

## CHARAKTERIZÁCIA TUHÝCH DISPERZIÍ LIEČIV V POLYMÉRNÝCH MATRICIACH POMOCOU $^{29}\text{Si}$ NMR SPEKTROSKOPIE

OLÍVIA POLICIANOVÁ, MARTINA URBANOVÁ,  
LIBOR KOBERA a JIŘÍ BRUS

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Heyrovského  
nám. 2, 162 06 Praha 6 – Břevnov

policianova@imc.cas.cz, urbanova@imc.cas.cz,  
kobera@imc.cas.cz, brus@imc.cas.cz

Došlo 6.8.12, prepracované 11.1.13, prijaté 31.1.13.

Kľúčové slová: NMR spektroskopie pevnej fázy, zvýšenie biodostupnosti, tuhé disperzie, korelačné experimenty

### Obsah

1. Úvod do problematiky málo rozpustných liečiv
2. Klasifikácia tuhých disperzií aktívnych substancií
3. Charakterizácia tuhých disperzií pomocou  $^{29}\text{Si}$  NMR
  - 3.1. Rozlíšenie a identifikácia kryštalových foriem – základné techniky  $^{29}\text{Si}$  NMR
  - 3.2. Posúdenie rozsahu interakcií API-polymér – relaxačné experimenty
  - 3.3. Štruktúra komplexov API-polymér – korelačné experimenty MAS NMR
4. Záver

### 1. Úvod

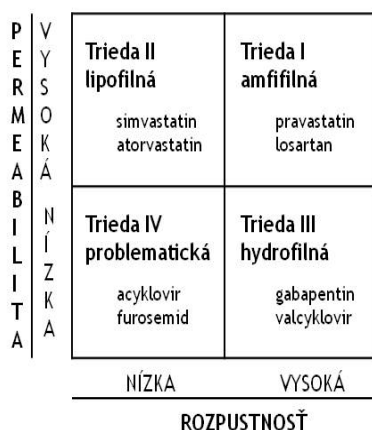
V súčasnej dobe predstavujú pevné farmaceutické produkty (tablety, tobolky) približne 80–85 % z produkcie liečivých prípravkov na trhu<sup>1</sup>. Z tohto dôvodu je dôležité, aby aktívna farmaceutická ingrediencia (API) bola vo farmaceutickom priemysle dostatočne kontrolovaná nielen počas kryštalizácie, ale v celom procese výroby substancie, formulácie do tabletovej podoby, skladovania a distribúcie. Čiže, aby nevznikli iné kryštalické modifikácie – polymorfy, ktoré by mohli byť menej účinné alebo v horšom prípade neúčinné vôbec. Typickým príkladom tohto chovania je prípad Ritonaviru, čo je liečivo s antivirálnymi účinkami, používané pri nákuze vírusom HIV. Pri tomto liečive, 18 mesiacov po uvedení na trh, sa zistilo, že v liekových formách vzniká nový, termodynamicky stálejší polymorf, ktorý bol menej rozpustný ako originálna modifikácia tejto API<sup>2</sup>.

Je zrejme, že liečivo musí mať dobrú biodostupnosť. Okrem iných aspektov to znamená predovšetkým dobrú disolúčnú rýchlosť, rozpustnosť v telových tekutinách a dobrú permeabilitu v gastrointestinálnom trakte (GIT) pri

orálnom spôsobe podania liekovej formy. Na základe týchto farmakokinetických vlastností API vypracoval americký úrad pre kontrolu liečiv (FDA) biofarmaceutický klasifikačný systém (BCS), ktorý klasifikuje APIe do štyroch tried (obr. 1a). Základom rozdelenia liečiv podľa BCS je rozpustnosť a črevná permeabilita aktívnych substancií v ľudskom tele. API je vysoko rozpustná, ak najvyššia orálna dávka je rozpustná v  $\leq 250$  ml vodného média v rozmedzí pH 1,2–6,8 a vysoko permeabilná, ak najvyššia orálna dávka sa vstrebe z  $> 90$  % v GIT. Ak sa spája vlastnosti API s disolúciou farmaceutického produktu, BCS berie v úvahu tri hlavné faktory: disolúciu, rozpustnosť v telových tekutinách a permeabilitu v GIT. Tieto tri faktory určujú rýchlosť a objem absorpcie liečiva z priamo uvoľnenej orálnej pevnej dávky. Keďže mnoho farmaceutických substancií (hlavne triedy 2. a 4., 40–60 % svetovej produkcie liekov) prejavuje nízku biodostupnosť a rozpustnosť vo vode, súčasným cieľom farmaceutického výskumu je zvýšiť tieto nedostatočné vlastnosti liečiva<sup>3–5</sup>.

Chemická a fyzikálna premena API patrí k jedným z mnoho metód ako zvýšiť biodostupnosť málo rozpustných liečiv. Možnosti chemickej úpravy liečiva zahŕňujú transformáciu na soľ, hydrát, glykosilovaný derivát, proliečivo, kokryštal. Možnosti fyzikálnej úpravy sú zamerané na tvorbu kryštalických viac rozpustných polymorfov, amorfov, či tuhých disperzií, taktiež na lyofilizáciu, riadenú kryštalizáciu pomocou polymérov, miešanie v tavenine, sprejové sušenie. Je teda zrejme, že existuje množstvo postupov ako modifikovať aktívnu farmaceutickú substanciu a pripraviť produkt s požadovanými vlastnosťami. Mnoho úsilia sa taktiež venovalo metodickému rozvoju charakterizácie týchto farmaceutických produktov. Samozrejme v prípade komplikovaných viacložkových formulácií, medzi ktorými zvláštne miesto zaujímajú polymérne disperzie, vývoj charakterizačných metód a techník stále prebieha. Jednoznačná charakterizácia týchto produktov je však jedna z fundamentálnych požiadaviek inštitúcií, ktoré sú zodpovedné za kontrolu a reguláciu trhu s liečivami (FDA, SÚKL atď.). Štandardné postupy, aké sú prášková röntgenová difrakcia (XRPD), infračervená spektroskopie (FTIR) alebo Ramanova spektroskopie môžu v týchto prípadoch multikomponentných systémov sklamať, a to napríklad vďaka veľkému prekrytiu signálov aktívnej substancie s polymérnym nosičom alebo vďaka nízkej koncentrácii API. Vzhľadom k rastúcemu záujmu farmaceutických spoločností o komerčnú produkciu disperzných produktov, ktorý potvrdzuje aj nedávny článok v časopise *Molecular Pharmaceutics*<sup>6</sup>, sa úsilie o rozvoj postupov spoľahlivej charakterizácie týchto produktov podstatne zvýšilo. Ako veľmi nádejná sa javí NMR spektroskopie pevného stavu, pričom jej základným aplikáciám je venovaný tento referátový príspevok<sup>7–9</sup>.

