

## TERNÁRNÍ FÁZOVÉ DIAGRAMY KOKRYSTALŮ TROSPIMUM-CHLORIDU

TEREZA BENČO, VERONIKA SLÁDKOVÁ  
a BOHUMIL KRATOCHVÍL

Ústav chemie pevných látek, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
bohutil.kratochvil@vscht.cz

Došlo 19.6.17, přijato 14.9.17.

Klíčová slova: kokrystaly trospium chloridu, ternární fázové diagramy, rozpustnost

### Úvod

Nízká biodostupnost řady aktuálních léčivých látek (API) je způsobena především jejich nízkou rozpustností. Zvýšení rozpustnosti bývá dokonce natolik problematické, že ani klasické postupy, např. redukce velikosti částic, nemusí být dostatečně účinné. Biodostupnost proto bývá zvyšována transformací léčivé látky do formy solí, amorfní fáze, nebo moderně do formy kokryсталů<sup>1,2</sup>.

Kokryстал je multikomponentní sloučenina typu host:hostitel, kde pozici hostitele zaujímá léčivá látka a hosta kokryсталizační partner (koformer)<sup>3</sup>. Farmaceutický kokryстал lze připravit různými metodami, mezi které patří např. krystalizace z roztoku, mletí, krystalizace tavením atd.<sup>4,5</sup>. Sofistikovaná výroba kilových množství kokryсталů však vyžaduje analýzu ve formě ternárních fázových diagramů. V těchto diagramech jsou obsaženy informace o chování systému, což je důležité nejen pro výběr vhodného kokryсталizačního partnera, ale také pro navrhování (ko)krystalizačního procesu<sup>6</sup>.

Ternární fázové diagramy lze sestavit pomocí predikce, která je založená na hodnotách rozpustností. Pro modelování těchto diagramů se využívají aproximace, uvedené např. v práci Ainouze<sup>7</sup>. Zjednodušeně tato aproximace říká, že malé množství API přidané do čistého roztoku koformeru nezmění jeho rozpustnost. Tuto aproximaci lze popsat takto:

$$x_A = x_A^* \quad \text{kde } A = \text{API} \quad (1)$$

$$x_B = x_B^* \quad \text{kde } B = \text{koformer} \quad (2)$$

přičemž  $x$  vyjadřuje molární frakci a \* odpovídá binární rozpustnosti čisté složky za definované teploty.

Pro popis rovnováhy mezi kokryсталem a roztokem byla stanovena konstanta  $K_{app}$ :

$$K_{app} = x_A^a \cdot x_B^b \quad (3)$$



kde  $x$  vyjadřuje molární nebo hmotnostní frakci umocněnou stechiometrickými koeficienty  $a, b$ .

Rozpustnost v ternárním systému může být významně ovlivněna také přítomností třetí složky<sup>8</sup>. Jestliže byly získány hodnoty rozpustností a dopočtena konstanta  $K_{app}$ , následuje vizualizace diagramů, např. v softwaru ProSim.

Ternární fázové diagramy lze sestavit také experimentální konstrukcí, ke které lze využít několika metod. Poněkud novějším přístupem je metoda DITA<sup>10</sup> (Discontinuous Isoperibolic Thermal Analysis). Jedná se o kalorimetrickou metodu, která je založena na principu rozpouštění jedné nebo dvou pevných látek za přidávání čistého rozpouštědla. Během rozpouštění dochází k měření tepelné odezvy systému. V této práci byly diagramy konstruovány pomocí podrobné analýzy vzorků, kdy se analyzuje jak kapalná, tak pevná fáze.

Experimentální stanovení diagramů je obtížnější a časově náročnější. Metoda predikce je mnohem jednodušší a časově méně náročná, nemusí ovšem vždy přiléhat korelovat s experimentálně zjištěnými konstrukcemi.

