

## PŮVODNÍ PRÁCE

# Sledování vzniku hydrátů diklofenaku sodné soli a jejich vlivu na disoluci léčiva z připravených tablet

## Monitoring of formation of diclofenac sodium salt hydrates and their influence on the drug dissolution from prepared tablets

Petr Doležel • Jan Muselík • Michaela Králová • David Vetchý

Došlo 16. září 2013/ Přijato 11. listopadu 2013

### Souhrn

NIR spektroskopie společně s vícerozměrnou analýzou dat se použila k analýze hydrátů diklofenaku sodné soli připravených z nevodných rozpouštědel tetrahydrofuranu a methanolu za standardních laboratorních podmínek při 20 °C a RH < 60 %. Potvrdilo se, že pomocí vyvinutého PLS regresního modelu lze sledovat proces vzniku hydrátů. Dále se zjistilo, že při přípravě lékové formy využívající impregnaci na pevný nosič z nevodných rozpouštědel vzniká hydratovaná forma diklofenaku sodné soli, což se výsledně projevuje až dvojnásobným zpomalením uvolňování léčiva z tablet. NIR spektroskopie se zde potvrdila jako jedna z účinných PAT (process analytical technology) metod.

**Klíčová slova:** PAT metody • PLS regrese • NIR spektroskopie • hydráty • impregnace • diklofenak sodná sůl

### Summary

NIR spectroscopy together with multivariate data analysis were used to analyze the hydrates of diclofenac sodium prepared from the non-aqueous solvents tetrahydrofuran and methanol under standard laboratory conditions at 20 °C and relative humidity less than 60%. It was confirmed that the developed PLS regression model can monitor the process of formation of hydrates. It was also found that the hydrated form of diclofenac

sodium arises during the preparation of the dosage form the using technology of impregnating the solid carrier by non-aqueous solvents, which resulted in reducing of the drug release rate from prepared tablets up to twice. NIR spectroscopy was confirmed as one of the effective PAT (Process Analytical Technology) methods.

**Keywords:** process analytical technology method • PLS regression • NIR spectroscopy • hydrates • impregnation • diclofenac sodium

### Úvod

Odhaduje se, že nejméně 1/3 farmaceuticky účinných látek je schopna s molekulami vody vytvářet pevnou krystalickou strukturu zvanou hydrát. Tato pseudopolymorfni přeměna může nastávat v průběhu technologických procesů, jako je vlhká granulace, potahování tablet, krystalizace, nebo během skladování suroviny. Hydratovaná látka pak může mít odlišné fyzikální, chemické a farmakologické vlastnosti, jako jsou tokové vlastnosti, elektrostatický náboj, adhezivita, rozpustnost, stabilita nebo biodostupnost<sup>1–3</sup>.

Mezi látky schopné tvořit hydráty za běžných podmínek se řadí i diklofenak sodná sůl (DS). Už za podmínek dlouhodobého stabilitního zkoušení (25 ± 2 °C/60 ± 5 % relativní vlhkosti (RH) nebo 30 ± 2 °C/65 ± 5 % RH) dochází prokazatelně k začleňování molekul vody ze vzdušné vlhkosti do krystalické struktury. Hydráty mohou vznikat i při krystalizaci DS z nevodných rozpouštědel při 25 °C a RH menším než 60 %<sup>1,4</sup>.

Jedna z vhodných metod ke studiu procesů tvorby hydrátů je spektroskopie v blízké infračervené oblasti (NIR spektroskopie), protože v oblasti vlnových délek 800–2500 nm dochází k absorpci záření především u lehkých atomů s vodíkem, tedy i O-H v molekule vody. Jedná se o metodu procesní analytické technologie (process analytical technology, PAT) umožňující analyzovat vzorky přímo bez úprav, jako je rozpouštění, drcení nebo ředění, a tedy s minimálním ovlivněním krystalické

P. Doležel • doc. Mgr. Jan Muselík, Ph.D. (✉) • D. Vetchý  
Ústav technologie léků, Veterinární a farmaceutická univerzita  
Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno  
e-mail: muselikj@vfu.cz

M. Králová  
Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny  
a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

struktury látky<sup>5</sup>). Jelikož výsledná spektra vznikají z velkého množství překrývajících se pásů, využívají se k jejich analýze vícerozměrné metody dekompozice dat, jako např. PLS regrese nebo-li metoda částečných nejmenších čtverců. Touto metodou je možné vyjádřit závislosti mezi maticí spektrálních dat a maticí závislé proměnné (např. obsahu vody) pomocí redukovaného počtu latentních proměnných, tzv. principal components, a odhalit tak spektrální pásy, které významně popisují závislou proměnnou<sup>6</sup>.