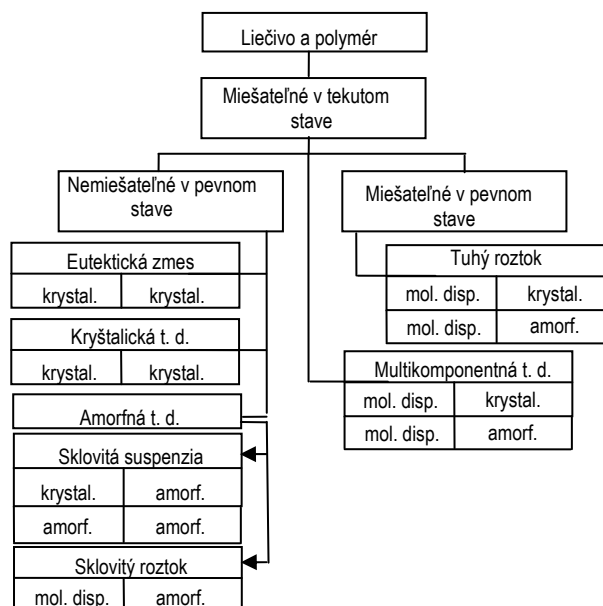
a



b

Typ disperzie	
stav liečiva	stav matrice

Amorfný stav = amorf.  
 Kryštalický stav = kryštal.  
 Molekulárne dispergovaný stav = mol. disp.  
 Tuhá disperzia = t.d.



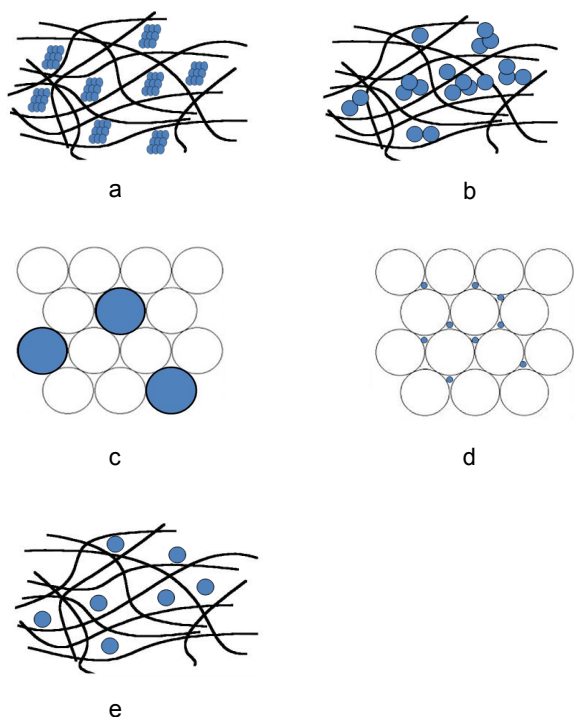
Obr. 1. a) Schematické znázornenie biofarmaceutického klasifikačného systému BCS. Základom je rozdelenie liečiv podľa rozpustnosti a črevnej permeability aktívnych substancií v ľudskom tele. b) Schematické znázornenie klasifikácie tuhých disperzií podľa stavu jednotlivých komponent<sup>12–16</sup>

## 2. Klasifikácia tuhých disperzií aktívnych substancií

Už v roku 1961 bol pojem tuhé disperzie spájaný so zvýšením absorpcie málo rozpustných liečiv<sup>10,11</sup>. Počas nasledujúcich rokov sa tento predpoklad v mnohých prípadoch potvrdil a teda platí, že vhodne pripravené disperzie preukázateľne zvyšujú biodostupnosť liečiva. Dnes sú už tieto systémy detailnejšie preskúvané a pojem tuhá disperzia je popísaný princípom dispergovania hydrofóbných molekúl API do hydrofilnej matrice, napr. polyméru. Ich základné rozdelenie je znázornené na obr. 1b. Všeobecne

platí, že aktívna substancia môže v matrici existovať v kryštalických či amorfných doménach alebo v molekulárne dispergovanom stave<sup>12–16</sup>.

*Eutektické zmesi* vznikajú, ak API a matrice (napr. polymér) sú miešateľné v ich roztavenom stave a pri tuhnutí kryštalizujú ako dve odlišné komponenty so zanedbateľnou miešateľnosťou. Ich eutektická zmes má nižší bod topenia ako v ich oddelenom stave. Toto zistenie stále vyvoláva isté kontroverzie, pretože niektorí autori tvrdia, že tieto eutektiká sú intímne premiešané, ale stále inertné fyzikálne zmesi. Iní však tvrdia, že pozorované zníženie teploty topenia odráža molekulárne interakcie



Obr. 2. Schematické znázornenie štruktúry rozličných tuhých disperzií: a) kryštalická tuhá disperzia, b) amorfná tuhá disperzia, c) substitučný kryštalický tuhý roztok, d) intersticiálny kryštalický tuhý roztok, e) amorfný tuhý roztok

medzi molekulami liečiva a nosičom. Nie so všetkými maticami môžu tvoriť málo rozpustné liečivá eutektickú zmes so zvýšenou disolučnou rýchlosťou. Vhodnými kandidátmi na tvorbu eutektických zmesí sú polyetylenglykol (PEG), močovina, polyoxyetylen-polyoxypropylen (Pluronic®)<sup>16,17</sup>.

