

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie



Diplomová práce

**Problematika rekrystalizace účinných látek
v léčivých přípravcích**

Tomáš Máčalík

© 2019 FaF UK v Hradci Králové

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne: 14.5.2019

.....

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval panu PharmDr. Ondřeji Holasovi, Ph.D. za metodické vedení a cenné připomínky při zpracování mé diplomové práce. Poděkování patří též zaměstnancům TEVA Czech Industries s.r.o. za vstřícnost a zprostředkování výzkumu v tomto farmaceutickém gigantu. Velké díky také patří panu Dr. Aleši Vránovi, kterému touto cestou přeji pevné zdraví a mnoho štěstí při zvládnutí náročné životní situace. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé rodině a přítelkyni za podporu a toleranci během mých studií.

Obsah

1	Abstrakt.....	10
2	Abstract.....	11
3	Zadání	12
	Seznam zkratk a symbolů	13
4	Úvod	14
5	Současný stav poznání.....	15
5.1	Krystalizace	15
5.1.1	Krystalizace APIs.....	15
5.1.1.1	Nukleace	17
5.1.1.2	Termodynamika krystalizace.....	18
5.1.1.3	Mechanismus růstu krystalu a jeho kinetika	19
5.1.1.4	Tvar krystalu.....	21
5.1.1.5	Řízená krystalizace	24
5.1.1.6	Krystalizace polymorfů	25
5.2	Polymorfismus	26
5.2.1	Definice a vymezení.....	26
5.2.2	Polymorfie	27
5.2.3	Predikce polymorfie	28
5.2.4	Termodynamika polymorfie	30
5.2.4.1	Stabilita polymorfie.....	36
5.2.4.2	Kinetika polymorfie	37
5.2.5	Strukturní rozličnosti.....	39
5.3	Polymorfismus jako nástroj vývoje generických léčiv	40
5.4	Metody využívané ke stanovení, měření velikosti a popisu polymorfů.....	41
5.4.1	Gralulometrie	42
5.4.1.1	Velikost částic.....	42
5.4.1.2	Distribuce velikosti částic.....	43

5.4.1.3	Granulometrické metody.....	45
5.4.1.4	Ostatní metody.....	46
5.5	Rekrystalizace.....	47
5.5.1	Statická rekrystalizace.....	47
5.5.2	Dynamická rekrystalizace.....	48
5.5.2.1	Rekrystalizace, jako laboratorní metoda.....	48
5.5.2.2	Rekrystalizace, jako technologická inkompatibilita.....	49
5.6	Problematika polymorfismu v praxi.....	49
5.6.1	Případ 1 - Dimorfní chování ritonaviru.....	50
5.6.2	Případ 2 – Dimorfismus u ranitidinu.....	50
6	Případová studie.....	54
6.1	Úvod.....	54
6.2	Algifen Neo.....	54
6.2.1	Charakteristika přípravku.....	54
6.2.2	Složení.....	55
6.2.2.1	Účinné látky.....	55
6.2.2.2	Pomocné látky.....	55
6.2.3	Skladování a obaly.....	55
6.2.4	Terapeutické indikace.....	55
6.2.5	Farmakologické vlastnosti.....	56
6.2.5.1	Farmakodynamické vlastnosti.....	56
6.2.5.2	Farmakokinetické vlastnosti.....	57
6.2.5.3	Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti přípravku.....	57
6.3	Výroba přípravku Algifen Neo.....	58
6.3.1	Příjem surovin a kontrola totožnosti surovin.....	59
6.3.2	Příprava výrobního zařízení.....	60
6.3.3	Mikronizace a mletí.....	61
6.3.4	Navažování.....	61
6.3.5	Vlastní výroba.....	62
6.3.6	Filtrace.....	63

6.3.7	Homogenizace	64
6.3.8	Odběr vzorků	65
6.3.9	Čištění výrobního zařízení.....	66
6.3.10	Mytí a sterilizace lékovek.....	67
6.3.11	Vytřukávání lékovek	68
6.3.12	Plnění.....	69
6.3.13	Sekundární obaly.....	70
6.3.14	Skladování	73
6.4	Správná výrobní praxe (SVP).....	73
6.4.1	Požadavky SVP.....	73
6.4.2	Dokumenty SVP	74
6.4.2.1	Řízená dokumentace	74
6.4.2.2	Operativní (záznamová) dokumentace.....	75
6.4.2.3	Registrační dokumentace	76
6.4.2.4	Další předpisy	76
6.4.2.5	Validace a revalidace	77
6.4.3	Personál	77
6.4.4	Hygiena.....	79
6.4.5	Prostory.....	81
6.4.5.1	Budovy	81
6.4.5.2	Výrobní prostory.....	81
6.4.5.3	Skladovací prostory.....	81
6.4.5.4	Pomocné prostory	82
6.4.5.5	Čistota a hygienický režim	82
6.5	Kontrola kvality	89
6.6	Rekrystalizace metamizolu.....	90
6.6.1	Případ	90
6.6.2	Kontrolní várka	91
6.6.3	Šetření.....	91
6.6.4	Výsledek šetření.....	92

6.6.5	Vyvozená opatření	93
6.6.6	Dopad pro výrobce	94
7	Výsledky	95
8	Závěr a diskuse	96
9	Použitá literatura.....	97

Seznam obrázků

Obrázek 1:	Schéma krystalizačního procesu	17
Obrázek 2:	Křivka rozpustnosti a vzniku krystalů	19
Obrázek 3:	Růst krystalové plochy	20
Obrázek 4:	Nákres - šest základních druhů farmaceutických krystalů	22
Obrázek 5:	Reálné tvary částic	22
Obrázek 6:	Krystalové struktury minerálů	23
Obrázek 7:	Vliv běžných rozpouštědel na tvar krystalů kyseliny acetylsalicylové .	23
Obrázek 8:	Energetické vs teplotní křivky pro dva polymorfy I a II.....	32
Obrázek 9:	Vynesení enthalpie H vůči teplotě.....	34
Obrázek 10:	E/T diagram dimorfního systému.	35
Obrázek 11:	E/T diagram dimorfního systému II.....	35
Obrázek 12:	Rozdíly mezi enantiotropním a monotropním systémem	36
Obrázek13:	Reakční koordináta vyjadřující krystalizaci v dimorfním systému	38
Obrázek 14:	Soluční diagram pro dimorfní systém.....	39
Obrázek 15:	Definice ekvivalentního průměru koule dV	43
Obrázek 16:	Částice a k ní přiřazené „ekvivalentní koule“	43
Obrázek 17:	Distribuce velikosti částic	44
Obrázek 18:	Kumulativní křivka naměřená metodou laserové difrakce	44
Obrázek 19:	Ranitidin hydrochlorid - léčba žaludečních vředů	50
Obrázek 20:	Originální přípravek (vlevo) vs. jedno z mnoha generik (vpravo)	51
Obrázek 21:	Polymorf I vs. polymorf II	51
Obrázek 22:	Mikroskopie originálního léčiva (vlevo) vs. generika (vpravo).....	52
Obrázek 23:	Ramanovo spektrum originálu (vlevo) vs. generika (vpravo).....	52

Obrázek 24: RTG difraktogram - originál	52
Obrázek 25: RTG difraktogram - generikum	53
Obrázek 26: Algifen Neo 50ml	54
Obrázek 27: Sodná sůl metamizolu	56
Obrázek 28: Obecné schéma výroby Algifenu.....	58
Obrázek 29: Koloidní mlýn Frymakoruma	61
Obrázek 30: Výrobní kotel Fryma s kapacitou 3200l bulku	63
Obrázek 31: Deskový vs. rukávový filtr	64
Obrázek 32: Příklady používaných míchadel.....	64
Obrázek 33: Homegenizátor.....	65
Obrázek 34: Magnetická míchačka	65
Obrázek 35: Automatická mycí stanice	66
Obrázek 36: Příprava lékovek	67
Obrázek 37: Sterilizace lékovek	68
Obrázek 38: Vyřukávání lékovek.....	68
Obrázek 39: Vyfukování sterilním vzduchem.....	69
Obrázek 40: Plnička Groninger	70
Obrázek 41: Plnicí linka.....	70
Obrázek 42: Etiketovací stroj.....	71
Obrázek 43: Kartonovací stroj.....	71
Obrázek 44: Balení do kartonových přepravních krabic	72
Obrázek 45: Sklad.....	72
Obrázek 46: Postup převlékání pracovníků	79
Obrázek 47: Personální propust.....	80
Obrázek 48: Příklad pomocného technického zázemí	82

Seznam tabulek

Tabulka 1: Faktory ovlivňující, který polymorf případně solvát vykrystalizuje	26
Tabulka 2: Procesy farmaceutické výroby se zvýšeným rizikem vzniku polymorfů	40
Tabulka 3: Srovnání vybraných metod měření velikosti částic	46
Tabulka 4: Složení přípravku	59
Tabulka 5: Třídy čistoty dle VYR 36	85
Tabulka 6: Standart počtu částic v prostoru dle VYR 36	87
Tabulka 7: Systém signálního značení tlakového spádu	87
Tabulka 8: Limity mikrobiologické kontaminace dle VYR 36	88

Seznam rovnic

Rovnice 1: Vztah popisující růst částic při nukleaci	17
Rovnice 2: Vztah vyjadřující nukleaci v přesyceném roztoku	18
Rovnice 3: Vztah vyjadřující chemický potenciál při krystalizaci	19
Rovnice 4: Fázové pravidlo	30
Rovnice 5: Helmholtzův vztah	32
Rovnice 6: Možné vyjádření tepelné kapacity	33
Rovnice 7: Vztah pro Gibsovu volnou energii zohledňující teplotu	34
Rovnice 8: Arheniův vztah	37

1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Posluchač: Tomáš Máčalík

Název diplomové práce: Problematika rekrystalizace účinných látek v léčivých přípravcích

Tématem diplomové práce je problematika rekrystalizace účinných látek ve farmaceutických přípravcích. Cílem práce je tento jev demonstrovat na konkrétním reálném léčivém přípravku, u kterého se vyskytl. Součástí je detailní popis výrobního procesu včetně všech závazných podmínek, možných kritických míst, šetření a vyvozených opatření. Práce se skládá ze dvou částí. První z nich detailně popisuje současný stav poznání. Je založená na znalostech získaných z dostupné odborné literatury týkající se daného tématu. Podrobně jsou zde vysvětleny základní pojmy z okruhu krystalizace a polymorfismu, které tvoří podklad pro následnou případovou studii. Součástí případové studie je detailní popis konkrétního léčivého přípravku. Následně je krok po kroku objasněna jeho výroba, správná výrobní praxe a postupné šetření objevené technologické inkompatibility. Výsledek práce poukazuje na fakt, že problematika rekrystalizace a polymorfismu se velmi úzce týká i farmaceutické velkovýroby a je třeba s těmito jevy kalkulovat. Závěrem jsou popsána následná vyvozená reparativní opatření, díky kterým se podařilo těmto jevům zabránit, samotnou výrobu následně obnovit a vzniklý problém tak zdárně vyřešit.

Klíčová slova: krystalizace, rekrystalizace, polymorfismus, granulometrie, farmaceutická výroba, správná výrobní praxe, stabilita, kontrola kvality, metamizol

2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical technology

Consultant: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Student: Tomáš Máčalík

Title of Thesis: Problematics of active compounds recrystallisation
in pharmaceutical preparations

The topic of the thesis is the recrystallization of active substances in pharmaceutical preparations. The aim of this work is to demonstrate this phenomenon on a real particular pharmaceutical product, in which it has occurred. It includes a detailed description of the manufacturing process including all mandatory conditions, possible critical points, investigations and measures taken. The thesis consists of two parts. The first describes in details the current state of knowledge. It is based on the findings of the available literature on the subject. The basic concepts of crystallization and polymorphism are explained in detail, which form the basis for the subsequent case study. The case study includes a detailed description of a specific medicinal product. Subsequently, its production, good manufacturing practice and gradual investigation of the discovered technological incompatibility are explained step by step. The result of the work points out that the issue of recrystallization and polymorphism is very closely related to pharmaceutical large-scale production and it is necessary to calculate with these phenomena. In the end there are described the follow-up reparative measures, thanks to which these phenomena were prevented, the production itself was subsequently restored and the problem was solved successfully.

Keywords: crystalization, recrystallization, polymorfism, granulometry, pharmaceutical industry, good manufacturing practice, stability, quality control, metamizol

3 Zadání

Cílem této práce bylo zpracovat přehled dostupné literatury v problematice polymorfií, rekrytalizací a jejich specifik pro farmaceutický průmysl. Dále ve spolupráci s Teva Czech Industries s.r.o. vyhledat a zpracovat relevantní případové studie. Po jejich prostudování sumarizovat problematiku rekrytalizací včetně doporučení pro další praxi.

Seznam zkratk a symbolů

API	Aktivní farmaceutická substance - (Active Pharmaceutical Ingredient)
CFU	Jednotky tvořící bakteriální kolonie - (Colony Forming Units)
CIP	Sanitační stanice - (Clean In Place)
DVČ	Distribuce velikosti částic
DRX	Dynamická rekrystalizace
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
EMA	Evropská Lékařská Agentura - (European Medicines Agency)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv - (Food and Drugs Agenture)
HVAC	System zajišťující stálou teplotu a vlhkost vzduchu ve výrobních prostorech- (Heating, Ventilation and Air Conditioning)
OL	Operační list
<i>ppm</i>	počet částic na milion – koncentrační jednotka (parts per milion)
PVP	Prozatímní výrobní předpis
PW	Čištěná voda - (Purrified Water)
QA	Kontrola jakosti (proces) - (Quality Assurance)
QC	Kontrola kvality (produkt) - (Quality Control)
QP	Kvalifikovaná osoba – (Qualified Person)
RTG	Rentgen
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SIP	Sterilizační stanice - (Sterilize in place)
SOP	Standartní pracovní postup – (Standart Operating Procedure)
SRX	Statická rekrystalizace
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
VRP	Výrobní protokol
WFI	voda pro injekce – (Water for injections)

Pozn.: V seznamu nejsou uvedeny symboly a zkratky všeobecně známé nebo používané jen ojediněle s vysvětlením v textu.

4 Úvod

Krystalizace je jedním ze základních přírodních procesů. Lidstvo se s ní poprvé setkalo nejspíše při mrznutí vody a odpařování moří. Později ji však začali úspěšně využívat i ve farmaceutické výrobě. Ačkoliv je tento proces známý již od pradávna, stále se jej v určitých případech nedaří cíleně řídit. Mezi konkrétní případy ve farmaceutickém průmyslu patří například krystalizace nestabilních polymorfů a jejich možné a nekontrolovatelné polymorfni přechody na stabilní fázi v určitých technologických stupních (vlhká granulace, mikronizace atd.) Může se však vyskytnout například i vlivem nevhodného skladování léčiv.

Pojem polymorfie, resp. polymorfismus (z řeckého: poly = mnohý, morph = tvar) byl použit poprvé v krystalografické souvislosti německým chemikem Eilhardem Mitscherlichem v roce 1822. Polymorfismus popsal na základě svých pozorování, kdy u některých arseničnanů a fosforečnanů může jedna sloučenina, určitého chemického složení, vykrystalovat ve více krystalových formách. Stejně tak jako u mnoha termínů v chemii neexistuje přesná teorie, která by polymorfii látek objasnila. K jejímu popisu proto využíváme McCroneho definici, tj. polymorfii chápeme jako schopnost dané sloučeniny uspořádat molekuly v krystalové struktuře nejméně do dvou formací.

S polymorfii a polymorfními přechody se setkáváme u celé řady látek. Jednotlivé polymorfy se mezi sebou významně liší v mnoha chemických, fyzikálních a biologických vlastnostech, což může mít významný dopad na finální produkt.

Pro zamezení nebo alespoň snížení rizika těchto jevů je zapotřebí s nimi při farmaceutické výrobě kalkulovat a podřídit jim zpravidla celý výrobní proces. Pro vytvoření efektivního, účinného, opakovatelného, a hlavně po všech stránkách bezpečného výrobního procesu musí farmaceutická firma splnit celou řadu podmínek které lze shrnout jako zásady správné výrobní praxe (SVP).

Ještě před započítím výroby je však zapotřebí jasně nadefinovat samotný výrobní proces a zohlednit v něm kritické kroky. Léčivý přípravek, u jehož účinné látky je následně popsán jev rekrystalizace a polymorfismu nese název Algifen Neo. Přípravek se využívá k léčbě bolesti a křečí hladkého svalstva.

5 Současný stav poznání

5.1 Krystalizace

5.1.1 Krystalizace APIs

Krystalizace je v současné době zejména díky převažující produkci pevných lékových forem jedním z nejdůležitějších čistících a separačních procesů ve výrobě farmaceutických substancí (APIs). Krystalizace či růst krystalů je druh fázové přeměny, při které dochází k pravidelnému uspořádání částic do krystalové mřížky.

Nejčastější cestou vzniku krystalů je přechod z kapalně fáze látky, která vzniká vytvořením **přesyceného roztoku** API. Během tohoto procesu dochází k postupnému spojení nahodile rozmístěných molekul za vzniku vnitřně uspořádaných krystalů (supramolekul). (Beckmann, 2013)

Samotný proces krystalizace je lidstvu známý dlouho. Navzdory této skutečnosti ho stále v některých případech **nedokážeme cíleně řídit**. Příkladem jsou některé konkrétní procesy ve farmaceutickém průmyslu, kdy dochází během krystalizace k nekontrolovatelnému vzniku **nestabilních polymorfů**. K těmto procesům může docházet například při **vlhké granulaci**, či **mikronizaci**. Není však výjimkou, že ke změně krystalové struktury API může dojít i vlivem **nevhodného skladování** vyrobeného farmaceutického přípravku. (Borchardt, 2004)

Součástí procesu krystalizace je několik základních fyzikálních, chemických a technologických procesů, které se mezi sebou navzájem ovlivňují a přímo na sebe navazují. Díky těmto návaznostem vzniká určitý mezioborový přesah, tudíž odborníci z vývoje nových substancí, technologové a kontroloři kvality (QC) a jakosti (QA) musí při zavádění procesu jako takového navzájem blíže spolupracovat.

Počátek krystalizace jako takový je závěrečným stupněm, kdy je ještě API ve formě homogenního roztoku, tj. lze proměřit všechny potřebné vstupní parametry.

Všichni výše zmínění mají společný cíl, kterým je navrhnout samotný proces tak, aby bylo dosaženo:

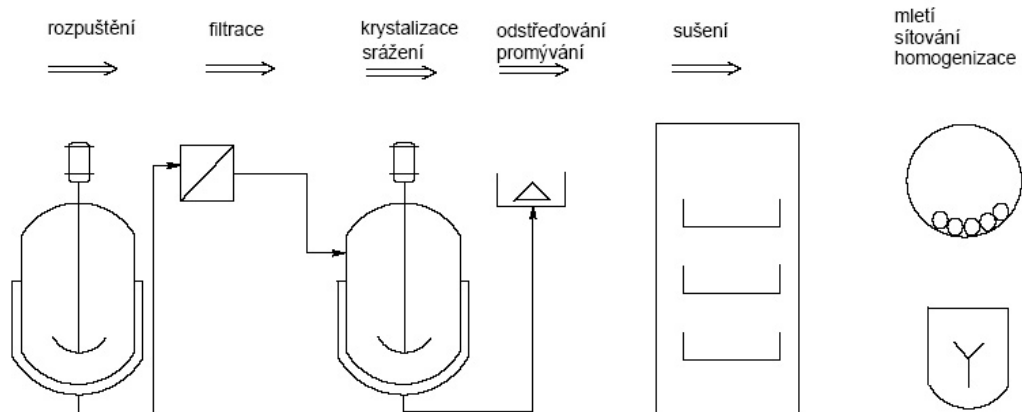
- A) požadované substance v odpovídající čistotě a polymorfní formě
- B) dobrého výtěžku
- C) reprodukovatelné distribuci částic
- D) požadovaných fyzikálně-chemických vlastností

Podstatnými charakteristikami pro finální kvalitu API se tak stala velikost částic, jejich tvar a samotné chemické složení. Z výše zmíněného je patrné, proč je o samotný krystalizační proces a jeho řízení v poslední době čím dál tím větší zájem. Jeho vliv na finální léčivý přípravek a produkt je totiž obrovský. (Kratochvíl, 2006)

Krystalizace jako taková sloužila vždy primárně jako čistící proces, kdy změnou skupenství a tvaru částic mohou být nečistoty snadněji odstraněny. Zároveň specifikací procesu a následnou filtrací můžeme přímo ovlivnit následné výrobní procesy jakými jsou například **granulace, lisovatelnost, pevnost, hrubost, povrch** atd. Samotný výtěžek a strávený čas se následně promítnou na celkovou ekonomiku procesu, která je nezanedbatelnou složkou rozhodující o úspěchu či neúspěchu celé technologie. (Beckmann, 2013)

Proces screeningu polymorfních forem, solvátů a solí je konstruován k identifikaci a charakterizaci všech možných krystalických forem farmaceutické substance. Je realizován ve velmi malém měřítku. Jeho cílem je následně provádět reprodukovatelný krystalizační proces vybrané formy ve velkém měřítku. Použití substance ve formě soli nebo solvátu je obvykle z důvodu horších vlastností této substance. Mezi tyto vlastnosti patří například nedostatečná krystalinita, rozpustnost ve vodě nebo stabilita. V případě, že daná substance vykazuje horší rozpustnost, je mnohdy vhodnou alternativou zvolit její amorfni formu. Studium strukturní a chemické stability amorfni forem API je jednou ze základních otázek během farmaceutického vývoje. (Davey, a další, 2000)

Pro cílené řízení krystalizace je nezbytně nutné tento proces ovlivnit již v počátečním, tzv. **prenukleačním stádiu**. A to jak termodynamickou stránku, tj. jaké krystalické fáze vzniknou za určitých podmínek, tak i kinetickou, tj. jak rychle se tvoří krystalové zárodky (**nuklea**) a jak rychle z nich následně rostou samotné krystaly.

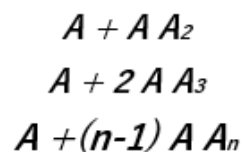


Obrázek 1: Schéma krystalizačního procesu

5.1.1.1 Nukleace

Krystalizace se skládá ze dvou hlavních kroků. Prvním z nich je **nukleace**, na kterou přímo navazuje fáze samotného **růstu krystalů**. Pokud k nukleaci nedojde, tj. koncentrace nukleí nepřekročí tzv. **kritickou mez**, vzniká při solidifikaci roztoku tzv. amorfni fáze.

Nukleaci jako takovou dělíme na **primární** (spontánní, svévolnou) a **sekundární** (ovlivněnou přítomností pevné fáze). Homogenní nukleace je nereálný, pouze teoretický model, kdy se nuklea tvoří náhodnými srážkami molekul kdekoli v objemu krystalizujícího roztoku bez přítomnosti pevné fáze. Následnou molekulární adicí v přesyceném roztoku vznikají klastry (molekulární agregáty).



Rovnice 1: Vztah popisující růst částic při nukleaci

V daném roztoku se pak následně vyskytují klastry různých velikostí, **A...An**, které mají následně tendenci se spontánně rozpadat. Tento jev však současně vede i k následným vzájemným srážkám jednotlivých částic a tím fakticky i jejich postupnému růstu.

Pokud klastr vlivem nabalování dosáhne tzv. **kritické velikosti**, hovoříme již o **nukleu**. Nukleus se skládá řádově z několik až několika stovek molekul (dle druhu API), je schopen růstu a nedochází u něj již k samovolnému rozpadu. Pokud roztok ponecháme spontánní nukleaci, vznikne nebezpečí krystalizace v nežádoucí produkt (**polymorf**). Tento jev však může být zároveň vyvolán i prostřednictvím (nechtěných) vlivů například **otřesů při výrobě či pohybem míchadla**. Více v kapitole 5.2.