Cílem práce byla příprava hydrátů diklofenaku sodné soli a jejich hodnocení s využitím NIR spektroskopie, ověřování jejich vzniku při výrobě lékové formy využívající impregnaci na pevný nosič v prostředí organického rozpouštědla a sledování jejich vlivu na disoluční profil připravené lékové formy. Impregnace je v současnosti považována za progresivní metodu, díky které je možné připravit stabilní hydráty nebo polymorfy léčiv, a ovlivnit tak jejich biodostupnost nebo zlepšit obsahovou stejnoměrnost práškových směsí<sup>7, 8</sup>.

## Pokusná část

### Použité suroviny

Diklofenak sodná sůl (DS, Š: OP00407; Zentiva a.s.; Česká republika); Methanol (MeOH, Š: 4530051957; Dr. Kulich Pharma; Česká republika); Tetrahydrofuran (THF) (Š:1502260210; Penta; Česká republika); Mikrokrystalická celulóza (Avicel PH101; Š: 24015007; Pliva-Lachema; Česká republika); Koloidní oxid křemičitý (Aerosil 200; Š: 24020707; Zentiva; Česká republika); Hydrogenfosforečnan vápenatý (Š: 01/51699-01; Budenheim; Německo); Stearan hořečnatý (Š: C3228246, Kulich, Česká republika).

## Metodika

### Příprava hydrátů diklofenaku

Podle postupů z literatury se připravilo několik typů hydrátů. V literatuře popsány DS tetrahydrát (DSH4a) obsahuje 20 hm.% vody, tetrahydrát DS (DSH4b) 20,9 hm. % vody, trihydrát DS (DSH3) 16 hm.% vody a 4,75 hydrát (DSH4,75) 21,2 hm. % vody. DSH4a se připravil skladováním DS v tenké vrstvě na Petriho misce v prostředí o 100 % RH při 20 °C po dobu 24 h. DSH4b se získal rekrystalizací z vody (100 mg DS v 10 ml H<sub>2</sub>O) při 20 °C. DSH3 se připravil a) dehydratací DSH4a při teplotě 40 °C po dobu 3 minut v horkovzdušné troubě, b) uložením DS po dobu 20 minut v prostředí při 40 °C a 75 % RH. DSH4,75 se připravil rekrystalizací z methanolu (50 mg DS v 5 ml MeOH) při 20 °C po dobu 48 h<sup>1, 4, 9</sup>.

### Analýza hydrátů s využitím NIR spektroskopie

Vzorky připravených hydrátů a bezvodého DS (0,5 g) se bezprostředně po přípravě měřily metodou difuzní reflektance na FT-NIR spektroskopu Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, Madison, USA). Měřilo se v rozsahu vlnočtů 10 000–4000 cm<sup>-1</sup> s rozlišením 4 cm<sup>-1</sup>. Každý vzorek se proměřil 60krát a získalo se spektrum

průměrné. Naměřená spektra se upravila metodou SNV (standard normal variate) normalizace, pro korekci efektu rozptylu záření. Následně se provedlo vysušení hydrátů v sušárně při 130 °C po dobu 15 minut, aby se gravimetricky zjistil obsah krystalicky vázané vody<sup>1, 4</sup>). Z naměřených dat se sestrojil vícerozměrný PLS (partial least squares) model pro zjištění závislosti mezi maticí X naměřených spekter a maticí Y % obsahu vody v hydrátech (program Unscrambler X, v. 1.3, Camo Software). Model se validoval úplnou křížovou validací, při které se použije stejná sada vzorků jako při kalibraci s vyloučením vždy jednoho ze standardů. Ze zbylých kalibračních dat se poté sestrojí nový model, který se použije pro kvantifikaci vyloučeného standardu<sup>6</sup>.

### Příprava lékové formy impregnací

Během procesu impregnace se rekrystaloval DS z organického rozpouštědla v disperzním prostředí pomocných látek.

