

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití diferenční skenovací kalorimetrie při studiu termického chování
Griseofulvinu

Bakalářská práce

2022

Kateřina Kozlová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Kozlová**
Osobní číslo: **C19026**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Využití diferenční skenovací kalorimetrie při studiu termického chování farmaceutických substancí**
Téma práce anglicky: **Utilization of differential scanning calorimetry in study of thermal behavior**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte teoretickou rešerši na téma diferenční skenovací kalorimetrie a její využití ve farmacii.
2. Studujte termické chování vybrané farmaceutické substance metodou diferenční skenovací kalorimetrie.
3. Proveďte analýzu experimentálních DSC krystalizačních dat pomocí softwarového vybavení.
4. Využijte metod strukturní analýzy k provedení strukturní charakterizace vybraného léčiva.
5. Diskutujte výsledky krystalizační a strukturní analýzy.
6. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce.

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

Seznam doporučené literatury:
Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Daniela Košťálová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Roman Svoboda, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

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

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

V Pardubicích dne 30. června 2022

Kateřina Kozlová v.r.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Daniele Košťálové, Ph.D. za odborný dohled, ochotu a cenné rady při zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala panu Ing. Romanu Svobodovi, Ph.D. za cenné rady a obětovaný čas.

V neposlední řadě bych chtěla také hlavně poděkovat své rodině za podporu při studiu.

ANOTACE

Předložená bakalářská práce je zaměřena na studium základní kinetiky krystalizace a strukturní relaxace Griseofulvinu. Griseofulvin je farmaceutická účinná látka používaná jako antimykotikum, které se využívá na léčbu plísňové infekce. Krystalizace a strukturní relaxace Griseofulvinu byla studována pomocí techniky termické analýzy, a to její nejrozšířenější – diferenční skenovací kalorimetrií (DSC). Podstatou kinetické analýzy bylo určit hodnoty aktivačních energií krystalizace E_A a hodnoty aktivačních energií strukturní relaxace Δh^* .

KLÍČOVÁ SLOVA

diferenční skenovací kalorimetrie, krystalizace, strukturní relaxace, kinetika, Griseofulvin

TITLE

Use of differential scanning calorimetry in the study of thermal behavior of Griseofulvin

ANNOTATION

The presented bachelor thesis is focused on the study of the basic kinetics of crystallization and structural relaxation of Griseofulvin. Griseofulvin is a pharmaceutical active substance used as an antifungal drug that is used to treat fungal infections. Crystallization and structural relaxation of Griseofulvin was studied by using the technique of thermal analysis, its the most common – differential scanning calorimetry (DSC). The essence of the kinetic analysis was to determine the activation energy of crystallization E_A and activation energy of structural relaxation Δh^* .

KEYWORDS

differential scanning calorimetry, crystallization, structural relaxation, kinetics, Griseofulvin

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK.....	13
ÚVOD.....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1. GRISEOFULVIN.....	15
1.1.1. POPIS SUBSTANCE	15
1.1.2. POUŽITÍ.....	16
1.1.3. TOXIKOLOGIE	18
1.1.4. MECHANISMUS ÚČINKU	18
1.1.5. LÉKOVÁ FORMA A DÁVKOVÁNÍ GRISEOFULVINU	20
1.1.6. POLYMORFISMUS	21
1.1.6.1. POLYMORFISMUS GRISEOFULVINU	21
1.1.6.2. RENTGENOVÁ DIFRAKČNÍ ANALÝZA	22
1.1.7. KLASIFIKACE AKTIVNÍ FARMACEUTICKÉ SUBSTANCE	22
1.2. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE	25
1.2.1. TERMICKÁ ANALÝZA	25
1.2.2. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE	26
1.2.3. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE S TEPELNÝM TOKEM A KOMPENZAČNÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE.....	26
1.3. KINETICKÁ ANALÝZA KRYSTALIZAČNÍCH DAT Z DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE	30
1.3.1. VÝPOČET AKTIVAČNÍ ENERGIE.....	30
1.3.2. URČENÍ KINETICKÉHO MODELU	31
1.3.2.1. JOHNSON-MEHL-AVRAMI MODEL	33
1.3.2.2. AUTOKATALYTICKÝ (ŠESTÁK-BERGGREN) MODEL	34
1.3.3. STANOVENÍ PŘEDEXPONENCIÁLNÍHO FAKTORU	34
1.4. AMORFNÍ LÁTKY	35
1.4.1. STRUKTURNÍ RELAXACE.....	35

1.4.1.1. KINETICKÁ ANALÝZA STRUKTURNÍCH RELAXAČNÍCH DAT DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE.....	36
1.4.1.1.1. TOOL-NARAYANASWAMY-MOYNIHAN MODEL.....	37
1.4.1.1.1.1. METODY PRO VYHODNOCENÍ AKTIVAČNÍ ENERGIE	38
1.4.1.1.1.1.1. VYHODNOCENÍ Δh^* z CR cyklů	38
1.4.1.1.1.1.2. VYHODNOCENÍ Δh^* z CHR cyklů	38
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
2.1. PŘÍPRAVA VZORKU.....	39
2.2. POSTUP MĚŘENÍ.....	41
2.2.1. KRYSTALIZACE	43
2.2.2. STRUKTURNÍ RELAXACE.....	45
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	46
3.1. KRYSTALIZACE.....	47
3.1.1. ZÁKLADNÍ KINETICKÁ ANALÝZA KRYSTALIZACE	53
3.2. RENTGENOVÁ DIFRAKČNÍ ANALÝZA.....	55
3.3. SKELNÁ TRANSFORMACE.....	57
3.3.1. ZÁKLADNÍ KINETICKÁ ANALÝZA STRUKTURNÍ RELAXACE	57
4. ZÁVĚR.....	59
5. POUŽITÁ LITERATURA	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	předexponenciální faktor
AC(M,N)	autokatalytický Šesták – Berggren model
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování
API	účinná farmaceutická složka (Active Pharmaceutical Ingredient)
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
CHR	cyklu konstantní rychlosti ohřevu
CR	cyklu konstantního poměru
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
DTA	diferenční termická analýza
E_A	aktivační energie
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
$f(\alpha)$	kinetický model
GIT	gastrointestinální trakt
GSF	Griseofulvin
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IČ	infračervená oblast elektromagnetického záření
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
JMA(m)	Johnson – Mehl – Avrami (model nukleačně-růstový)
KAHR	Kovacs-Aklonis-Hutchinson-Ramos
KAS	Kissinger – Akahira – Sunose
KWW	Kohlrauschovou–Williamsovou–Wattsovou
m	kinetický parametr JMA modelu
M, N	kinetické parametry AC modelu

MCF-7	lidské buňky rakoviny prsu
q^+	rychlost ohřevu
q^-	rychlost chlazení
R	univerzální plynová konstanta
RDA	rentgenová difrakční analýza
RTG	rentgenové záření
SEDDS	self-emulsifying drug delivery systems
t	čas
T	teplota
TA	termická analýza
TG	termogravimetrie
TMA	termomechanická analýza
TNM	Tool-Narayanaswamy-Moynihan
TOA	termooptometrie
T_c	extrapolovaná koncová teplota DCS píku
T_e, T_{on}	extrapolovaná počáteční teplota (teplota onsetu) DSC píku
T_f	fiktivní teplota
T_g	teplota skelné transformace
T_p	teplota v maximu DSC píku
T_t	teplota tání
T_0, T_n	počáteční a konečná teplota DSC píku
T_α	teplota pro stupeň přeměny α
x	parametr nelinearity
x_p	redukováná aktivační energie v maximu DSC píku ($x_p = E_A/RT_p$)

$y(\alpha)$	charakteristická funkce definovaná vztahem (5a) a (6a)
$z(\alpha)$	charakteristická funkce definovaná vztahem (5b) a (6b)
α	stupeň přeměny
$\alpha_{\max, y}$	hodnota stupně přeměny alfa v maximu funkce y
$\alpha_{\max, z}$	hodnota stupně přeměny alfa v maximu funkce z
β	parametr neexponenciality
ΔH	entalpická změna
Δh^*	aktivační energie strukturní relaxace
τ	relaxační čas
Φ	tepelný tok
Φt	relaxační funkce
$\Phi \alpha$	tepelný tok pro stupeň přeměny α