*Kryštalická tuhá disperzia* vzniká vtedy, ak rýchlosť kryštalizácie liečiva z miešateľnej zmesi liečivo-polymér je väčšia, než rýchlosť solidifikácie (tuhnutia) tejto zmesi (obr. 2a).

*Amorfná tuhá disperzia* potom vzniká v prípadoch, kedy miešateľná zmes liečivo-polymér (tavenina) je ochladzovaná takou rýchlosťou, pri ktorej nedochádza ku kryštalizácii molekúl liečiva a tieto molekuly sú potom kineticky zachytené v amorfnom stave. Aj keď tento typ systémov ponúka vďaka zvýšenej termodynamickej aktivite zlepšenie disolučných vlastností liečiva, je možné, že tieto disperzie môžu konverzovať späť k viac stabilnému systému alebo k menej rozpustnej kryštalickej forme (obr. 2b). K tomuto typu amorfných disperzií sa zaraďujú formy sklovitých roztokov a suspenzií. Sklovitý roztok je homogénny systém, v ktorom sa liečivo rozpúšťa v sklovitom rozpúšťadle. Táto forma disperzií sa získava väčšinou náhlym ochladením zmesi. Pod teplotou sklovitého prechodu  $T_g$  vzniká krehký materiál. Pri zahrievaní postupne

mäkne bez utajeného bodu topenia<sup>13,16</sup>.

*Tuhé roztoky* sú také tuhé disperzie, ktoré ukazujú miešateľnosť nielen v tekutom stave (tavenine, roztoku), ale i v pevnom stave. Rozdeľujú sa na základe miešateľnosti (I. podtrieda) a na základe možnosti distribúcie dispergovanej častice do matrice (II. podtrieda). V podtriede I. sa rozlišujú *kontinuálne tuhé roztoky*, kedy obe zložky ukazujú neobmedzenú miešateľnosť. Druhú skupinu potom predstavujú *diskontinuálne tuhé roztoky*, ktorých vzájomná miešateľnosť je limitovaná. V podtriede II. sa rozlišujú substitučné kryštalické tuhé roztoky, čo je klasický tuhý roztok s kryštalickou štruktúrou, kde rozpustené molekuly liečiva nahradzujú molekuly rozpúšťadla (matrice) (obr. 2c). Substitúcia je možná na základe podobnej veľkosti molekúl (tolerancia 15 %). Ďalej sú to intersticiálne kryštalické tuhé roztoky, v ktorých sa zabudujú molekulové častice do medzipriestoru nachádzajúcom sa medzi molekulami rozpúšťadla (matrice) (obr. 2d). Rozhodujúcim faktorom pri tvorbe tohto roztoku je veľkosť častíc dispergujúcej zložky a matrice. A nakoniec amorfné tuhé roztoky, kde rozpustené molekuly sú dispergované do amorfného rozpúšťadla (napr. polymérnej matrice) na molekulárnej úrovni (obr. 2e)<sup>16,18</sup>. U liečiva griseofulvinu, dispergovaného v kyseline citrónovej, bol prvý krát demonštrovaný súvis so zvýšením disolučnej rýchlosti málo rozpustných liečiv<sup>12</sup>.

Ako poslednú skupinu týchto systémov je možné uviesť multikomponentné tuhé disperzie, čo sú tuhé disperzie, do ktorých sa pridáva tretia zložka a tou je surfaktant. Surfaktanty sú pridávané na zvýšenie disolučnej rýchlosti a zvýšenie miešateľnosti medzi liečivom a polymérom, aby nedochádzalo ku kryštalizácii liečiva pri uskladnení<sup>16</sup>. Z uvedeného prehľadu je zrejmé, že je možné pripraviť veľké množstvo rôznych typov tuhých disperzií v polymérnych maticiach s rozličnými vlastnosťami. Preto, jedným z dôležitých krokov, vo farmaceutickom priemysle je tieto produkty správne charakterizovať a identifikovať. Ako nádejná metóda k sledovaniu štruktúry a dynamiky farmaceutických disperzných systémov sa javí NMR spektroskopie pevnej fázy (ssNMR). V nasledujúcej kapitole budú stručne zhrnuté súčasne možnosti jej využitia v tejto oblasti farmaceutického a materiálového výskumu.

### 3. Charakterizácia tuhých disperzií pomocou ssNMR

Tuhé disperzie sú často charakterizované termickými metódami, ako sú DSC, TGA a iné. DSC poskytuje informáciu o miešateľnosti API a polyméru,  $T_g$ , či iných termických hodnotách a stabilitách. Táto metóda avšak poskytuje iba základné informácie o vlastnostiach disperzného systému a pokiaľ ide o informácie štruktúrne je dosť limitovaná.

Ďalej je často využívaná metóda XRPD, ktorá poskytuje už väčšie množstvo štruktúrnych informácií, sleduje kryštalické materiály a poukazuje na chýbajúcu kryštalickú časť systému. Množstvo informácií môžeme tiež získať

aj s iných metód, ako sú IČ, Ramanova mikrospektroskopia, či TEM. Pre podrobnejší až detailný štruktúrny popis týchto disperzných systémov je však najvhodnejšia metóda ssNMR. Táto metóda detailne charakterizuje štruktúru, dynamiku, morfológiu systému, veľkosť domén dispergovanej API (0,5–500 nm) a mnoho iných dôležitých vlastností farmaceutických API-polymér disperzií<sup>6,19,20</sup>.