V úvodních experimentech se zkoušela rekrystalizace DS z čistých rozpouštědel MeOH a THF při standardních podmínkách 20 °C a RH < 60% a vzniklé krystaly se následně analyzovaly s využitím NIR spektroskopie na obsah krystalické vody. Následovala příprava tabletoviny s léčivem vázaným impregnací na nosič, která se již neanalyzovala NIR spektroskopii z důvodu nízkého obsahu léčiva ve směsi a složitějším způsobu kalibrace. Předpokládalo se, že léčivo vytvořilo stejnou krystalickou formu jako při krystalizaci z čistých rozpouštědel a impregnace na nosič zabránila jeho případné přeměně<sup>1, 4, 9</sup>.

Disperzní prostředí pro metodu impregnace bylo složené z mikrokrystalické celulózy, koloidního bezvodého oxidu křemičitého a hydrogenfosforečnanu vápenatého. Zhomogenizované látky (4 min; 48 ot./min; Turbula T2F; Švýcarsko) se přesypaly do zařízení Rotolab (Zanchetta; Itálie) a homogenizovaly se společně s DS předem rozpuštěným v MeOH, nebo THF při 40 °C při 1200 ot./min a za sníženého tlaku do úplného odpaření. Poté se k naimpregnované směsi přidaly extragranulární látky (magnesium-stearát a karmelosa sodná sůl) a tabletovina se homogenizovala v přístroji Turbula po dobu 4 minut. Prostou homogenizací pomocných látek s bezvodým DS po dobu 10 minut se dále připravila kontrolní směs. Složení tabletoviny bylo v poměru DS : mikrokrystalická celulóza : koloidní bezvodý oxid křemičitý : hydrogenfosforečnan vápenatý : stearan hořečnatý : karmelosa sodná sůl 15 : 30 : 1 : 51 : 1 : 2 hm.%.

Z tabletovin se vylišovaly tablety s půlící rýhou uprostřed (výstředníkový tabletovací lis KORSCH) o průměrné hmotnosti přibližně 400 mg a o pevnostech 35 N, 65 N a 120 N.

### Analýza lékové formy disoluční zkouškou

Disoluce se provedla na přístroji s pádly (SOTAX AT7 Smart, Švýcarsko) při 37 °C, 50 ot./min, v tlumivém fosforečnanovém roztoku o pH 6,8. Vzorky se odebíraly v 5minutových intervalech po dobu 30 minut a sledovala se absorbance při vlnové délce 276 nm (Perkin Elmer, Lambda 25). Disoluční zkouška se prováděla se třemi tabletami od každého vzorku.