Abychom tomuto negativnímu jevu zabránili, používáme ve farmaceutické výrobě tzv. **očkovanou sekundární nukleaci**. Při tomto procesu přidáváme do výchozího roztoku drobné **krystalky známé látky** (očka), která nám zajistí vznik pouze požadované fáze.

5.1.1.2 Termodynamika krystalizace

K nukleaci krystalů může dojít pouze za předpokladu, že je roztok **přesycený**. Situaci v přesyceném roztoku lze vyjádřit vztahem:

$$\Delta c = c_{př} - c_{eq}$$

Rovnice 2: *Vztah vyjadřující nukleaci v přesyceném roztoku*

C př ve vztahu značí koncentraci přesyceného roztoku a **C eq** koncentraci nasyceného roztoku. V grafu (Obr. 2) je plnou čarou znázorněna obecná rovnovážná křivka rozpustnosti. **ceq (T)** vyjadřuje závislost koncentrace krystalizující API na teplotě pro nasycený roztok.

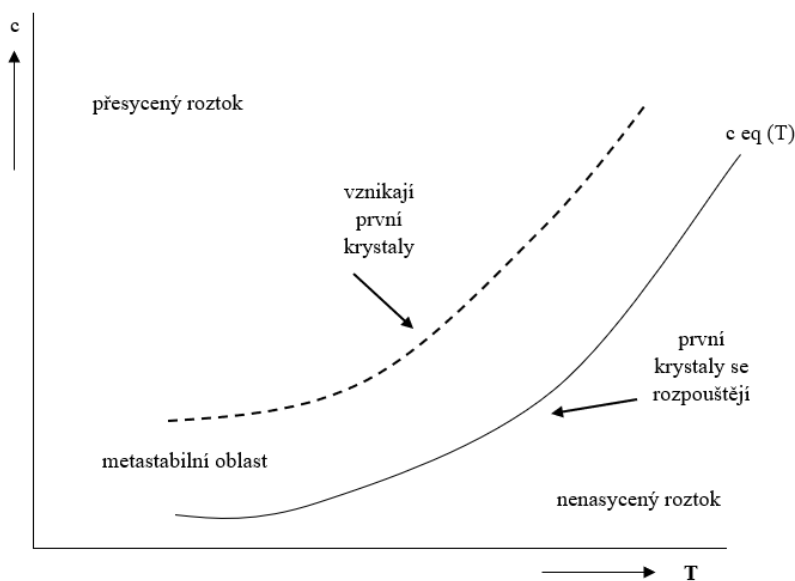
Pod křivkou rozpustnosti se nachází tzv. **oblast nenasyčeného roztoku**. Při postupném snižování teploty, se dostáváme postupně přes roztok nasycený až k přerušované křivce, která je zhruba rovnoběžná s křivkou rozpustnosti. Přerušovaná křivka, odpovídá **maximálnímu přesycení** (v tomto bodě dojde ke vzniku prvních krystalů) a určuje spolu s křivkou rozpustnosti tzv. **šířku metastabilní oblasti**.

Nad přerušovanou křivkou se vyskytuje tzv. oblast přesyceného roztoku. Zde přednostně probíhá nukleace. Šířka metastabilní oblasti je přímo závislá na typu nukleace (**heterogenní, homogenní, očkovaná**), a především na přítomnosti nečistot na kterých krystalizace zpravidla započne. (Lewis, a další, 2015)

Krystalizace API je nutné provádět právě v metastabilní oblasti. viz. (obr. 2) Důvodu je, že v oblasti nenasyceného roztoku už pevná fáze neexistuje. Z termodynamického hlediska ke krystalizaci dojde pouze za předpokladu, že chemický potenciál krystalizované složky v **rovnovážném stavu (μ_{eq})** je nižší, než chemický potenciál této složky v **přesyceném stavu ($\mu_{př}$)**. Hnací silou samotné krystalizace je příslušný rozdíl těchto parametrů, který vyjadřuje následující vztah:

$$\Delta \mu = \mu_{př} - \mu_{eq}$$

Rovnice 3: Vztah vyjadřující chemický potenciál při krystalizaci



Obrázek 2: Křivka rozpustnosti a vzniku krystalů

Plnou čarou je vyznačena obecná křivka rozpustnosti, c – koncentrace, T -teplota. Přerušovaná čára odpovídá maximálnímu přesycení a vymezuje tak šířku metastabilní oblasti. (Novák, 2007)

5.1.1.3 Mechanismus růstu krystalu a jeho kinetika

Postupným nabalováním nového materiálu na povrch nuklea dochází k růstu krystalu. Samotný mechanismus je velmi komplikovaný proces, jehož podrobné

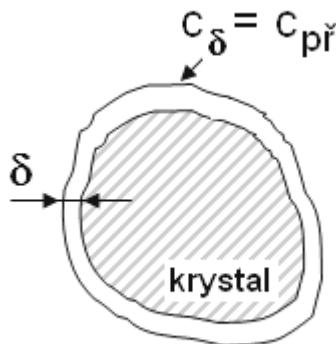
detaily nejsou dosud zcela známy. Důvodem je fakt, že v přesyceném roztoku se vyskytuje velkého množství různorodých stavebních částic (atomů, iontů, molekul, dimerů, trimerů, polymerů, agregátů či jejich solvatovaných forem atd.). Jejich struktura je někdy velmi nejasná.

Proces růstu krystalu je založený na **převažující rychlosti přítoku** nových stavebních jednotek nad rychlostí jejich odtoku. Výsledkem je vznik **krystalových ploch**, které určují jeho následnou morfologii neboli **habitus**.

Podle tzv. **Stenova zákona** i přes fakt, že všechny krystalové plochy nemusí růst vždy stejnoměrně, zůstávají úhly mezi plochami **neměnné**.

Krystalový habitus je zpravidla tvořen právě těmi plochami, které rostou nejpomaleji. Tyto plochy mají tudíž nejmenší energii a zároveň největší hustotu obsazení stavebními částicemi. Naopak u nejrychleji rostoucích ploch (s největší energií) většinou následně dochází k postupnému zarůstání.

Krystalý však nerostou pravidelně, ale různými růstovými mechanismy závislými na energii. Nové částice se nejsnadněji přichycují ke zlomům, obtížněji k hranám a neochotně k hladkým plochám.



Obrázek 3: *Růst krystalové plochy*

K tomu, aby v přesyceném roztoku došlo k růstu krystalu, musí být rozpuštěná stavební částice dopravena až k samotnému povrchu nuklea. Na tomto místě následně dojde k jejímu ukotvení do krystalové struktury.

K transportu částic dochází přes tenkou vrstvu roztoku (film). Tato vrstva musí být v dynamické rovnováze jak s povrchem krystalu na jedné straně, tak s kapalnou fází matečného roztoku na straně druhé. Tloušťka této vrstvy přímo závisí

na teplotě krystalizačního systému a jeho hydrodynamických vlastnostech (turbulence vlivem míchání roztoku atd.). Bývá však zpravidla v rozmezí **(20–50 μ m)**.

Vlastní krystalizaci můžeme následně popsat a rozdělit do těchto kroků:

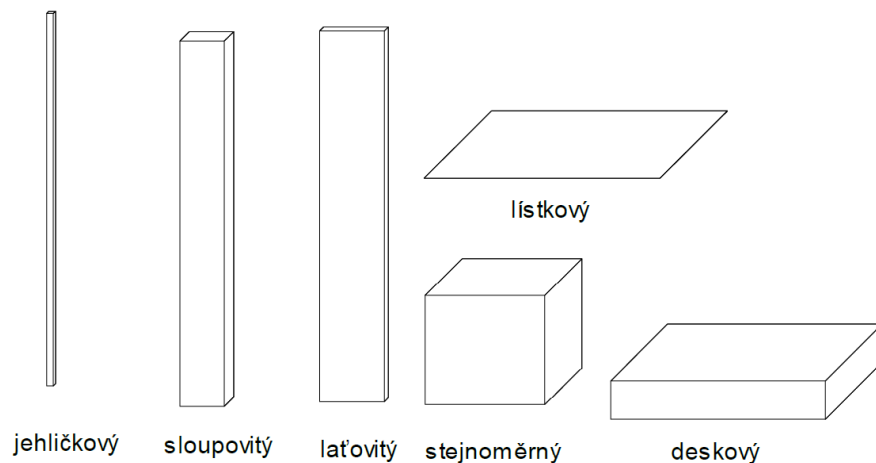
- 1) přenos složky z kapalně (roztokové) fáze do filmu obklopujícího vznikající krystal
- 2) difuze složky přes vrstvu filmu
- 3) orientace a zabudování jednotlivých stavebních částic do krystalové struktury
- 4) převedení vzniklého krystalizačního tepla do matečného roztoku

Celkovou kinetiku krystalizace určuje tzv. **řídící dějem**. Za předpokladu, že roztok nebudeme míchat, bude tímto dějem nejčastěji **difuze**. Za přítomnosti míchání roztoku se situace změní a tímto dějem bude nejpravděpodobněji **zorientování a zabudování částice** do krystalu. Při přítomnosti konformačně flexibilních molekul dochází zpravidla ke zpomalení zabudování částic do krystalu. (Mullin, 2001)

5.1.1.4 Tvar krystalu

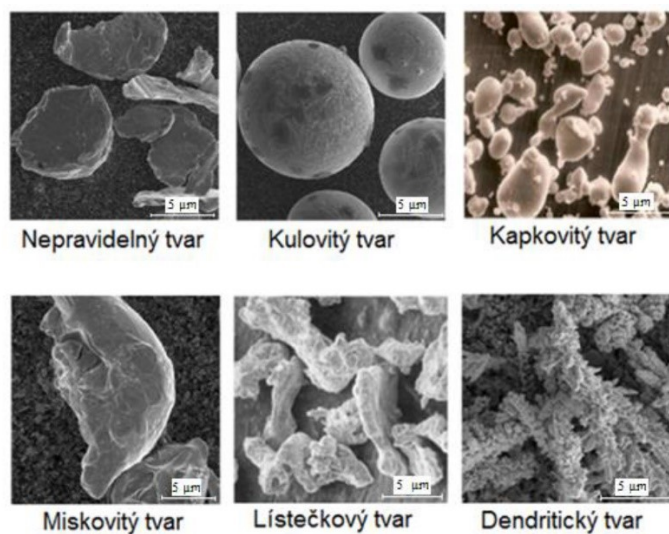
Vnější tvar neboli **habit krystalu** je definován jeho vnitřní strukturou. Krystalografové rozlišují mnoho rozličných forem, druhů a tvarů krystalů, které následně řadí do krystalových systémů.

Termín habit popisuje vnější vzhled krystalu a zahrnuje skupinu symetricky podobných krystalových ploch. Při mikroskopování ve farmacii využíváme zjednodušených modelů, kde jsou u popisu vynechány některé složité krystalové struktury, které využívají například mineralogové (tetragonální, orthorombická atd.). (Hilfiker, 2006)



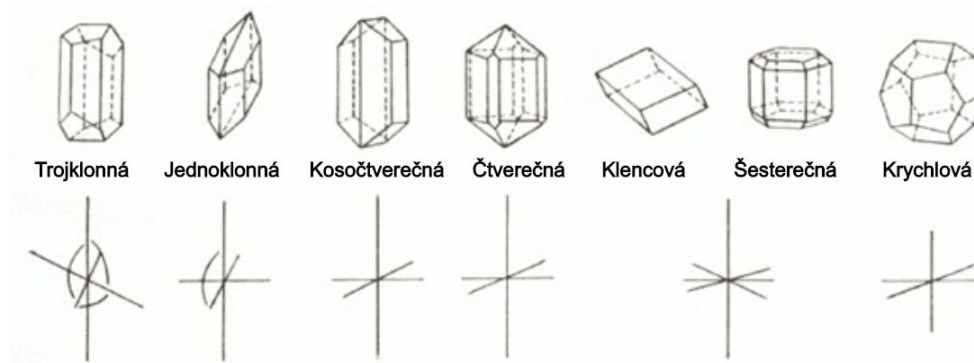
Obrázek 4: *Nákres - šest základních druhů farmaceutických krystalů (Hilfiker, 2006)*

V důsledku deformací způsobených během nepravidelného růstu krystalových ploch, mají jednotlivé krystalové částice různorodý tvar. K popsání tvaru tak využíváme jednodušších termínů, které jsou pro sledování rozdílů mezi jednotlivými šaržemi farmaceutické substance vhodnější.



Obrázek 5: *Reálné tvary částic (Skotnicová, a další, 2013)*

Krystalový habit následně ovlivňuje i významné farmaceutické parametry jakými je například **rozpuštnost**. Rozlišujeme šest základních tvarů. Krystaly následně řadíme do jednoho ze sedmi krystalových systémů. Viz obrázek 6.

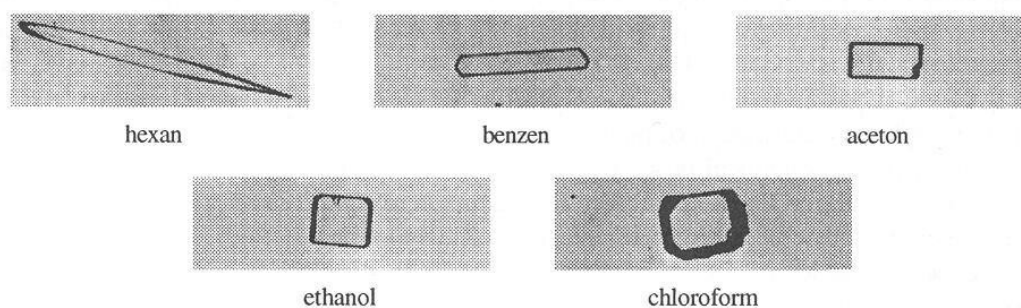


Obrázek 6: Krystalové struktury minerálů

Tvar krystalů určuje také důležité mechanické vlastnosti následného produktu. Mezi ně patří například **filtrovatelnost**, **sušící charakteristiky**, **sypná hustota**, **mikronizovatelnost** aj. Tyto vlastnosti se promítají i na samotnou následnou formulaci léčivých přípravků.

Další možné dělení krystalů je na **pravidelné** (blíží se kulovitému tvaru) tj. krychličky, hranolky, oktaedry atd. a **nepravidelné** (pro farmaceutickou formulaci nepříliš vhodné), které svým tvarem připomínající spíše špičaté jehličky či tenké lístečky.

Velký vliv na finální tvar krystalu má i použité rozpouštědlo případně směs několika rozpouštědel. Jak se můžeme přesvědčit na následujícím obrázku.



Obrázek 7: Vliv běžných rozpouštědel na tvar krystalů kyseliny acetylsalicylové (Kratochvíl, 2006)

Rozpouštědla lze podle příbuznosti hodnot jejich parametrů, mezi které patří například **viskozita**, **povrchové napětí**, **bod varu**, **polarita**, **dipólový moment**, **hustota** aj. dělit do jednotlivých skupin, což následně pomáhá při vytváření cíleného krystalového designu. Vlivu a využití jednotlivých rozpouštědel na krystalovou a polymorfni strukturu se podrobněji věnuje kapitola 5.2.3.

20 nejběžnějších rozpouštědel vyjma vody dělíme navíc dle bezpečnosti na:

- A) Rozpouštědla, nevhodná pro farmaceutickou výrobu** (známé lidské karcinogeny, potenciální jedy a látky škodlivé pro životní prostředí do této kategorie spadají například: benzen, tetrachlormethan, 1,1-dichlorethan a další

- B) Rozpouštědla podezřelá z jiné významné, ale reverzibilní toxicity** (nejsou genotoxické, neurotoxické ani teratogenní) do této kategorie spadají například: hexan, methanol, 1,2-dioxan, formamid, acetonitril, chloroform, ethylenglykol a další

- C) Rozpouštědla bez toxického potenciálu pro člověka** (u těchto rozpouštědel nebyl zaznamenán možný toxický potenciál pro člověka, neuvádí se u nich statovené množstevní limity) do této kategorie spadají: ethanol, aceton, anisol, heptan, ethyl acetát, 2-butanol, kyselina octová a další

U prvních dvou zmíněných skupin existují pro konkrétní jednotlivé látky závazné individuální koncentrační limity *ppm* (parts per milion) které nelze překročit. (EMA, 2018)

5.1.1.5 Řízená krystalizace

Řízená krystalizace probíhá za důkladného monitorování termodynamických a kinetických parametrů v systému. Při finální krystalizaci API se za předpokladu, že hrozí nebezpečí nežádoucího polymorfního přechodu používá metoda tzv. **očkované krystalizace** (do roztoku se přidají drobné krystalky známé látky očka, která nám zajistí vznik pouze požadovaných krystalů).

Cílů řízené krystalizace je hned několik. Patří mezi ně zejména zlepšit chemickou čistotu substance, dosáhnout optimálního krystalového tvaru a jakosti povrchu, zkrátit dobu sušení, odstranit zbytkové množství rozpouštědla

pod stanovený limit a optimalizovat distribuci velikosti vzniklých krystalků. (Kratochvíl, 2007)

5.1.1.6 Krystalizace polymorfů

V polymorfním systému je za daných podmínek vyskytuje vždy jeden stabilní polymorf. Ostatní jsou z termodynamického hlediska nestabilní (metastabilní). I takové polymorfy však mohou být za určitých okolností využitelné pro následnou lékovou formulaci. Mezi parametry stabilního polymorfu patří:

- nejnižší rozpouštěcí rychlost
- nejnižším parciálním tlak
- nejnižší biodostupností
- nejnižší Gibbsovou energii
- nejvyšším bod tání
- nejnižší rozpustnost v libovolném rozpouštědle
- nejnižší reaktivita

Originální farmaceutická firma k výrobě zpravidla volí **termodynamicky nejstabilnější polymorf** (hydráty či jiné solváty se většinou používají pouze jako možné prekurzory). U stabilního polymorfu je totiž zaručena reprodukovatelnost výrobních šarží a stabilita jak při formulaci, tak během následného skladování lékové formy.

Na rozdíl od toho generické firmy, volí většinou právě **nestabilní polymorfy** (hydráty), aby obešly patentovou kontrolu, či zlepšily dané terapeutické využití léčiva. Pro jejich cílenou výrobu se používá metoda **očkované krystalizace**. Problém nastává, pokud není k dispozici krystalizační očko. Neexistuje totiž metoda, jak usměrnit polymorfní chování určité API žadáním směrem, a tak daný polymorf vyrábět **robustně** a **reprodukovatelně** (opakovatelně v čase). Což potvrzuje i absence fundamentální teorie polymorfismu více v kapitole 5.2.2.

O druhu vykrystalizovaného polymorfu se rozhoduje v **prenukleačním stádiu** na základě kompetice kinetických a termodynamických faktorů působících na molekulární agregáty (viz. kapitola 5.3.)

Často tak dochází ke krystalizaci jiného polymorfu, než si přejeme, protože energetické rozdíly mezi jednotlivými polymorfy jsou velmi malé. Existuje celá řada

faktorů, které mohou ovlivnit krystalizaci (nukleaci), stejně tak jako množství použitelných metod (viz. tabulka 1).

Tabulka 1: Faktory ovlivňující, který polymorf případně solvát vykrytalizuje z roztoku a metody jejich přeměny na jiný polymorf

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

5.2 Polymorfismus

5.2.1 Definice a vymezení

Z dřívější definice řeckého (*polys* = mnohý) a (*morfé* = tvar) jako určitá chemická sloučenina, která může v závislosti na krystalizačních podmínkách krystalovat v odlišných krystalových tvarech (habitech).

V současné době hovoříme o polymorfismu jako o schopnosti určitých molekul, v závislosti na krystalizačních podmínkách, **krystalovat ve více krystalových strukturách neboli polymorfech**. Pokud je součástí struktury

i solvent hovoříme o solváttech (hydrátech), příp. solvatomorfech či pseudopolymorfech.

Jakákoli odlišnost krystalové struktury se obvykle promítne změnou makroskopických vlastností například **rozpuštěcí rychlosti, barvy, krystalového tvaru** atd. (Hilfiker, 2006)

„Každá molekula může být potenciálně polymorfní, počet nalezených polymorfů dané látky je závislý pouze na množství peněz, času a energie investovaných do jejího podrobného výzkumu.“ (Walter McCrone, 1963)

Problematiku polymorfismu je nezbytné podrobně studovat a monitorovat zejména kvůli **nekontrolovatelným polymorfním (fázovým) přechodům**. Tento jev je mezi léčivými látkami velmi rozšířen. Bylo prokázáno, že až **90 % API** se vyskytuje ve více než jedné pevné formě.

Jak vyplývá z McCroneho definice, každá molekula je potenciálně polymorfní. Procentuální zastoupení s množstvím polymorfů samozřejmě klesá, tj. u dimorfismu je (90,7 %), trimorfismu (8,4 %), tetramorfismu (0,9 %), pentamorfismu (0,1 %) ...

Počet polymorfů molekulárního krystalu je teoreticky dán počtem možností vytvářet slabé interakce v krystalu (**Van der Waalsovy síly, H-můstky, π - π**). Ve farmacii je v současné době používáno asi **6500 API** s možným polymorfním rizikem.

5.2.2 Polymorfie

Farmaceuticky aktivní substance (API) jsou v drtivé většině organické molekuly. Je tedy zvykem hovořit o pevných formách příp. jednotlivých fázích. Tím jsou míněny nejen krystalické polymorfy, ale také rozličné krystalické solváty nebo hydráty.

Navzdory tomu, že biologický účinek API je vyvolán interakcí molekuly léčiva s cílovým receptorem (**farmakodynamika**), je velmi důležité, v jaké formě je aktivní substance pacientovi podávána (**farmakokinetika**).

Z toho vyplývá, že v případě farmacie nezáleží jen a pouze na molekulové, ale i **krystalové struktuře aktivní substance**. Různé formy jedné aktivní substance mají (mohou mít) různou krystalovou strukturu a tvar krystalů, příp. jsou amorfní. Jsou mezi nimi také patrné významné odlišnosti v jejich fyzikálních a biologických vlastnostech. Odlišná rozpouštěcí rychlost polymorfů a solvatomorfů tak může mít za následek například jejich **rozdílnou farmakokinetiku a biodostupnost** v zažívacím traktu.

Vlastnosti pevných látek závisí na formě soli, velikosti částic a polymorfní formě. U farmaceuticky aktivních látek rozlišujeme tyto vlastnosti:

- morfologii (habitus)
- hustotu a tvrdost krystalu
- transformaci během procesu
- biodostupnost a toxicitu
- barvu
- teplotu tání
- hygroskopičnost
- rozpustnost
- chemickou stabilitu
- stabilitu během skladování
- čistotu a výtěžnost (Giron, 2004)

5.2.3 Predikce polymorfie

„Predikce polymorfie se při patentových sporech neuznává!“ (Lee, 2002)

Polymorfismus jako takový je ve farmacii velmi rozšířený jev. Dokážeme jej sice popsat, ale neumíme jej předpovídat ani fundamentálně vysvětlit. Predikce vzniku polymorfismu není zatím obecně možná. V současné době existuje pouze teoretický model zahrnující výpočet mřížkových energií možných struktur, tzv. **predikce krystalové struktury**, která je založená na základě (výpočtu mřížkové energie při 0 K). Chyby této výpočtu jsou však srovnatelné s energetickými rozdíly

mezi jednotlivými polymorfy, takže tato metoda je při patentových sporech značně neprůkazná.

Pro farmaceutické firmy může být polymorfismus přínosným, avšak i výrobu komplikujícím fenoménem. Záleží pouze na tom, z kterého úhlu na něj nahlížíme. Zda z pozice originální či generické firmy pro kterou je nález a výroba vhodného polymorfu vlastně hlavním gró. Je povinností každé farmaceutické společnosti důkladně monitorovat polymorfismus svých substancí nejen v průběhu výroby, ale i po dobu celého následného procesu skladování.