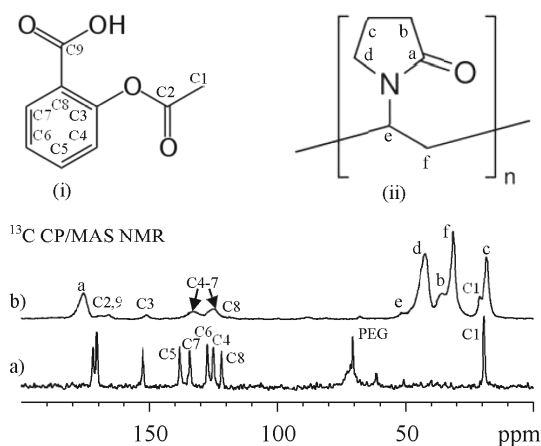
### 3.1. Základné techniky ssNMR

K základným technikám ssNMR vhodným k meraniu farmaceutických tuhých disperzií patrí experiment využívajúci techniku prenosu polarizácie (<sup>13</sup>C CP/MAS NMR, cross-polarization, CP) a jednoduchý jednopulzný <sup>13</sup>C MAS NMR experiment. Experiment <sup>13</sup>C CP/MAS NMR je veľmi rýchly, trvá obvykle niekoľko desiatok minút až niekoľko hodín a používa sa k prvotnej charakterizácii systémov. Dokáže rozlíšiť amorfnú a kryštalickú zložku a to vďaka úzkym signálom, ktoré sú charakteristické pre kryštalickú zložku, a rozšíreným signálom, ktoré sú typické pre zložku amorfnú. To, či je signál úzky alebo široký závisí na usporiadaní danej zlúčeniny. Pre amorfné formy je typická neusporiadanosť systému, čo sa prejaví ako široký signál, ktorý zobrazuje rozdielne odozvy lokálneho magnetického poľa rôznych molekulárnych orientácií. Zatiaľ čo kryštalická fáza zobrazí odozvy jednotného lokálneho magnetického poľa vďaka usporiadanej kryštalickej štruktúre<sup>19</sup>. Tieto typické znaky sú dobre vidieť na príklade API-polymér systémoch tvorených kyselinou acetylsalicylovou s polyetylglykolom (PEG) alebo polyvinylpyrrolidonom (PVP) (obr. 3). V prvom prípade sú <sup>13</sup>C CP/MAS NMR signály kyseliny acetylsalicylovej veľmi úzke, úplne rozlíšené a jasne indukujúce kryštalický charakter API (kryštalická tuhá disperzia). Zatiaľ čo v druhom prípade sú

odpovedajúce signály značne rozšírené a nerozlíšené. Toto rozšírenie indikuje neuniformný štruktúrny charakter molekúl API, ktoré sa môžu vyskytovať buď vo forme amorfných, viac či menej separovaných domén (amorfná tuhá disperzia) alebo v úplne molekulárne dispergovanom stave (amorfný tuhý roztok). Je teda zrejme, že <sup>13</sup>C CP/MAS NMR experimentom sa môžu predbežne rozdeliť disperzné systémy do jednotlivých typov tuhých disperzií. Určuje sa to pomocou pološírky a veľkosti signálov systému API-polymér v porovnaní s primárnymi spektrami API a polyméru. Na presnejšie rozlíšenie tuhých disperzií a predovšetkým na určenie veľkosti dispergovaných domén sa používajú zložitejšie typy experimentov. Na tomto mieste je tiež nutné upozorniť, že <sup>13</sup>C CP/MAS NMR experiment slúži k získaniu spektrálnych dát hlavne rigidných zložiek systému. Ak by sa v systéme nachádzala výrazne pohyblivejšia zložka (napr. amorfný nízkomolekulárny polymér PEG s molekulovou hmotnosťou do 2000), potom <sup>13</sup>C CP/MAS NMR experiment nie je schopný túto zložku vôbec zaznamenať. Preto je nutné použiť alternatívny jednopulzný experiment <sup>13</sup>C MAS NMR<sup>21</sup>, ktorý je však veľmi málo citlivý a jeho prevedenie vyžaduje enormné množstvo experimentálneho času. Obvykle je teda nutné použiť obe experimenty. Značný prínos k tejto problematike priniesla práca, publikovaná v roku 2011, v ktorej je demonštrované použitie veľmi jednoduchej pulznej sekvencie, ktorá kombinuje obe vyššie uvedené experimenty. Vďaka tomu je možné získať nielen kvalitatívne, ale aj kvantitatívne informácie o veľmi heterogénnych systémoch v relatívne krátkom čase<sup>22</sup>.

### 3.2. Posúdenie rozsahu interakcií API-polymér – relaxačné experimenty

Relaxačné experimenty patria k pomerne časovo náročným experimentom, ktorých stredná dĺžka trvania sa pohybuje v rade desiatok hodín. Všeobecne pod pojmom relaxácia rozumieme návrat jadrových spinov do termálnej rovnováhy, z ktorej bol spinový systém vychýlený aplikáciou *rf* pulzov. Pri tomto procese dochádza k poklese celkovej magnetizácie, ktorá sa sleduje v podobe exponenciálnej funkcie. Všeobecne je proces relaxácie vyvolaný a urýchlený segmentovým pohybom. V kontexte štúdia štruktúry disperzií liečiv v polymérnych maticiach sa rozlišujú dva typy týchto meraní. Po prvé, sú to experimenty, ktoré merajú relaxáciu jadier <sup>1</sup>H. Konkrétne sa jedná o  $T_1(^1\text{H})$  a  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačné experimenty. V širšom rozsahu, bolo už na viacerých dvojzložkových, či multizložkových polymérnych systémoch demonštrované, že rozdiely v <sup>1</sup>H relaxačných časoch medzi jednotlivými komponentmi indikujú heterogénny charakter týchto systémov. Toto pravidlo vychádza z faktu, že <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H spinová difúzia, ktorá je všeobecne veľmi rýchla v organických pevných látkach, nie je schopná ustáliť magnetické vlastnosti vo všetkých <sup>1</sup>H atómoch. Typicky je <sup>1</sup>H magnetizácia prenášaná cez priestor približne do vzdialenosti 1,1 až 1,2 nm počas 1 ms. V prípade meraní  $T_1(^1\text{H})$  spin-