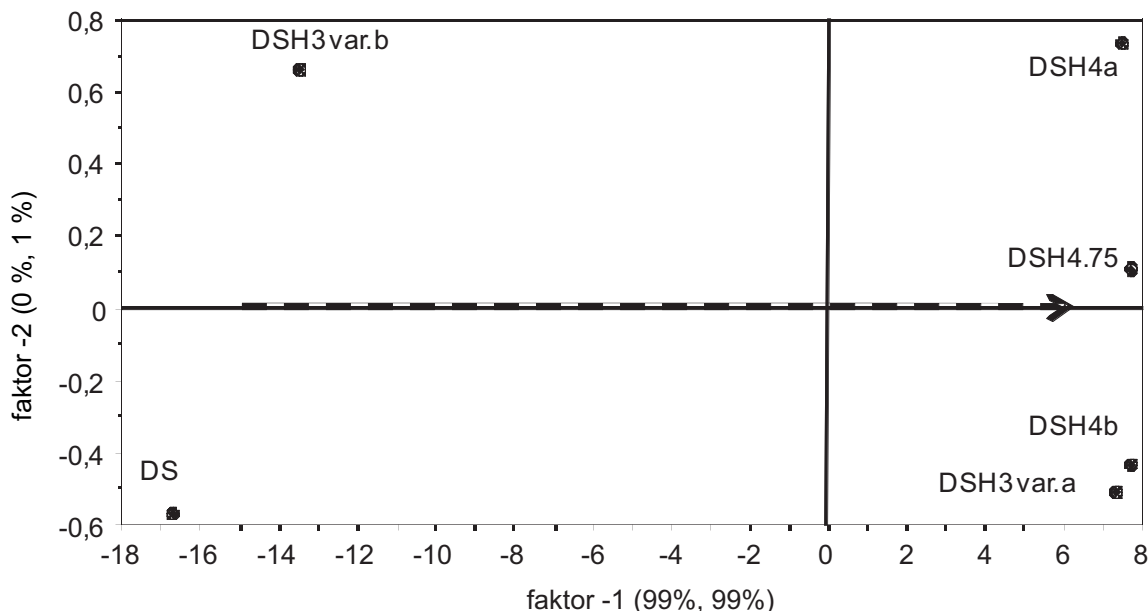
## Výsledky a diskuze

### Příprava hydrátů diklofenaku

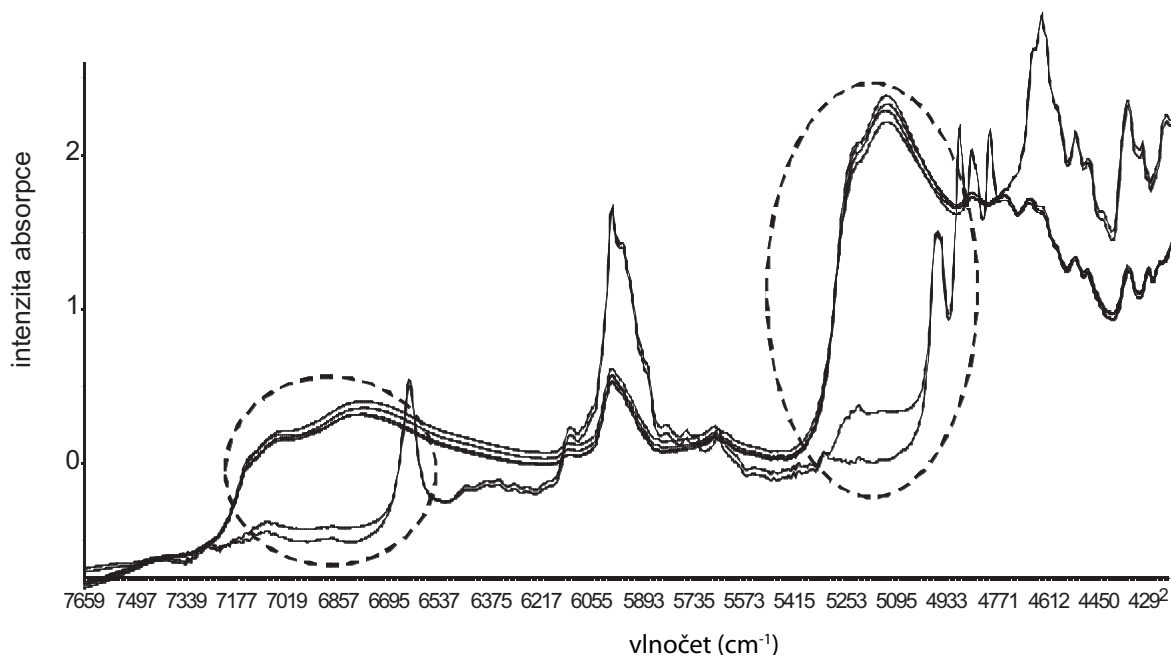
Podle postupů uvedených v literatuře se připravily hydráty DS. Sušením se zjistil obsah vody: 21,06 hm.% v DSH4a, 20,96 hm.% v DSH4b, 18,8 hm.% v DSH3 připraveného variantou a), resp. 4,64 hm.% v DSH3 připraveného variantou b) a 21,24 hm.% v DSH4,75. Kromě postupu pro DSH3 varianta b) se obsah vázané vody přibližně shodoval s literárními zdroji a předpokládalo se tedy, že se připravily tri- a více-hydráty DS.

### Analýza hydrátů s využitím NIR spektroskopie

Ze spekter naměřených z připravených hydrátů se sestrojil PLS model vyjadřující závislost mezi intenzitami vlnových délek a obsahem vody v hydrátech. V grafu komponentních skóre (obr. 1) je 99 % variability matice X a Y popsáno již 1. komponentou. Rozložení vzorků podle 1. komponenty odpovídá jejich hydrataci a je zde dobře patrný rozdíl mezi bezvodým DS, resp. DSH3 varianta b) s nejnižší hodnotou vázané vody a ostatními více-hydráty. Takto sestrojený model vykazuje dobrou kalibrační statistiku (koeficient determinace  $R^2 = 0,978$ ; chyba predikce RMSECV = 1,52). Na obráz-



Obr. 1. PLS-graf komponentních skóre zobrazuje rozložení vzorků v prostoru prvních dvou komponent. Z hlediska interpretace je významná 1. komponenta s 99 % vysvětlené celkové variability. Šipka znázorňuje trend hydratace. V levé části anhydrát DS, následuje částečně hydratovaný vzorek DSH3 varianta b). V pravé části více-hydráty DS.