Mezi nejdůležitější vlastnosti pro farmacii patří bezesporu fakt, že se polymorfy stejné látky mohou významně lišit v **disolučním profilu** a tím podstatně ovlivnit vstřebávání, tj. i celkovou úspěšnost použité terapie. Každý farmaceutický výrobce musí provádět průběžný screening na polymorfii svých API. Tyto zkoušky mohou zahrnovat až několik tisíc krystalizačních experimentů, které probíhají kombinatorně v přítomnosti různých rozpouštědel (viz. seznam rozpouštědel 5.1.1.4). Tento screening se pro celkové urychlení prování pomocí speciálních krystalizačních automatů.

Přítomnost polymorfismu je jedním z významných kontrolních prvků pro regulační autority v procesu schvalování i propouštění jednotlivých přípravků a šarží.

Vzhledem k těmto okolnostem vyžadují monitorování a důkazy polymorfni čistoty i regulační orgány jakými jsou například (**SÚKL, EMA, FDA**). Nález nežádoucího polymorfu je následně klasifikován jako přítomnost **nečistoty** a může vést k **zamítnutí šarže** či jejímu kompletnímu **stažení a likvidaci**.

Nežádoucí polymorf má zpravidla odlišný farmakokinetický profil (**rozpouštěcí rychlost**) a tak obvykle i odlišnou **biologickou dostupnost**. Rozdílná disoluce může být následně použita jako parametr pro možnou detekci jeho přítomnosti.

V extrémním případě může být polymorfni forma buď **neaktivní**, tj. finální léčivý přípravek má snížený či žádný terapeutický účinek. Na druhé straně spektra je případ, kdy by mohl naopak působit na člověka **zdraví ohrožujícím způsobem**.

Existuje celá řada analytických metod využívaných k monitorování polymorfismu a zároveň rozeznávání jednotlivých polymorfů vedle sebe.

Jako vhodné řešení se jeví výběr odlišné pevné fyzikální nebo chemické formy aktivní molekuly. Je zapotřebí jednoznačně rozlišovat, kdy se jedná o tzv. **čistý polymorfismus** a kdy pouze o pevné formy aktivní molekuly. Mezi nejčastěji využívané metody patří: **PXRD** (prášková Röntgenová difrakce, **DSC/MTDSC** (modulovaná diferenciální skenovací kalorimetrie) a **FT-IR** (infračervená spektroskopie s Furierovou transformací) (Bernstein, 2002) více v kapitole 5.4

5.2.4 Termodynamika polymorfie

Struktura polymorfních molekulárních krystalů se skládá z různých fází určitých molekulárních jednotek. K samotnému pochopení vzniku a jednotlivých vztahů mezi polymorfy nám slouží tzv. **fázové pravidlo**.

$$F = C - P + 2$$

Rovnice 4: *Fázové pravidlo*

F = počet stupňů volnosti systému

C = počet složek systému

P = počet fází (Bernstein, 2002)

Z fázového pravidla vyplývá, že fáze je homogenní část heterogenní soustavy oddělená od ostatních fází ostrým **fázovým přechodem**. Vlastnosti uvnitř fáze jsou na kterémkoli místě shodné, případně se mění spojitě bod po bodu. Na fázovém rozhraní je však situace diametrálně odlišná a jednotlivé vlastnosti se zde mění skokově.

Dle této definice existuje pro každou chemickou sloučeninu jedna kapalná a jedna plynná fáze, které jsou chemicky i fyzikálně **homogenní**. Každá krystalická forma vytváří vlastní fázi. Tento jev je možné pozorovat např. u různých krystalických forem ledu.

Výchozí premisu, že směs dvou polymorfů obsahuje dvě pevné fáze, ale homogenní tuhý roztok, nebo slitina vzájemně mísitelných kovů je pouze jednou lze však aplikovat pouze u jednoznačných příkladů.

Problémem však zůstává, jak ověřit, zda systém vyhovuje právě definici slova „homogenní“. Samotná definice „homogeneity“ totiž na molekulární úrovni často selhává. Jsou známy případy sloučenin, které se při působení rentgenové

difrakce chovají jako jeden krystal (jedna fáze), zatím co při podrobné analýze jsou vyhodnoceny jako nehomogenní směsi krystalů nebo dokonce racemické směsi. Zaznamenány byly i případy, kdy bylo dokonce potvrzeno, že jednotlivý krystal byl vlastně hybridem, ve kterém koexistovaly dvě polymorfní formy současně. (Hilfiker, 2006)

Hodnota C neboli počet složek v systému, odpovídá minimálnímu počtu nezávislých látek definujících složení všech fází v systému. Notoricky známým a často zmiňovaným příkladem je voda, která se vyskytuje v různých rovnovážných stavech zahrnujících 3 fáze (kapalnou, pevnou i plynnou). V takovém systému je však vždy přítomna pouze jedna složka. Obdobná je i situace u kyseliny octové, která ačkoli je ve všech svých fázích asociována do dimerů, může být vždy jednoznačně určena jako molekula kyseliny octové.

U tohoto konkrétního případu je významným faktorem **rychlost ustanovení rovnovážného stavu monomer-dimer**. Tato rychlost je vyšší než požadovaná rychlost k určení např. tlaku par nad kapalinou. V případě, že je dosaženo rovnovážného stavu pomaleji než rychlostí potřebnou k fyzikálnímu měření, je nutné zařadit vyjma funkce teploty, také faktor složení směsi. V takovém případě je k definování sloučeniny nutný i kinetický aspekt.

Veličina F odpovídá počtu stupňů volnosti, tj. počtu proměnných nezbytných k definování stavu a podmínek rovnovážného systému. Mezi tyto proměnné patří například **teplota, koncentrace a tlak**. U jednosložkového systému počet stupňů volnosti s počtem fází **klesá**. Z toho vyplývá, že jednosložkový systém v jedné fázi má **dva** stupně volnosti (např. vodní pára). Jednosložkový systém ve dvou fázích má **jeden** stupeň volnosti (kapaliny a plyny). U jednosložkového systému ve třech fázích není oproti tomu **žádný** stupeň volnosti.

V polymorfním systému určité látky jsou pro nás podstatné vztahy mezi polymorfy **jedné** sloučeniny. Za rovnovážného stavu se mohou vyskytovat maximálně **tři polymorfy s žádným stupněm volnosti**. Častější je však situace, kdy se vyskytují v systému dva polymorfy s jedním stupněm volnosti v kapalné nebo plynné fázi, ale nikdy ne v obou zároveň. Za těchto podmínek můžeme docílit jiného

trojného bodu pro dvě pevné fáze a kapalinu na jedné straně, nebo dvou pevných fázích a plynu na straně druhé.

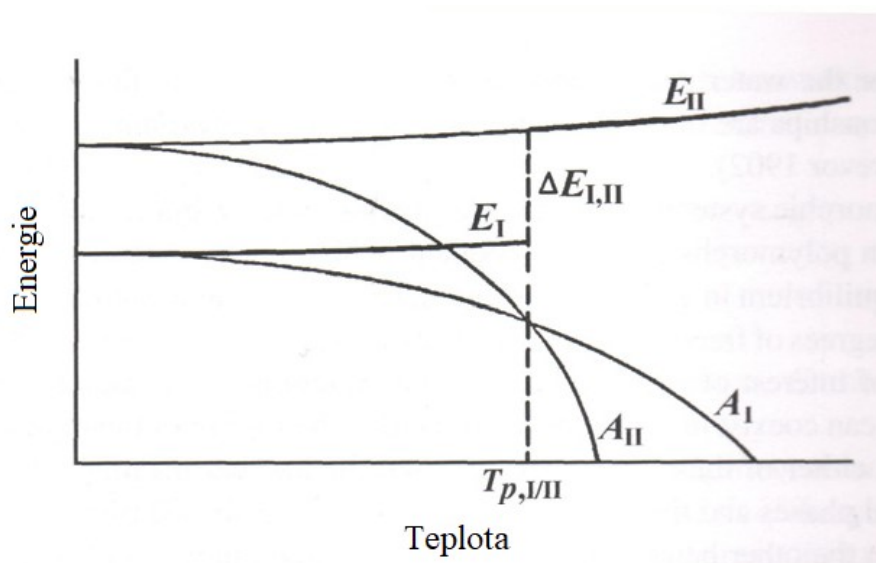
Množství volné energie má vliv na relativní stabilitu dvou polymorfů. Nejstabilnější forma má **nejmenší** množství volné energie. Méně stabilní forma bude energeticky vedena k **přechodu na formu stabilnější**, avšak kinetické faktory se budou snažit tomuto přechodu zabránit.

Rozdíly objemů dvou pevných polymorfů jsou tak nepatrné, že je lze tudíž společně se změnami tlaku zanedbat. Za předpokladu, že je tlak i teplota konstantní, volná energie A pevných látek může být reprezentována **Helmholzovým vztahem**:

$$A = E - TS$$

Rovnice 5: *Helmholzův vztah*

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



Obrázek 8: *Energetické vs teplotní křivky pro dva polymorfy I a II (Bernstein, 2002)*

Na obrázku 15 je znázorněn průběh energetických a teplotních křivek dvou různých polymorfů. Parametr E odpovídá vnitřní energii a A značí Helmholtzovu volnou energii. Z grafu vyplývá, že forma **I** má předpoklad vyšší stability při pokojové teplotě (Bernstein, 2002)

Za předpokladu, že teplota dosáhne 0 K tj. absolutní nuly, můžeme člen TS zanedbat. Helmholtzova volná energie se tak v tomto případě rovná energii vnitřní, někdy také označované jako energie strukturní či mřížková.

Z výše zmíněného vyplývá, že by **nejstabilnější** polymorf měl mít i **nejmenší vnitřní energii**. V oblasti nad teplotou 0 K může dva polymorfy rozdělovat tzv. **entropický člen**. Chování volných energií jako funkcí teploty se tak může u různých polymorfů významně lišit. Tento jev je demonstrován u křivek **AI**, **AII**, kdy je forma **I** stabilnější při „absolutní nule“.

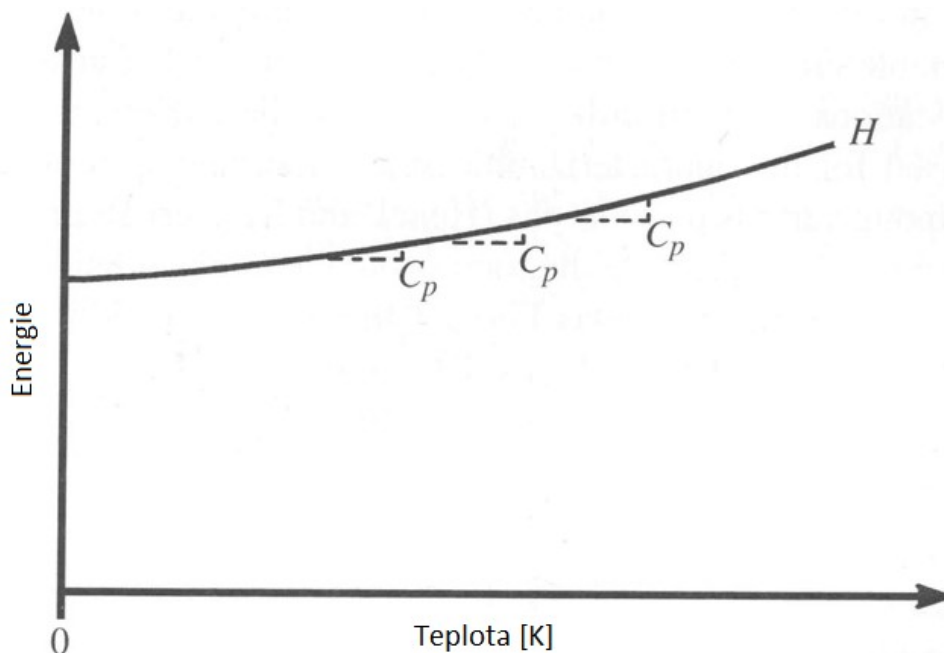
Tyto dvě křivky se protínají v tzv. bodě transformace **T_p I/II**. Nad touto teplotou je stabilnější forma **II**. Při teplotě fázové přeměny mají sice oba polymorfy stejné množství volné energie, ale vzhledem k tomu, že je vnitřní energie formy **FI** nižší než formy u **FII**, množství energie potřebné k fázové přeměně je **ΔE** .

Buerger v roce 1951 také popsal endotermní povahu každé přeměny, která nastává při zvyšování teploty. Častěji než diagram vyjádřený na (*Obr 8.*) bývají pro popis využívány diagramy, kde je Helmholtzova volná energie **A** nahrazena Gibbsovou volnou energií **G** a vnitřní energie **E** je nahrazena enthalpií **H** . Data k těmto diagramům jsou totiž experimentálně snadněji dosažitelná. (Novák, 2007) Křivky enthalpie proti teplotě mohou být experimentálně vytvořeny určením tepelné kapacity **C_p** ze vztahu:

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

Rovnice 6: Možné vyjádření tepelné kapacity

Dle třetího zákona termodynamiky je tepelná kapacita ideálního krystalu nulová při **0 K**. Proto musí být sklon křivky v grafu na (*Obr 9.*) při teplotě **0 K** také nulový.



Obrázek 9: Vynesení enthalpie H vůči teplotě (Bernstein, 2002)

Na výše umístěném grafu je vyjádřena enthalpie H vůči teplotě a následně znázorněná spojením s tepelnou kapacitou C_p (Bernstein, 2002)

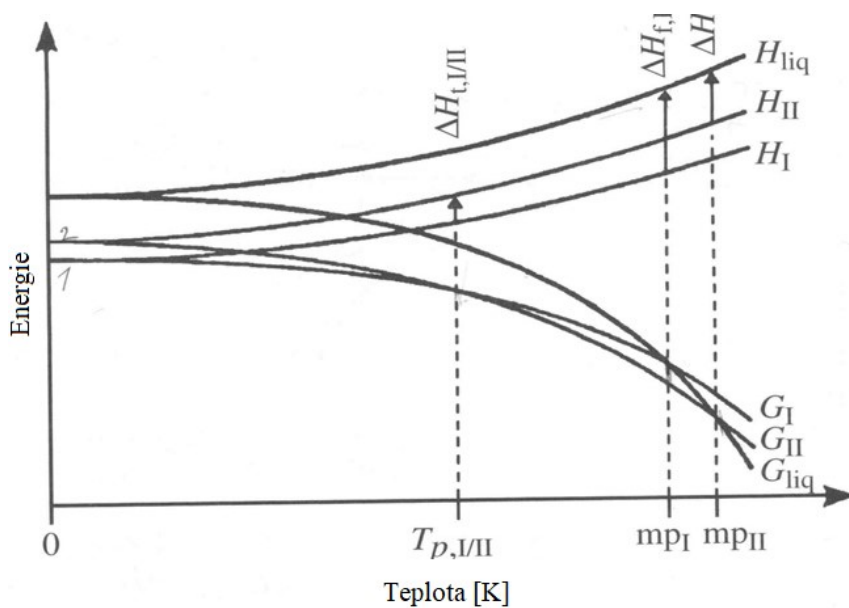
Z termodynamického hlediska lze polymorfii rozdělit na dva typy. První typ se nazývá **enantiotropie**. U něj mohou obě formy reverzibilně přecházet fázovou přeměnou. Druhý typ, který se nazývá **monotropie**, je charakterizován přechodem jedné formy **ireverzibilně (nevratně)** fázovou přeměnou na formu druhou. Nárůst teploty vede k přechodu polymorfu na formu stabilnější. Velké množství organických sloučenin krystalizuje z taveniny stejným způsobem, jako monotropní formy. Tento typ sloučenin vykazuje **nižší stabilitu a nižší teplotu tání**.

Pro takové sloučeniny platí vztah pro Gibbsovu volnou energii s parciálními derivacemi, které zohledňují teplotu.

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

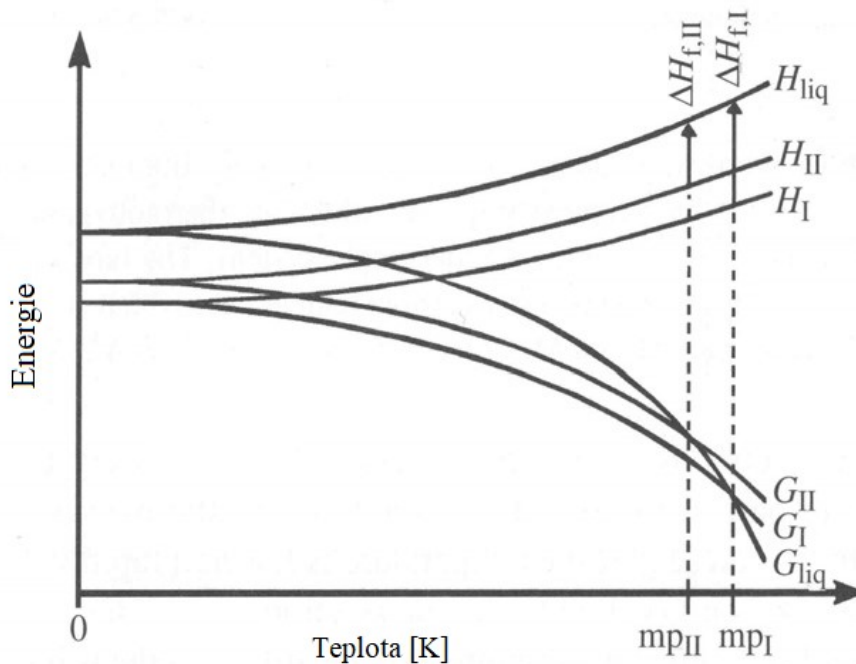
Rovnice 7: Vztah pro Gibbsovu volnou energii zohledňující teplotu

Za předpokladu, že S je vždy pozitivní, je G konstantně klesající funkcí. Isobary volných energií G mohou nabývat různé dráhy, a jejich spojnice reprezentují body přeměny T_p mezi jednotlivými fázemi (Obr. 10). Fyzikálně je však možný pouze jeden průnik isobar. (Bernstein, 2002)



Obrázek 10: *E/T diagram dimorfního systému. (Bernstein, 2002)*

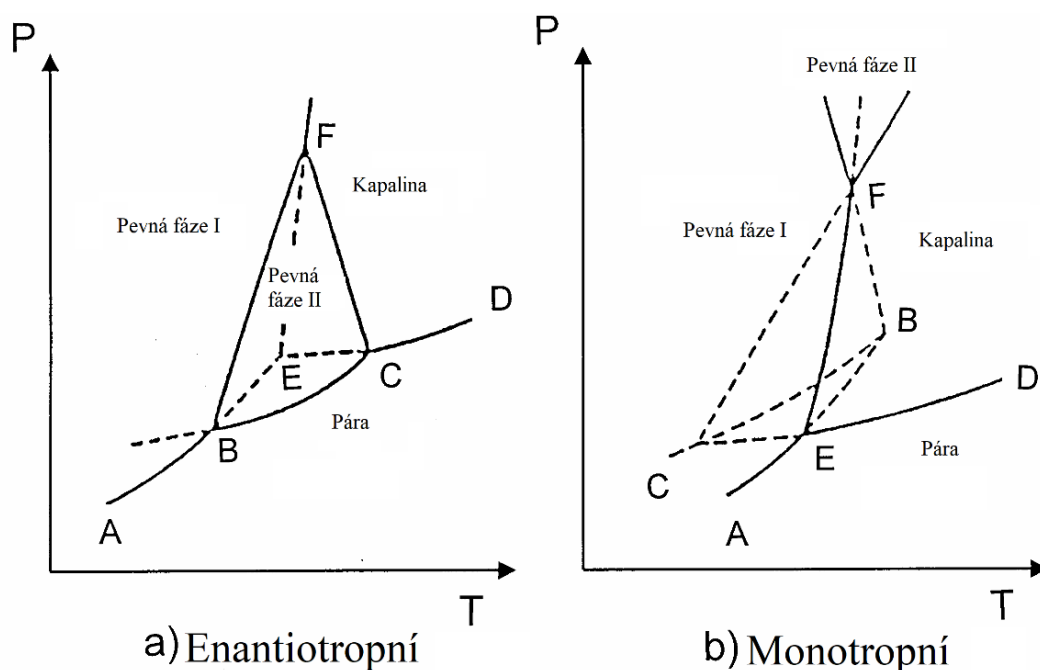
Na obrázku 10 je znázorněn E/T diagram dimorfního systému, kde **G** značí Gibbsovu volnou energii a **H** vyjadřuje enthalpii. Tento diagram vyjadřuje situaci v **enantiotropním systému**. Forma I je stabilní pod bodem přeměny **T_p**, a pravděpodobně při pokojové teplotě. (Bernstein, 2002)



Obrázek 11: *E/T diagram dimorfního systému II. (Bernstein, 2002)*

Na obrázku 11 je znázorněn E/T diagram dimorfního systému, kdy G značí Gibbsovu volnou energii a H vyjadřuje enthalpii. Tento diagram nastiňuje situaci v **monotropním systému**, ve kterém je forma **I** stabilnější **při všech teplotách**. Hypotetická spojnice křivek volných energií $G I$, $G II$ (není znázorněna) bude nad teplotou tání pro obě formy. (Bernstein, 2002)

Vzhledem k tomu, že jsou teplota a tlak dobře experimentálně měřitelné veličiny, vztahy mezi parou, kapalinou a polymorfy substance lze znázornit



Obrázek 12: Rozdíly mezi enantiotropním a monotropním systémem (Giron, 2004)

prostřednictvím **P/T diagramů**. Na následujícím obrázku jsou demonstrovány rozdíly, mezi **enantiotropním** a **monotropním** systémem.

5.2.4.1 Stabilita polymorfie

Jak zmiňuje Attwood existují určitá obecná pravidla, ze kterých při určování stability polymorfů následně vycházíme. Prvním z nich je fakt, že v daném systému (např. T , P) je stabilní pouze **jedna forma polymorfu**. Hydráty mají vždy nižší rozpustnost v rozpouštědlech obsahujících vodu. **Nejstabilnější polymorf má i nejnižší rozpustnost**. Krystalická forma s nejvyšší hustotou je často nejstabilnější. (Attwood D., 2008)

Termodynamická stabilita fází substancí závisí na:

- tlaku
- médiu obklopujícím krystal
- teplotě
- rozpustnost solventu
- relativní vlhkost vzduchu
- mechanických faktorech (mletí, síťování atd.).

Změna těchto parametrů vede často k metastabilním formám (Mahato, 2012)

Zároveň musíme však pamatovat na to, že při polymorfních transformacích nesmíme zanedbat **dynamickou povahu** krystalizačního procesu, protože to, jaká forma nakonec vznikne není dáno pouze termodynamikou, ale i kinetikou krystalizace. (Borchardt, 2004)

5.2.4.2 Kinetika polymorfie

Za předpokladu, že by fázové přeměny byly závislé pouze na termodynamických zákonech, docházelo by k velmi snadnému vzniku stabilních krystalických forem. S ohledem na kinetické faktory je však nutné počítat i se vznikem forem **metastabilních**. Přeměna polymorfu ze stavu metastabilního na stabilní, je možná pouze za předpokladu, že překoná významnou energetickou bariéru.