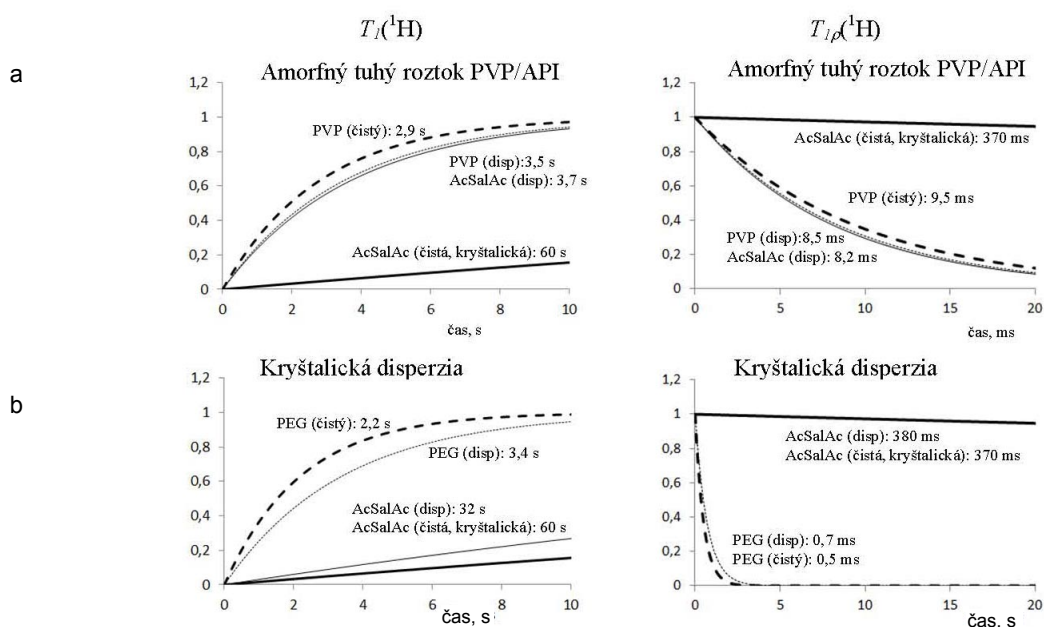
Obr. 3. Spektrá systémov s AcSalAc (i), polymérmí PVP<sub>7600</sub> (ii) a PEG<sub>2000</sub>: a) disperzia kryštalickej formy AcSalAc/PEG<sub>2000</sub>, b) disperzia amorfnej formy AcSalAc/PVP<sub>7600</sub>

mriežkových relaxačných konštánt relevantné časové periódy počas  $^1\text{H}$  šírenia magnetizácie sú v rozsahu niekoľko sekúnd. Následkom toho môže byť  $^1\text{H}$  magnetizácia efektívne prenášaná cez 100–200 nm. Preto ak  $T_1(^1\text{H})$  spin-mriežkové relaxačné časy oboch komponent sú rôzne, napríklad ak  $T_1(^1\text{H})$  API je podstatne dlhšia ako  $T_1(^1\text{H})$  polymérnej matrice, potom analyzované dvojkomponentné systémy sú heterogénne s veľkosťou domén približne viac ako 100–200 nm. Podobná koncepcia aplikácie je tiež pri meraní vodíkových  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  spin-mriežkových relaxačných časov v rotujúcej sústave súradnej ( $T_{1\rho}$ ). V tomto type experimentov sú však časové periódy, počas ktorých je  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spinová difúzia aktívna, v podstatne kratších rozsahoch a to od mikrosekúnd do 10 milisekúnd. Z tohto dôsledku môže byť  $^1\text{H}$  magnetizácia efektívne prenášaná cez niekoľko desiatok nanometrov. Vtedy, ak má multi-komponentný systém uniformný  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačný čas, môže byť považovaný za homogénny s veľkosťou domén menšou než niekoľko nanometrov<sup>23</sup>.

Po druhé, sú to experimenty sledujúce relaxáciu  $^{13}\text{C}$  jadriér, ktoré skúmajú hlavne dynamiku systému. Sú to uhlíkové relaxačné experimenty  $T_1(^{13}\text{C})$  a  $T_{1\rho}(^{13}\text{C})$ .  $T_1(^{13}\text{C})$  experimenty sú citlivé na pohyby molekúl v korelačnej frekvencii blízkej rezonančnej frekvencii, čo je približne v rámci stoviek MHz.  $T_{1\rho}(^{13}\text{C})$  relaxační experimenty potom sledujú pomalšie molekulárne pohyby s frekvenciou niekoľko desiatok kHz.