Cílem práce bylo zmapovat kokryсталizační potenciál trospium-chloridu (TCl): změřit jeho rozpustnost, stejně jako kokryсталizačních partnerů a kokryсталů v rozpouštědlech propan-1-olu (PrOH) a butan-1-olu (BuOH). Tato rozpouštědla byla vybrána z toho důvodu, že netvoří s TCl solváty, které by komplikovaly fázové systémy<sup>11</sup> a díky své nízké toxicitě se řadí mezi solventy 3. třídy ICH (cit.<sup>12</sup>).

Naměřené rozpustnosti byly použity pro predikci ternárních fázových diagramů, jejichž přínos spočívá v plánování robustní výroby kokryсталů. Cílem bylo také zkonstruovat ternární fázové diagramy pomocí podrobné analýzy vzorků, kdy se analyzuje kapalná i pevná fáze, a následně porovnat výsledky s diagramy predikovanými a vyhodnotit přínosy zvolených metod.

### Experimentální část

#### Syntéza kokryсталů

Léčivou látkou, zvolenou v této práci, byl trospium-chlorid (TCl) vyráběný firmou Interpharma Praha a.s. Je známo, že TCl tvoří řadu solvátů a kokryсталů. Pro tuto práci byly vybrány kokryсталy TCl s koformery kyselinou salicylovou (TCl-SA 1:1) a kyselinou šťavelovou (TCl-OX 2:1). Pro přípravu těchto kokryсталů byla využita ověřená metoda – mletí s přikapáváním rozpouštědla<sup>4</sup>. Fyzikální směs (TCl + koformer) byla roztírána v třecí misce a přikapáván ethanol. Následně byl produkt změřen na RTG práškovém difraktometru (PANalytical X'Pert PRO, záření CuK $\alpha$ , rozsah 4–40° 2 $\theta$ , software High Score

Plus), aby bylo potvrzeno, že došlo k úplné konverzi na kokrystal.

#### Měření rozpustnosti

Pro stanovení rozpustností výchozích látek a kokrystalů byly využity dvě metody – UV-Vis spektrometrie a gravimetrie.

Rozpustnosti byly měřeny na UV-Vis spektrofotometru UV mini 1240 Shimadzu. Zdrojem záření byla halogenová a deuteriová lampa při rozsahu vlnových délek 190 až 1100 nm, tloušťka kyvety 10 mm. Naměřená data byla vyhodnocena softwarem UV Probe.

Pro každou látku (TCl, OX, SA, kokrystal) bylo připraveno 5 kalibračních roztoků o různé koncentraci, následovalo změření jejich absorbance a poté vytvoření kalibrační přímky v programu Excel. Následně byla změřena absorbance roztoků zředěných tak, aby absorbance byly v lineární části kalibrační přímky a dopočtena výsledná rozpustnost. Všechna měření probíhala za teploty 21 °C.

Metodou gravimetrie byla stanovována rozpustnost TCl a koformerů. Rozpustnost kokrystalů takto změřena nebyla, neboť tato metoda vyžaduje větší množství materiálu, který nebyl k dispozici. Nejdříve byl připraven nasycený roztok dané látky v příslušném rozpouštědle. Přesný objem nasyceného roztoku byl převeden do předem zvážené baňky. Poté byl solvent odpařen a baňka s pevným podílem zvážena a dopočtena rozpustnost. Pevný podíl, který zůstal v baňce po odpaření solventu, byl analyzován pomocí RTG práškové difrakce.

#### Predikce diagramů

Jak již bylo zmíněno výše, predikce diagramů je založena na hodnotách rozpustností. Poté, co byly naměřeny hodnoty rozpustností, byla data zpracována v Excelu. Do-