Známý **Arheniův vztah** vyjadřuje spojení aktivační energie E s rychlostní konstantou transformace k :

$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

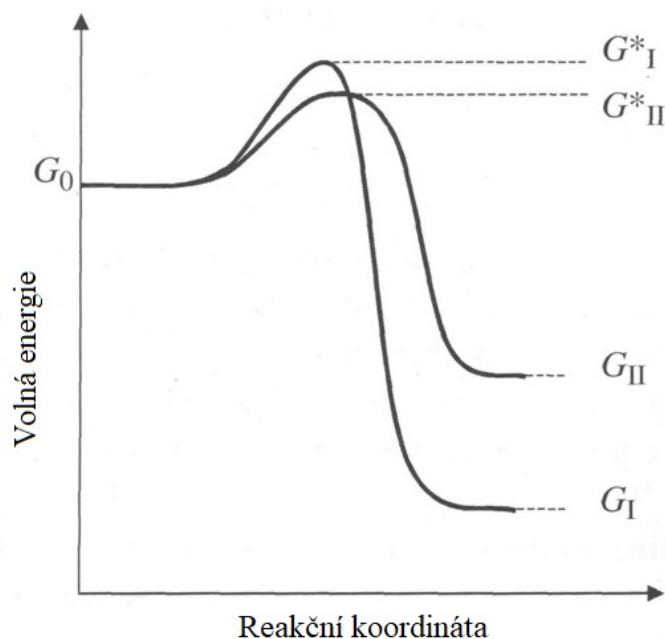
Rovnice 8: Arheniův vztah

A = frekvenční faktor spojený s entropií aktivace S

R = plynová konstanta

T = absolutní teplota [K]

Energetická bariéra může být snížena za přítomnosti katalyzátoru, nečistot nebo defektů v krystalové struktuře. (Stahl, a další, 2002)



Obrázek 13: Reakční koordináta vyjadřující krystalizaci v dimorfním systému (Bernstein, 2002)

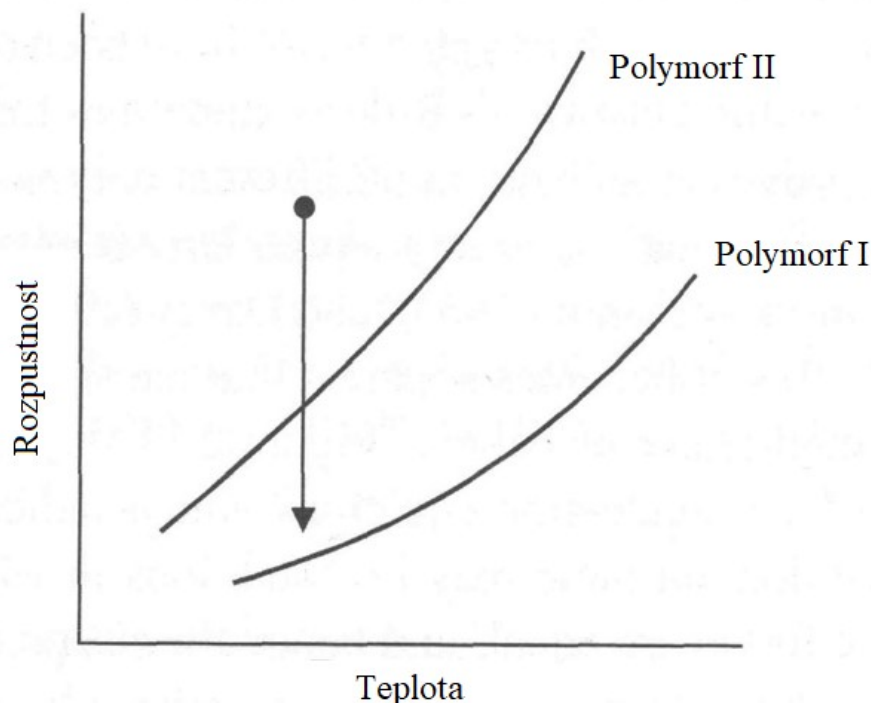
Průběh křivky na obrázku 13 vyjadřuje energetické bariéry při vzniku polymorfu I a II. (Bernstein, 2002)

Pro zjednodušení si popíšeme situaci v monotropním dimorfním systému (Obr. č. 13). Na první pohled je patrné, že v oblasti vymezené složením rozpouštědla a teplotním rozmezím ležící mezi křivkami rozpustnosti krystalické formy I a II může vykrystalizovat jen a pouze forma I. Výsledek krystalizace vedené za **isotermních** podmínek znázorněných vektorem (obr. č. 14) nebude tak patrný při počátečním přesycení roztoku.

Termodynamické podmínky napomáhají vzniku formy I, zatímco kinetické podmínky (přesycení roztoku) naopak **vzniku formy II**. Následná přeměna zpátky na stabilní formu však může být urychlena doplněním většího množství rozpouštědla.

Skutečnost, že při krystalizaci z roztoku nebo taveniny dochází nejprve je **vzniku metastabilní formy**, která se posléze **transformuje na formu stabilní**, je známa již od konce 19 století. Tento jev popisuje německá technická literatura (1870–1914) a demonstruje jej na experimentech z organické i anorganické chemie. (Bernstein, 2002)

Následující obrázek představuje **soluční diagram** pro dimorfní systém. Vertikální šipka vykresluje hypotetickou krystalizační dráhu při konstantní teplotě. (Novák, 2007)



Obrázek 14: Soluční diagram pro dimorfní systém (Bernstein, 2002)

5.2.5 Strukturní rozličnosti

Tvar a struktura polymorfů, resp. různých forem aktivních substancí je dána zejména nekovalentními interakcemi mezi jejich molekulami. Krystaly organických látek spojené iontovými nebo kovalentními vazbami, se prakticky nevyskytují. Nekovalentními interakcemi v molekulárních krystalech jsou velice často **vodíkové můstky**, **van der Waalsovy vazby**, **π - π interakce** a zřídka kdy i **vazby „charge-transfer“ komplexů**. Různé krystalické formy určité molekuly vznikají často krystalizací z různých rozpouštědel (polárních nebo nepolárních). V některých případech velmi záleží i na obsahu vody v rozpouštědle a samozřejmě na hodnotách teploty a tlaku při krystalizaci. (Kratochvíl, 2007) viz. 5.1.1.4

O vzniku určitého polymorfu se rozhoduje již v **prenukleačním** (agregačním) stádiu na základě **kompetice kinetických a termodynamických faktorů** při krystalizaci (viz výše). Nekontrolovatelné polymorfní přechody

(hysterezní, špatně definované, často probíhají přes kapalnou fázi) jsou „postrachem“ farmaceutické výroby viz. případová studie.

Existuje velké množství jednotlivých výrobních kroků, během kterých může docházet k nežádoucím polymorfním a krystalickým přeměnám. Je zapotřebí zejména během nich dbát na jejich možnou eliminaci. Mezi tyto rizikové výrobní procesy patří například:

Tabulka 2: *Procesy farmaceutické výroby se zvýšeným rizikem vzniku polymorfů*

sušení produktu
dlouhodobé stání produktu v matečném roztoku
vlhká granulace
vlivem excipientů v lékové formě
mikronizace (homogenizace)
tabletače
finální krystalizace aktivní substance („disappearing polymorph“)

5.3 Polymorfismus jako nástroj vývoje generických léčiv

Oblastí generických léčiv se zabývá obor s názvem částicové inženýrství. Pojem částicové inženýrství zahrnuje prostředky pro výrobu částic majících definovanou morfologii, distribuci velikosti částic a složení. (Brittain, 2016)

Cílem je nalézt a reprodukovat syntetizovat molekuly s drobnými strukturálními rozlišnostmi (často právě polymorfy) s identickým nebo alespoň velmi podobným bioekvivalenčním profilem k již registrovaným léčivům a následně je zaregistrovat pro potřeby generické firmy.

Generický vývoj je oproti originátorskému sice kratší a významně levnější, navzdory tomu je však velmi limitovaný, časem, samotným patentem originálu a legislativou, které následnou formulaci a její úspěšné zavedení na trh významně komplikují.

Mezi základní požadavky na generikum patří vytvoření dosud nepatentované chemické substance, která splňuje tyto podmínky:

- A) snadno a opakovatelně připravitelná
- B) stabilní
- C) bezpečná
- D) neporušující patent ani legislativu
- E) stejně, nebo více efektivní než originál (Newman, 2011)

Originální firmy však kromě extrémně finančně a časově nákladného vývoje léčiv (v dnešní době jsou náklady na vývoj nového léčiva zhruba 1 mld. USD a 10 let) mají za úkol si svoje drahé patenty chránit. Již při samotném vývoji tak předem testují, prověřují a následně patentují slibné polymorfy, které by následně mohla některá z konkurenčních generických firem využít (zneužít) pro přípravu generik. Jejich cílem je mimo jiné případný vývoj generik v mezích zákona co nejvíce zkomplikovat a eliminovat si tak možnou konkurenci na trhu.

5.4 Metody využívané ke stanovení, měření velikosti a popisu polymorfů

Analytické fyzikálně-chemické techniky využívané ke stanovení, popsání tvaru, velikosti a charakteru polymorfů jsou dány příslušnými směrnici státních autorit. Podle uznávané směrnice FDA ICH Q6A mezi ně patří:

- mikrometrie (**granulometrie**, povrch částic, porozita, hustota)
- **laserová difrakce**
- síťová analýza
- Couleterova metoda
- sedimentační metody
- **mikroskopie** (optická, termooptická, SEM, AFM),
- **RTG difrakce**
- **termická analýza** (TGA, DSC, mikrokolorimetrie),
- spektroskopie pevného stavu (NMR, IČ, Ramanova),
- **stanovení rozpustnosti a rozpouštěcí rychlosti**
- sorpce/desorpce vlhkosti (Kratochvíl, 2016)

Následně si podrobněji popíšeme ty, které jsou výše zvýrazněné. Ostatní metody nemají při farmaceutické výrobě využití, jsou pro velkovýrobu nevhodné nebo jsou již zastaralé. (Syvitski, 2010)

5.4.1 Gralulometrie

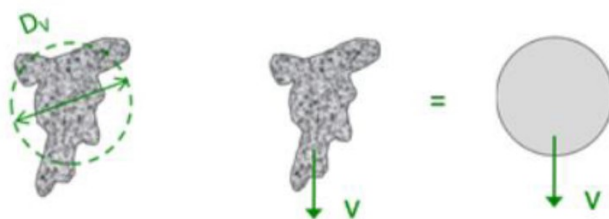
Granulometrie se zabývá velikostí částic a jejich zastoupením. Velikost částic je důležitý parametr, který následně ovlivňuje formulaci, stabilitu i mnohé následné biofarmaceutické aspekty. Zároveň má vliv na fyzikální, chemické i mechanické vlastnosti léčivých přípravků zejména na jejich rozpustnost a rychlost uvolnění léčiva z lékové formy. Vzhledem k tomu, že mají částice značně nepravidelný tvar, bylo za potřebí vyvinout metody umožňující popsat jejich přesnou velikost. (Stanley-Wood, a další, 2007)

5.4.1.1 Velikost částic

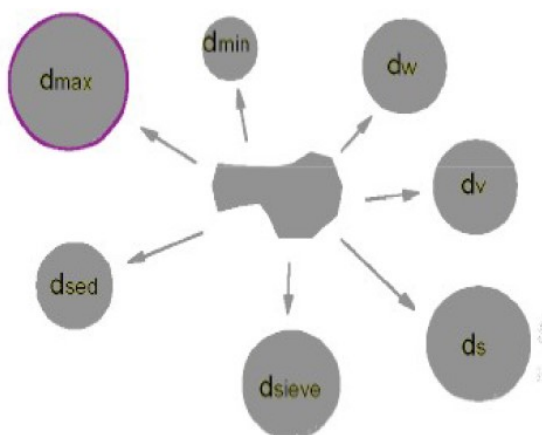
Všechny techniky umožňující měření částic mají jeden společný cíl, tím je poskytnout pouze jedno číslo, které by tyto částice charakterizovalo. Problémem však je, že částice nejsou pouze planární, ale trojrozměrné objekty. K jejich přesnému popisu je tak zapotřebí uvést všechny tři parametry tj. **délku, výšku i šířku.**

V historii byla zavedena celá řada průměrů, podle kterých se následně určovala **přibližná plocha** a následná velikost částic. Mezi nejvýznamnější z nich patří **Martinův** (délka sečny částice) či **Feretův** (vzdálenost mezi dvěma rovnoběžnými tečnami k částici). Úplně nejjednodušší planární model je tzv. **plošně ekvivalentní** průměr, kdy je velikost částice popsána jako plocha kruhu adekvátního průměru částice. (Komárek, a další, 2006)

Většina současných technik pro měření velikosti částic však předpokládá zjednodušený tzv. **model kulovité částice**, kdy je výsledná velikost částice průměrem „**ekvivalentní koule**“, která by poskytla stejný výsledek jako měřená částice. Způsob této aproximace je patrný na obrázcích 15 a 16.



Obrázek 15: Definice ekvivalentního průměru koule dV (Skotnicová, a další, 2013)



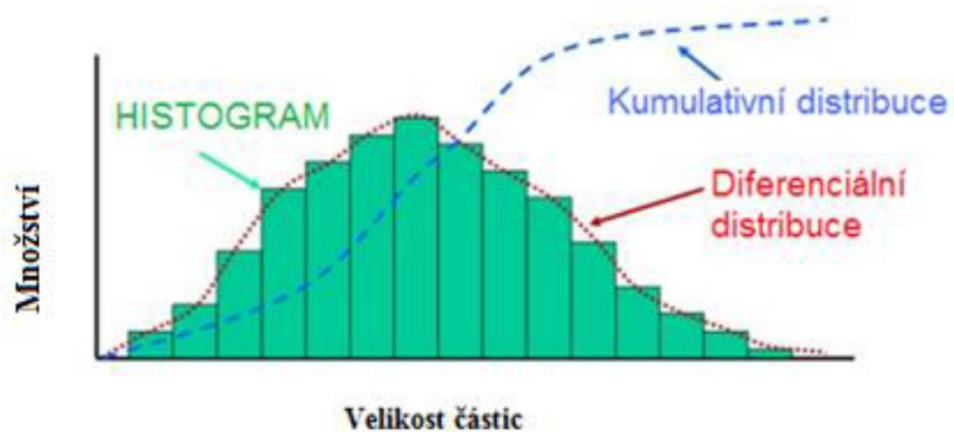
Obrázek 16: Částice a k ní přiřazené „ekvivalentní koule“ (Skotnicová, a další, 2013)

Odpovídající průměr určený pro tuto konkrétní částici závisí na fyzikální vlastnosti měřené zvolenou technikou. V případě laserové difrakce (viz kapitola 5.4.1.3.2) je zapotřebí zohlednit všechny možné aspekty zobrazené na obrázku č. 16 (Attwood D., 2008)

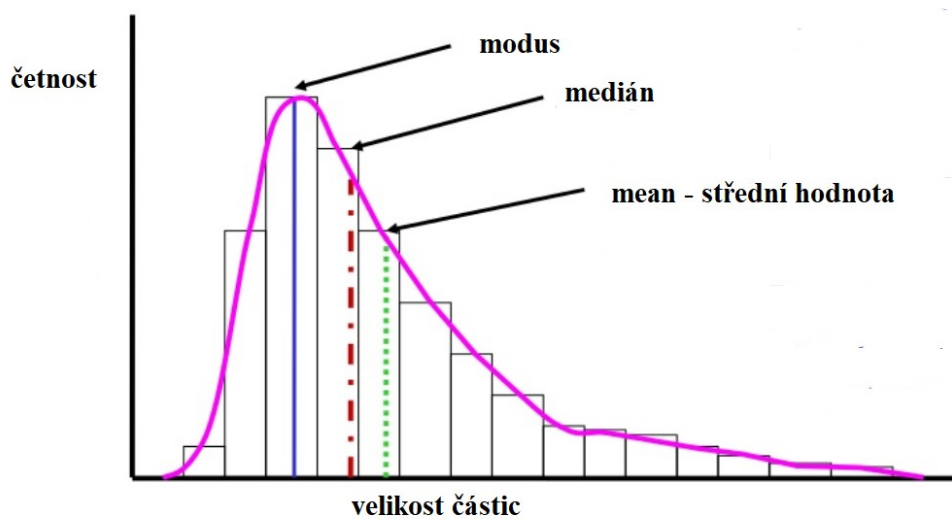
5.4.1.2 Distribuce velikosti částic

Prášky jsou vždy **polydisperzní** (složené z více frakcí částic různých velikostí). Tato vlastnost se u nich hodnotí pomocí stanovení distribuce velikosti částic. Hodnocení se provádí na základě charakteristik, jakými jsou například **medián, modus, meán** či **směrodatná odchylka**.

Výsledky měření částic mohou být následně prezentovány v grafické podobě například jako **distribuční křivky** (histogramy), **frekvenční křivky**, **kumulativní aritmetické křivky** nebo **kumulativní pravděpodobnostní křivky** viz následující obrázky.



Obrázek 17: Distribuce velikosti částic (Trevianus)



Obrázek 18: Kumulativní křivka naměřená metodou laserové difrakce

Statistické hodnoty:

Modus (Mode) – hodnota, která má nejvyšší četnost v daném souboru

Medián (Median) – hodnota která soubor rozděluje na dvě části

Střední hodnota (Mean) – aritmetický průměr daného souboru hodnot (Allen, 2013).

5.4.1.3 Granulometrické metody

5.4.1.3.1 Mikroskopie

Optické metody se mezi sebou významně liší ve svém využití. Některé částicové změny jsou patrné již při běžné **optické mikroskopii**. U některých je však zapotřebí využít přesnějších, sofistikovanějších, ale bohužel i nákladnějších metod jakými jsou například **transmisní (TEM)** a **skenovací elektronová mikroskopie (SEM)** pomocí kterých jsme schopni dosáhnout až 1000000 násobného zvětšení.

5.4.1.3.1.1 Optická mikroskopie

Mikroskopie jako taková je zavedená metoda pro měření velikosti částic od 1 μm do 1000 μm . Při porovnávání velikosti částic je v některých případech tato metoda dostačující. Částice, které jsou dispergovány v kapalině mohou být následně pozorovány při různých zvětšeních. Velikost nejmenších a největších částic je zaznamenána a potom je odhadnuta jejich průměrná hodnota. I přes fakt, že se nejedná o příliš přesnou metodu, s dostatkem zkušeností operátora může být rychlá a poskytovat jednoduše reprodukovatelné výsledky. Její hlavní síla je zejména u porovnávání významných rozlišností mezi jednotlivými vzorky.

Manuální způsob určování distribuční velikosti částic je **pomalý a nepřesný**, protože může být změřen jen malý počet částic. Z tohoto důvodu je efektivnější použití **automatického analyzátoru**. Při použití automatického analyzátoru je přesnost závislá na přípravě vzorku. Jednotlivé částice by se neměly překrývat nebo být vzájemně slepeny. K statisticky průkaznému výsledku je nutné změřit tisíce částic. Distribuce velikosti částic je ve farmaceutickém průmyslu v současné době určována již jinými, sofistikovanějšími metodami, ale i tak zde má světelná mikroskopie své uplatnění. (Šimek, a další, 2014)

5.4.1.3.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Je metoda využívající k zobrazování pohyblivý svazek elektronů. Skenovací neboli rastrovací elektronový mikroskop pracuje na principu, postupného dopadu tenkého fokusovaného svazku elektronů na všechna místa vzorku. Elektrony interagují s atomy ve vzorku a produkují různé signály, které obsahují informaci o topografii povrchu a složení vzorku. Emitovaný (odražený) paprsek je následně

převeden na viditelný obraz. SEM může dosáhnout za ideálních podmínek rozlišení lepšího než 1 nanometr. (Dohnal, 2010)

5.4.1.3.2 Laserová difrakce

Laserové difrakce je v současnosti stále více preferovanou metodou měření velikosti částic ve farmaceutickém průmyslu. Svou popularitu si získala zejména proto, že se jedná o rychlou, reprodukovatelnou a robustní metodu.

Tato technika měří částice hromadně, a následně generuje výsledek pro celý vzorek. Princip spočívá v kontinuálním průtoku částic měřicí celou, na kterých následně difraktuje laserový svazek. Vzhledem k tomu, že poskytuje difrakční obraz a nikoli přímý obraz částice, je vhodné výstup doplnit o mikroskopické snímky. (Šimek, a další, 2014)

Tabulka 3: Srovnání vybraných metod měření velikosti částic (Dohnal, 2010)

Metoda	Min [μm]	Max [μm]	Určení distribuce	Určení tvaru	Určení povrchu	Navážka [g]
Optická mikroskopie	1	1000	ANO	ANO	ANO	< 0,1
SEM	0,02	1000	ANO	ANO	ANO	< 0,1
Laserová difrakce	0,02	2000	NE	NE	ANO	< 0,1

5.4.1.4 Ostatní metody

5.4.1.4.1 RTG difrakce

Jedna z nejpoužívanějších metod, prostřednictvím které, lze zjistit a změřit krystalovou strukturu substance. Je založena na principu pružného rozptylu dopadajícího (primárního) rentgenového svazku na krystalovou strukturu (trojrozměrně se opakující molekulární motiv).

K rozptylu dojde na jednotlivých atomech, které mají ve své krystalové struktuře určitou rozdílnou pozici vůči zvolenému počátku, která je tak

charakterizuje. Na základě této vlastnosti mají malé rozptýlené vlny neměnný fázový rozdíl. (Kratochvíl, 2016)

5.4.1.4.2 Termická analýza

Termická analýza je založená na uvolňování nebo absorpci tepla při stavových změnách materiálu. Různé techniky termické analýzy jsou zaměřeny na určení entalpie provázející stavové změny **měřením rozdílů** v tepelném toku mezi studovaným vzorkem a referenčním standardem.

Mezi nejvýznamnější patří **diferenciální skenovací kalorimetrie** neboli **DSC**. Jedná se o termo-analytickou techniku, při které se měří rozdíl množství tepla potřebného ke zvýšení teploty vzorku a referenčního standardu.

Vzorek i standart jsou během měření udržovány na téměř totožné teplotě. DSC analýza je obecně navržena tak, aby teplota rostla lineárně jako funkce času. Referenční vzorek by měl mít dobře definovanou tepelnou kapacitu v rozsahu teplot, které mají být snímány. (Bernstein, 2002)

5.5 Rekrystalizace

Existuje více možných úrovní chápání pojmu rekrystalizace. Některé z nich se týkají geologických přeměn metamorfózy hornin. Jiné například metalurgie, konkrétně změn vlastností vysokotavitelných kovů jejich žháním. Nás však tato problematika zajímá spíše z hlediska chemického. Rekrystalizaci lze dělit na **statickou** a **dynamickou**.

5.5.1 Statická rekrystalizace

Statická rekrystalizace neboli (SRX) je proces, při kterém se deformovaný materiál transformuje na strukturu bez napětí při zvýšených teplotách. Tento jev se vyskytuje u nukleace částic nazývaných jádra, která rostou a následně nahrazují původní deformovanou matici. (Lin, a další, 2008)

Nukleace může mít různý fyzický původ. Typ nukleace silně závisí na rozmístění jednotlivých jader. **Homogenní nukleace** se provádí bez ohledu na umístění v původní mikrostruktuře. **Heterogenní nukleace** se vyskytuje na specifických místech v mikrostruktuře, např. částic, jejich spojení atd.

Kontinuální nukleace je případ, kdy k nukleaci dochází v průběhu času. (Humphreys, a další, 2004)

5.5.2 Dynamická rekrytalizace

Dynamická rekrytalizace (DRX) je typem rekrytalizace, který se využívá zejména v oblasti metalurgie a geologie. U dynamické rekrytalizace, na rozdíl od statické, dochází k nukleaci a růstu nových zrn již během stádia deformace, nikoli až následně během samostatného tepelného zpracování.

Konkrétní chování před dosažením ustáleného stavu závisí na počáteční velikosti zrna, teplotě a rychlosti deformace. Pokud se před dosažením ustáleného stavu objeví oscilace napětí, pak dochází k několika cyklům rekrytalizace a růstu zrn a chování při stresu je cyklického nebo vícenásobného typu. (Kaibyshev, a další, 1999)

5.5.2.1 Rekrytalizace, jako laboratorní metoda

Jak z předešlého textu vyplývá, na rekrytalizaci lze nahlížet z hlediska chemie ze dvou různých úhlů pohledu. V prvním případě se jedná o pozitivní (pro chemii prospěšnou) laboratorní metodu **přečišťování pevných chemických látek**. Podstatou je, že se surová látka (meziprodukt) za horka rozpustí v co nejmenším množství vhodného rozpouštědla. Roztok se následně přestane zahřívat a přidá se do něj vhodný adsorbent. Dále se roztok znovu zahřeje a za horka zfiltruje. Po ochlazení vypadnou krystalky přečištěného finálního produktu.