Ako už bolo uvedené vyššie, pomocou vodíkových relaxačných ssNMR experimentov dokážeme potvrdiť homogenitu, či nehomogenitu vzorky, teda premiešanie

zložiek na molekulárnej úrovni. Tieto experimenty dokážu tiež sledovať ovplyvnenie pohyblivosti API a príslušnej ďalšej zložky systému a taktiež predpokladať typ tuhej disperzie. Na obr. 4 je potom rôznych rozsah interakcií a premiešania jednotlivých zložiek v systéme polymér-API zreteľný zo získaných  $T_1(^1\text{H})$  a  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačných dát. V prípade polymérnej matrice tvorenej napr. PVP došlo k výraznému skráteniu jak  $T_1(^1\text{H})$ , tak  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačných časov API, ktoré sú porovnateľné s relaxačnými časmi polymérnej zložky. To jednoznačne potvrdzuje intímne premiešanie oboch zložiek. API je skôr molekulárne dispergovaná v polymérnej matrici, pričom veľkosť prípadných domén je podstatne menšia ako 5 nm. Oproti tomu v prípade polymérnej matrice tvorenej PEG je situácia trochu komplikovanejšia.  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačné časy PEG i API zmerané pre tuhú disperziu sú identické s  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačnými časmi stanovenými pre čisté zložky. To indikuje, že v danom systéme je miešateľnosť oboch zložiek v tuhom stave obmedzená a že spinová difúzia v časovom horizonte desiatok milisekúnd je neefektívna. Systém je teda heterogénny, pričom veľkosť dispergovaných domén API je podstatne väčšia ako 10 nm. Spresnenie tohto údaju sa môže dosiahnuť posúdením  $T_1(^1\text{H})$  relaxačných časov. V prípade PEG matrice je  $T_1(^1\text{H})$  v pripravenej tuhej disperzii o trochu dlhší než v čistom stave, zatiaľ čo relaxačný čas API v polymérnej disperzii sa skrátil. Nedošlo však k úplnému vyrovnaniu oboch časov tak ako v predložom prípade, kedy relaxačné časy API i PVP matrice v tuhej disperzii boli identické. To znamená, že  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  spinová difúzia dokáže iba čiastočne vyrovnávať chovanie  $^1\text{H}$  magne-



Obr. 4.  $T_1(^1\text{H})$  a  $T_{1\rho}(^1\text{H})$  relaxačné krivky zmerané pre dva základné typy tuhých disperzií: amorfný tuhý roztok, ktorý je reprezentovaný systémom AcSalAc/ T-but, 30 % + PVP<sub>7600</sub>/ T-but, 70 %, lyofilizovaný (a), a kryštalická disperzia AcSalAc/ T-but, 30 % + PEG<sub>10 000</sub>/ T-but, 70 %, lyofilizovaná (b)

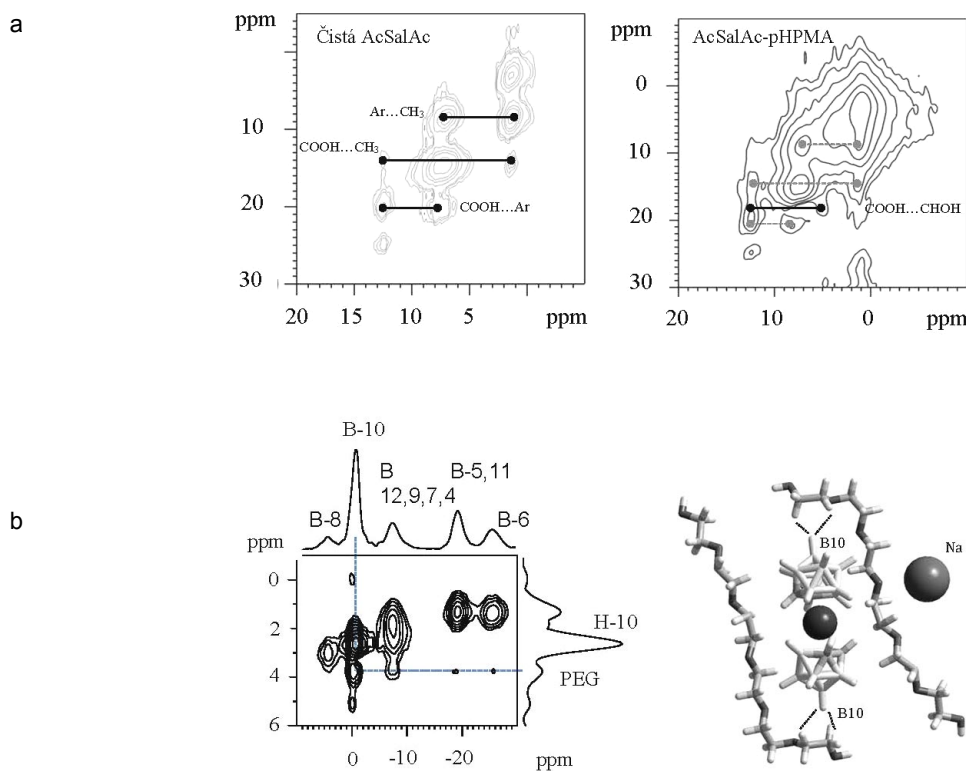
tizácie v systéme. Veľkosť domén API sa potom môže pohybovať v intervale 100–200 nm. Zmeny v relaxačnom chovaní oboch komponent spolu s úzkymi signálmi pozorovanými v  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spektre tak naznačujú, že API vytvára v matici PEG nanokryštalické domény. Prítomnosť väčších častíc, viac ako 500 nm, či mikrokryštálov, by potom nespôsobovala žiadnu pozorovateľnú zmenu relaxačných parametrov<sup>24</sup>.