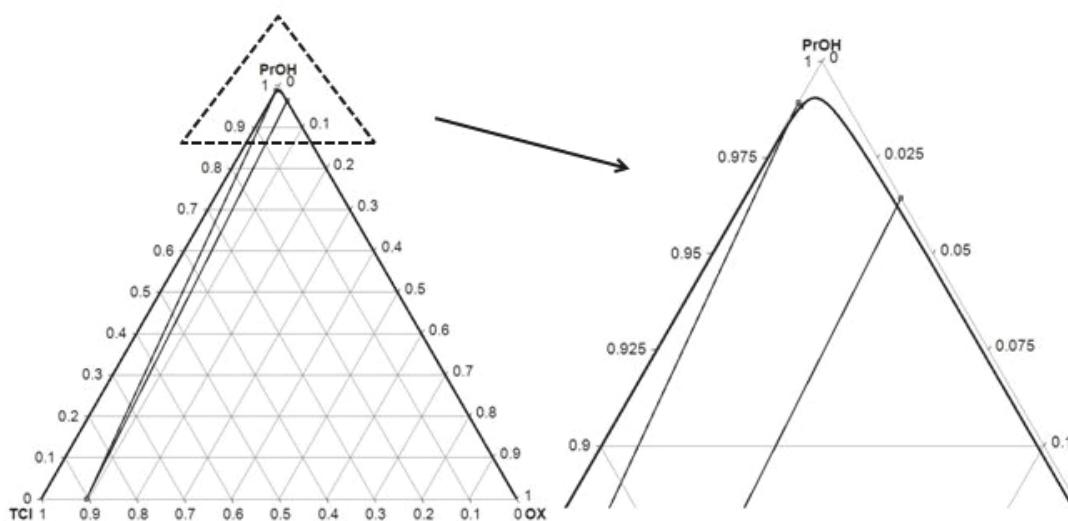
počtena byla konstanta  $K_{app}$  a také další údaje potřebné pro predikci. Poté byly hodnoty vloženy do softwaru ProSim, kde proběhla vizualizace predikovaných diagramů (obr. 1).

#### Konstrukce diagramů na základě experimentů

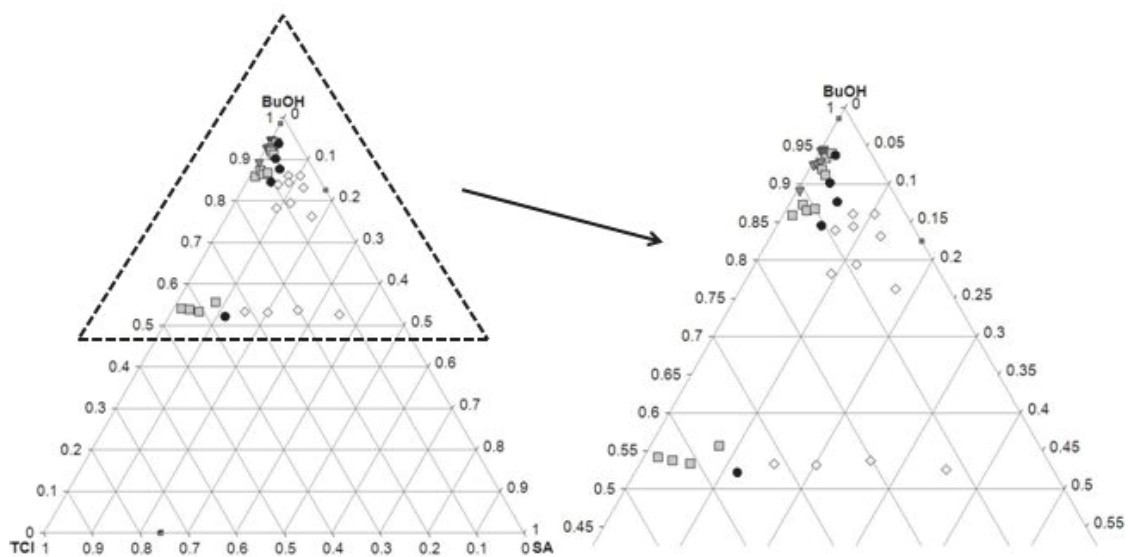
V tomto případě byla využita metoda podrobné analýzy suspenzí, kdy se analyzuje jak pevná, tak i kapalná fáze. Bylo připraveno celkem 9 fyzikálních směsí o různých poměrech pro měření v BuOH a 6 fyzikálních směsí pro měření v PrOH. Fyzikální směs vznikla smícháním TCl a koformeru v daném poměru. Směs byla homogenizována v třecí misce. Z těchto směsí byly postupně připraveny 4 skupiny suspenzí, které se lišily množstvím přidaného rozpouštědla. První suspenze byly připraveny přidáním 3 ml rozpouštědla. Nejmenší množství přidaného rozpouštědla bylo 0,3 ml. V BuOH bylo připraveno celkem 36 suspenzí a v PrOH 24 suspenzí. Z těchto experimentů byly sestaveny diagramy v hmotnostním i molárním poměru. Připravená skupina suspenzí byla umístěna na termostátovanou třepačku po dobu jednoho týdne při teplotě 23 °C. Po uplynutí této doby byla suspenze zfiltrována. Při přípravě suspenzí byly zaznamenávány tři hmotnosti. Hmotnost prázdné lahvičky, lahvičky s fyzikální směsí a hmotnost lahvičky s fyzikální směsí po přidání rozpouštědla. Hmotnost přidaného rozpouštědla byla získána vážením, nikoliv přepočtem z objemu rozpouštědla.