Důležitá je volba vhodného rozpouštědla. Vhodné rozpouštědlo je takové, ve kterém se daná látka velmi dobře rozpouští za horka a pokud možno, jen velmi omezeně za chladu. U neznámých látek je nutné provést specifické krystalizační zkoušky a vhodné rozpouštědlo pro ně tak nalézt experimentálně.

Vhodný adsorbent je látka, která na sebe váže nečistoty. Přidává se jej velmi omezené množství (maximálně 1 až 2 % hmotnosti surové látky) tak, aby nedošlo k navázání samotného produktu. Množství se odhaduje podle toho, jaké množství

látky rekrystalizujeme. Je-li rozpouštědlem polární látka, použije se pravidla aktivní uhlí. Je-li rozpouštědlem nepolární látka, použije se např. silikagel. (Cídllová, 2008)

Rekrystalizační metody mají na rozdíl od ostatních metod přípravy monokrystalů z plynné nebo kapalně fáze své přednosti i nedostatky. Pomocí rekrystalizace lze poměrně snadno získat monokrystaly slitin tuhých roztoků v širokém koncentračním rozsahu, a to i takových, které mají široký interval krystalizace.

K nedostatkům této metody patří nemožnost získat krystaly velkých průřezů a monokrystaly žádané krystalografické orientace a geometrického tvaru. (Drápala, 2006)

5.5.2.2 Rekrystalizace, jako technologická inkompatibilita

Jev rekrystalizace však nemusí být za všech okolností žádoucím (této problematice se budeme podrobněji věnovat v praktické části). Zejména v případech, kdy se jedná o tzv. **re-krystalizaci**. V tomto případě dojde vlivem narušení termodynamických pochodů během reakce ke zpětné krystalizaci rozpuštěné látky do roztoku za vzniku viditelné opalescence, zákalu, či přítomnosti krystalů. Podrobněji se mu budeme věnovat v kapitole 6.6.

5.6 Problematika polymorfismu v praxi

Některé polymorfy jsou velmi subtilní, a je tak těžké mít jejich výrobu pod kontrolou. Byly zaznamenány případy, kdy i u technologie, která byla doposud bezproblémová a vedla vždy k požadovanému produktu, došlo k jevu, který Dunitz a Bernstein nazvali jako „disappearing polymorph“ (**ztracený polymorf**).

Dlouho vyráběný polymorf se najednou nedaří reprodukovat. Příčinou je zřejmě skutečnost, že (náhodou?) došlo při výrobě ke vzniku prenukleí jiného polymorfu, která následně kontaminují krystalizační zařízení. Případně jsou tyto prenuklea přítomna v okolním prostředí, a tak dochází vždy právě ke krystalizaci nechtěného polymorfu. Pokusy vykrytalizovat jiný na stejném místě jsou dlouhodobě neúspěšné.

5.6.1 Příklad 1 - Dimorfní chování ritonaviru

Konkrétním příkladem **ztráty polymorfu** z praxe je předem neodhalené dimorfní chování **ritonaviru**. Ritonavir je inhibitorem enzymu HIV–proteasa. Problematika se týkala konkrétně léčiva Norvir, vyráběného farmaceutickou firmou Abbott Laboratories).

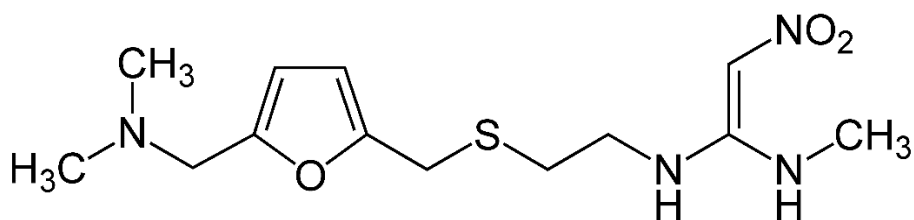
Tento fakt byl odhalen až v roce 1998 tj. dva roky po uvedení tohoto přípravku na trh. Do té doby probíhala výroba bez sebemenších komplikací. Ze dne na den se však rapidně změnila výsledky kontrolních disolučních testů a z polotuhého přípravku začalo najednou vypadávat samotné léčivo.

Rozsáhlým šetřením bylo prokázáno, že se jedná o **nový stabilní polymorf**, později označovaný jako **forma II**. Původně vyráběná forma byla následně označena jako **forma I**. Krátce na to došlo k nevratné kontaminaci výrobních prostor formou II a veškeré nově vyrobené šarže formy I tak **samovolně přecházely** právě na formu II.

I přes to, že byly do vyšetřování investovány nemalé finanční prostředky i výzkumné kapacity, tento problém se nepodařilo uspokojivě vyřešit. Vzhledem k těmto skutečnostem, byla firma Abbot nucena v roce 1999 přeformulovat Norvir do jiné lékové formy-roztoku. (Kratochvíl, 2007)

5.6.2 Příklad 2 – Dimorfismus u ranitidinu

Na následujícím příkladu u léčiva **ranitidin** používaného k léčbě žaludečních vředů si můžeme demonstrovat to, jak se dva registrované a průmyslově vyráběné polymorfy totožné účinné látky mezi sebou diametrálně liší.

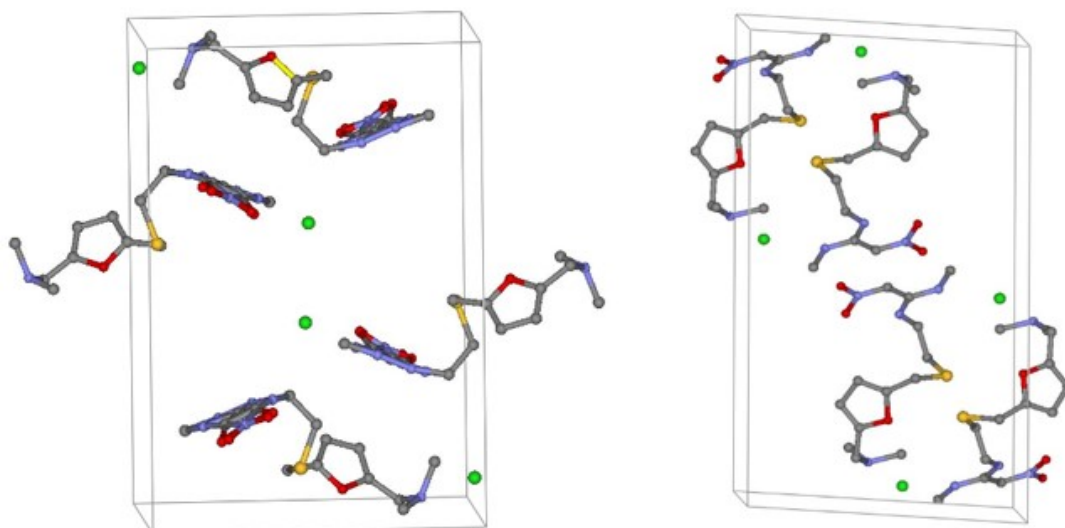


Obrázek 19: *Ranitidin hydrochlorid - léčba žaludečních vředů*

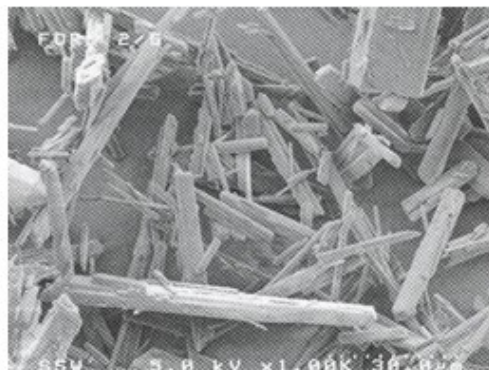
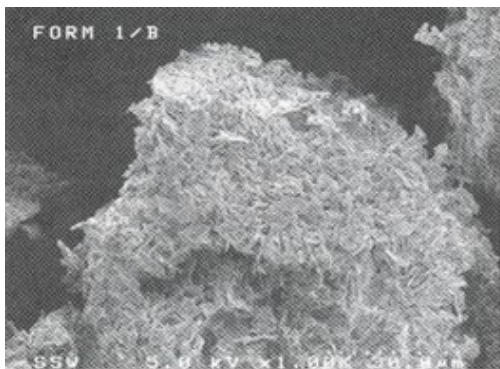
Kauza, která všeobecně rozpoutala větší zájem o samotnou problematiku polymorfismu ve farmaceutickém průmyslu pochází z roku 1995. Jednalo se o patentový spor mezi firmami Glaxo a Novopharm týkající se dimorfismu **ranitidin hydrochloridu formy I a II**. Původní firmě totiž vypršela patentová ochranná lhůta, která umožnila generickým firmám vstup na trh. O tom, že se nejednalo o spor zanedbatelný svědčí tržby z prodejů ranitidinu z devadesátých let překračující ročně 5 miliard USD.



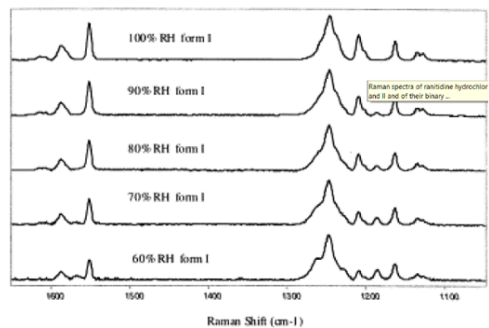
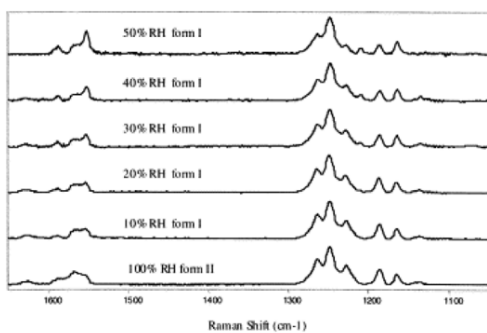
Obrázek 20: *Originální přípravek (vlevo) vs. jedno z mnoha generik (vpravo) (M.U.P.)*



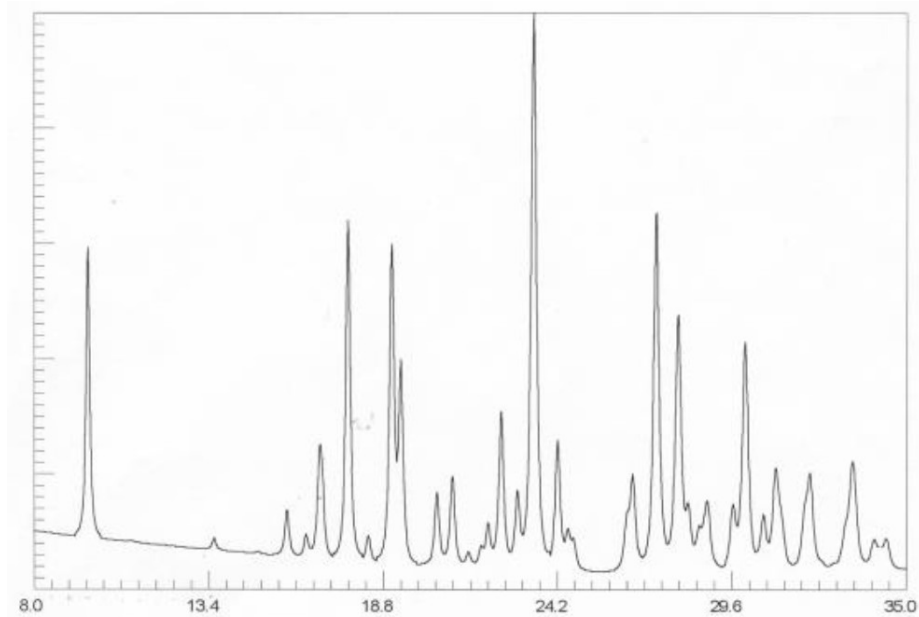
Obrázek 21: *Polymorf I vs. polymorf II (Kratochvíl, 2007)*



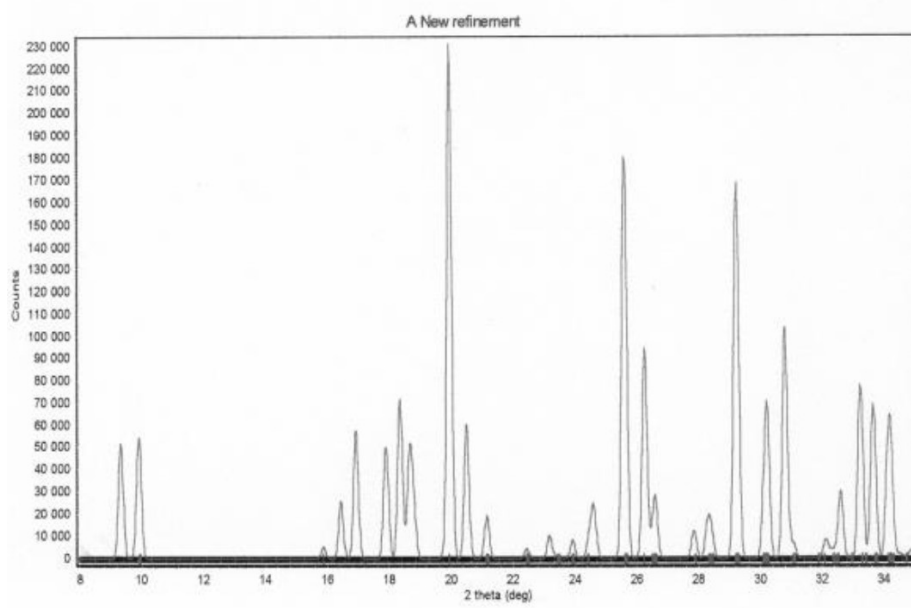
Obrázek 22: Mikroskopie originálního léčiva (vlevo) vs. generika (vpravo)
(Kratochvíl, 2007)



Obrázek 23: Ramanovo spektrum originálu (vlevo) vs. generika (vpravo)
(Kratochvíl, 2007)



Obrázek 24: RTG difraktogram - originál (Kratochvíl, 2007)



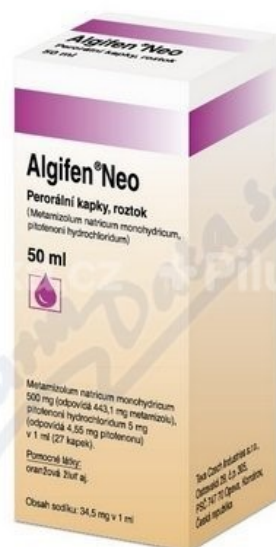
Obrázek 25: RTG difraktogram - generikum (Kratochvíl, 2007)

6 Případová studie

6.1 Úvod

Problematika rekrystalizace a polymorfismu se netýká pouze laboratorní přípravy (gramy), ale samozřejmě i samotné farmaceutické velkoobjemové výroby (tuny). Pro názornou ukázkou jsem se rozhodl celou problematiku demonstrovat na případu jednoho konkrétního kapalného léčivého přípravku, vyráběného českým farmaceutickým kolosem společností TEVA Czech Industries s.r.o. sídlící s Opavě. U tohoto přípravku byl tento fenomén pozorován a vedl kromě stažení šarží i k dlouhodobému výpadku, který nastartoval celou sérii šetření vedoucích k technologickým a procesním úpravám. V praktické části si popíšeme tento konkrétní přípravek, jeho využití, výrobu a její úskalí a následné řešení konkrétních stabilitních problémů.

6.2 Algifen Neo



Obrázek 26: Algifen Neo 50ml (Pilulka Distribuce s.r.o.)

6.2.1 Charakteristika přípravku

Algifen Neo 500 mg/ml + 5 mg/ml perorální kapky, roztok

Popis přípravku: čirý, žlutooranžový roztok.

Farmakoterapeutická skupina: syntetická anticholinergika v kombinaci s analgetiky

ATC kód: A03DA02

Držitel registrace: Teva Czech Industries s.r.o., Ostravská 29, č.p. 305, PSČ 747 70 Opava-Komárov, Česká republika

Registrační číslo - 73/166/01-C

Datum první registrace: 2. 5. 2001

Datum prodloužení registrace: 6. 8. 2014

6.2.2 Složení

6.2.2.1 Účinné látky

Účinnými látkami v přípravku jsou **metamizolum natriicum monohydricum** 500 mg (odpovídá 443,1 mg metamizolu) a **pitofenoni hydrochloridum** 5 mg (odpovídá 4,55 mg pitofenonu) v 1 ml (= 27 kapek).

6.2.2.2 Pomocné látky

Pomocné látky se známým účinkem jsou oranžová žlut' (E110), propylenglykol, dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, monohydrát sodné soli sacharinu, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, aroma curacao, dihydrát dinatrium-edetátu a čištěná voda.

6.2.3 Skladování a obaly

Přípravek je nutné skladovat v původním obalu, tak aby byl přípravek chráněn před světlem a mrazem při teplotě do 25 °C.

Lahvička je vyrobená z hnědého skla, s modrým HDPE kapacím zařízením opatřená bílým HDPE pojistným šroubovacím uzávěrem a následně uložena do kartonové krabičky. Velikosti balení jsou 25 a 50 ml.

6.2.4 Terapeutické indikace

Přípravek se využívá k léčbě spastických bolestí hladkého svalstva (spasmy trávicí trubice, žlučové a ledvinové koliky, tenesmy močového měchýře), spastické dysmenorey, spastické migrény a bolesti zubů. Dále se využívá k spasmolýzi

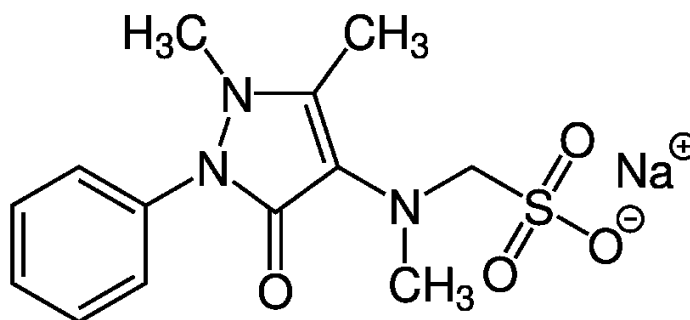
před nebo po instrumentálním vyšetření a kontrole bolesti po malých operačních výkonech.

6.2.5 Farmakologické vlastnosti

Algifen Neo je kombinovaný spasmooanalgetický přípravek, obsahující nenarkotické analgetikum ze skupiny pyrazolonů – **metamizol** a spasmolyticky působící látku – **pitofenon**. Účinek nastupuje obvykle během 15 minut a trvá minimálně 4 hodiny.

6.2.5.1 Farmakodynamické vlastnosti

Metamizol má výrazné **analgetické**, **antipyretické** a ve vysokých dávkách i **antiflogistické** účinky. Působí rovněž mírně spasmolyticky. V přípravku se využívá zejména jeho analgetické aktivity a také protizánětlivého a spasmolytického účinku tam, kde je bolest vyvolána některým z těchto faktorů.



Obrázek 27: Sodná sůl metamizolu

Mechanismus účinku metamizolu spočívá v inhibici syntézy prostaglandinů. Metamizol inhibuje cyklooxygenázu, syntézu tromboxanu v destičkách, agregaci destiček indukovanou arachidonovou kyselinou a syntézu prostaglandinu E₁ a E₂. Je stejně **účinným inhibítozem syntézy prostaglandinů** jako kyselina acetylsalicylová. Účinky metamizolu mohou být jak **periferní**, tak **centrální**. Je známo, že metamizol působí na centrum pro regulaci teploty v hypotalamu a tím **snižuje zvýšenou tělesnou teplotu**.

Pitofenon patří mezi **muskulotropní spasmolytika**. Má tedy přímý **relaxační účinek** na hladké svalstvo.

6.2.5.2 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorální aplikaci se metamizol neenzymaticky hydrolyzuje v tenkém střevě na aktivní metabolit 4-methylaminoantipyrin (4-MAA), který se po absorpci metabolizuje v játrech na sekundární aktivní metabolit 4-aminoantipyrin (4-AA) a inaktivní metabolity (4-formylaminoantipyrin – 4-FAA, 4-acetylaminoantipyrin – 4-AcAA). Absorpce 4-MAA není signifikantně ovlivněna potravou, proto je možno metamizol podávat jak bez potravy, tak s potravou. Maximální sérové hladiny 4-MAA jsou dosaženy 1-2 hodiny po perorálním podání. Vazba aktivních metabolitů na plazmatické bílkoviny je nízká (58 % pro 4-MAA, 48 % pro 4-AA). Distribuční objem 4-MAA je cca 40 l. Metabolity se vylučují převážně močí a jsou poměrně rychle eliminovány při hemodialýze. Z metabolitů jsou v moči v největší míře zastoupeny 4-FAA a 4-AcAA. Tři až sedm procent dávky se vylučuje jako 4-MAA a 5-7 % dávky jako 4-AA. Eliminační biologický poločas je 2-3 hodiny (pro 4-MAA) a 4-5 hodin (pro 4-AA). Oba aktivní metabolity pronikají do mateřského mléka, kde se nachází ve vyšší koncentraci než v séru.

Pitofenon se dobře resorbuje z trávicího traktu a snadno proniká buněčnými membránami; prochází hematoencefalickou i placentární bariérou. Destrukce v organismu probíhá především hydrolyzou v játrech. Metabolity se vylučují převážně ledvinami.

6.2.5.3 Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti přípravku

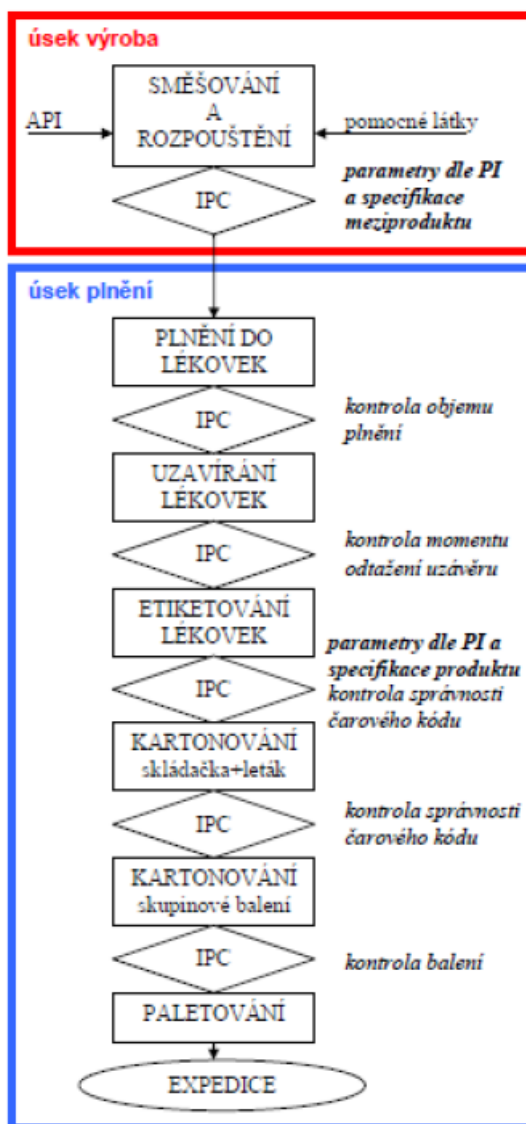
Jsou známy údaje o **akutní toxicitě metamizolu**.