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura Griseofulvinu.....	15
Obrázek 2: Schéma DSC s kompenzací příkonu ^[7]	27
Obrázek 3: Schéma DSC s tepelným tokem (S = vzorek, R = reference) ^[47]	27
Obrázek 4: Schématické znázornění DSC křivky zobrazující skelný přechod T_g , teplotu krystalizace T_c , entalpii krystalizace ΔH_c , počáteční teplotu tání T_o , extrapolovanou počáteční teplotu (teplotu onsetu) T_e , entalpii tání ΔH_1 , teplota tání píku T_m a degradaci D. ^[41]	28
Obrázek 5: Detail píku s jeho charakteristickými teplotami a liniemi ^[48]	28
Obrázek 6: Algoritmus pro stanovení vhodného kinetického modelu založeného na hodnotách maxim funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$. ^[3]	32
Obrázek 7: Graf znázorňující změnu entalpie a objemu tvorby skla, strukturní relaxaci a krystalizaci. ^[62]	36
Obrázek 8: Amorfni Griseofulvin v achátové misce před nadrcením	39
Obrázek 9: Analytická váha k navažování vzorku amorfniho Griseofulvinu a speciální lis k hermetickému uzavření kelímků se vzorky	40
Obrázek 10: Diferenční skenovací kalorimetr (DSC).....	41
Obrázek 11: DSC křivka pro vzorek Griseofulvinu, A – frakce 0 – 180 μm , rychlost ohřevu 30 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, B – frakce 0 – 180 μm , rychlost ohřevu 1 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, C – frakce 180 – 500 μm , rychlost ohřevu 30 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, D – frakce 180 – 500 μm , rychlost ohřevu 1 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	43
Obrázek 12: CR cykly Griseofulvinu (frakce: 0 – 180 μm)	45
Obrázek 13: DSC křivka Griseofulvinu frakce 180 – 500 μm pro všechny studované rychlosti ohřevu s detailem krystalizačních píků.....	47
Obrázek 14: Závislost ΔH tání a ΔH krystalizace Griseofulvinu v závislosti na přirozeném logaritmu rychlosti ohřevu.....	49
Obrázek 15: DSC křivka pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu při rychlosti 1 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	50
Obrázek 16: DSC křivka pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu při rychlosti 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	51
Obrázek 17: DSC křivka pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu při rychlosti 30 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	53
Obrázek 18: Kissingerova metoda – určení E_A krystalizačního procesu ze směrnice závislosti pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu	54

Obrázek 19: Vlevo je náš výsledek z RDA pro vzorek zkoumaného krystalického Griseofulvinu a vpravo difrakční obrazce pro tři polymorfní formy Griseofulvinu – shora dolů: krystalická forma I, krystalická forma II a krystalická forma III. [69]	55
Obrázek 20: Závislost teploty skelné transformace Griseofulvinu na rychlostech ohřevu pro obě velikostní frakce	57
Obrázek 21: Stanovení Δh^* pomocí CR cyklů ze směrnice závislosti pro obě studované frakce Griseofulvinu	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Chemické a fyzikální vlastnosti Griseofulvinu	15
Tabulka 2: Druhy jednotlivých dermatofytóz, jejich místa výskytu a jejich léčba	17
Tabulka 3: Přehled jednotlivých dávek Griseofulvinu	20
Tabulka 4: Rozpustnost léčiv dle Českého lékopisu 2009 a jeho doplňků	23
Tabulka 5: Klasifikace dle BCS	23
Tabulka 6: Klasifikační systém lipofilních formulací	24
Tabulka 7: Přehled metod termické analýzy	25
Tabulka 8: Teploty tání T_m a entalpie ΔH polymorfů Griseofulvinu [2]	48
Tabulka 9: Hodnoty aktivační energie krystalizace pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu	54
Tabulka 10: Odečtené hodnoty z DSC křivky obou velikostních frakcí Griseofulvinu pro teplotu tání T_m a entalpii ΔH	56
Tabulka 11: Hodnoty aktivační energie strukturní relaxace pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu	58

ÚVOD

V dnešní době se do popředí výzkumu dostávají léčiva v amorfni formě. Právě díky těmto léčivům lze dosáhnout vyšší rozpustnosti léčiva a tím pádem i biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv ve srovnání s krystalickými protějšky. Příkladem léčiva s velmi malou rozpustností ve vodě, kterým se v naší práci budeme zabývat, je Griseofulvin. Griseofulvin je farmaceutická účinná látka používaná jako antimykotikum a jeho velmi nízká rozpustnost ve vodě má za následek velmi nízkou biologickou dostupnost. Nízká biologická dostupnost může způsobit ekonomický problém, protože při výrobě léčiva je potřeba použít větší množství léčivé látky. Hlavním problémem léčiv s nízkou biologickou dostupností je především, že mohou způsobit vážné vedlejší účinky, pokud se abnormálně velké množství absorbuje v důsledku specifických účinků pacienta.

Bohužel ani amorfni léčiva v tomto ohledu nejsou dokonalá, v průběhu času (výroby nebo skladování) mají tendenci krystalizovat. V důsledku jejich vyšší molekulární mobility je jejich povrchová krystalizace daleko rychlejší než objemová, což může způsobit jejich špatnou stabilitu a pomalé rozpouštění léčivých přípravků.

Pochopení molekulární mobility amorfniích léčiv k určení jejich dlouhodobé fyzické stability je tedy pro farmaceutický průmysl zásadní. Znalost termických vlastností, kinetiky krystalizace a strukturní relaxace amorfniích léčiv je nutná pro jejich charakterizaci a použití. Dále umožňuje předpovídat chování amorfniího léčiva při libovolných podmínkách a určit jeho stabilitu.

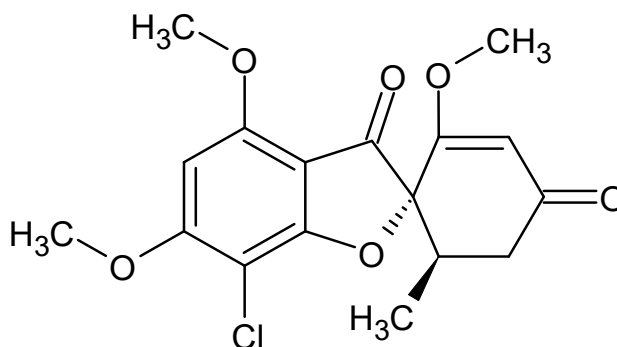
Krystalizace, strukturní relaxace a termické vlastnosti Griseofulvinu byly studovány pomocí metody termické analýzy, která má ve farmaceutické technologii široké využití. Jedná se o skupinu metod, které se zabývají sledováním některých fyzikálních a chemických vlastností zkoumaných látek vystavených určitému teplotnímu programu. V mé práci byla využita nejrozšířenější metoda termické analýzy, a to diferenční skenovací kalorimetrie (DSC).