U suspenzí, kde byly přidány 3 ml a 2 ml rozpouštědla, byl pro analýzu ponechán kapalný i pevný podíl. U suspenzí tvořených 1 ml a 0,3 ml nebylo možné získat po filtraci dostatečné množství kapalného podílu. Tyto suspenze sloužily pouze pro analyzování pevných fází.

Po filtraci suspenzí byly pevné podíly usušeny ponecháním na vzduchu a poté byly změřeny na RTG práškovém difraktometru. Difraktogram obsahoval buď čistý TCl, koformer, kokrystal nebo směs kokrystal + TCl nebo



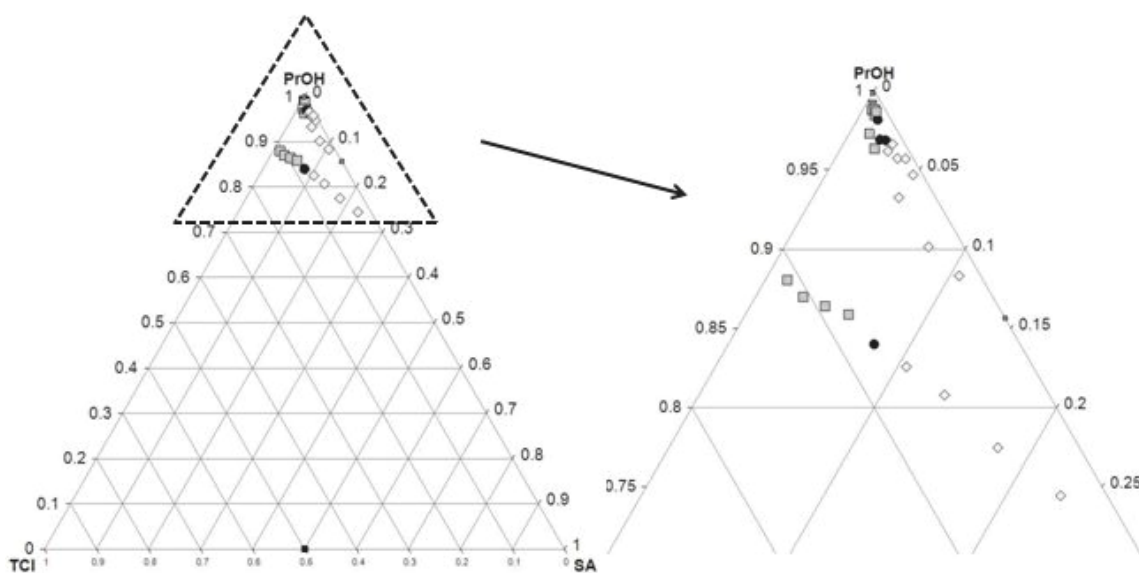
Obr. 1. Kokrystal TCl-OX v PrOH. Predikovaný diagram pro hmotnostní poměr