LD_{50} (potkan, p. o.) = 5935 mg/kg, LD_{50} (myš, p. o.) = 5369 mg/kg

Metamizol má výrazné analgetické, antipyretické a ve vysokých dávkách i antiflogistické účinky. Působí rovněž mírně spasmolyticky. V přípravku se využívá zejména jeho analgetické aktivity a také protizánětlivého a spasmolytického účinku tam, kde je bolest vyvolána některým z těchto faktorů. **Pitofenon** je spasmolytikum s přímým účinkem na hladké svalstvo. (Státní ústav pro kontrolu léčiv SÚKL)

6.3 Výroba přípravku Algifen Neo

Konkrétní přesné postupy výroby včetně teplot, frekvence míchání, časů a navážek tohoto přípravku jsou přísně střeženým výrobním tajemstvím a patentovaným know-how firmy. Pro potřeby této práce mi bylo umožněno zveřejnit pouze obecnější postup, který si postupně projdeme krok po kroku. Jelikož se jedná o kapalný léčivý přípravek, výroba obnáší specifické nároky na technologii a vybavení, které se vůči ostatním lékovým formám logicky významně liší.



Obrázek 28: Obecné schéma výroby Algifenu (TEVA, 2018)

6.3.1 Příjem surovin a kontrola totožnosti surovin

Celý proces začíná nákupem výrobních surovin, které musí splňovat striktně nastavené certifikace a jakost. Nákupčí jsou zodpovědní za volbu vhodného dodavatele, který musí nutně držet standartní jakost na totožné úrovni, aby byl proces výroby opakovatelný. Tyto suroviny se po příjezdu do závodu skladují ve vysoko objemových obalech v centrálním skladu po jednotlivých šaržích. Důležité je pevné suroviny přijímat v takové velikosti částic, na kterou je výrobní proces nastavený, případně se následně mikronizují během samotného procesu přípravy.

Tabulka 4: Složení přípravku

Účinné látky	Pomocné látky
Metamizolum natricum	oranžová žluť (E110)
Pitofenoni hydrochloridum	Propylenglykol
	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
	monohydrát sodné soli sacharinu
	dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného
	aroma curacao
	dihydrát dinatrium-edetátu
	oranžová žluť (E 110)
	čištěná voda

Při zahájení výroby musí operátor vážícího můstku ve váhově připravit všechny potřebné suroviny na každou šarži a opatřit je příslušnou potřebnou dokumentací, aby byl následně dohledatelný jejich původ. Součástí započetí výroby je i vyplnění všech potřebných formulářů a protokolů. Přípravek se vyrábí ve **1000 l nebo 2000 l** šaržích, tomu odpovídá i jejich následná navážka.

Z výrobních specifikací i příbalových informací vyplývá, že v 1 ml roztoku, tj. 27 kapkách je rozpuštěno 500mg **metamizolum natricum monohydricum** (což odpovídá 443,1 mg metamizolu) a 5 mg **pitofenoni hydrochloridum** (což odpovídá 4,55 mg pitofenonu). Při výrobě šarže o objemu 1000 litrů je tak navážka zhruba 500 kg metamizolu a 5 kilogramů pitofenonu. Přesná navážka a

časový harmonogram přidávání pomocných látek je přísně střežené know-how firmy, proto jej zde není možné uvést. Vzhledem k přítomnosti dalších pomocných látek je tak následný finální roztok velmi koncentrovaný.

Příjem surovin se provádí ve vstupním filtru surovin, kam přichází ze skladu navážené přesně na šarži (aby se zamezilo možné záměně). Na jedné paletě mohou být suroviny **pouze k právě na jednu výrobní šarži**. Ve vstupním filtru se provede kontrola značení a neporušenosti obalů a očistí se případné nečistoty na vnějším obalu.

Během celého procesu výroby platí zásady **IPC** (in proces control), kdy validovaný proces vyžaduje po každém proběhlém uceleném kroku náležité ověření kvality a jakosti. Průmyslová výroba je velmi nákladná a jakákoli odlišnost od receptury vede z pravidla k likvidaci celé šarže a tím ztrátě nemalého množství prostředků. Proto je nutné vše striktně dodržovat a vést správně dokumentaci. **Standarty a limity** jsou velmi přísně nastaveny, protože nelze být hypoteticky riskovat se zdravím koncových pacientů. Pokud by nastal například případ, kdy bude finální produkt v naprostém pořádku, ale dokumentace bude vykazovat určité neshody, velmi pravděpodobně i taková šarže nebude propuštěna.

6.3.2 Příprava výrobního zařízení

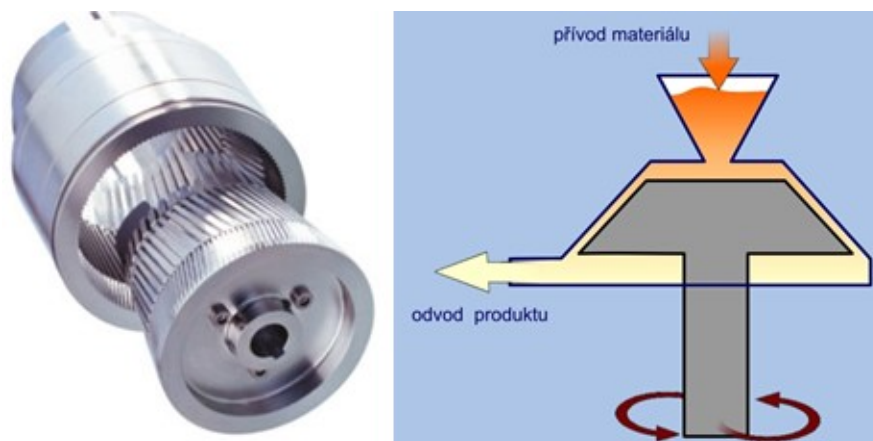
Před započítím výroby musí být provedena kontrola čistoty výrobních prostor a zařízení. Každé výrobní zařízení musí být řádně označeno. Z označení musí být na první pohled jasně patrné v jakém stavu se právě nachází. Zda je čisté, připravené k výrobě, nachází se v něm produkt nebo je prázdné, ale ještě neumyté.

K označení se používají speciální štítky, na kterých musí být minimálně uveden název a číslo zařízení, název přípravku, šarže, datum výroby a podpisy operátorů, způsob čištění (odkaz na dokument), datum a čas čištění. Výroba každého přípravku obnáší určitý standart čistoty, který se zpravidla překračuje (nadhodnocuje) aby se zaručila absence možné kontaminace přípravku.

Poté, co proběhne kontrola čistoty a značení, je výrobní zařízení opláchnuto čištěnou vodou a etanolem. V některých případech je dokonce provedeno propaření (zbavení mikroorganismů) zakončené vysušením dusíkem.

6.3.3 Mikronizace a mletí

API bývají již od dodavatele mikronizovány na požadovanou velikost (hrubost) částic. Důvodem homogenizace je rozbití shluků (clusterů) API a pomocných látek, které mohou vzniknout při výrobě a skladování. Takové shluky by mohli významně ovlivnit rozpustnost těchto látek. Všeobecně platí pravidlo, že čím drobnější je velikost částic, tím větší mají smáčivost a snadněji se rozpouští.



Obrázek 29: Koloidní mlýn Frymakoruma (NEOTEC)

Ve farmaceutické velkovýrobě je **mikronizace** práškových substancí často řešena pomocí **koloidního mlýnu**, který může být integrovaný přímo s výrobním kotlem. Hlavní částí přístroje je kuželovitý stator, ve kterém se otáčí rotor umístěný na svislé hřídeli. Šterbina mezi oběma částmi je velmi malá a seřizuje se mikrometrickým šroubem. Rotor se otáčí rychlostí 1000 až 20 000 otáček za minutu. Rozdrobňovaný materiál je protlačován šterbinou a odchází výpustným otvorem. Materiál je rozdrobňován především pomocí tření, v menší míře nárazy.

Druhou možnou variantou je průtokové provedení. Obecně se však jedná vždy o soustavu statoru a rotoru (konkrétní řešení je dáno výrobcem konkrétního mlýnu). Velikou výhodou mlýnu je, že umožňuje nejen mletí suchých látek, ale také látek rozptýlených v kapalině. Nevýhodou mlýnu je, že během mletí **dochází ke značnému zahřívání** všech jeho částí, které je nutno **chladit**. (Pathway, 2016)

6.3.4 Navažování

V okamžiku, kdy máme celou soustavu dokonale vyčištěnou a připravenou na samotný výrobní proces, stejně tak jako vstupní suroviny připravené na vstupním můstku, je potřeba ještě jednou přesně ověřit jejich množství. V místnosti,

kde dochází k samotné výrobě jsou přítomny **můstkové váhy** pro ověření váhy již navážených surovin (dvojitá kontrola) s adekvátní váživostí, kdy se požadované množství zváží a obsah dle pracovního postupu v adekvátním pořadí následně vysype (vylíje) do kotle.

Pro ověření množství velkoobjemových substancí, které se do kotle přivádějí pomocí potrubí, se používají tzv. **tenzometrické váhy**, které jsou umístěny pod nožičkami samotného varného kotle. Celý výrobní kotol je umístěn na tenzometrická čidla, jeho hmotnost je během celé výroby snímána a v čase zaznamenávána do řídicího systému, který na tomto základě dává další pomocné látky.

Kapaliny se nasávají vakuem přes automatický ventil pomocí nasávací trubky napojené hadicí na nasávací ventil na víku kotle (navazování je automatické do dosažení požadované hmotnosti). Sypké suroviny se vsypávají otvorem nebo nasávají pod hladinu, aby se látky dokonale smočily a zabránilo se jejich shlukování či nalepení na stěny výrobního kotle.

Při výrobě Algifenu nejsou použity žádné vysoce účinné látky (steroidy, hormony, antibiotika), které by vyžadovaly navážku v laminárním boxu (pro ochranu zdraví personálu a možnou kontaminaci prostředí).

6.3.5 Vlastní výroba

Výroba probíhá v nasazovacích boxech. Vnitřní povrchy veškerého výrobního zařízení musí být vyrobené z **nerezu, neporušené, čistitelné a dezinfikovatelné**. Nasazovací box je oddělený čistý prostor, který přináší ochranu před křížovou kontaminací. V každém nasazovacím boxu je umístěn pouze jeden výrobní kotol a vyráběna pouze jedna šarže jednoho konkrétního produktu.

Do výrobního kotle jsou postupně přidávány účinné látky (metamizolum natriicum monohydricum a pitofenoni hydrochloridum), pomocné látky (oranžová žluť (E110), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, monohydrát sodné soli sacharinu, dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného, aroma curacao, dihydrát dinatrium-edetátu) a rozpouštědla (propylenglykol a čištěná voda). Tyto látky se do kotle přidávají postupně v daném pořadí, za stálé teploty a míchání se v průběhu validovaného procesu společně smísí v požadovaný roztok (mezi

produkt). Prachy jsou nasávány pod hladinu rozpouštědla tak, aby se zabránilo jejich shlukování a přilepení na stěnu kotle. Po dokonalém rozpuštění všech pevných složek dojde k ukončení této fáze. Následuje filtrace a převod meziprojektu do homogenizátoru.



Obrázek 30: Výrobní kotel Fryma s kapacitou 3200l bulku (TEVA, 2018)

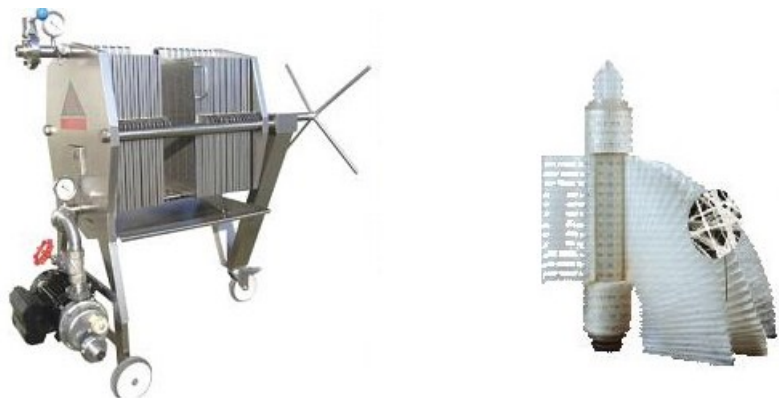
6.3.6 Filtrace

Poté, co dojde k rozpuštění všech složek roztoku, meziprojekt se zfiltruje pod tlakem přes **filtrační rukávec**. Filtrační rukávce jsou speciální vaky vyrobené z vhodných materiálů např. polyesteru, polypropylenu, nylonu, o porózitě 0,5 - 250 μm . Velikost póru se volí podle typu přípravku, vodné roztoky se filtrují přes hustší filtry, sirupy přes řidší. Pro každý přípravek je přesně daný typ filtru v pracovní instrukci.

Rukávce se nestřídají pro různé přípravky, i když jsou parametry stejné. Jeden konkrétní rukávec je vždy vyhrazen pouze pro jeden přípravek. Rukávce se vkládají do hausingu, kdy je přípravek pomocí čerpadla přiváděn horem do rukávce a následně **tlakem filtrován**. K samotnému procesu filtrace se v následujících částech této práce ještě vrátíme.

Deskové filtry obsahují celulózové vložky, které se vkládají do nerezových nebo polypropylenových rámců. Ve farmaceutické výrobě se příliš nepoužívají.

Využívají se spíše v potravinářství například při výrobě piva či vína. Na následujícím obrázku je patrný rozdíl mezi jednotlivými výše zmíněnými druhy filtrů.



Obrázek 31: *Deskový vs. rukávový filtr (TEVA, 2018)*

6.3.7 Homogenizace

Jeden z nejdůležitějších kroků samotné výroby. Produkt musí být v celé výrobní šarži dokonale homogenní, tj. v každém náhodně vybraném vzorku a následném balení obsahově shodný.

K tomuto procesu slouží zásobní nebo kompletační kotle s duplikací i bez ní. Tyto kotle obsahují různé druhy míchadel (**rámová**, **vrtulová**, **magnetická**). Vnitřní povrch kotlů je vyrobený z nerezové farmaceutické kvality (AISI 316L), který je stálý a snadno čistitelný.



Obrázek 32: *Příklady používaných míchadel (TEVA, 2018)*



Obrázek 33: *Homegenizátor (TEVA, 2018)*



Obrázek 34: *Magnetická míchačka (TEVA, 2018)*

6.3.8 Odběr vzorků

Důležitou úlohu během celého procesu výroby plní kontrola jakosti (QA). Hlídá, zda nedošlo k žádnému pochybení či odchylce od předepsaného postupu a zda se průběžné hodnoty shodují se stanovenými standarty.

V této fázi výroby a homogenizace existují dva způsoby, jak odebrat z kotle vzorek vzorek pro IPC:

- A) Použitím odběrových pomůcek po otevření víka
- B) Jehlou přes odběrovou membránu bez otevření kotle. (Tento způsob se více využívá u sterilních produktů nebo nosních sprejů, kde by otevřením hrozila kontaminace meziprojektu)

6.3.9 Čištění výrobního zařízení

Čištění a mytí výrobních zařízení se provádí jak automaticky, tak ručně. Pro mytí se používají **kyselý a zásaditý mycí roztok** definovaného složení. Pro automatické mytí se využívá automatická mycí stanice, která sama dávkuje požadovanou koncentraci a množství mycích médií. Proces mytí se musí validovat, aby se potvrdilo, že na zařízení nezůstávají zbytky produktů, ani zbytky oplachových médií.

CIP – Clean in place

SIP – Steam in place



Obrázek 35: Automatická mycí stanice (TEVA, 2018)

6.3.10 Mytí a sterilizace lékovek

Pro zachování kvality výsledného produktu je zapotřebí dbát i na čistotu primárních a sekundárních obalů. Na rozdíl od sterilní výroby, kde jsou lékovky dodávány již od výrobce s deklarovanou sterilitou, se u výroby Algifenu používají nesterilní lékovky, které je zapotřebí prohlédnout, vyčistit a následně vymýt dle validovaných postupů. Přisun lékovek je obsluhou zajišťován prostřednictvím vstupního zařízení. Lékovky jsou dále transportovány buď šnekovým nebo pásovým dopravníkem, kde jsou v první fázi postříkány teplou PW (čištěnou vodou) nebo WFI (vodou pro injekce).



Obrázek 36: Příprava lékovek (TEVA, 2018)

V dalším kroku jsou přes zvedací zařízení dopraveny ke kornoutům. V této poloze procházejí mycím cyklem, kdy je kontinuálně umýván jejich vnitřní i vnější povrch cirkulační filtrovanou vodou a následně jsou ofoukány sterilním vzduchem.

Druhé vnitřní mytí lékovek je prováděno PW nebo WFI vodou a zakončeno vyfoukáním sterilním vzduchem. Po umytí jsou lékovky dopraveny pásovým dopravníkem do sterilizačního tunelu, kde jsou sterilizovány teplotou 220 °C, následně zchlazeny na 20 °C a dále dopraveny až k plnicímu stroji. Ačkoli se jedná o nesterilní výrobu, obaly jsou sterilizovány.



Obrázek 37: *Sterilizace lékovek (TEVA, 2018)*

6.3.11 Vytřukávání lékovek

Přísun lékovek je obsluhou zajišťován prostřednictvím vstupního zařízení. Odtud jsou lékovky dále transportovány do vyfukovačky. Z kruhu jsou lékovky předány do vstupní rozety a následně do kleštin po jedné lékovce, lékovka je otočená dnem vzhůru. V této poloze procházejí lékovky vyfukovacím cyklem, kdy je kontinuálně vyfoukáván vnitřní povrch lékovek sterilním vzduchem.



Obrázek 38: *Vytřukávání lékovek (TEVA, 2018)*



Obrázek 39: Vyfukování sterilním vzduchem (TEVA, 2018)

V následujícím kroku jsou lékovky otočeny dnem dolů a předány do výjezdové rozety. Čisté lékovky jsou pásovým dopravníkem přiváděny k podávacím unášecům plnicího stroje.

6.3.12 Plnění

Plnění lékovek probíhá na automatické plničce, která je součástí plnicí a uzavírací linky. Algifen je plněn do lékovek o objemu 25 a 50 ml. Plnička jich dokáže za hodinu naplnit při plném výkonu až 36 000 ks.

Plnicí stroje

Plnicí a uzavírací stroje rozplňují příslušný roztok do 25 ml a 50 ml lékovek. Plnění je automatické pomocí magneticko-induktivních cívek. Plnicí a uzavírací stroje jsou umístěny v plnicích boxech 1 - 4 třída čistoty „T 1“. V tomto konkrétním případě se jedná o plnicí stroj Groninger.



Obrázek 40: *Plnička Groninger (TEVA, 2018)*



Obrázek 41: *Plnicí linka (TEVA, 2018)*

Lékovky jsou zde podávány pod trysky a pomocí magneticko-induktivního nebo keramicko-rotačního dávkovacího systému jsou tryskami naplněny. Dále jsou pomocí rozety vedeny k uzavíracím hlavám.

Samotné uzavírání probíhá ve dvou krocích, kdy nejprve kapátková hlava nasadí kapátko na lékovku a následně uzavírací hlava nasadí šroubek a dotáhne uzávěr na požadovanou hodnotu momentu dotažení (80 – 120 N/cm) dle požadavků specifikovaných pro jednotlivý přípravek.

6.3.13 Sekundární obaly

Etiketování

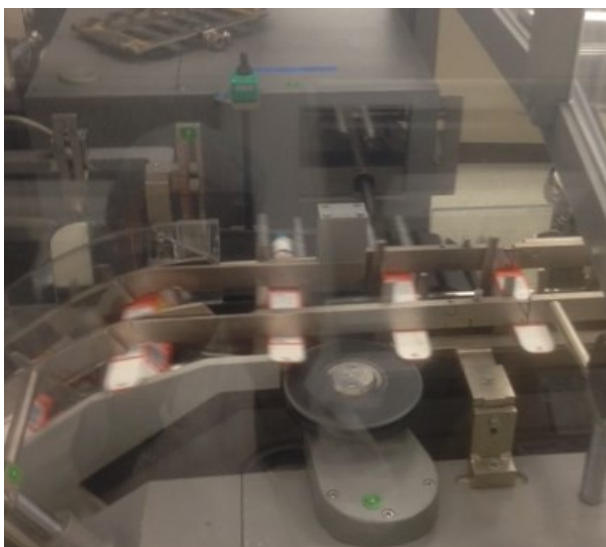
Součástí každé lékovky je po jejím uzavření i náležitý polep příslušnou etiketou obsahující **název, informace o velikosti a síle přípravku**, a v neposlední řadě **číslo šarže** a **expiraci** daného balení případně **datum výroby**. Tento krok zajišťuje **etiketovací stroj** umístěný na lince v prostorech sekundárního balení. Je plně automaticky řízený počítačem. Etikety jsou pro lepší kontrolu a bilancování na spodní podkladní pásce očíslovány.



Obrázek 42: *Etiketovací stroj (TEVA, 2018)*

Kartonování

Po etiketování následuje na lince další důležitý krok, kterým je uložení lékovky do příslušné kartonové skládačky. Tuto práci zajišťuje počítačem řízený kartonovací stroj. Ještě před uzavřením skládačky, speciální rameno vloží do každého kartonu složenou příbalovou informaci. Následně se skládačka uzavře a vyrazí se do ní šarže a doba použitelnosti, případně další požadované údaje.



Obrázek 43: *Kartonovací stroj (TEVA, 2018)*

Vzhledem k automatizaci a rychlosti kartonování je samozřejmě potřeba celý proces počítačově kontrolovat. Jako směrodatný parametr je použita celková váha balení, kdy počítač pomocí, byť drobných nuancí dokáže vyhodnotit například, zda uzavřený karton obsahuje příbalovou informaci či nikoli. Takový zmetek z linky bez problému a narušení chodu vyřadí. Zároveň laser ověřuje přítomnost čárových kódů.

Na kartonovací stroj přímo navazuje skupinové balení, kdy se kde požadavků distributora ukládají přípravky do kartonových přepravek. Následně se paletují a po ovinutí ochranou průtažnou folií jsou přesunuty do skladu.



Obrázek 44: *Balení do kartonových přepravních krabic (TEVA, 2018)*



Obrázek 45: *Sklad (TEVA, 2018)*

6.3.14 Skladování

Palety se zabalenými přípravky jsou následně uloženy do skladu. Zde jsou skladovány za specifických předepsaných podmínek (teplota, vlhkost, osvětlení) a čekají tu na následnou distribuci do sítě zdravotnických zařízení.

6.4 Správná výrobní praxe (SVP)

Správná výrobní praxe (SVP) neboli Good manufacturing practice (GMP), představuje ve farmaceutické výrobě systém ochrany spotřebitele (pacienta). Je to **soubor opatření**, které minimalizují riziko, že by se na trh dostal lék nevyhovující kvality či nevhodný zamýšlenému použití. (ISPE, 2019)

6.4.1 Požadavky SVP

Základním požadavkem SVP při výrobě léčiv je zabezpečení takových podmínek, aby bylo možno vyrobit **kvalitní, bezpečná a účinná léčiva**. Nezbytným a neméně důležitým požadavkem, vyjma zajištění prostorů, zařízení a personálu, je příprava a vedení dokumentace. Dokumentace musí splňovat náročné požadavky SVP, a je součástí systému zabezpečení jakosti při výrobě léčiv.

Dalším nezbytným požadavkem je zabezpečení pravidelného školení a soustavného vzdělávání, systém preventivní **údržby, kalibrace, monitoringu** a systém **validací** a **revalidací**.

Obecně mají být dokumenty srozumitelné, jednoznačné a přehledné, musí být popsán systém **přípravy, kontroly, schvalování, vydávání, distribuce** a **archivování** dokumentů. Reprodukce dokumentů z originálu nesmí být příčinou chyb nebo záměn, dokumenty musí být pravidelně **revidovány** a **aktualizovány**. Každá oprava musí být doplněna datem a podpisem, přičemž původní údaj musí být čitelný. (TEVA, 2018)

6.4.2 Dokumenty SVP

6.4.2.1 Řízená dokumentace

6.4.2.1.1 Organizační dokumentace

Organizační dokumentace je souhrn informací a instrukcí obecného charakteru. Dělí se na **standardní operační postupy** (SOP), které popisují provádění obecných postupů v souladu s SVP a **návody k obsluze** zařízení popisujících způsob používání a čištění zařízení či přístrojů.