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. GRISEOFULVIN

1.1.1. POPIS SUBSTANCE

Griseofulvin (Obr. 1), $C_{17}H_{17}ClO_6$, chemicky (2S,6'R)-7-chlor-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-3H-spiro[benzofuran-2,1'-cyklohexan]-2'-en-3',4-dion, je přírodní produkt ^[1], který byl poprvé izolován v roce 1939 z *Penicillium griseofulvum* ^[2] Albertem F. Oxfordem a dalšími. ^[2,3] V roce 1946 byla z *Penicillium janczewskii* izolována sloučenina nazvaná jako "Curling Factor". Svůj název získala díky schopnosti stočit houbové hyfy. O rok později bylo zjištěno, že Griseofulvin a "Curling Factor" jsou ve skutečnosti stejná sloučenina. ^[3] V dnešní době je známo několik dalších druhů hub rodu *Penicillium* (např. *P. urticae*, *P. raistrickii*, *P. raciborskii*, *P. kapuscinskii* a mnoho dalších), které též produkují Griseofulvin. ^[4] Struktura Griseofulvinu byla objasněna až v roce 1952 ^[5] Johnem F. Grovem a dalšími. ^[3]



Obrázek 1: Struktura Griseofulvinu

Griseofulvin je bílý, krémový až nažloutlý krystalický prášek. Základní fyzikální a chemické vlastnosti Griseofulvinu jsou uvedené v následující Tabulce 1. ^[6]

Hustota (g/cm^3):	1,358 ^[2]
Relativní molekulová hmotnost (g/mol):	352,77 ^[6]
Rozpustnost:	Velmi málo rozpustný ve vodě (0,2 g/l při 25 °C); málo rozpustný v ethanolu a methanolu; rozpustný v acetonu, chloroformu a dimethylformamidu ^[6]
Optická rotace:	$[\alpha]_D^{17}, +376^\circ$ ^[6]
Teplota tání (°C):	220 ^[6]
Teplota krystalizace (°C):	130–150 ^[7]
Teplota skelného přechodu (°C):	88 ^[7]

Tabulka 1: Chemické a fyzikální vlastnosti Griseofulvinu

V předešlé tabulce si nemůžeme nevšimnout, že se Griseofulvin řadí mezi látky, které jsou velmi málo rozpustné ve vodě. ^[6] Velmi nízká rozpustnost léčivé látky ve vodě má za následek velmi nízkou biologickou dostupnost. ^[8] Nízká biologická dostupnost se může stát ekonomickým problémem kvůli vyšším výrobním nákladům. Jelikož velká část léčiva zůstává biologicky nedostupná, je při výrobě léčiva potřeba použít větší množství léčivé látky. Mimo to léky s nízkou biologickou dostupností mohou způsobit vážné vedlejší účinky, pokud se abnormálně velké množství absorbuje v důsledku specifických účinků pacienta. ^[9] Právě z těchto důvodů se do popředí výzkumu dostávají léčiva v amorfní formě, neboť lze takto dosáhnout vyšší rozpustnosti a tím pádem i biodostupnosti špatně rozpustných léčiv. Více o přednostech a problematice amorfních léčiv viz. kapitola 1.4.

1.1.2. POUŽITÍ

Griseofulvin (GSF) je účinná látka, která se používá například v antifungálních léčivech. Antifungální lék obsahující GSF byl poprvé schválen v roce 1959. Léčivo je podáváno perorálně k léčbě plísňové infekce kůže, nehtů a vlasů (tj. dermatofytóza) u lidí i zvířat ^[1], kterou nelze vyléčit jinými antimykotiky. Působí fungistaticky, a to pouze na dermatofyty – parazitické zástupce rodu *Trichophyton*, *Microsporum* a *Epidermophyton*. Tento lék není tedy účinný proti jiným patogenním houbám a bakteriím nebo kvasinkám, které způsobují mykózy. ^[4,8]

Dermatofyty jsou houby, které ke svému růstu vyžadují keratin, jsou tedy omezeny na vlasy, nehty a povrchovou kůži. Tyto houby neinfikují povrchy sliznic. Dermatofyty se šíří přímým kontaktem od jiných lidí (antropofilní organismy), zvířat (zoofilní organismy) a půdy (geofilní organismy). K přenosu dermatofytů může také dojít i nepřímě z fomitů (např. čalounění, kartáče na vlasy, klobouky). Dermatofytózy se označují pojmem „tinea“. Jsou také pojmenovány podle příslušného místa na těle (Tab. 2). ^[11]

<i>Druh infekce</i>	<i>Místo výskytu infekce</i>	<i>Riziko infekce</i>	<i>Léčba</i>
<i>Tinea Capitis</i>	Pokožka hlavy a vlasové stvoly	Špatná hygiena (kartáč na vlasy, povlak na polštář), často děti	Perorální antimykotika 4-12 týdnů
<i>Tinea Corporis</i>	Trup, končetiny nebo obličej		Snížení vlhkosti kůže a lokální antimykotické krémy 2-4 týdny
<i>Tinea Barbae</i>	Kůže v oblasti hrubých chlupů, vousů a kníru	Nejčastěji ochlupení pracovníci na farmě (přenos zoofilními organismy)	Perorální antimykotika
<i>Tinea Faciei</i>	Oblast obličejě bez vousů		Snížení vlhkosti kůže a lokální antimykotické krémy
<i>Tinea Manuum</i>	Jedna ruka nebo příležitostně obě ruce	Často u pacientů s tinea pedis	Lokální antimykotická léčba a látky obsahující kyselinu mléčnou
<i>Tinea Cruris</i>	Třísla, stehna, hýždě a břicho	Nošení mokrého a těsného oblečení, častěji u mužů	Doplňková léčba zahrnuje dávky kortikosteroidu
<i>Tinea Pedis</i>	Noha, meziprstní prostory, chodidla	Chůze naboso ve veřejných prostorách, mokré ponožky, nedezinfikovaná obuv,	Antimykotické krémy, vzácně systémová terapie 4-8 týdnů
<i>Tinea Unguium</i>	nehty	Stárnutí, cukrovka, špatně padnoucí boty	Perorální antimykotika od 4-6 měsíců do 1 roku

Tabulka 2: Druhy jednotlivých dermatofytóz, jejich místa výskytu a jejich léčba

Léčba dermatofytózy je však časově náročná a může způsobovat několik vedlejších účinků počínaje mírnými účinky, jako je vyrážka a brnění rukou a nohou, až po pálení žáhy, nauzeu, závratě a průjem. Závažné nežádoucí účinky Griseofulvinu zahrnují kožní alergické reakce, kopřivku, kožní puchýře, horečku a poškození jater (hepatotoxicitu). Pacienti proto často přerušují léčbu poté, co se klinické příznaky zlepšily, místo aby pokračovali až do jejího dokončení, což vede k recidivě nebo dokonce rezistenci na aktuálně dostupná léčiva. Z důvodu vzniklé rezistence na Griseofulvin, už Griseofulvin dermatofyty nezabíjí, ale pouze zpomaluje jejich růst. Griseofulvin je však stále nejpoužívanějším antifungálním lékem v případě dermatofytóz i přesto, že má více nežádoucích účinků (nad kterými však stále převažují benefity z léčby).^[12]

Nedávno došlo k obnovení výzkumu Griseofulvinu a jeho analogů z důvodu jeho antimitotických a antiproliferativních vlastností v různých typech rakovinných buněk. Kromě toho, že je to antifungální léčivo^[1], nedávno bylo prokázáno, že inhibuje proliferaci různých typů rakovinných buněk a inhibuje růst nádorů u athymických myší^[13], což znamená, že by mohlo být také dobrým kandidátem na chemoterapii rakoviny.^[1] Griseofulvin inhibuje buňky MCF-7^[13] (lidské buňky rakoviny prsu)^[14] při mitóze a narušuje tak dynamickou nestabilitu mikrotubulů v buňkách, tím způsobuje, že buňky podstupují programovanou buněčnou smrt.

Jeho případná aktivita proti rakovinným buňkám v prsu byla poprvé zkoumána v kombinaci s vinblastinem. ^[13] Vinblastin je přírodní účinná látka používaná jako cytostatikum především pro léčbu rakoviny prsu a rakoviny varlat. ^[15] Studie ukázala, že tyto dva léky společně mohou být úspěšně použity při léčbě rakoviny prsu. ^[13] Z těchto důvodů bylo rozhodnuto, že izolace a polosyntéza analogů Griseofulvinu stojí za další bádání. ^[1]

1.1.3. TOXIKOLOGIE

V experimentech na pokusných zvířatech existují náznaky karcinogenní aktivity u některých druhů. ^[6,8,16] Uvádí se, že Griseofulvin mění homeostázu hormonů štítné žlázy u potkanů. Studie na myších prokázaly, že Griseofulvin byl u myší po perorálním podání hepatokarcinogenní. Mechanismus karcinogenity je nejasný ^[6,17], ale mohl by souviset s indukci enzymů nebo s jeho antimitotickými schopnostmi (vazba na tubulin). ^[6] Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) dospěla k závěru, že Griseofulvin je hepatokarcinogenní u myší a že neexistují dostatečné důkazy pro posouzení karcinogenity u lidí, ale že látka může být karcinogenní pro člověka. ^[17]