Obr. 2. Experimentální konstrukce diagramu pro kokrystal TCl-SA v BuOH v hmotnostním poměru; ▼ TCl, ■ kokrystal + TCl, ● kokrystal, ◆ kokrystal + SA

kokrystal + SA (OX). V případě, že se jednalo o směs, bylo stanoveno procentuální zastoupení jednotlivých komponent pomocí Rietveldova fitu v krystalografickém programu Jana 2006 (cit.<sup>13</sup>). Každá suspenze představuje v diagramu jeden bod (obr. 2 a 3).

Kapalné podíly ze suspenzí, které obsahovaly 3 ml a 2 ml solventu, byly změřeny na UV-Vis spektrofotometru. Kalibrační křivka byla sestavena z pěti roztoků kyseliny salicylové. Kapalné podíly bylo potřeba hodně naředit, aby absorbovaly v lineární části kalibrační křivky. Byly



Obr. 3. Experimentální konstrukce diagramu pro kokrystal TCl-SA v PrOH v molárním poměru; ▼ TCl, ■ kokrystal + TCl, ● kokrystal, ◆ kokrystal + SA

dopočteny hodnoty koncentrace, které odpovídají kyselině salicylové v roztoku. Jelikož množství vzorků, se kterými se pracovalo, bylo velmi malé, nebylo možné zjistit po filtraci suspenzí přesné množství pevné a kapalné fáze. V průběhu práce docházelo ke ztrátám, které při tak malém množství vzorku nebyly zanedbatelné. Z tohoto důvodu nelze na základě výpočtů získat koncentraci TCl v roztoku.

Koncentrace TCl byla zjištěna v kapalných podílech ze suspenzí, které obsahovaly největší množství rozpouštědla (3 ml). Tyto roztoky byly odpařeny na vakuové odparce a dosušeny v sušárně. Po vychladnutí byly baňky s pevným podílem zváženy a byla dopočtena koncentrace TCl v kapalném podílu.

## Výsledky a diskuse

Pro predikci diagramů byly využity hodnoty získané pomocí UV-Vis spektrofotometrie, zatížené stejnou chybou měření. Pouze rozpustnost kyseliny šťavelové v PrOH se nepodařilo změřit, protože absorpční pás se nenacházel v rozsahu vlnové délky, a tudíž byla použita hodnota získaná z gravimetrie. Metoda gravimetrie byla využita spíše jako doplňující metoda, která sloužila k porovnání, zda jsou hodnoty rozpustností z UV-Vis spektrofotometru správné. U kyseliny salicylové v PrOH se rozpustnosti získané z obou metod od sebe výrazně lišily. Z literatury bylo zjištěno<sup>14</sup>, že rozpustnost kyseliny salicylové činí 279 mg ml<sup>-1</sup>, proto byla pro predikci zvolena hodnota rozpustnosti získaná měřením na UV-Vis spektrofotometru. V tab. I jsou uvedeny všechny naměřené hodnoty rozpustností.

Hodnoty  $K_{app}$  pro predikci byly vypočteny pomocí

rovnice (3) a jsou uvedeny v tab. II a III. Z predikovaných dat bylo zkonstruováno celkem 8 diagramů: 4 v hmotnostním a 4 v molárním poměru. Jediná data, která jsou k predikci potřeba, jsou hodnoty rozpustností. Tyto hodnoty však není někdy potřeba měřit, ale lze využít literární data. Ve výsledných predikovaných diagramech je téměř minimální oblast, kde se vyskytuje čistý TCl popřípadě čistý koformer. Oblast kokystalu je poměrně široká a křivky oddělující oblasti s výskytem pevné fáze od zóny, kde se nachází pouze kapalina, se vyskytují až ve vrcholu diagramu.