6.4.2.1.2 Výrobní dokumentace

Do kategorie výrobní dokumentace lze zařadit:

- **Bezpečnostní datové listy** (BDL) – obsahují souhrnné identifikační údaje o látce nebo výrobku z hlediska ochrany zdraví a životního prostředí
- **Adjustační norma** (AN) – je seznam prostředků obalové techniky zahrnující jejich množství a kvalitu
- **Technicko-hospodářská norma** (THN) – seznam výchozích materiálů a meziproductů včetně množství a kvality
- **Prozatímní výrobní předpis** (PVP) – obsahuje způsob výroby a kontroly pro navrhovanou velikost šarže při zavádění výroby nebo ověřování technologického postupu
- **Technologický reglement** (TR) – obsahuje způsob výroby a kontroly pro standardní velikost šarže
- **Pracovní instrukce** (PI) – popisuje činnosti při konkrétním technologickém procesu, požadované IPC a požadované prostředí
- **Validační protokol** (VP) – plán připravované validace procesu nebo čištění
- **Validační zpráva postupu** (VZP) – popis validace a souhrn získaných výsledků, včetně závěru a doporučení

6.4.2.1.3 Kontrolní dokumentace

Do kategorie kontrolní dokumentace lze zařadit:

- **Analytická metoda (AN)** – popis postupu při analýze
- **Stabilitní plán (SP)** – souhrn informací k založení stabilitní studie
- **Specifikace suroviny (SS)** – souhrn informací a kritérií pro hodnocení suroviny
- **Specifikace obalu (SO)** - souhrn informací a kritérií pro hodnocení obalů
- **Specifikace meziprojektu (SM)** - souhrn informací a kritérií pro hodnocení meziprojektu
- **Specifikace výrobku (SV)** - souhrn informací a kritérií pro hodnocení finálního produktu
- **Stabilitní zpráva (SZ)** – souhrn informací a kritérií pro hodnocení stability
- **Validační zpráva analytické metody (VZA)**

6.4.2.2 Operativní (záznamová) dokumentace

Operativní dokumentace podává konkrétní informace o daném produktu v celém průběhu jeho výroby. Mezi její dokumenty lze zařadit:

- **Interní certifikát** – osvědčení o kvalitě v souladu se specifikací materiálu
- **Pracovní příkaz** – pokyn k zahájení výroby šarže daného výrobku
- **Vzorkovací protokol** – záznam o odběru vzorku (meziprojektu nebo finálního výrobku)
- **Certifikát o analýze** – osvědčení o kvalitě v souladu se specifikací výrobku
- **Operační list (OL)** – záznam o technologickém průběhu výroby v souladu s příslušnou pracovní instrukcí jejíž je OL součástí
- **Výrobní protokol (VRP)** – výpis z databáze řídicího systému výroby o celém průběhu technologického procesu
- **Propouštěcí protokol** – záznam o povolení vyrobené šarže výrobku do distribuce (souhlas, že výroba proběhla dle zásad SVP) – vydává kvalifikovaná osoba (QP)
- **Odchylka** – záznam o neplánované změně v průběhu procesu výroby a kontroly, která je ošetřena postupem dle SOP.

- **Změna** – záznam o plánované změně v průběhu procesu výroby a kontroly (která by mohla ovlivnit kvalitu materiálu nebo produktu), která je ošetřena postupem dle SOP
- **Provozní kniha přístroje** – veškeré záznamy o přístroji, od jeho pořízení až k jeho vyřazení
- **Provozní kniha zařízení** – veškeré záznamy o zařízení, od jeho pořízení až k jeho vyřazení (TEVA, 2018)

6.4.2.3 Registrační dokumentace

Pro výrobu léčivých přípravků je zapotřebí mít právně ošetřené (zaregistrované) postupy a konkrétní chemické substance.

- **Pro léčivé přípravky**
- **Pro léčivé látky**

6.4.2.4 Další předpisy

Mezi další opatření patří nutnost proškolení personál ze všech potřebných dokumentů, rozdělení podle úrovně zařazení do procesu výroby, kontroly a distribuce

- **Vzdělávání** – systém vzdělávání v oblasti souvisejících činností a SVP
- **Preventivní údržba** – popis všech kroků při preventivní kontrole o údržbě přístroje nebo zařízení
- **Kalibrace** – kalibrace, včetně protokolu a systému evidence, všech přístrojů zaznamenávajících údaje důležité pro dané technologické postupy nebo prostředí, ve kterém výroba, kontrola a distribuce probíhá.
- **Monitoring** – souhrn údajů za stanovené období, který dokumentuje specifikovaný stav technologických procesů, prostředí nebo kontrolních výsledků. Reprodukují se ve formě tabulek a grafů, které názorně zobrazují příslušný trend, který má pro dlouhodobé sledování větší vypovídající hodnotu než jednotlivě získané výsledky. Bližší informace v kapitole 6.4.5.5.4

6.4.2.5 Validace a revalidace

Validace a revalidace „je zajištění dokumentovaných důkazů, které poskytují vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude neustále poskytovat produkt splňující předem **určené specifikace a atributy jakosti**“ (definice FDA pro validace). Validace dělíme na **prospektivní** (před uvedením produktu na trh), **souběžné** (v průběhu rutinní výroby) a **retrospektivní** (po uvedení produktu na trh).

S validacemi se ve farmaceutické výrobě můžeme setkat v mnoha různých úrovních. Dle jejich výskytu se dělí na:

- **specifikace** – Functional (FS), Design Specification (DS)
- **instalační** – Instalation Qualification (IQ)
- **operační** – Operational Qualification (OQ) – kvalifikace procesu, demonstrace spolehlivosti – proces je efektivní a reprodukovatelný
- **procesní** – Process Qualification (PQ) - kvalifikace simulace výroby produktu nebo čištění, demonstrace spolehlivosti – vyráběný produkt nebo čistící proces odpovídá specifikaci a je bezpečný.
- **procesní** – Process Validation (PV) - validace výroby konkrétního produktu nebo čištění, demonstrace spolehlivosti – vyráběný produkt nebo čistící proces odpovídá specifikaci a je bezpečný.
- **Řídící plán validací** (VMP) - je důležitým dokumentem, který popisuje firemní strategii v této oblasti
- **Revalidace** – je nutná při všech změnách, které by mohly ovlivnit kvalitu výsledného produktu nebo pro prokázání standardnosti po určitém časovém intervalu

6.4.3 Personál

Personál je z hlediska SVP (správné výrobní praxe více v 6.4) velmi významným faktorem, který může ovlivnit výrobu léčiv jak v kladném, tak záporném slova smyslu. Je proto nezbytně nutné věnovat velkou pozornost výběru a následnému školení pracovníků podílejících se bezprostředně na výrobě léčiv.

Je nutné zajistit dostatečný počet pracovníků s potřebnou kvalifikací a zkušenostmi, aby se v případě nutnosti mohli vhodně zastupovat. Zároveň farmaceutická výroba probíhá často v nepřetržitém provozu, protože započatý výrobní proces nelze v jeho průběhu zastavit. Z tohoto důvodu zaměstnanci pracují proti sobě a je třeba si osvojit vhodné komunikační nástroje pro předání důležitých informací mezi jednotlivými směny.

V žádném případě neplatí, že výrobu zvládne kdokoli na základě dodaného písemného postupu, jak s oblibou opakují někteří manažeři neznalí všech nástrah a úskalí výroby léčiv. Je nezbytně nutné, aby si výrobní procesy jednotliví pracovníci osvojili a dokázali je zvládat rutinně. Zároveň je nutné, aby věděli, jak jednat v krizových situacích a na koho se případně obrátit.

Výroba léčivých přípravků je validovaný a přesně známý automatizovaný proces probíhající na základě receptury vytvořené v řídicím systému výroby. Operátoři vykonávají pokyny dle receptury, potvrzují jednotlivé kroky a nemají možnost provést změnu. Není zde prostor pro jakékoli vlastní invence. Proto, aby proces proběhl tak jak má, je nutné dodržet přesnou recepturu krok po kroku.

Při nedodržení předepsaných parametrů dojde k zablokování receptury. Největší riziko selhání je tzv. **lidský faktor**, tj. chyba samotného operátora. Cílem je nastavit proces tak, aby se možná chybovost snížila na minimum. Dle slov ředitele opavské výroby kapalných léčivých přípravků je „největším nebezpečím pro produkt farmaceutické výroby přítomnost lidí ve výrobě“.

Pro zabezpečení trvalé kvality je důležité rovněž zachovat nezávislost funkcí vedoucích pracovníků odpovědných za výrobu, **kontrolu kvality (QC)** a **kontrolu jakosti (QA)**. Za finálním rozhodnutím stojí pověřená kvalifikovaná osoba, která za něj nese plnou zodpovědnost.

Nezanedbatelné a důležité jsou popisy práce v písemné podobě, a to jak pro řadové pracovníky, tak i vedoucí pracovníky a manažery. V těchto podrobných instrukcích se dozví vše potřebné krok za krokem.

Součástí provozu jsou i pravidelná školení pracovníků výroby a kontroly. Obsahují jak základní teorii, tak i praktické ukázky SVP. Při změně metodiky,

či zavádění nového přípravku jsou zařazeny i speciální výcviky vykonávaných činností, které **zvyšují jistotu a bezpečnost výroby**. Během těchto školení si zaměstnanci procesy osahají pod dohledem odborného školitele.

6.4.4 Hygiena

Z hlediska hygienického chování pracovníků ve výrobě je nezbytné popsat veškeré činnosti a chování v hygienickém řádu nebo podobném standartním pracovním postupu (SOP). Bez patřičného proškolení a převlečení do ochranného oděvu nelze pustit do výroby ani návštěvy a předem neproškolené osoby.



Obrázek 46: Postup převlékání pracovníků (TEVA, 2018)

Pracovníci se převlékají v tzv. **personálních propustech**. Tyto místnosti oddělují prostory s vyšší a nižší třídou čistoty a slouží k **převlékání a dekontaminaci osob**. Jsou vybaveny speciálními vzduchovými a vodními sprchami a náležitou dezinfekcí.

Dle třídy čistoty se používají různé druhy pracovních oděvů. Ty se mezi sebou liší zpravidla materiálem, barvou, provedením a přídatnými komponenty od běžného bezúletového (z vláken, které neuvolňují částice), až po speciální s filtro-ventilační jednotkou. Prádlo se pravidelně pere či sterilizuje. V případě, že se jedná o jednorázové verze se ihned po svlečení vyhazuje.

Důvodů, proč je třeba využívat speciální oblečení je hned několik. V prvé řadě se jeho použitím zamezí (sníží pravděpodobnost) kontaminace produktu

(mechanické, křížové i mikrobiologické). Dále je pracovník ochráněn před účinky vyráběného přípravku a je tak zajištěna jeho bezpečnost v provozu. Oděvy jsou voleny tak, aby bylo zajištěno pro pracovníky během výkonu náležité pohodlí volbou vhodného materiálu a střihu.

Pracovníci musí před nástupem projít lékařskou prohlídkou, která se musí opakovat v pravidelných, zákonem daných intervalech. V prostorách výrobních, skladových a kontrolních nesmí být uloženy potraviny, nápoje, kuřácké potřeby nebo léky k osobní potřebě. Je nutno zabránit přímému kontaktu pracovníka s produktem a kontaktu rukou pracovníka s výrobním zařízením přicházejícím do styku s produktem.

Člověk významně poškozují svou přítomností hodnoty parametrů čistého prostoru. Pracovník, který sedí emituje **100 000 částic / min.** Zatímco pomalu jdoucí člověk jich emituje dokonce až **5 mil.**



Obrázek 47: *Personální propust (TEVA, 2018)*

6.4.5 Prostory

6.4.5.1 Budovy

Budovy farmaceutických provozů by měly být umístěny v prostředí s minimálním rizikem kontaminace. Musí být zabráněno vstupu nepovolaných osob, stejně tak jako vniku hmyzu nebo jiných živočichů. Měly by být logicky projektovány tak, aby výrobní prostory na sebe logicky navazovali a přesuny mezi jednotlivými procesy byly co nejkratší. (TEVA, 2018)

6.4.5.2 Výrobní prostory

Musí být umístěny, navrženy, realizovány a udržovány tak, aby to odpovídalo činnostem, jež v nich mají probíhat. Celkové uspořádání a funkční návaznost musí umožňovat výrobu minimalizující riziko chyb. Zároveň by měli také umožňovat účinné čištění a údržbu, aby bylo možno předejít křížové kontaminaci mezi jednotlivými produkty, usazování reziduí léčivých a pomocných látek a aby se ve svém důsledku zabránilo ovlivnění jakosti produktu a umožnilo vyrobit kvalitní, bezpečná a účinná léčiva. (SÚKL, 2009)

Prostory by měly být řešeny formou logicky propojených celků minimalizujících riziko záměn, dle sledu výrobních operací a v souladu s požadavky na třídu čistoty ovzduší. Pro výrobu určitých léčiv (alergizující látky, biologické látky, antibiotika, hormony, cytotoxické látky atd.) by měla být vytvořena jednoúčelová provozně uzavřená pracoviště, aby neprobíhala výroba společně na stejných zařízeních, výjimečně lze připustit výrobu v kampaních (po sobě jdoucích šaržích), čemuž však musí předcházet řádná validace čištění. Výroba technických toxických látek (pesticidy, herbicidy atd.) není povolena v prostorách pro výrobu léčiv.

6.4.5.3 Skladovací prostory

Skladovací prostory musí mít dostatečně velkou kapacitu a musí splňovat všechny předepsané podmínky pro skladování surovin a hotových produktů (teplota, vlhkost, ochrana před povětrnostními vlivy).

Je nezbytné jednoznačně oddělit prostory pro materiály v karanténě, propuštěné, zamítnuté, vrácené nebo reklamované. Silně účinné látky, jedy a omamné látky je nutné skladovat na speciálně vyhrazených a hlídaných a uzamčených místech. Prostory pro vzorkování a navažování materiálů musí být taktéž oddělené. Všechny skladovací prostory musí být rovněž adekvátně zajištěny proti vstupu a pohybu neoprávněných osob, dle stanoveného stupně zabezpečení.

6.4.5.4 Pomocné prostory

Pomocné prostory jsou rovněž velmi důležitou součástí prostor souvisejících s výrobou léčiv. Do výčtu těchto prostorů patří oddělené místnosti pro odpočinek a občerstvení, šatny, umývárny a toalety (zde nesmí být vstup přímo z výrobních a skladových prostor), které musí odpovídat normě dle počtu pracovníků. Náhradní díly a nářadí musí být v oddělených místnostech nebo uzavíratelných skříňkách. Dílny musí být oddělené od výrobních prostor.



Obrázek 48: *Příklad pomocného technického zázemí (TEVA, 2018)*

6.4.5.5 Čistota a hygienický režim

Hygienický režim musí odpovídat předepsaným postupům ve **standartním pracovním postupu** (SOP). Osvětlení, teplota, vlhkost a výměna vzduchu musí vyhovovat předepsaným požadavkům pro jednotlivé procesy nebo manipulaci. Opravy a údržba budov nesmí jakkoli ohrozit jakost produktů.

Vnitřní stěny a povrchy by neměly uvolňovat ani zachycovat částice s možností vystavení materiálů vnějšímu prostředí. Musí být hladké, nepopraskané a bez otevřených spár. Okna a dveře musí splňovat vyhovující těsnost. Měla by být

zajištěna snadná čistitelnost, dezinfikovatelnost a prostřednictvím ní tak zamezeno zachycení nečistot a průniku částic z nežádoucích prostor.

Potrubí, osvětlení, vzduchotechnika a ostatní prostory mají být realizovány bez obtížně čistitelných míst a výklenků. Větrání, teplota, vlhkost, případně filtrace vzduchu musí **odpovídat povaze zpracovávaného produktu**, požadované účinnosti a vnějšímu prostředí. Důležitým kritériem při navrhování a realizaci je zabránění **křížové kontaminaci** ve všech krocích výroby a balení produktu. Svůj význam má rovněž vhodné umístění prostor pro provádění **IPC** (in process control).

6.4.5.5.1 Zařízení

O zachování čistoty prostředí se stará systém vzduchotechnických jednotek složený z **ventilátorů, filtrů a výměníků**. Tento systém upravuje v klimatizační jednotce čistý vzduch a následně jej dopravuje na potřebné místo pomocí potrubních rozvodů.

Kaskáda filtrů čistí přiváděný i odváděný vzduch (eliminuje nežádoucí částice ve vzduchu). Skládá se z **HEPA filtrů** (High-Efficiency Particulate Air) o účinnosti 99.97% zachycení částic velikosti ≥ 0.3 . V případě vyšších hygienických a bezpečnostních standardů na ně navazuje **ULPA filtr** (Ultra Low Penetration Air filters) o účinnosti 99.999% zachycení částic velikosti 0.12 μm .

Čerstvý vzduch udržuje snížený/zvýšený tlak (proti okolí) v čistém prostoru a nahrazuje „použitý“ vzduch. Laminární proudění (laminar flow) slouží k ochraně kritických míst, kde se manipuluje s materiálem. Zároveň systém **HVAC** (Heating, Ventilation and Air Conditioning) udržuje teplotu a vlhkost vzduchu v čistém prostoru v požadovaných mezích (viz. monitoring).

6.4.5.5.2 Čistý prostor

Čistý prostor je prostor, v němž je **řízena koncentrace částic ve vznosu** a který je konstruován a využíván takovým způsobem, aby to minimalizovalo zanesení, generování a zadržování částic uvnitř prostoru/zóny a v němž jsou řízeny ostatní relevantní parametry, např. teplota, vlhkost a tlak. (VYR 36)

Přítomnost nežádoucích částic a mikrobů se významně liší za klidového režimu a za provozu. V klidovém režimu jsou ochranné i měřicí mechanismy funkční, avšak v prostorech není přítomen materiál ani personál. Naproti tomu, za provozu je ve výrobě přítomen personál i materiál, takže počet částic ve vznosu a mikrobiální zatížení je významně vyšší.

Čisté prostory pro výrobu léčivých přípravků jsou klasifikovány podle požadovaných charakteristik prostředí. Každá výrobní činnost vyžaduje přiměřenou úroveň čistoty prostředí za provozu, aby bylo minimalizováno riziko mikrobiální nebo částicové kontaminace produktu a zpracovávaných materiálů. Musí být dosaženo požadovaných podmínek ve stavu "**za provozu**", stejně tak jako "**za klidu**".

Stav "**za klidu**" je stav, ve kterém jsou zcela nainstalována výrobní zařízení a tato zařízení jsou v provozu bez přítomnosti zpracovávaného produktu a obalového materiálu a nejsou zde přítomni žádní pracovníci.

Stav "**za provozu**" je stav, kdy výrobní zařízení jsou v běžném provozu s předepsaným počtem pracovníků. Stav „za provozu“ a „za klidu“ by měl být definován pro každou místnost nebo výrobní místo. Pro výrobu léčivých přípravků jsou rozlišovány **4 třídy čistoty A, B, C a D** od nejpřísnější, po tu s nejméně přísnými limity.

Třída A: Zahrnuje pracovní prostory pro vysoce rizikové činnosti, např. plnicí místo, zásobník pro zátky, otevřené ampule a lahvičky, provádění aseptického propojení. Podmínky třídy A jsou běžně zajišťovány vzduchotechnickými systémy s laminárním prouděním vzduchu. Tyto systémy mají zajišťovat homogenní rychlost proudění vzduchu v rozsahu **0,36 – 0,54 m/s** (v pracovním místě v případě otevřeného pracovního prostředí. Zachování laminarity proudění musí být prokázáno a validováno. Stejnoseměrné proudění a nižší rychlosti proudění jsou přípustné v uzavřených izolátorech nebo rukávcových boxech.

Třída B: Pro aseptickou přípravu a plnění. Prostory přímo obklopující třídu A.

Třída C a D: Čisté prostory pro provádění méně kritických činností ve výrobě léčivých přípravků. Klasifikace čistých prostor a zařízení (SÚKL, 2009)

Tabulka 5: Třídy čistoty dle VYR 36 (SÚKL, 2009)

Třída čistoty	Maximální přípustný počet částic/m ³ o velikosti rovné nebo větší			
	Za klidu		Za provozu	
	0,5 μm	5,0 μm	0,5 μm	5,0 μm
A	3520	20	3 520	20
B	3520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	nedefinováno	nedefinováno

6.4.5.5.3 Kontaminace

Kontaminací materiálu se rozumí biologické, chemické nebo fyzikální znečištění výchozí látky, obalového materiálu meziproduktu, nerozplněného produktu nebo konečného produktu.

Křížovou kontaminací je chápáno znečištění výchozí látky nebo produktu jinou výchozí (API) látkou, obalovým materiálem nebo produktem ať už ze současné výroby na odlišné lince či nedokonalou sanitací po předchozí výrobě na lince stávající.

Limitní hodnota – maximální nebo minimální hodnota určená dle kvalifikovaného požadavku / standardu případně validačního protokolu

Mimolimitní stav – překročení limitních hodnot (limity: varovný- **alert**, akční - **alarm**)

6.4.5.5.4 Monitoring

Je způsob, jak objektivně **posuzovat funkčnost procesů** zajišťujících předepsanou čistotu a nezbytnou ochranu produktu před nežádoucími vlivy. Zároveň je nástrojem k doplnění či nahrazení rekvalifikace nebo revalidace určitého systému. Nezbytnou podmínkou správného nastavení monitoringu je detailní poznání správné funkce zařízení či systému. Na tomto základě se určí klíčové parametry a jejich limitní hodnoty, které musí být monitoringem **sledovány, zaznamenávány** a následně **vyhodnocovány**.

Monitoring může být probíhat **kontinuálně** s on-line záznamem v čase tzv. **e-monitoring**. Toho se využívá například u nepřetržitě sledovaných parametrů, jakými jsou například vlhkost, či teplota vzduchu...

U plánovaných měření dle **SOP** (týdně, měsíčně, čtvrtletně...) probíhá **diskontinuálně**. Tj. záznam sledovaného parametru je vypracováván v podobě **protokolu o provedeném monitoringu** a následně vyhodnocen. Sledované parametry musí mít vypovídací hodnotu dle požadavků regulačních orgánů a specifických podmínek jednotky (výrobní, skladovací apod.)

6.4.5.5.4.1 Teplota

Teplotní standarty se liší na základě ročního období a konkrétních prostor. Pro zimní provoz je teplotní rozmezí **20 +/- 2 °C**, zatímco pro letní provoz **22 +/- 2°C**. Standard pro skladování surovin a výrobků je **15 °C až 25 °C**. U speciálních druhů, které vyžadují specifické podmínky je standart např. 2 °C až 8 °C nebo úplně odlišná.

6.4.5.5.4.2 Vlhkost vzduchu

Vlhkost vzduchu je velmi důležitý parametr, který se může napříč celým výrobním procesem velmi negativně promítnout na produkt. Relativní vlhkost vzduchu je zpravidla udržována na hodnotě **45 +/- 10 %**. Maximální vlhkost by neměla překročit **65 %**.

6.4.5.5.4.3 Částicový monitoring

Třídy čistoty a klasifikace čistých prostor jsou definovány dle VYR 36. Čisté prostory a zařízení by měly být klasifikovány v souladu s EN ISO 14644-1. Klasifikace by měla být jasně oddělena od provozního monitorování čistých prostor. Maximálně přípustný počet částic pro každou třídu čistoty je dán v následující tabulce:

Tabulka 6: Standard počtu částic v prostoru dle VYR 36 (SÚKL, 2009)

Třída	Maximální přípustný počet částic /m ³ rovný nebo větší			
	Za klidu		Za provozu	
	0,5 μm	5 μm	0,5 μm	5 μm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	nedefinován	nedefinován

6.4.5.5.4.4 Tlak a tlakový spád

Priváděný filtrovaný vzduch musí vytvářet přetlak směrem od vyšší třídy čistoty k nižší (směr od produktu). Cílem je zajistit, aby mezi prostory byl takový směr proudění vzduchu, který **zabrání**, jak vnější, tak křížové **kontaminaci** produktu.