Griseofulvin lze považovat za genotoxický na základě své schopnosti indukovat mikrojádra a aneuploidii v buňkách hlodavců in vitro a in vivo a v lidských buňkách in vitro. Genovou mutaci v bakteriích nebo kultivovaných savčích buňkách GSF nevyvolal. ^[6]

Griseofulvin je také embryotoxický a teratogenní u zvířat vystavených vysokým dávkám. ^[18] Teratogenní účinky Griseofulvinu jsou potvrzeny u potkanů, koček a u krys. ^[6,17] Griseofulvin je také schopen projít přes lidskou placentu, z tohoto důvodu není předepisován během těhotenství. ^[18]

1.1.4. MECHANISMUS ÚČINKU

Mechanismus, kterým Griseofulvin inhibuje růst plísňových, rostlinných a savčích buněk, je především založen na vyvolání abnormální mitózy a blokováním buněk v přechodu mezi fázemi G₂/M buněčného cyklu. ^[13] (v G₂ fázi se buňka připravuje na vstup do fáze M (mitózy), kde se buňka dělí na dvě dceřiné buňky). ^[19]

Koncentrace Griseofulvinu potřebná k zastavení růstu houbových buněk je nižší než koncentrace potřebná k zastavení savčích buněk kvůli jeho vyšší afinitě k houbovému tubulinu

proti savčímu tubulinu. ^[13,20] Rané studie ukázaly, že Griseofulvin inhibuje mitózu způsobem, který se podobá účinkům kolchicinu. ^[20] Kolchicin je alkaloid objevený v *Colchicum autumnale* (ocún podzimní), funguje jako antiuratikum a je účinný v léčbě chronické myeloidní leukémie. Tento alkaloid se váže na tubulin a tím je schopen blokovat polymeraci (prodlužování) mikrotubulů. Látky vážící se na mikrotubuly a bránící jim v polymeraci či depolymeraci, mají cytotoxický účinek a jsou označovány jako mitotické jedy, inhibitory mikrotubulů nebo antitubulinové látky. Jejich účinek na buňku je smrtící, ale cíleným zásahem mitotických jedů do dělení nádorových buněk lze dosáhnout zastavení jejich dalšího růstu. Z tohoto důvodu našly tyto látky praktické uplatnění v medicíně jako léčiva zhoubného bujení a zájem o ně se neustále zvyšuje. ^[21] GSF se tedy váže na tubulin, inhibuje polymeraci mikrotubulů, což má za následek inhibici mitózy v nádorových buňkách a také to, že populace mitoticky blokových buněk unikla mitóze s chybně oddělenými chromozomy, a nakonec podstoupila apoptotickou buněčnou smrt. ^[13]

Otázka, zda inhibice mitózy Griseofulvinem zahrnuje depolymerizaci mikrotubulů nebo jiné působení na mikrotubuly v lidských buňkách, zůstala nevyřešena. ^[20]

Griseofulvin se užívá s jídlem nebo po jídle. Aby byl Griseofulvin účinný, musí projít buněčnou membránou, ale sám o sobě toho není schopen. Jeho transport tedy vyžaduje energeticky závislý proteinový transportér v buněčné membráně. Griseofulvin se z GIT vstřebává pomalu kvůli jeho nízké rozpustnosti ve vodě. Má nízkou perorální biologickou dostupnost. Bylo zjištěno, že k absorpci dochází až 30 hodin po perorálním požití 500 mg Griseofulvinu, přičemž se absorbuje 27 – 72,5 % dávky, v pokožce a keratinu se však zadržuje celé týdny. Velikost částic, příjem tuku, rychlost rozpouštění, složení a dávkování, to vše ovlivňuje stupeň absorpce Griseofulvinu. Malé částice jsou lépe absorbovány než velké částice, tuk také zvyšuje absorpci. Hlavním metabolitem v moči po perorálním podání Griseofulvinu byl 6–desmethylgriseofulvin, přičemž 48 % perorální dávky bylo nalezeno jako volná forma a 37,4 % jako glukuronidový konjugát. Velmi málo bylo vylučováno jako nemetabolizovaný Griseofulvin a pouze 2 % se objevila jako glukuronid 4–desmethylgriseofulvinu. ^[6,8,12]

1.1.5. LÉKOVÁ FORMA A DÁVKOVÁNÍ GRISEOFULVINU

Griseofulvin není v České republice registrován. [22,23]

V zahraničí je ale používán běžně, např. v USA, kde je Griseofulvin schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA). Griseofulvin je perorální lék. Dodává se ve formě tablet, které obsahují 250 nebo 500 mg mikrokystalů Griseofulvinu nebo 125 nebo 250 mg ultramikrokystalů Griseofulvinu. [24] Perorální dostupnost mikronizované formulace je proměnlivá, 25 – 70 %, ultramikronizovaný Griseofulvin je naopak téměř úplně absorbován. [25] Griseofulvin je také dostupný jako perorální suspenze obsahující 125 mg/5 ml mikrokystalů Griseofulvinu. [26] Dávkování Griseofulvinu se liší v závislosti na tom, zda je léčivo podáváno jako mikrorozměrné nebo ultramikrorozměrné, zda je pro dospělého nebo pro dítě a podle toho, který typ tinea se léčí (Tab. 3). [6,16] Mimo to se doporučené dávky ultramikrorozměrného Griseofulvinu mírně liší v závislosti na výrobci a složení léku. [6]

<i>DÁVKA</i>	<i>Ultramikrorozměrné tablety</i>	<i>Mikrorozměrné tablety</i>
<i>Dospělí Tinea corporis, tinea cruris a tinea capitis</i>	330-375 mg/den	500 mg/den
<i>Dospělí tinea pedis a tinea unguium</i>	660-750 mg/den	1000 mg/den
<i>Děti od 2 let</i>	7,3 mg/kg	10-11 mg/kg
<i>Vážíci 14-23 kg</i>	82,5-165 mg/den	125-250 mg/den
<i>Vážíci >23 kg</i>	165-330 mg/den	250-500 mg/den

Tabulka 3: Přehled jednotlivých dávek Griseofulvinu

Neaktivní složky v tabletových formách Griseofulvinu mohou také zahrnovat stearát vápenatý, kukuřičný škrob, monohydrát laktózy, stearát hořečnatý, methylcelulózu, pšeničný lepek a další látky. [6] Suspenze může obsahovat alkohol 0,2 %, umělou příchut', mentol, methylparaben, propylenglykol, propylparaben, sacharin sodný, sacharózu, čištěnou vodu a další. [26]

1.1.6. POLYMORFISMUS

Polymorfismus je schopnost určitých chemických látek krystalovat ve dvou nebo ve více formách. Látka, která může existovat v různých krystalických formách nebo modifikacích, se nazývá polymorf. Jednotlivé polymorfní formy látky se odlišují svými hlavními fyzikálními vlastnostmi, jako je teplota tání, barva, rozpustnost, index lomu, tvrdost nebo vodivost. [27] V praxi se rozlišují dva typy polymorfismu, enantiotropie a monotropie. Enantiotropní polymorfy jsou typické tím, že mohou vratně přecházet z jedné krystalové formy do druhé. Monotropní polymorfismus je přechod metastabilní formy do stabilní formy, a protože probíhá pouze jedním směrem, je nevratný. [13,27] Díky tomu, že různé polymorfy mají různé struktury a vlastnosti, je polymorfismus důležitým jevem při výrobě pigmentů, výbušnin a hlavně léčiv.