Sestavit ternární fázové diagramy na základě experimentu, pomocí podrobné analýzy vzorků, je podstatně složitější a časově náročnější než predikce. Výsledky získané z experimentální konstrukce jsou ovšem přesnější. Jak lze vidět na obr. 4, oblast kokystalu je mnohem užší, než tomu bylo v predikci. Naopak širší oproti predikci je oblast s výskytem TCl a kyseliny salicylové. Je-li oblast kokystalu velice úzká, je důležité mít tuto zónu dobře popsanou a vědět, kde přesně se nachází.

Výsledky získané z obou metod během této práce se od sebe někdy výrazně liší. Odlišnost může být částečně způsobena nekongruentním chováním kokystalu.

Pomocí podrobné analýzy vzorků se podařilo pro kokystal TCl-SA zkonstruovat ternární fázový diagram a porovnat ho s predikcí v hmotnostním poměru (obr. 2). Body v diagramu získané analýzou kapalných podílů určují hranici, nad kterou už se vyskytuje v systému pouze kapalná fáze. Kapalně podíly ze suspenzí, které obsahovaly v pevné fázi směs (kokystal + TCl, kokystal + SA), určují místo, kde se nachází eutektikum. Výsledky z těchto suspenzí by teoreticky měly směřovat do dvou bodů v diagramu (dvě eutektika). Ve skutečnosti se výsledky lišily, což bylo nejspíš způsobeno chybou měření, popřípadě

Tabulka I  
Naměřené hodnoty rozpustností

Měřená látka	UV-VIS spektrofotometrie		Gravimetrie	
	BuOH $c$ [mg ml <sup>-1</sup> ]	PrOH $c$ [mg ml <sup>-1</sup> ]	BuOH $c$ [mg ml <sup>-1</sup> ]	PrOH $c$ [mg ml <sup>-1</sup> ]
TCl	11,05	8,69	10,30	12,50
SA	171,54	309,57	190,37	205,57
OX	31,38	–	51,00	29,61
kokystal TCl-SA	4,02	6,75	–	–
kokystal TCl-OX	8,14	9,52	–	–

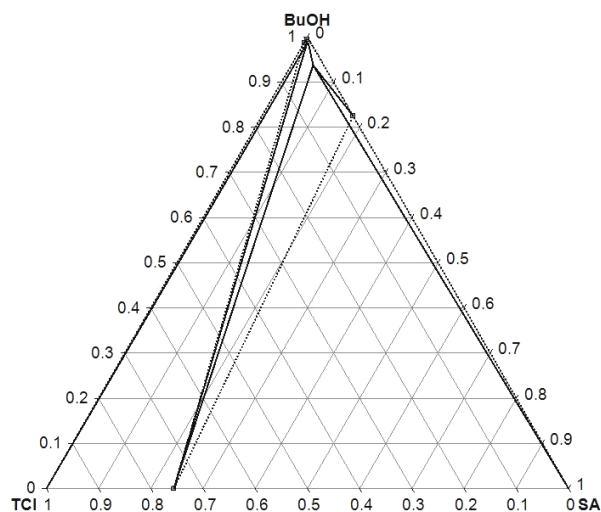
Tabulka II  
Vypočtené hodnoty  $K_{app}$  molárně

TCl-SA		TCl-OX	
BuOH	PrOH	BuOH	PrOH
$1,06 \cdot 10^{-6}$	$1,99 \cdot 10^{-7}$	$7,23 \cdot 10^{-11}$	$6,32 \cdot 10^{-11}$