Obr. 2. Znázornění NIR spekter studovaných vzorků. V oblasti 5000 a 7000  $\text{cm}^{-1}$  jsou označeny (---) měnící se spektrální pásy, které náležejí overtonům, resp. kombinacním přechodům OH skupin vody a vyjadřují stupeň hydratace. V oblasti 6633 a 6000  $\text{cm}^{-1}$  se projevuje silná absorpce bezvodého DS a DSH3 varianta b).

ku 2 jsou znázorněná měřená spektra. V oblasti 7000 a 5000  $\text{cm}^{-1}$  je možné pozorovat rostoucí spektrální pásy v závislosti na hydrataci, náležící overtonům, resp. kombinacím přechodům OH skupin vody<sup>10)</sup>. Vyvinutý PLS model tak umožňoval sledovat proces vzniku hydrátů.

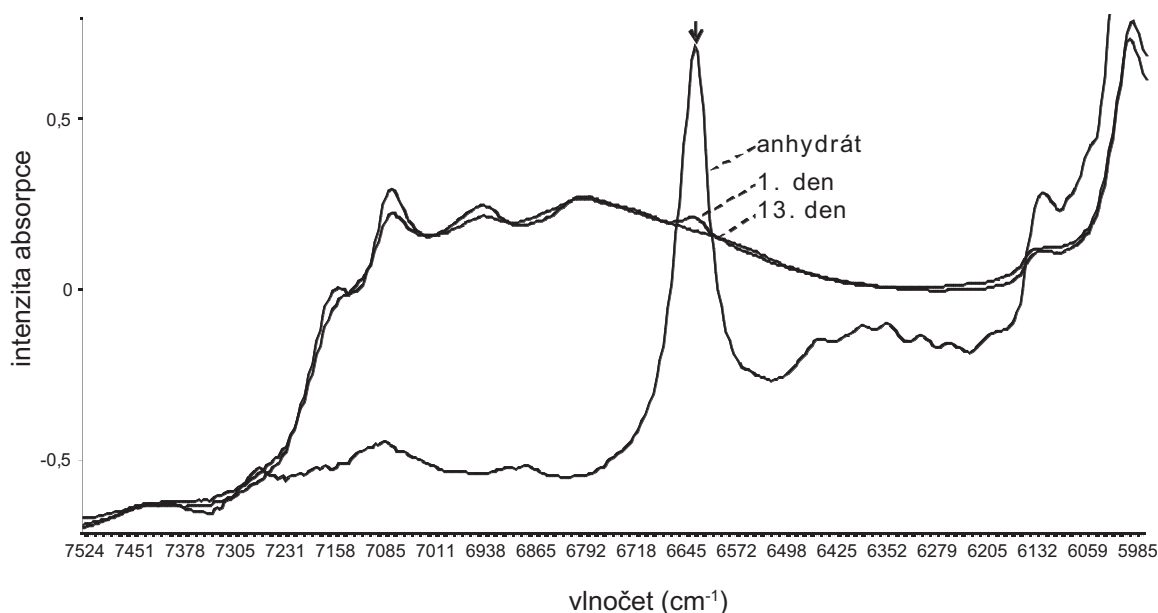
#### Příprava lékové formy impregnací

Rekrytalizací DS z nevodných rozpouštědel (MeOH, THF) za standardních podmínek se připravily krystaly, které se v 1. a 13. dnu po přípravě měřily NIR spektroskopii a na základě vyvinutého PLS modelu se z naměřených spekter předpověděl obsah vázané vody. V případě THF se 1. i 13. den zjistily přibližně stejné hodnoty 18,8, resp. 18,7 % vody. V případě MeOH se 1. den zjistila hodnota 18,1 % a 13. den hodnota 18,6 %