Polymorfismus ovlivňuje vlastnosti jak účinné farmaceutické složky (API, Active Pharmaceutical Ingredient) (např. chemická stabilita, rozpustnost a rychlost rozpouštění), tak léčivého přípravku (např. biologická dostupnost). [2] Zjištění, zda daná substance má sklon k polymorfním přeměnám, je velice podstatné při formulaci stabilní lékové formy a následně i při registraci a patentové ochraně nově vyvinutých léčiv. Jestli má daná látka polymorfní schopnosti, můžeme určit pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a popřípadě identifikovat její polymorfní formy, u kterých lze také určit, jaká forma je stabilnější a při kterých teplotách. [13] Jednotlivé krystalické modifikace jsou tedy stabilní v určitém teplotním rozmezí a jsou jim přiřazena řecká písmena (α , β) nebo římská čísla (I, II, III). Charakterizaci jednotlivých polymorfních forem umožní jejich různé fyzikální vlastnosti. Pro studium a charakterizaci polymorfů jsou využívány i jiné analytické metody jako např. infračervená (IČ) spektroskopie, rentgenová difrakční analýza (RDA), studie rozpustnosti a termooptická analýza (TOA). [27]

1.1.6.1. POLYMORFISMUS GRISEOFULVINU

V roce 1977 byla zaznamenána první zmínka o krystalové struktuře GSF. A následné snahy o získání jiné krystalové formy pomocí krystalizací roztoku přinesly opět pouze tu stejnou krystalovou formu (formu I), a tak se dlouho věřilo, že GSF existuje pouze v jedné krystalické formě. [2,28] Polymorfní screening je obecně prováděn krystalizací z roztoků za různých podmínek, zatímco krystalizace z tavenin je používána jen zřídka. Nyní však existuje stále více příkladů nových polymorfů objevených právě krystalizací taveniny, které nejsou přístupné prostřednictvím krystalizace roztoku. Descamps a jeho spolupracovníci v roce 2013 zpozorovali dvě nové polymorfní fáze Griseofulvinu (pojmenované forma II a forma III) během

procesu krystalizace taveniny, které charakterizovali pomocí DSC a RDA. [2] I když jsou tyto dvě nové formy ve srovnání s formou I metastabilní, mají dlouhou životnost při pokojové teplotě. [28] Metastabilní GSF forma II má neobvykle velkou tepelnou roztažnost a neobvykle pomalou rychlost růstu krystalů ve srovnání s ostatními polymorfy. [2]

1.1.6.2. RENTGENOVÁ DIFRAKČNÍ ANALÝZA

Rentgenová difrakční analýza (RDA), která byla objevená už v roce 1912 Němci: Max von Laue, Walter Friedrich a Paul Knipping, prošla stoletým vývojem k současné rychlé, sofistikované a široce využívané analytické metodice. [29,30] Současná RDA metoda má velký význam při analýze krystalických pevných látek. Nejen, že může odhalit hlavní rysy struktury, tj. mřížkový parametr a typ struktury, ale také další detaily, jako je uspořádání různých druhů atomů v krystalech, přítomnost nedokonalostí, orientace, zrnitost a velikost zrna. [31] RDA se ve farmacii používá především k popisu polymorfismu farmaceutických molekul a pevných substancí. [30]

Difrakční obraz krystalové struktury získáme ozářením krystalu monochromatickým RTG zářením. [29,32] Dopadající (primární) RTG záření se pružně rozptyluje na elektronech měřeného krystalu (vzniká sekundární neboli difraktované záření). [29] Intenzita difrakčních linií určuje rozložení atomů v krystalické mřížce. V důsledku toho je rentgenový difrakční obraz otiskem periodického atomového uspořádání v daném materiálu. [32] Získaný difrakční obrazec lze porovnat s knihovnou Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). [33]

1.1.7. KLASIFIKACE AKTIVNÍ FARMACEUTICKÉ SUBSTANCE

V současné době se stále častěji používají léčivé látky (léčiva), které jsou ve vodném prostředí velmi těžce rozpustné. [34] To proto, že cílová místa působení léčivých látek (aktivní centra enzymů nebo membránové proteiny) jsou přístupná obzvláště pro lipofilní (hydrofobní) molekuly tzn. pro látky málo rozpustné ve vodě. Jejich rozpustnost ve vodě se musí nějakým způsobem zvyšovat, aby byly použitelné ve farmacii. [35] Rozpustnost léčiva ve vodném prostředí patří mezi nejdůležitější parametry, které často ovlivňují dosažení požadované koncentrace léčiva v systémové cirkulaci, která je schopna v organismu vyvolat zamýšlenou farmakologickou odpověď. Z hlediska fyzikálně-chemického je možné léčivé látky dělit na základě jejich rozpustnosti do sedmi skupin **dle Českého lékopisu** (Tab. 4). Vzhledem k tomu,

že při tomto členění není zohledněna terapeutická dávka léčiva, tak je tento způsob dělení z farmakologického hlediska obvykle nedostačující. [34]

<i>Klasifikace</i>	<i>Objem rozpouštědla v ml na gram rozpuštěné látky</i>
<i>Velmi snadno rozpustné</i>	<1
<i>Snadno rozpustné</i>	1 – 10
<i>Dobře rozpustné</i>	10 – 30
<i>Méně rozpustné</i>	30 – 100
<i>Těžce rozpustné</i>	100 – 1 000
<i>Velmi těžce rozpustné</i>	1 000 – 10 000
<i>Prakticky nerozpustné</i>	> 10 000

Tabulka 4: Rozpustnost léčiv dle Českého lékopisu 2009 a jeho doplňků

Z tohoto důvodu Amidon navrhl **Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS)**. [36] BCS se od svého vydání v roce 1995 stává stále důležitějším nástrojem při vývoji generických i inovativních léčivých přípravků po celém světě. BCS třídí léčivé látky nebo API podle základních parametrů, které řídí rychlost a rozsah perorální absorpce. Mezi základní parametry se zde řadí střevní propustnost (permeabilita) a rozpustnost/rozpuštění dávky léku ve vodě. [37] BCS tak slouží k rozdělení léčivých látek nebo API na základě jejich rozpustnosti a permeability, a to do čtyř tříd následujícím způsobem (Tab. 5). [38] Za vysoce rozpustná léčiva se z hlediska BCS považují ta, jejichž nejvyšší léčebná dávka se rozpustí ve 250 ml vodného pufru (pH 1–8), a jako vysoce prostupné se označují látky, které se u člověka vstřebávají nejméně z 90 %. Do třídy II nebo IV BCS je možné zařadit až 40 % běžně používaných léčiv a až 70 % nově syntetizovaných látek vykazující nízkou rozpustnost ve vodě. [34,36] Jak již bylo zmíněno, Griseofulvin má nízkou rozpustnost a tím se řadí do II. třídy BCS. [39]

<i>třída</i>	<i>Rozpustnost</i>	<i>Permeabilita</i>
<i>I</i>	vysoká	vysoká
<i>II</i>	nízká	vysoká
<i>III</i>	vysoká	nízká
<i>IV</i>	nízká	nízká

Tabulka 5: Klasifikace dle BCS

Pro empirické posouzení vstřebatelnosti léčivé látky navrhl Lipinsky „**pravidlo tří pětěk**“. Což je metoda k předpovědi účinnosti ADME ("absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování") léků, zejména u perorálních léků. Léčivá látka bývá obvykle těžce vstřebatelná, jestliže její molekulová hmotnost je větší než 500, dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu v systému oktanol/voda je větší než 5 a molekula má 5 a více vodíkových donorů. [36,40]

Jak již bylo několikrát zmíněno, nízká biologická dostupnost je obvykle spjata se špatnou rozpustností léčivé látky. Proto je nyní hlavním trendem moderní farmaceutické technologie zvyšování biologické dostupnosti léčivých látek. Léčivé látky, které jsou velmi těžce rozpustné ve vodě, jsou však obvykle dobře rozpustné v tucích, přesněji v lipofilních rozpouštědlech. Mezi metody využívající toho, že látky jsou rozpustné v lipofilních rozpouštědlech, je možné zařadit zpracování těžce rozpustného léčiva do pevné lékové formy v kapalně formě za pomoci samoemulgujících systémů (self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS). Tento systém se řadí mezi tzv. lipofilní formulace a vzniká plněním lipofilní kapaliny s eventuální přísadou tenzidů a kosolventů do měkkých nebo tvrdých tobolek. Lipofilní formulace dělíme do čtyř skupin (Tab. 6), které se od sebe liší především přítomností emulgátorů a kosolventů. SEDDS má tu výhodu, že obsahuje již rozpuštěné léčivo a tím zvyšuje jeho vstřebávání, respektive biodostupnost. [34]