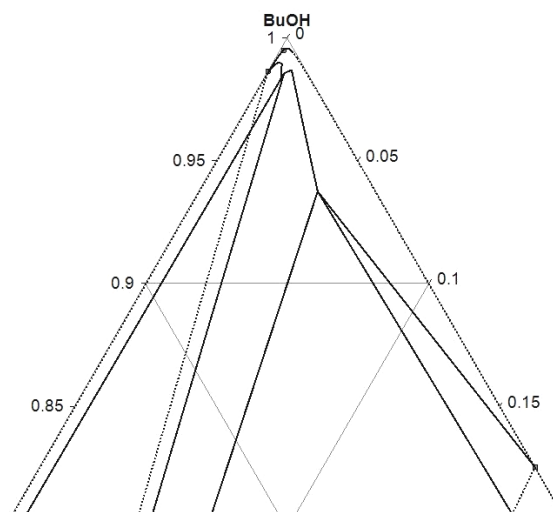
Tabulka III  
Vypočtené hodnoty  $K_{app}$  hmotnostně

TCl-SA		TCl-OX	
BuOH	PrOH	BuOH	PrOH
$4,51 \cdot 10^{-6}$	$1,28 \cdot 10^{-5}$	$7,69 \cdot 10^{-8}$	$1,25 \cdot 10^{-7}$

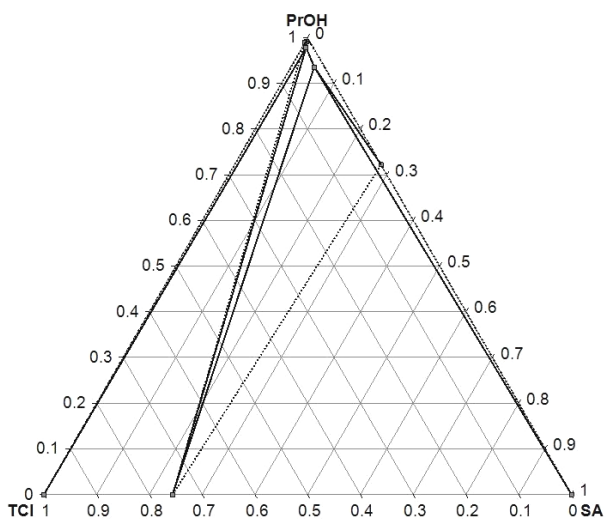
a)



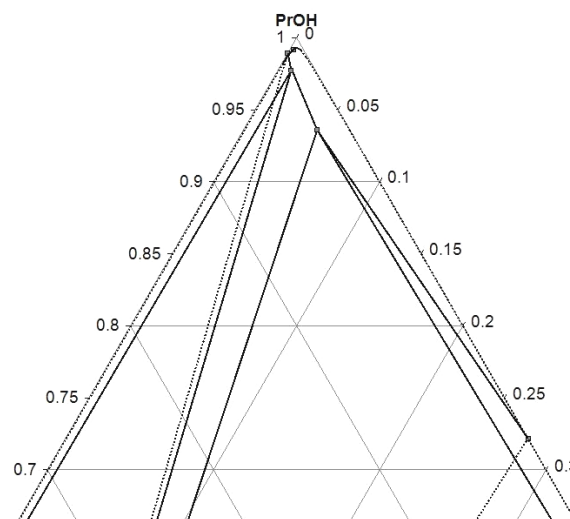
b)



c)



d)



Obr. 4. a) Kokrystal TCl-SA v BuOH. Porovnání experimentální konstrukce (plná čára) a predikce (tečkovaná čára) pro hmotnostní poměr, b) Detail, c) Kokrystal TCl-SA v PrOH. Porovnání experimentální konstrukce (plná čára) a predikce (tečkovaná čára) pro hmotnostní poměr d) Detail

nedostatečným ustanovením rovnováhy. Jako eutektické body v diagramu byly tedy zvoleny výsledky kapalných podílů ze suspenzí, které po spojení s hmotnostním nebo molárním poměrem nejlépe kopírovaly oblast kokrystalu získanou z analyzování pevných podílů. Ostatní body získané z kapalných podílů tvoří křivky oddělující oblasti s výskytem pevné fáze od oblasti, která je tvořena pouze kapalinou. Jelikož bylo analyzováno omezené množství kapalných frakcí, nejsou křivky dokonale hladké. Oblast, kde se vyskytuje v pevné fázi pouze čistý kokrystal, je velice úzká. Toto chování bylo pozorováno v obou rozpouštědlech.