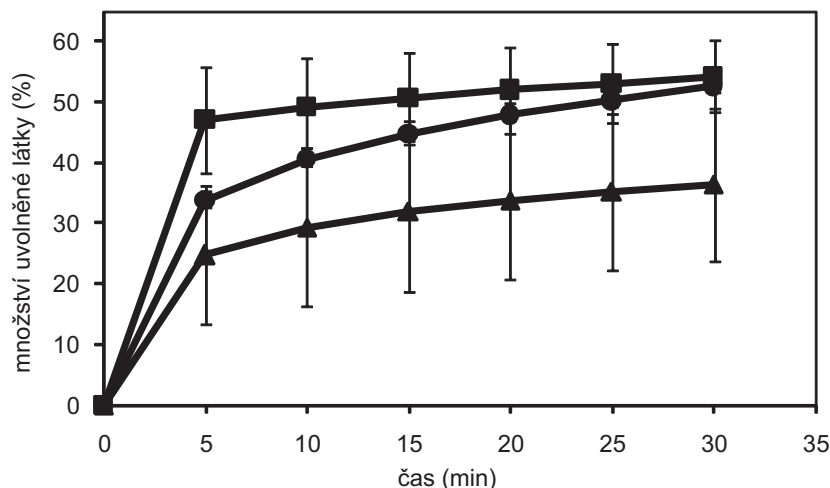
vody. Z obrázku 3 pro MeOH je patrné, že bezprostředně po přípravě krystalů vzorek obsahoval zbytky nehydratované formy DS, která během 13 dnů hydratovala. Vzorky MeOH a THF po 13 dnech skladování již obsahovaly přibližně stejný obsah vody, a tedy i pravděpodobně stejnou formu hydrátu. Vzhledem k chybě predikce 1,52% hydratované vody lze předpokládat vznik tri- nebo více-hydrátů DS.

#### Analýza lékové formy disoluční zkouškou

Na základě disoluce tablet připravených při různých lisovacích tlacích se zjistilo, že nejrychleji se uvolňuje léčivo z kontrolní směsi připravené prostou homogenizací s bezvodým DS. Na obrázku 4 pro tablety lisované tlakem 65 N je patrné nižší množství uvolněného DS



Obr. 3. NIR spektra bezvodého DS a hydrátů DS vykrytalizovaných z methanolu 1. a 13. den po přípravě. Šipka označuje spektrální oblast, v níž absorbují bezvodá forma DS. Ze spektra je patrné, že v 1. dnu po vykrytalizování vzorek obsahoval částečně bezvodou formu DS, která během 13 dnů přešla na formu hydratovanou.



Obr. 4. Porovnání disolučních profilů tablet s diklofenakem sodnou solí o pevnosti 65 N ve fosforečnanovém pufru o pH 6,8 pro tablety lisované z bezvodého DS (■), impregnovaného DS z methanolu (●) a tetrahydrofuranu (▲). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

z obou rozpouštědel, kde DS z THF jeví přibližně dvojnásobné snížení rozpustnosti. V literatuře se popisuje 2,5- a 1,7násobně nižší rozpustnost tetra-, resp. tri-hydrátu DS v porovnání s bezvodou formou<sup>1)</sup>. Vyšší množství uvolněného DS ze vzorku MeOH oproti THF bylo způsobeno pravděpodobně nekompletní hydratací diskutovanou výše. Z výsledků lze usuzovat, že během procesu impregnace léčiva na pevný nosič z nevodných rozpouštědel došlo ke vzniku hydratovaných forem DS, což se projevilo zpomalením uvolňování léčiva z tablet.

**Střet zájmů:** žádný.

## Literatura

1. **Bartolomei M., Rodomonte A., Antoniella E., Minelli G., Bertocchi P.** Hydrate modifications of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium: Solid-state characterisation of a trihydrate form. *J Pharmaceut Biomed* 2007; 45, 443–449.
2. **Kou X., Chan L. W., Steckel H., Heng P. W. S.** Physico-chemical aspects of lactose for inhalation. *Adv Drug Deliver Rev* 2012; 64, 220–232.