<i>Formulace</i>	<i>Pomocné látky</i>	<i>Vlastnosti</i>	<i>Výhody</i>	<i>Nevýhody</i>
<i>Typ I</i>	Olej bez emulgátoru	Nedispergující systém, léčivo se uvolňuje trávením	Netoxické, jednoduché, možnost plnění do tobolek	Malá rozpouštěcí kapacita, pokud léčivo není vysoce lipofilní
<i>Typ II</i>	Olej a lipofilní emulgátor	Samoemulgující systém bez hydrofilních pomocných látek	Neztrácejí rozpouštěcí kapacitu	Zakalená emulze o/v (velikost částic 0,25 – 2 μm)
<i>Typ III</i>	Olej, emulgátor a kosolvent (pomocné látky rozpustné i nerozpustné ve vodě)	Samoemulgující a samomikroemulgující systémy obsahující hydrofilní pomocné látky	Vytvářejí čirou nebo jemně zakalenou disperzi, léčivo se vstřebává bez trávení	V disperzi a během trávení ztrácí rozpouštěcí kapacitu, obtížněji se vstřebává
<i>Typ IV</i>	Hydrofilní emulgátor a kosolvent	Formulace vytvářejí micelární roztok	Formulace má výbornou rozpouštěcí kapacitu pro řadu léčiv	V disperzi a během trávení ztrácí rozpouštěcí kapacitu, léčivo se obtížněji vstřebává

Tabulka 6: Klasifikační systém lipofilních formulací

1.2. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE

1.2.1. TERMICKÁ ANALÝZA

Termická analýza označuje takové experimentální metody, které jsou založeny na sledování změn fyzikálně chemických vlastností zkoumaných látek při jejich zahřívání nebo ochlazování. Většina metod termické analýzy sleduje náležité vlastnosti systému (např. hmotnost, vodivost, energii a další) jako dynamickou funkci teploty. ^[41] Ve farmaceutickém průmyslu je znalost těchto vlastností důležitým krokem k formulaci stabilního a vyhovujícího léčivého přípravku. Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), termogravimetrie (TG) a diferenční termická analýza (DTA) jsou nejčastěji využívanými termickými metodami při výzkumu a vývoji léčiv. ^[42]

Názvy jednotlivých analýz jsou často odvozeny od vlastností, jež jsou danou metodou zkoumány. Mezi základní metody spadá termogravimetrie, diferenční termická analýza, diferenční skenovací kalorimetrie, termooptometrie a termomechanická analýza (Tab. 7). ^[43]

<i>Metoda termické analýzy</i>	<i>Zkratka</i>	<i>Sledovaná fyzikální vlastnost</i>
<i>Termogravimetrie</i>	TG	Hmotnost – měří se změna hmotnosti při ohřevu vzorku
<i>Diferenční termická analýza</i>	DTA	Rozdíl teplot – měří se rozdíl teplot mezi vzorkem a standardem při ohřevu nebo při chlazení
<i>Diferenční skenovací kalorimetrie</i>	DSC	Rozdíl teplot nebo energie – měří rozdíl teplot nebo energii, kterou je nutno dodat do analyzovaného vzorku nebo do reference, při lineárním ochlazování či zahřívání
<i>Termooptometrie</i>	TOA	Optické vlastnosti – měří se např. index lomu, emitované záření a intenzita odraženého/prošlého záření určité vlnové délky v závislosti na měnící se teplotě.
<i>Termomechanická analýza</i>	TMA	Rozeř a mechanické vlastnosti – analyzuje se deformace vzorku při zatížení v závislosti na teplotě

Tabulka 7: Přehled metod termické analýzy

Moderní přístroje navíc umožňují současné měření více vlastností během jednoho experimentu. Tyto metody se označují jako simultánní termická analýza (STA). Mezi nejvíce rozšířenou dvojici metod patří TG-DTA a TG-DSC. Tyto metody se totiž dobře doplňují. ^[43]

1.2.2. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC, differential scanning calorimetry), jak již bylo zmíněno, je jednou z důležitých metod termické analýzy. DSC je často využívána při určení teplot tání, skelných přechodů a krystalizací nejrůznějších materiálů. Řadí se mezi nejvýznamnější a nejčastěji používanou metodu ve farmaceutickém průmyslu. Tato metoda má ovšem uplatnění i v ostatních odvětvích průmyslu zabývajících se např. výrobou skla, keramiky, potravin, plastů a polymerů. [42,43,44]

DSC lineárně ochlazuje nebo ohřívá vzorek a měří rozdíl teplot nebo energii, kterou je nutno dodat do vzorku (pokud v něm probíhá endotermní děj) nebo do reference (ve vzorku probíhá exotermní děj), aby vzorek a referenční látka měly stejnou teplotu. [42,43] Principem této metody tedy je udržet stejnou teplotu, jak ve zkoumaném, tak i v referenčním vzorku, které jsou současně zahřívány pod stejným teplotním programem. [45]

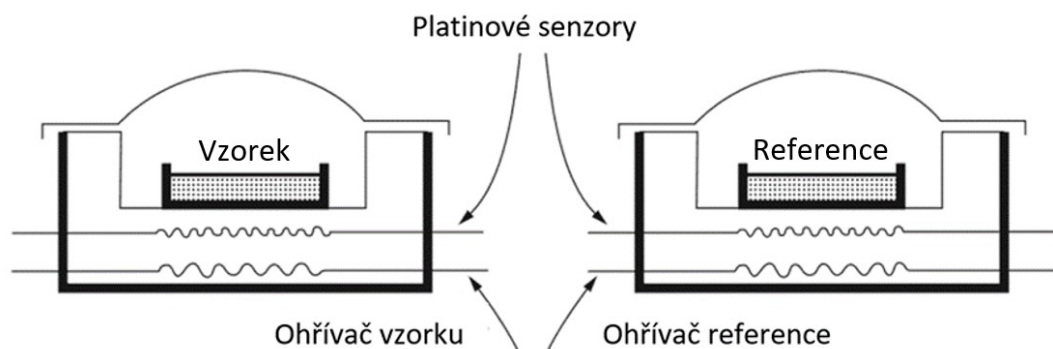
1.2.3. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE S TEPELNÝM TOKEM A KOMPENZAČNÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE

Používají se dva typy DSC metod, buď DSC s tepelným tokem (heat flux DSC, hf-DSC) nebo kompenzační DSC (power compensation DSC). Jednou z výhod použití DSC analýzy je spotřeba velmi malého množství vzorku, navážka se pohybuje od 1 mg do 100 mg. [42,43] Pracovat s malým množstvím materiálu je doporučeno proto, aby se minimalizovaly tepelné ztráty a tepelné gradienty ve vzorku a byla tak zvýšena účinnost měření. [46] Vzorky jsou umístěny v keramických nebo kovových kelímcích, které zajišťují dokonalý kontakt s topným tělesem a teplotními čidly. [43]

DSC s kompenzací příkonu zachovává nulový teplotní rozdíl mezi analyzovaným a referenčním vzorkem. DSC tedy měří energii, která je potřebná pro vyrovnání teplot mezi vzorkem a referencí. Pokud v analyzovaném vzorku dojde k tání vzorku (endotermní děj), je dodána energie do analyzovaného vzorku a teplotní rozdíl mezi vzorkem a referencí je tak vynulován. A naopak, v případě, že dojde ke krystalizaci vzorku (exotermní děj) je teplota analyzovaného vzorku vyšší oproti referenčnímu vzorku a je tedy nutné opět vzniklý teplotní rozdíl mezi vzorkem a referencí kompenzovat. Aby došlo k vyrovnání teplot s referenčním vzorkem, je do analyzovaného vzorku dodáno méně energie oproti referenčnímu vzorku. Díky kompenzací příkonu zůstává v obou vzorcích stejná teplota. Měrnou veličinou je elektrický

příkon potřebný k udržení stejné teploty obou identických cel. Každý vzorek je umístěn ve své měřící cele, která má svůj tepelný zdroj a jsou zahřívány/ochlazovány stejnou rychlostí. Aby se zabránilo tepelnému toku mezi vzorky, jsou od sebe izolovány. [42,43]