### 3.3. Korelačné experimenty MAS NMR

Detailné informácie o rozsahu interakcií medzi molekulami API a polymérnej matrice podávajú dvojdimenzionálne korelačné experimenty. Medzi tieto experimenty sa radia napr. homonukleárny  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  BABA (Back-to-back), či heteronukleárny  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR NMR experiment. Korelačné signály, ktoré sa vo výsledných spektrách objavujú, potom indikujú priestorovú blízkosť odpovedajúcich atómov a funkčných skupín. V prípade systémov API-polymér sa potom môžu identifikovať miesta špecifických interakcií medzi molekulami liečiva a polymérnou maticou<sup>20,26</sup>. Príkladom môže byť systém kyselina acetylsalicylová (AcSalAc)-poly[*N*-(2-hydroxypropyl)metakrylamid] (pHPMA). V  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  BABA spektre čistej kryštalickej

AcSalAc sú patrné korelačné signály medzi všetkými dostupnými vodíkovými atómami v molekule (obr. 5a). V spektre tuhej disperzie AcSalAc-pHPMA je potom zreteľný nový korelačný signál, ktorý naznačuje špecifickú interakciu medzi karboxylovou skupinou AcSalAc a CH–OH hydroxylovou skupinou pHPMA.

Ďalším často používaným experimentom vhodným k štúdiu štruktúry je heteronukleárny 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR experiment. Hoci je menej citlivý ako  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  BABA DQ/MAS, ktorý vyživa vysoko zastúpené jadrá  $^1\text{H}$ , je dostatočne postačujúci k prvotnému štúdiu korelujúcich vodíkových a uhlíkových skupín<sup>25</sup>. Vedľa korelácie vodíkov s atómami uhlíka je však možné vzájomne korelovať aj iné typy jadier, napr. atómy vodíka a atómy bóru ( $^{11}\text{B}$ ). Zlúčeniny bóru preukazujú značné terapeutické účinky. Medzi nimi napr. [3-kobalt(III) bis(1,2-dikarbolid)] sodný (NaCoD), ktorý je známy ako inhibítor HIV proteázy<sup>26</sup>. Ako bolo nedávno publikované, ak je tento metalokarbón pripravený ako tuhá disperzia v matici PEG, dochádza ku vzniku vysoko usporiadaného systému.  $^1\text{H}$ - $^{11}\text{B}$  ( $^{13}\text{C}$  a  $^{23}\text{Na}$ ) HETCOR korelačné experimenty potom umožnili nájsť špecifické štruktúrne motívy, ktoré sú príčinou vzniku takto usporiadaných štruktúr. Konkrétne vznik relatívne intenzívneho korelačného signálu medzi bórom B-10



Obr. 5. a)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  BABA NMR korelačné spektrá zmerané pre čistú kryštalickú AcSalAc (vľavo), a AcSalAc-pHPMA (vpravo), b)  $^1\text{H}$ - $^{11}\text{B}$  HETCOR NMR korelačné spektrum zmerané pri extrémne krátkej dobe prenosu polarizácie (50  $\mu\text{s}$ ) a predpokladaná špecifická interakcia medzi dispergovaným NaCoD a PEG maticou

(špička karboránového klastru, obr. 5b) a vodíkmi segmentov PEG. Tento signál je jasne zreteľný i pri použití veľmi krátkej doby spinovej difúzie, čo indikuje veľmi silnú interakciu. V tomto konkrétnom prípade sa jedná o zdvojenú vodíkovú väzbu medzi čiastočne kladne nabitými protónmi CH<sub>2</sub>-O segmentov PEG a čiastočne negatívne nabitými BH protónmi karboránu<sup>27</sup>.

#### 4. Záver

API dispergovaná v polymérnej matici môže byť amorfná, tvoriť nové kryštalové polymorfy, alebo viac či menej molekulových komponent s polymérnymi reťazcami. V tomto článku sú prezentované základné rozdelenia tuhých disperzií aktívnych substancií a možnosti ich charakterizácie pomocou metódy NMR spektroskopie pevnej fáze. Názorne sa preukázalo, že ssNMR je metóda, ktorá umožňuje posúdiť lokálne štruktúrne a konformačné zmeny, prítomnosť domén API a je schopná rozlišovať už v oblasti rozsahu až 1–200 nm. V uvedenom prehľade ssNMR experimentov sú systémy charakterizované pomocou základných a rozvinutých dvojdimenzionálnych metód ssNMR, ktoré poskytujú vysoké rozlíšenie a ľahšiu interpretáciu. Už v základných experimentoch <sup>13</sup>C MAS NMR a <sup>13</sup>C CP/MAS NMR sú pozorované dostatočné zmeny vyhovujúce k prvotnému predpokladu rozdelenia systémov do jednotlivých typov tuhých disperzií. Na detailnejšiu charakterizáciu týchto systémov je potom vhodné použiť zložitejšie experimenty, ako sú relaxačné experimenty T<sub>1</sub>(<sup>1</sup>H) CP/MAS, T<sub>1ρ</sub>(<sup>1</sup>H) CP/MAS NMR a dvojdimenzionálne <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HETCOR NMR, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H BABA MAS NMR korelačné experimenty s vysokým rozlíšením. Tieto experimenty umožňujú získať dôležité štruktúrne informácie systému i na krátku vzdialenosť, sledovať molekulárnu mobilitu systémov tuhých disperzií v relatívne krátkom čase a následne nastoliť predpoklad ovplyvnenia biodostupnosti API v polymérnych disperzných systémoch. Na základe tohto referátového príspevku je možné teda tvrdiť, že NMR spektroskopie pevnej fáze je vhodným nástrojom k štúdiu týchto farmaceutických tuhých disperzií a umožňuje získať rýchlu a presnú informáciu o štruktúre a dynamike systémov pre základný výskum i farmaceutický priemysel. Dôvod, prečo sa ssNMR vo farmaceutickej analýze príliš nepoužíva, je jej drahé prístrojové vybavenie.