3. **Karner S., Urbanetz N. A.** The impact of electrostatic charge in pharmaceutical powders with specific focus on inhalation-powders. *J Aerosol Sci* 2011; 42, 428–445.
4. **Bartolomei M., Bertocchi P., Antoniella E., Rodomonte A.** Physico-chemical characterisation and intrinsic dissolution studies of a new hydrate form of diclofenac sodium: comparison with anhydrous form. *J Pharmaceut Biomed* 2006; 40, 1105–1113.
5. **Muselík J.** Aplikace blízké infračervené spektroskopie ve farmaceutické analýze. *Chem Listy* 2012; 106, 10–15.
6. **Esbensen K. H.** Multivariate Data Analysis – In Praxi, 5. vyd. CAMO Process AS 2004; 598.
7. **Franc A., Rabišková M., Goněc R.** Impregnation: a progressive method in the production of solid dosage forms with low content of poorly soluble drugs. *Eur J Parent Pharm Sci* 2011; 16, 85–93.
8. **Franc A., Rabišková M., Goněc R.** Impregnation method in the production of solid dosage forms containing low-dose poorly absorbable drugs. *Ind Pharm* 2011; 26, 7–9.
9. **Llina's A., Burley J. C., Box K. J., Glen R. C., Goodman J. M.** Diclofenac Solubility: Independent determination of the intrinsic solubility of three crystal forms. *J Med Chem* 2007; 50, 979–983.
10. **Gastaldi D., Canonico F., Irico S., Pellerej D., Paganini M. C.** Near-infrared spectroscopy investigation on the hydration degree of a cement paste. *J Mater Sci* 2010; 45, 3169–3174.

## ZPRÁVY

### ● K životnímu jubileu doc. RNDr. PhMr. Milana Čeladníka, CSc.

Dne 17. prosince 2013 oslavil devadesáté narozeniny doc. RNDr. PhMr. Milan Čeladník, CSc., někdejší vedoucí katedry anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Pan doc. Čeladník patří mezi budovatele českého farmaceutického školství, kterému věnoval celý svůj aktivní věk. Studium farmacie na brněnské univerzitě završil doktorátem získaným na přírodovědecké fakultě v roce 1951. Svoji pedagogickou kariéru zahájil v roce 1955 na farmaceutické fakultě Masarykovy univerzity v Brně, kde již v roce 1960 získal titul kandidáta věd. Po spojení brněnské fakulty s Farmaceutickou fakultou Komenského univerzity v Bratislavě přešel do Bratislavy, kde získal titul docent organické chemie. V roce 1969 otevřela Univerzita Karlova novou Farmaceutickou fakultu v Hradci Králové a pan doc. Čeladník se stal jedním z prvních učitelů, kteří ji pomáhali budovat. Zvláště aktivně se podílel na vytváření koncepce chemických disciplín, a to anorganické, organické i farmaceutické chemie. Od roku 1977 až do roku 1990, kdy odešel do penze, zastával funkci vedoucího katedry anorganické a organické chemie.

Pedagogické působení doc. Čeladníka na hradecké fakultě je široké. Zprvu se věnoval výuce anorganické chemie, avšak záhy se orientoval na výuku organické chemie. Vydal učebnici organické chemie, která byla oceněna cenou rektora UK. Významně přispěl jako spoluautor do kompendia „Chemická léčiva“, redigovaném zakladatelem české školy farmaceutické chemie doc. Bohuslavem Melicharem. Docent Čeladník byl nejen vynikající učitel, ale i vědec. Jeho vědecká práce zasáhla různé oblasti biologicky aktivních látek. Věnoval se chemii steroidů, lokálních anestetik, antibakteriálních látek a za své hradecké éry především studiu potenciálních antituberkulotik pyridinové řady. Pod jeho vedením byly vypracovány četné dizertační práce a mnozí z jeho žáků pokračují v započaté vědecké práci. S výsledky své práce seznámil vědeckou veřejnost v 65 publikacích a ve více než stovce sdělení na vědeckých konferencích. V neposlední řadě musíme zdůraznit, že pan docent byl a zůstává vynikajícím člověkem, s velkou dávkou lidskosti a tolerancí ke svým spolupracovníkům a blízkým.

Vážený pane docente, dovolte nám, abychom Vám jménem svým a všech našich kolegů z katedry anorganické a organické chemie a především jménem celé Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové popřáli k Vaším narozeninám hodně zdraví, radosti ze života a spokojenosti v kruhu svých blízkých.

V. Klimešová, A. Hrabálek