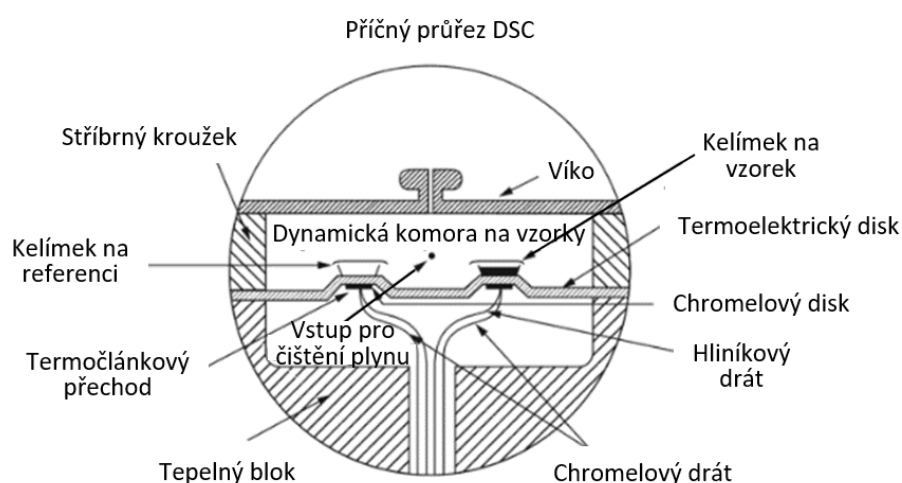
Zařízení pro DSC s kompenzací příkonu je zobrazeno na Obrázku 2. [47]



Obrázek 2: Schéma DSC s kompenzací příkonu [7]

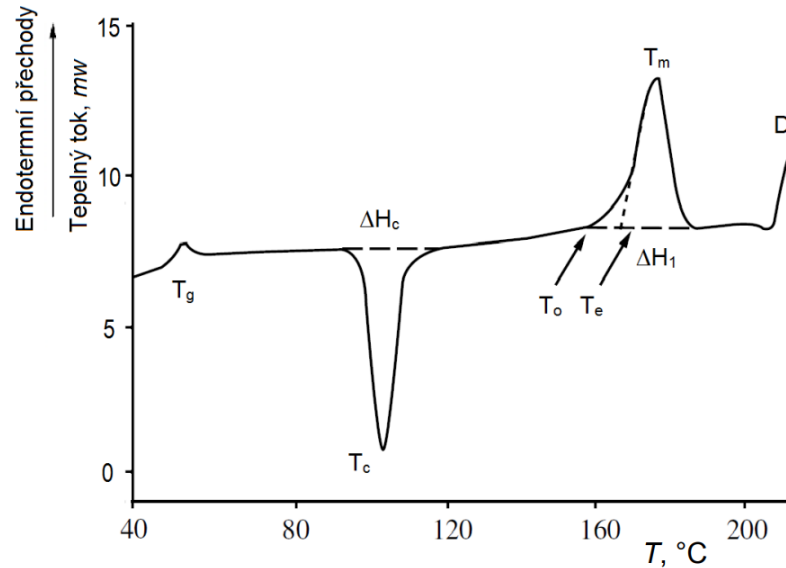
DSC s tepelným tokem měří rozdíl teplot analyzovaného a referenčního vzorku, který je měřen pomocí rozdílu termoelektrických napětí jednotlivých termočlánků. Rozdíl teplot je zaznamenáván jako závislost tepelného toku na teplotě, takže výstup z obou analyzátorů je analogický a vzájemně porovnatelný. [42,43,45]

Zařízení pro DSC s tepelným tokem (Obr. 3.) se obvykle skládá z jedné cely, která obsahuje držáky pro umístění kelímků určených pro referenci a kelímků pro vzorek. To znamená že, oba kelímky jsou umístěny ve společné kalorimetrické cele na samostatných teplotních čidlech a jsou navzájem spojeny tepelným mostem. [42,47]

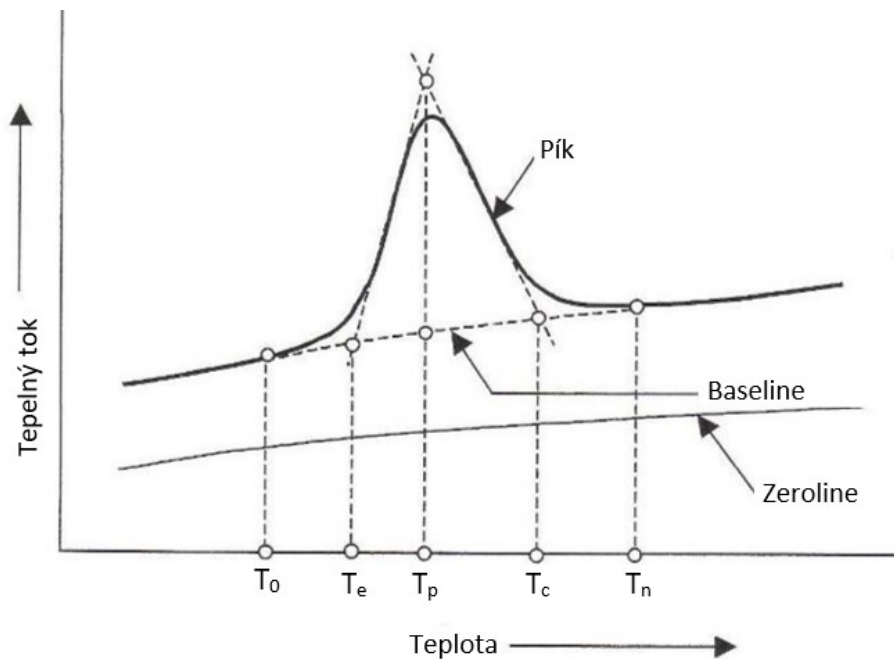


Obrázek 3: Schéma DSC s tepelným tokem ($S =$ vzorek, $R =$ reference) [47]

Výsledkem měření obou zmíněných DSC metod v případě neizotermních měření je závislost tepelného toku Φ na teplotě T . Výstup z DSC měření se nazývá DSC křivka (Obr. 4). Píky na DSC křivce odpovídají jednotlivým tepelným procesům probíhajícím ve vzorku. Popis vybraného termického efektu společně s charakteristickými teplotami a liniemi je zobrazen na Obrázku 5. [48]



Obrázek 4: Schématické znázornění DSC křivky zobrazující skelný přechod T_g , teplotu krystalizace T_c , entalpii krystalizace ΔH_c , počáteční teplotu tání T_o , extrapolovanou počáteční teplotu (teplotu onsetu) T_e , entalpii tání ΔH_1 , teplota tání píku T_m a degradaci D. [41]



Obrázek 5: Detail píku s jeho charakteristickými teplotami a liniemi [48]

Nulová linie (tzv. zeroline) představuje křivku na DSC záznamu, kterou získáme z měření, kdy je kalorimetr prázdný, příp. obsahuje prázdné kelímky. [43,48]

Základní linie (tzv. baseline) odpovídá měření vzorku, který nevykazuje žádný termický efekt (spotřeba/uvolnění tepla). Základní linie by tedy měla být v průběhu celé analýzy konstantní. [45]

Charakteristické teploty DSC křivky jsou definovány následovně:

- Počáteční teplota píku T_0 začíná tam, kde se křivka naměřených hodnot začíná odchylovat od základní linie.
- Extrapolovaná počáteční teplota T_e je v místě, kde čára vedená lineárním úsekem stoupajícího píku protíná základní linii [48], neboli též nazývána „teplota onset“, která určuje teplotu fázového přechodu. [49]
- Maximální teplota píku T_p je maximální rozdíl mezi křivkou DSC a základní linií.
- Extrapolovaná koncová teplota T_c je v místě, kde čára přes téměř lineární část píku protíná základní linii.
- Teplota konce píku T_n je v místě, kde se křivka DSC vrací na základní linii. [48]

Pík se na křivce objeví, když je ustálený stav narušen produkcí nebo spotřebou tepla vzorkem. Ne však všechny tepelné přechody vytvoří rozlišitelný pík, skelný přechod vede pouze k vytvoření schodu na DSC křivce. [48] Píky spojené s endotermickými procesy (např. táním) jsou tzv. *endoefekty*. Naopak píky spojené exotermickými procesy (např. krystalizací) jsou tzv. *exoefekty*. [45] Plocha píku nad/pod základní linií je přímo úměrná entalpii ΔH probíhajícího procesu [49], neboli spotřebovanému/uvolněnému teplu při procesu. [43] Pro amorfní látky je typický endotermní skelný přechod, který může následovat krystalizace (exoterma), tání (endoterma) a nakonec degradace. [42]