Doporučená hodnota tlakového rozdílu mezi prostory sterilní výroby s odlišnou třídou čistoty o jeden stupeň je **10 až 15 Pa**. V rámci jedné třídy čistoty se tlakový spád resp. směr proudění řídí technologií a je kvantifikován projektově a ověřen validačními zkouškami. Zpravidla se volí **tlakový spád 5 Pa**.

Přetlak je sledován pomocí měřičů tlakového rozdílu, na kterých jsou vyznačeny provozní pole nebo systémem elektronickým. Na základě výsledků těchto měření jsou provozní stavy tlakového rozdílu mezi místnostmi při zavřených dveřích označeny třemi barevnými poli viz tabulka:

Tabulka 7: Systém signálního značení tlakového spádu

zelená	normální stav
přechod zelená – žlutá	varovný limit (alert)
žlutá	poruchový stav (tlakování)
červená	havarijní stav
přechod žlutá - červená	akční limit (alarm)

6.4.5.5.4.5 Mikrobiologický monitoring

Mikrobiologický monitoring probíhá obdobně jako monitoring počtu částic. Provádí se diskontinuálně v závislosti na třídě čistoty v **denních, týdenních, měsíčních či čtvrtletních intervalech.**

Mikrobiologická čistota je zkoumána ve vzduchu ve výrobních prostorech a prostorech přilehlých (spad do živné kultury v Petriho misce). Zároveň se provádějí stěry z povrchů, výrobního zařízení, výrobních prostorů či prostorů na ně navazujících. Důležité jsou taktéž odběry z rukavic samotných pracovníků ve výrobě.

Tabulka 8: *Limity mikrobiologické kontaminace dle VYR 36 (SÚKL, 2009)*

Třída	Doporučené limity pro mikrobiologickou kontaminaci			
	Vzorkování vzduchu CFU / m ³	Petriho miska (průměr 90 mm) CFU / 4 hod.	Kontaktní desky (průměr 55 mm) CFU / deska	Otisk rukavice 5 prstů CFU / rukavici
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

6.4.5.5.5 Nápravná opatření

Pokud z jakéhokoli důvodu dojde k přítomnosti nálezu, musí být vedena dokumentace formou detailního zápisu. Její součástí musí být uvedena i následná přijatá opatření (změny, které by měly do budoucna těmto situacím zabránit). Za vystavení, vyplnění dokumentu a za splnění opatření odpovídá zpravidla určený uživatel, správce zařízení.

Je výhodné ve standardech stanovit operační tým pro monitoring, který se schází k řešení takovýchto problémů. Tento tým posoudí míru ohrožení produktu a navrhne nápravná opatření, která se případně následně promítnou do příslušné dokumentace.

Mimořádné a nestandardní události musí být zaznamenány přímo do **operačního listu**. V případě závažného ohrožení zpracovávaného produktu (např. nadlimitní mikrobiální kontaminací, teplotou u termolabilních produktů)

je třeba věnovat zvýšenou pozornost při propouštění produktu do užití. Případně produkt v krajních případech nepropustit. Na konci celého procesu zkontroluje stanovený tým efekt nápravných opatření.

6.5 Kontrola kvality

Z technologického hlediska má velký význam hodnocení celého procesu výroby léčivého přípravku a navazujících procesů. Nestačí pouze průběžná výrobní kontrola (IPC – in process control), mezioperační kontrola (kontrola „bulk“ produktu) či kontrola finálního produktu, protože kvalita produktu může být ovlivněna i zdánlivě nevýznamnými vlivy, které jsou mnohdy **obtížně identifikovatelné**.

Kvalita produktu se může významně lišit v době před vlastním výrobním procesem, v jeho průběhu, při balení nebo i po dlouhodobějším skladování. Pro následné skladování využíváme **zrychlené i dlouhodobé stabilitní testy**.

Jednotlivé fáze kontroly a jistění jakosti proto nelze oddělovat. Není možné stanovit, které jsou důležitější, a které méně důležité. Je nutné pohlížet na hodnocení z pohledu přípravy výrobku předepsané kvality, který splňuje všechny náročné požadavky jak z hlediska fyzikálních a chemických parametrů, tak i z hlediska bezpečnosti, jistění jakosti a biologické dostupnosti léčivé látky v terapeutické praxi.

Z pohledu výrobce má proto velký význam poznání a zmapování celého procesu, včetně toku materiálů, úrovně obsluhy, monitoringu, preventivní údržby a kontroly záznamové dokumentace, ve spojení s výsledky fyzikálně – chemických kontrol, které jsou již jen výsledkem úrovně zvládnutí celého výrobního procesu nebo potvrzením odchylek a změn v průběhu výrobního procesu.

Konkrétní hodnocení fyzikálních a chemických parametrů meziprojektu nebo finálního výrobku musí odpovídat předepsané specifikaci nebo lékopisným parametrům, což u kapalných lékových forem jsou:

- **čirost a stupeň opalescence (porovnání se standardy)**
- **stupeň zbarvení (porovnání se standardy)**
- stanovení pH
- stanovení hustoty a viskozity
- index lomu a optická otáčivost
- **obsah léčivých a pomocných látek**
- hodnocení velikosti částic (suspense, emulze)
- **hodnocení kontaminace částicemi pod hranicí viditelnosti**
- **hodnocení kontaminace viditelnými částicemi**
- zkouška na sterilitu
- **zkouška mikrobiálního znečištění nesterilních výrobků**
- a další, které jsou uvedeny ve výše citovaných dokumentech

Poznámka – tučně vyznačené parametry jsou podstatné pro následně řešený konkrétní případ inkompatibility u Algifenu

6.6 Rekrystalizace metamizolu

6.6.1 Příklad

V září roku 2016 došlo ve výrobním závodě v průběhu běžné výroby Algifenu Neo k pozitivnímu nálezu **opalescence** (okem viditelného zákalu) překračující mnohonásobně povolené limity.

Tento problém byl detekován IPC při procesu **filtrace rukávcovým filtrem** viz. 6.3.6 a vedl ke znehodnocení celé 2000 l šarže, která tak nemohla být propuštěna do dalšího kroku výroby. Následně byla po odebrání a prověření vzorků prohlášena za **nevyhovující** a celá **zlikvidována**. V ten okamžik zatím nikdo netušil, čím mohla být tato vzniklá situace způsobená, což nastartovalo rozsáhlé podrobné šetření.

6.6.2 Kontrolní várka

Vzhledem k okolnostem a výrobnímu procesu, který je z velké části automatizovaný (počítačově řízený) se technologové a samotné vedení rozhodli linku a budoucí výrobu tohoto přípravku dočasně zastavit. Nejprve se rozhodli celý proces, avšak již v menší testovací 50 l šarži (pro ušetření nákladů) se shodným postupem zopakovat.

Cílem bylo ověřit, zda problém nemohl vzniknout spontánně a zda se opalescence objeví znovu. Pro kontrolní várku byly použity stejné šarže materiálu a zachován i stejný výrobní postup.

Po přivedení bulku do stádia filtrace se však situace opakovala a okem viditelná opalescence se opět projevila. Pokud se ale várka zahřála, opalescence zmizela. Při následném ochlazení pod kritickou teplotu se však opět projevila.

Tento fakt nastartoval rozsáhlé šetření faktorů, které by mohly být zodpovědné za celý tento problém. Cílem bylo zodpovědět otázky, proč doposud bezproblémový výrobní postup najednou selhal, jaká látka je zodpovědná za vzniklou opalescenci či jak a proč se najednou změnila rozpustnost API v ten okamžik nikdo neznal.

6.6.3 Šetření

Vedení společnosti Teva Czech Industries neumožnilo pro potřeby této diplomové práce uvést přesné výsledky šetření ani detailních analýz, které by vzhledem k charakteru zveřejňování diplomových prací mohli společnost následně poškodit. Proto je následný postup šetření a jeho hodnocení popsán ve zjednodušené, společností schválené a akceptované formě. Stejně tak neumožnili zveřejnění fyzikálně-chemického srovnání API a vzniklého polymorfu.

Na základě zaznamenané technologické inkompatibility se tým technologů zodpovědný za monitoring postupně pustil do hledání možné příčiny. Nejprve bylo zapotřebí společně s QA ověřit, zda výrobní proces proběhl skutečně tak, jak měl dle operativních postupů a norem.

Kontrolovali i zda nedošlo k porušení jakéhokoli bodu ze zásad SVP. Mimořádný důraz kladli na ověření sanitace a vlivů, které by mohli ovlivnit rozpustnost, tj. teplotu a míchání.

Stejně tak byla kontrolována podrobná procesní dokumentace, zda nebyla do kotle například vsypána vyšší navážka či doplněno menší množství rozpouštědla.

6.6.4 Výsledek šetření

Během rozsáhlého šetření bylo zjištěno, že výrobní proces, který je unifikovaný a samozřejmě validovaný, toho inkriminovaného dne **proběhl zcela v pořádku** ve smyslu dodržení opatření a správných výrobních i technologických postupů.

Ve výrobních prostorech nebyla zaznamenána kontaminace vlivem nedostatečné sanitace ani prostřednictvím pracujícího personálu. Zároveň nebylo nalezeno žádné pochybení ze strany operátorů ve smyslu nedodržení stanoveného operačního postupu.

Následná částicová analýza a mikrobiální monitoring vyhovovaly všem standardům a limitům, tj. nebyla ve výrobním prostoru prokázána přítomnost žádných nežádoucích částic, které by mohli sloužit například jako krystalizační očka a stát za celkovým problémem následně popsáným jako **rekrystalizace metamizolu**. Tlak, vlhkost vzduchu i teplota byla během celého procesu výroby taktéž v normě.

Postupně se šetření dostalo až k detailní analýze šarží vstupních surovin s velkým důrazem na analýzu samotného metamizolu. Detailní analýza skladu byla ukončena se závěrem, že ve výrobních šaržích nebyla zachycena přítomnost polymorfu. V tomto stádiu, kdy bylo ověřeno, že vstupní surovina je prostá polymorfu se vyšetřování přesunulo na úroveň, ve kterém kroku výroby mohlo k polymorfnímu přechodu dojít. Postupně byly prověřeny všechny rizikové výrobní kroky s možným rizikem vzniku polymorfního přechodu viz. 5.1.1.6.

Vzhledem k tomu, že samotná navážka polymorf neobsahovala, ale ve výrobním kotli už byla jeho přítomnost zaznamenána, připadlo logické podezření na proces **mikronizace**, neboli rozdrobnění pevné látky na stejně velké částice. Koloidní mlýn totiž při výrobě Algifenu na varný kotel přímo nasedá.

Následným měřením bylo prokázáno, že právě vlivem **mikronizace** při vstupu navážky do výrobního kotle došlo vlivem zahřátí u metamizolu k nekontrolovanému přechodu na **nestabilní polymorf**.

U naleznutého polymorfu byla následně experimentálně naměřena za stejných výrobních podmínek významně **horší rozpustnost** než u běžné sodné soli metamizolu. Není tak náhodou, že při původním procesu přípravy a rozpouštění této API byla překročena nasycená koncentrace látky v roztoku, což po zchlazení vlivem filtrace vedlo k jeho následné rekrystalizaci.

Když byla známa samotná podstata této technologické inkompatibility, přesunulo se šetření na možný důvod, proč se po dlouhou dobu naprosto stabilně chovající látka toho inkriminovaného dne chovala odlišně. Stejně tak bylo zapotřebí vysvětlit, proč validovaný a několik let bez problému fungující proces najednou selhal.

6.6.5 Vyvozená opatření

Prošetření celé kauzy vedlo k celkové **revalidaci procesu** a následném zavedení **pomocného procenta K** (speciální upravená navážka), která reflektuje možný spontánní vliv přítomného množství polymorfu a jeho **horší rozpustnost**.

Zároveň došlo ke změně technologie na bázi **zefektivnění míchání** (zvýšení otáček), **zvýšení teploty** a následného doplnění rozpouštědla (vody) na patřičný objem, ve kterém je již metamizol rozpustný beze zbytku.

Během procesu mikronizace se zařízení intenzivně chladí, aby se zabránilo zahřívání produktu a jeho možnému polymorfnímu přechodu. Celý inovovaný proces byl nastaven tak, aby vyhovoval přísným výrobním standartům a bylo tak díky němu zabráněno možnému opakovanému vzniku nežádoucího polymorfu. Pokud by v budoucnu došlo k jeho opětovnému vzniku, vzniklá opatření by měla zabránit i jeho možné následné rekrystalizaci (měl by se rozpustit beze zbytku).

Následně byl inovovaný proces schválen Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Po nutné technologické odstavce byla výroba obnovena a pokračuje za nově nastolených podmínek až do současnosti.

6.6.6 Dopad pro výrobce

Vzhledem k faktu, že výroba přípravku musela být dočasně pozastavena na zhruba 4 měsíce (od 9/2016 do 12/2016), firma během odstávky utrpěla nemalé finanční ztráty.

Během přerušení distribuce tento na trhu unikátní přípravek nahradila konkurenční značka Stada, avšak s léčivem, které nebylo zcela ekvivalentní náhradou (obsahuje pouze metamizol, nikoli pitofenon) tj. nebylo vhodné pro všechny běžné indikace Algifenu. Případně bylo v průběhu výpadku možné jej nahradit přípravkem Algifen tablety, který má sice stejné složení, avšak jinou biologickou dostupnost a lékovou formu.

Po revalidaci inovovaného procesu byla výroba obnovena a **probíhá od 12/2016 až do současnosti bez vážnějších komplikací.**

7 Výsledky

Rozsáhlým šetření technologické inkompatibility byla prokázána výrobní odchylka s konečným názvem **rekrytalizace metamizolu** tj. účinné látky. Za touto technologickou komplikací stojí fyzikálně-chemický jev zvaný polymorfismus. U objeveného polymorfu, který vznikl zahřátím a následným polymorfním přechodem při procesu mikronizace metamizolu, byla dle výsledků měření prokázána významně horší rozpustnost než u prvotní formy.

Při mírném ochlazení homogenního roztoku, s do té doby dokonale rozpuštěným metamizolem, tak došlo k takzvanému „vypadnutí“ neboli rekrytalizaci účinné látky. Podrobnou studií bylo prokázáno, že tento polymorf nemá odlišné terapeutické vlastnosti od originálu.

Do budoucna bylo nutné s tímto jevem kalkulovat (v ideálním případě mu zabránit) a výrobní proces dle těchto podmínek nastavit a přizpůsobit.

Prošetření celé kauzy vedlo k celkové revalidaci procesu. Kromě zefektivnění systému chlazení při mikronizaci došlo i k zavedení pomocného procenta K (speciální upravená navážka). Změna technologie se promítla také do oblasti zefektivnění míchání (zvýšení otáček), zvýšení teploty, prodloužení času rozpouštění a následného doplnění na patřičný objem, ve kterém je již i potenciálně vzniklý polymorf rozpustný bezzbytku. Nový proces byl nastaven a validován tak, aby vyhovoval přísným výrobním standardům a následně byl po náročném testování úspěšně schválen Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Po nutné technologické odstávce byla výroba obnovena a pokračuje až do současnosti.

8 Závěr a diskuse

Hlavním cílem práce bylo popsat a vysvětlit problematiku rekrystalizace a polymorfismu účinných látek v léčivých přípravcích a následně ji demonstrovat na konkrétním farmaceutickém přípravku z reálné praxe.

Součástí práce je detailní popis léčivého přípravku a jeho výrobního procesu s důrazem na místa s možným rizikem polymorfního přechodu API. Je zde dbáno na zásady správné výrobní praxe a dodržování výrobní dokumentace.

Šetření nalezené technologické inkompatibility prokázalo přítomnost rekrystalizace metamizolu během ochlazení při procesu filtrace. Tento jev byl způsobený polymorfním přechodem metamizolu na hůře rozpustný polymorf vlivem předešlého zahřátí při mikronizaci částic.

Zjištěné poznatky vedly k celkové revalidaci výrobního procesu a následnému zavedení pomocného procenta K (speciální upravená navážka), která reflektuje možný spontánní vliv přítomného množství polymorfu a jeho horší rozpustnost. Zároveň došlo ke změně technologie na bázi zefektivnění chlazení při mikronizaci, míchání (zvýšení otáček), zvýšení teploty a následného doplnění rozpouštědla (vody) na patřičný objem, ve kterém je i hůře rozpustný polymorf rozpustný bezzbytku.

Eliminace tohoto jevu stála farmaceutickou firmu velké množství úsilí a financí spjatých s inovací technologie, změnou výrobního procesu a ušlým ziskem během přerušování výroby. I přes všechny komplikace se podařilo nalézt a zrealizovat reparativní opatření, díky kterým bylo možné těmto jevům zabránit, samotnou výrobu následně obnovit a vzniklý problém tak zdárně vyřešit.

Výsledek práce poukazuje na fakt, že problematika rekrystalizace a polymorfismu se velmi úzce týká i farmaceutické velkovýroby a je zapotřebí s těmito jevy kalkulovat a věnovat jim velkou pozornost.

9 Použitá literatura

- Allen, T. 2013.** *Particle size Measurement*. místo neznámé : Springer, 2013. 9781489930637.
- Attwood D., Florence A.T. 2008.** *Physical Pharmacy*. London : Pharmaceutical Press, 2008. 978 0 85369 725 1.
- Beckmann, Wolfgang. 2013.** *Crystallization: Basic Concepts and Industrial Applications*. místo neznámé : John Wiley & Sons, 2013. 978-3-527-65035-4.
- Bernstein, Joel. 2002.** *Polymorphism in molecular crystals*. 2002. 9780199236565.
- Borchardt, R.T. 2004.** *Pharmaceutical Profiling in Drug Discovery for Lead Selection*. místo neznámé : AAPS Press, 2004. 9780971176799.
- Brittain, Harry G. 2016.** *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*. místo neznámé : Informa healthcare, 2016. 0824702379.
- Cídllová, Hana. 2008.** Laboratorní technika: Rekrystalizace. *Masarykova univerzita Brno*. [Online] Masarykova univerzita Brno, 2008. [Citace: 30. 1 2019.] <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/rekrystalizace.html>.
- Davey, R. a Garside, J. 2000.** *Introduction to Crystallization*. Oxford : Oxford University Press, 2000. 0 19 850489 6.
- Dohnal, J. 2010.** *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2010. 978-80-7305-085-6.
- Drápala, Jaromír. 2006.** *Škola růstu krystalů*. Ostrava : Vysoká škola Báňská, 2006.
- EMA. 2018.** European Medicine Agency. *ICH guideline Q3C (R7) on impurities: guideline for residual solvents*. [Online] 10. 19 2018. [Citace: 5. 2 2019.] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-14.pdf.
- Giron, D. 2004.** *Thermodynamic and kinetic factors to be considered in chemical development*. Frankfurt : IPQC Conference, 2004.
- Hilfiker, Rolf. 2006.** *Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry*. místo neznámé : WILEY-WCH, 2006. 9783527607723.

- Humphreys, F.J. a Hatherly, M. 2004.** *Recrystallization and Related Annealing Phenomena*. Oxford : Pergamon, 2004. 978-0080441641.
- ISPE. 2019.** Good Manufacturing Practice (GMP) Resources . *International Society for Pharmaceutical Engineering*. [Online] 2019. [Citace: 25. 2 2019.] <https://ispe.org/initiatives/regulatory-resources/gmp>.
- Kaibyshev, R, Sokolov, B a Galiyev, A. 1999.** The Influence of Crystallographic Texture on Dynamic Recrystallization,. *Textures and Microstructures*, 1999, Sv. 32.
- Komárek, Petr a Rabišková, Miloslava. 2006.** *Technologie léků*. místo neznámé : Galén, 2006. 8072624237.
- Kratochvíl, B. 2007.** Crystallization of pharmaceutical substances. *Chemické Listy*. 2007.
- Kratochvíl, B., Hušák M., Jegorov, A. 2002.** Polymorphism and solvamorphism of solid substances in pharmacy. *Chemické listy*. 2002.
- Kratochvíl, Bohumil. 2016.** *Chemické listy - VÝZNAM STANOVENÍ RTG KRYSTALOVÝCH STRUKTUR PRO FARMACII*. Praha : VŠCHT, 2016. stránky 110, 40-47.
- . 2007. *Chemické listy 101*, 3-12. 2007.
- . 2006. *Krystalizace farmaceutických substancí*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006.
- Lewis, Alison a Seckler, Marcelo. 2015.** *Industrial Crystallization Fundamentals and Applications*. místo neznámé : Cambridge University Press, 2015. 9781107052154.
- Lin, Y.C a Zhong, Jue. 2008.** Study of static recrystallization kinetics in a low alloy steel. *Computational Materials Science*. 2008.
- M.U.P. Ranitidine. Medical Union Pharmaceuticals.** [Online] [Citace: 10. 4 2019.] <http://mupeg.com/en/products/ranitidine>.
- Mahato, R. I. 2012.** *Pharmaceutical Dossage Forms and Drug Delivery*. místo neznámé : CRC Press Taylor & Francis, 2012. 978 1 4398 4918 7.
- Mullin, J.W. 2001.** *Crystallization*. místo neznámé : Butterworth Heinemann, 2001. 0 7506 4833 3.

- NEOTEC, spol. s r.o.** Koloidní mlýn MK. *IKA procesní technologie*. [Online] [Citace: 5. 4 2019.] <http://www.neotec.cz/ikaprocess/colloid-mill-mk/>.
- Newman, Ann.** 2011. *An Overview of Solid Form Screening During Drug Development*. Lafayette : Seventh Street Development Group, 2011.
- Novák, David.** 2007. *Studium polymorfie a optimalizace krystalizace*. Brno : autor neznámý, 2007.
- Pathway, Pharma.** 2016. Working and Principle of colloidal Mill. *Pharma Pathway*. [Online] 2016. [Citace: 20. Březen 2019.] <http://pharmapathway.com/working-and-principle-of-colloidal-mill/>.
- Pilulka Distribuce s.r.o.** Algifen Neo por.gtt.sol. 1x50ml/25000/250mg. *Pilulka.cz*. [Online] Pilulka Distribuce s.r.o. [Citace: 14. leden 2019.] <https://www.pilulka.cz/algifen-neo-por-gtt-sol-1x50ml-25000-250mg>.
- Skotnicová, K. a Kurša, M.** 2013. *Prášková metalurgie*. Ostrava : VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2013. str. 153. 978-80-248-3378-1.
- Stahl, H. P a Wermuth, G. C.** 2002. *Handbook of Pharmaceutical Salts Properties*. 2002. 3-906390-26-8.
- Stanley-Wood, N a Lines, R. W.** 2007. *Particle size analysis*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2007. 0-85186-487-2.
- Státní ústav pro kontrolu léčiv SÚKL.** sukl.cz. *SÚKL Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 29. listopad 2018.] <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0050335&tab=texts>.
- SÚKL.** 2009. Státní ústav pro kontrolu léčiv. *SÚKL*. [Online] 2009. [Citace: 25. 4 2019.] <http://www.sukl.cz/leciva/vyr-36>.
- Syvitski, James P. M.** 2010. *Principles, Methods and Application of Particle Size Analysis*. místo neznámé : Cambridge University Press, 2010. 9780511626142.
- Šimek, Michal a Grünwaldová, Veronika.** 2014. *Současné metody měření velikosti částic farmaceutických látek*. Praha : VŠCHT Praha, 2014. stránky 50–55, Chemické listy.
- TEVA.** 2018. *Výroba kapalných lékových forem*. [Dokumentace] Opava : TEVA Czech Industries s.r.o., 2018.

Trevianus, Ian. Introduction to Particle Size Analysis. *slideshare.net*. [Online]
[Citace: 26. 12 2018.] <https://www.slideshare.net/HORIBA/essentials-of-particle-size-analysis>.