility-dependent decoupling from viscosity. *The Journal of Chemical Physics*. 2008, 128 (3).
- [7] LAITINEN, R., LOBMANN, K., STRACHAN, C., GROHGANZ, H. a RADES, T.. Emerging trends in the stabilization of amorphous drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, 453, 65-79.
- [8] ŠULCOVÁ, P. a BENEŠ, L. Experimentální metody v anorganické technologii. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2018. e-book ISBN: 80-7194-420-3.
- [9] WAGNER, M. Thermal Analysis in Practise, Fundamental Aspect. Munich: Hanser Publishers, 2018. e-book ISBN: 978-1-56990-644-6.
- [10] LICARDI, J. a ENLOW, L. R. Hybrid Microcircuit Technology Handbook, Materials, Processes, Design, Testing and Production. 2nd edition. New Jersey: Noyes Publications, 1998. ISBN: 0-8155-1423-9.
- [11] VETCHÝ, D. a spol. Testování stability léčivých přípravků. *Chemické listy*, 100, 2006, 24-29.
- [12] JELIC, D. Thermal Stability of Amorphous Solid Dispersions. *Molecules*, 2021, 26, 236.
- [13] NURZYNSKA, K., BOOTH, J., ROBERTS, C. J., McCABE, J., DRYDEN, I. a FISHER, P. M. Long-Term Amorphous Drug Stability Predictions Using Easily Calculated, Predicted, and Measured Parameters. *Molecular pharmaceutics*, 2015, 12 (9), 3389-98.

- [14] SHIMPI, M., R., ALHAYALI, A., CAVANAGH, K.L., RODRIGUEZ-HORNEDO, N. a VELEGA, S.P.. Tadalafil-Malonic Acid Cocrystal: Physicochemical Characterization, pH-Solubility, and Supersaturation Studies. *Crystal Growth And Design*, **2018**, *18*, 4378-4387.
- [15] CIALIS. SÚKL, státní ústav pro kontrolu léčiv [online] Praha: SÚKL, ©2010. [cit. 14. 3. 2024]. Dostupné z: [https://prehledy.sukl.cz/prehled\\_liciv.html#/detail-reg/0029255](https://prehledy.sukl.cz/prehled_liciv.html#/detail-reg/0029255)
- [16] BARVE, I. J., CHIU, W. J., LIN, Y. L. a SUN, Ch. M.. Diastereospecific Synthesis of Tetrahydroisoquinolines via Radical Cyclization: Application in the Synthesis of ent-Tadalafil. *Advanced Synthesis and Catalysis*, **2021**, *363* (16), 4041-4046.
- [17] ALVANI, A., JOUYBAN, A. a SHAYANFAR, A.. The effect of surfactant and polymer on solution stability and solubility of tadalafil methylparaben cocrystal. *Journal of Molecular Liquids*, **2019**, *281*, 86-92.
- [18] VENHUIS, B.J, ZOMER, G., VREDENBREGT, M.J. a de KASTE, D.. The identification of (-)-trans-tadalafil, tadalafil, and sildenafil in counterfeit Cialis and the optical purity of tadalafil stereoisomers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2010**, *51*, 723-727.
- [19] Tadalafil. Merck index online. Dostupné z: <https://merckindex.rsc.org/monographs/m10427>.
- [20] DAUGAN, A., GRONDIN, P., RUAULT, C., LE MONNIER, A. CH., COSTE, H., LINGET, J. M., KIRILOVSKY, J., HYAFIL, F. a LABAUDINIÈRE, R.. The Discovery of Tadalafil: A Novel and Highly Selective PDE5 Inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1', 2': 1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione Analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2003**, *46*, 21, 4533-4542.
- [21] WLODARSKI, K., SAWICKI, W., HABER, K., KNAPIK, J., WOJNAROWSKA, Z., PALUCH, M., LEPEK, P., HAWELEK, L. a TAJBER, L.. Physicochemical properties of tadalafil solid dispersions – Impact of polymer on the apparent solubility and dissolution rate of tadalafil. *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics*, **2015**, *94*, 106-115.
- [22] SHINDE, S. V., SHAIKH, F. a GAWANDE, A. N.. Solubility enhancement and physicochemical characterization of tadalafil by inclusion complexation method. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, **2018**, *7* (8), 687-706.



- [23] GHADGE, O., SAMANT, M. a KHALE, A.. Determination of solubility of tadalafil by shake flask method by employing validated HPLC analytical method. *World Journal Of Pharmaceutical Research*, **2015**, 4 (7), 1370-1382.
- [24] WEI, Y., LING, Y., SU, M., QIN, L., ZHANG, J., GAO, Y. a QIAN, S.. Characterization and Stability of Amorphous Tadalafil and Four Crystalline Polymorphs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2018**, 66, 1114-1121.
- [25] FORGUE, S. T.; PATTERSON, B. E.; BEDDING, A. W.; PAYNE, C. D.; PHILLIPS, D. L.; WRISHKO, R. E. a MITCHELL, M. I. Tadalafil pharmacokinetics in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **2006**, 61 (3), 280-288.
- [26] VRANÍKOVÁ, B. a GAJDZIOK, J.. Metody používané ve farmaceutické technologii ke zvyšování biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv po perorálním podání. *Česká a slovenská Farmacie*, **2015**, 64, 159-172.
- [27] GRUBEROVÁ, L. a KRATOCHVÍL, B.. Pevné disperze málo rozpustných léčiv. *Chemické listy*, **2019**, 113, 383-390.
- [28] DVOŘÁČKOVÁ, K., BAUTZOVÁ, T. a RABIŠKOVÁ, M.. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické listy*, **2011**, 105, 50-54.
- [29] MUSELÍK, J., KOMERSOVÁ, A., LOCHAŘ, V. a KUBOVÁ, K.. Regresní analýza disolučního profilu léčiva a odhad mechanismu uvolňování léčiva. *Chemické listy*, **2019**, 113, 328-336.
- [30] BARNETOVÁ, V.. Růst krystalů v amorfních léčivech, bakalářská práce, Univerzita Pardubice, **2022**.
- [31] TURNBULL, D. Formation of crystal nuclei in liquid metals. *Journal of Applied Physics*, **1950**, 21, 1022-1028.
- [32] ŠTEFANSKÁ, P.. Studium viskózního chování v amorfních léčivech, bakalářská práce, Univerzita Pardubice, **2023**.
- [33] MICLAUS, M. O., KACSO, I. E., MARTIN, F. A., DAVID, L., POP, M. M., FILIP, C. a FILIP, X. Crystal Structure and Desolvation Behaviour of the Tadalafil Monosolvates with Acetone and Methyl Ethyl Ketone. *Journal of pharmaceutical sciences*, **2015**, 104 (11), 3782-3788.