#### Zoznam skratiek

AcSalAc	kyselina acetylsalicylová
API	aktívna farmaceutická ingrediencia
BCS	biofarmaceutický klasifikačný systém
CP	cross-polarization
DSC	diferenčná skenovacia kalorimetria
FDA	Food and Drug Administration
GIT	gastrointestinálny trakt
MAS	magic-angle spinning
NaCoD	[3-kobalt(III) bis(1,2-dikarbolid)] sodný
PEG	polyetylglykol

pHPMA	poly[N-(2-hydroxypropyl)metakrylamid]
PVP	polyvinylpyrrolidon
ssNMR	NMR spektroskopie pevnej fáze
SÚKL	Státni ústav pro kontrolu léčiv
T-but	terc-butanol
TEM	transmisná elektrónová mikroskopia
TGA	termogravimetrická analýza
XRPD	prášková röntgenová difrakcia

*Táto práca vznikla za finančnej pomoci Grantovej agentúry ČR (GA ČR, Grant č. P106/11/P426).*

*Ďakujeme Univerzite Karlovej v Prahe za umožnenie PhD. štúdia.*

#### LITERATÚRA

- Kratochvíl B.: Chem. Listy 104, 823 (2010).
- Chemburkar S. R., Bauer J., Deming K., Spiwek H., Patel, J. Morris K., Henry R., Spanton S., Dziki W., Porter W., Quick J., Bauer P., Donaubaauer J., Narayanan B. A., Soldani M., McFarland D., McFarland K.: Org. Process Res. Dev. 4, 413 (2000).
- World Health Organization: Multisource (Generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability, Working document QAS/04.093/Rev.4 (Switzerland 2005).
- Purohit R., Venugopalan P.: Resonance 14, 882 (2009).
- Vasconcelos T., Sarmiento B., Costa P.: Drug Disc. Today 12, 1068 (2007).
- Pham T. N., Watson S. A., Edwards A. J., Chavda M., Clawson J. S., Strohmeier M., Vogt F. G.: Mol. Pharmaceut. 7, 1667 (2010).
- Ambike A. A., Mahadik K. R., Paradkar A.: Int. J. Pharm. 282, 151 (2004).
- Okáčová L., Vetchý D., Franc A., Rabišková M., Kratochvíl B.: Chem. Listy 104, 21 (2010).
- Okáčová L., Vetchý D., Franc A., Rabišková M.: Chem. Listy 105, 34 (2011).
- Sekiguchi K., Obi N.: Chem. Pharm. Bull. 9, 866 (1961).
- Sekiguchi K., Obi N., Ueda Y.: Chem. Pharm. Bull. 12, 134 (1964).
- Chiou W. L., Riegelman S.: J. Pharm. Sci. 58, 1505 (1969).
- Chiou W. L., Riegelman S.: J. Pharm. Sci. 60, 1281 (1971).
- Kawabata Y., Yamamoto K., Debari K., Onoue S., Yamada S.: Eur. J. Pharm. Sci. 39, 256 (2010).
- van Drooge D. J.: Dissertation. University of Groningen, The Netherlands, 2006.
- Rong L. (ed.): Water-insoluble drug formulation. 2. vyd. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton 2008.
- Leuner C., Dressman J.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 47 (2000).
- Ghaste R., Dhanyakumar C. D., Shah R. R., Ghodke D. S.: Latest review. Pharmainfo.net 7, (2009).

19. Schantz S., Hoppu P., Juppo A. M.: *J. Pharm. Sci.* 98, 1862 (2008).
20. Vogt F. G., Katrincic L. M., Long s. T., Mueller, R. L., Carlton R. A., Sun Y. T., Johnson M. N., Copley R. C. B.: *J. Pharm. Sci.* 97, 4756 (2008).
21. Brus J.: *Chem. Listy* 99, 99 (2005).
22. Saito K., Martineau Ch., Fink G., Taulelle F.: *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 40, 66 (2011).
23. Urbanova M., Brus J., Sedenkova I., Policianova O., Kobera L.: *Spectrochim. Acta, Part A* 100, 59 (2013).
24. Speváček J., Brus J., Divers T., Grohens Y.: *Eur. Polym. J.* 43, 1866 (2007).
25. Scott R. A., Lukehart Ch. M. (ed.): *Application of Physical Methods to Inorganic and Bioinorganic Chemistry*. Wiley, Chichester 2007.
26. Uchman M., Cígler P., Grüner B., Procházka K., Matějčík P.: *J. Colloid Interface Sci.* 348, 129 (2010).
27. Matějčík P., Brus, J., Jigounov, A., Pleštil, J., Uchman, M., Procházka, K., Gradzielski, M.: *Macromolecules* 44, 3847 (2011).

**O. Policianová, M. Urbanová, L. Kobera, and J. Brus** (*Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Solid-state NMR Characterization of Solid Dispersions of Drugs in Polymer Matrices by NMR Spectroscopy**

Unfortunately promising pharmaceutical substances currently discovered are strongly hydrophobic exhibiting thus low bioavailability. One of the promising ways out is increasing solubility and bioavailability of these substances and reformulation of poorly water-soluble drugs into the form of solid dispersions in water-soluble polymer matrices. In this brief review we present an introduction to the problems of poorly water-soluble drugs, discuss the classification of the prepared solid dispersions and, in particular, focus on their structure characterization by solid-state NMR spectroscopy that is a powerful tool for detailed and fast pharmaceutical product analysis. As demonstrated the primary structural features discerning various types of solid dispersions can be revealed by basic  $^{13}\text{C}$  MAS NMR and  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR experiments. The experiments  $T_1$  ( $^1\text{H}$ ) CP/MAS,  $T_{1\rho}$ ( $^1\text{H}$ ) CP/MAS NMR then provide clear information on morphology and the extent of incorporation of active pharmaceutical ingredient (API) in polymer matrix. Finally 2D correlation techniques such as  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HETCOR NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  BABA MAS NMR allow finding the structure motifs that are responsible for interaction between API and polymer chains. ssNMR experiments, presented in this review, bring the option for fast and exact identification and detection of structure details and mobility of API in polymer matrices in a relatively short experimental time. By combining these experiments it is possible to expect the influence of bioavailability of API in solid dispersion.