## Závěr

Využitím predikce se podařilo sestavit diagramy pro dva kokrystaly – trospium-chlorid s kyselinou salicylovou a trospium-chlorid s kyselinou šťavelovou. Pro každý kokrystal byla predikce provedena ve dvou rozpouštědlech (PrOH, BuOH), v hmotnostním a molárním poměru. Experimentálně bylo možné sestavit ternární diagramy pouze pro kokrystal trospium chloridu s kyselinou salicylovou v obou zmíněných rozpouštědlech, a to na základě analýzy pevné a kapalně fáze v systému.

Z porovnání diagramů získaných predikcí a na základě experimentu bylo zjištěno, že výsledky se od sebe liší. Přesnější informaci poskytuje experimentální konstrukce a to v oblasti, kde se nachází pouze čistý kokrystal.

*Autoři děkují za finanční podporu grantu GAČR P206 16-10035S.*

#### LITERATURA

1. Kratochvíl B.: Chem. Listy 104, 823 (2010).
2. Schultheiss N., Newman A.: Cryst. Growth Des. 9, 2950 (2009).
3. Aakeroy C. B., Salmon D. J.: CrystEngComm 7, 439 (2005).
4. Sládková V., Cibulková J., Eigner V., Štunc A., Kratochvíl B., Rohlíček J.: Cryst. Growth Des. 14, 2931 (2014).
5. Sládková V., Kratochvíl B., Dorožko E.: Chem. Listy 108, 1018 (2014).
6. Holáň J., Štěpánek F., Billot P., Ridvan L.: Eur. J. Pharm. Sci. 63, 124 (2014).
7. Ainouz A., Authelin J. R., Billot P., Lieberman H.: Int. J. Pharm. 374, 82 (2009).
8. Lange L., Lehmkemper K., Sadowski G.: Cryst. Growth Des. 16, 2726 (2016).
9. [http://www.prosim.net/en/resources-free-tools\\_7-9.php](http://www.prosim.net/en/resources-free-tools_7-9.php), staženo 30.1.2017.
10. Marchand P., Lefebvre L., Querniard F., Cardinael P., Perez G., Counioux J. J., Coquerel G.: Tetrahedron-Asymmetry 15, 2455 (2004).
11. Sládková V., Skalická T., Skořepová E., Čejka J., Eigner V., Kratochvíl B.: CrystEngComm 17, 4712 (2015).
12. Grodowska K., Parczewski A.: Acta Pol. Pharm. 67, 3 (2010).
13. <http://jana.fzu.cz/>, staženo 30.1.2017.
14. Lim J., Jang S., Cho H. K., Shin M. S., Kim H.: J. Chem. Thermodyn. 57, 295 (2013).

#### **T. Benčo, V. Sládková, and B. Kratochvíl** (Department of Solid State Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague): **Ternary Phase Diagrams of Trospium Chloride Cocrystals**

Ternary phase diagrams are used for the cocrystal synthesis because they allow to conveniently choose the coformer and to define optimal process conditions. This article deals with the construction of predicted and experimental ternary phase diagrams of trospium chloride as the active substance. At first, the pre-selected co-crystals of trospium chloride with salicylic acid and trospium chloride with oxalic acid were prepared. Subsequently, the solubilities of the individual components and the co-crystals were measured. Values obtained were used for the prediction of cocrystals from ternary phase diagrams in two solvents (propan-1-ol and butan-1-ol). Experimental construction of diagrams was based on the detailed analysis of prepared suspensions of well-defined composition. Solid phases of suspensions were analyzed by X-ray powder diffraction, the liquid phases by UV-Vis spectrophotometry and gravimetry. In this way, diagrams for the co-crystal of trospium chloride with salicylic acid were created. Finally, predicted and experimental constructions were compared and the benefits and differences discussed.