Další důležité informace, jež můžeme získat z DSC měření, mohou souviset např. s kinetikou procesu, který ve vzorku probíhá. [46]

1.3. KINETICKÁ ANALÝZA KRYSTALIZAČNÍCH DAT Z DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE

Metody termické analýzy (TA), jako je DTA nebo DSC, jsou velmi používané pro kinetickou analýzu krystalizačních procesů v amorfních látkách. ^[50] Kinetickou rovnici krystalizačního píku (1) DSC lze popsat následující rovnicí:

$$\Phi = \Delta H \cdot A \cdot e^{-E_A/RT} \cdot f(\alpha) \quad (1)$$

kde Φ je tepelný tok měřený DSC, ΔH je krystalizační entalpie, A je předexponenciální faktor, E_A je aktivační energie procesu, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota a $f(\alpha)$ znamená vyjádření kinetický modelu (α je stupeň konverze). ^[51,52,53]

Důležité kinetické parametry krystalizačního procesu, jako jsou aktivační energie krystalizace, dále kinetický model a jeho parametry, a nakonec předexponenciální faktor, jsou určeny v několika následujících krocích kinetické analýzy. ^[51,52]

1.3.1. VÝPOČET AKTIVAČNÍ ENERGIE

V prvním kroku kinetické analýzy je obvykle třeba vypočítat aktivační energii krystalizace E_A . Existuje mnoho metod pro výpočet aktivační energie, nicméně mezi nejčastěji používané metody se řadí Kissingerova ^[51,52], modifikovaná Kissinger-Akahira-Sunose (KAS) ^[51,53] a Friedmanova metoda. Výběr metody závisí na neizotermních/izotermních podmínkách experimentu.

Pro neizotermní podmínky se využívají všechny zde vyjmenované metody. ^[52] Pro izotermní podmínky lze využít pouze metod izokonverzních řezů. ^[54]

Kissingerova metoda

Tato metoda je založená na posunu maxima krystalizačního píku T_p s rychlostí ohřevu q^+ . Její podstata je vystižena níže uvedenou rovnicí: ^[51,52]

$$\ln\left(\frac{q^+}{T_p^2}\right) = -\frac{E_A}{RT_p} + konst. \quad (2)$$

Nevýhodou Kissingerovy metody je, že poskytuje informace pouze pro dominantní krystalizační pík. ^[51,53]

Aktivační energie se dá také stanovit pomocí izokonverzních metod ^[52], které poskytují závislost E_A na α . ^[51] Mezi tyto metody se řadí modifikovaná Kissinger-Akahira-Sunose (KAS) metoda ^[51] (integrální izokonverzní metoda) ^[54] a Friedmanova metoda ^[52] (diferenciální metoda izokonverzních řezů). ^[54]

Modifikovaná Kissinger – Akahira – Sunose (KAS) metoda (integrální izokonverzní metoda)

Modifikovaná KAS metoda určí aktivační energii podle následující rovnice: ^[51]

$$\ln\left(\frac{q^+}{T_\alpha^{1,92}}\right) = -1,0008 \frac{E_A}{RT_\alpha} + konst. \quad (3)$$

Friedmanova metoda (diferenciální metoda izokonverzních řezů)

Při Friedmanově metodě se aktivační energie vypočítá pro různé hodnoty stupně přeměny. Její princip popisuje níže uvedená rovnice: ^[52]

$$\ln(\Phi_\alpha) = -\frac{E_A}{RT_\alpha} + konst. \quad (4)$$

kde Φ_α a T_α je měrný tepelný tok a teplota odpovídající určité zvolené hodnotě stupně konverze α . ^[2,3,4] Experimentální data jsou zde opět získána z krystalizačních křivek měřených při různých rychlostech ohřevu a jsou vykreslena pro každou hodnotu α zvlášť. Tímto způsobem se nakonec získá závislost aktivační energie E_A na stupni přeměny α . ^[52,53]

Předností metod izokonverzních řezů je, že je lze využít jak u neizotermálně měřených DSC dat, tak i u izotermálních měření. Hodnota aktivační energie E_A je pak určena jako střední hodnota nacházející se v intervalu $0.3 \leq \alpha \leq 0.7$. ^[54]

1.3.2. URČENÍ KINETICKÉHO MODELU

Další krok kinetické analýzy spočívá ve výběru vhodného kinetického modelu pro popis krystalizačního procesu. Pro tento účel byl vyvinut algoritmus založený na tvaru tzv. charakteristických kinetických funkcí $z(\alpha)$ a $y(\alpha)$. Tyto funkce jsou získány velmi jednoduchou transformací experimentálních DSC dat. ^[51,52]

V neizotermických podmínkách jsou tyto funkce definovány následovně: [50,51,52]

$$y(\alpha) = \Phi \cdot e^{E_A/RT} \quad (5a)$$

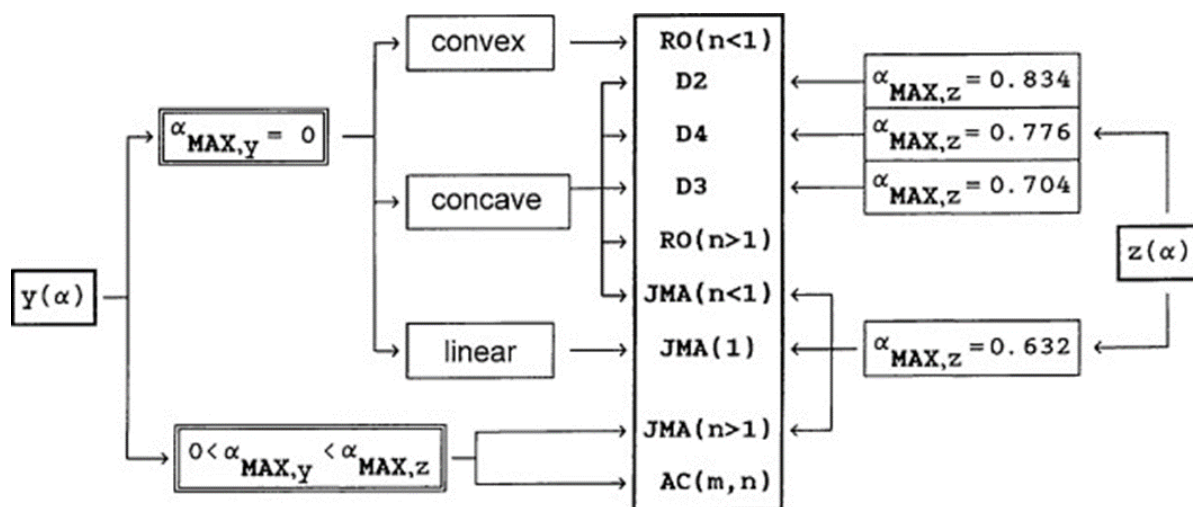
$$z(\alpha) = \Phi \cdot T^2 \quad (5b)$$

V izotermních podmínkách nabývají tyto funkce tvaru: [50]

$$y(\alpha) = \Phi \quad (6a)$$

$$z(\alpha) = \Phi t \quad (6b)$$

Zavedené funkce jsou ve skutečnosti univerzálním krokem při určování vhodného kinetického modelu použitelného pro jakýkoli fyzikální proces. [52] Stanovení nejvhodnějšího kinetického modelu využívá hodnoty α odpovídající maximum charakteristických funkcí a celkovému tvaru funkcí. [52,53] Na základě těchto informací lze zvolit optimální kinetický model podle algoritmu znázorněného na Obrázku 6, který zobrazuje i konkrétní hodnoty pro několik nejběžnějších kinetických modelů. [52]



Obrázek 6: Algoritmus pro stanovení vhodného kinetického modelu založeného na hodnotách maxim funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$. [3]

Kinetika krystalizace obvykle bývá popisována s využitím různých kinetických modelů. [50] Nejčastěji se používají tyto dva modely: nukleačně-růstový Johnson-Mehl-Avrami (JMA) model a semiempirický autokatalytický model Šesták–Berggren (AC). [52,53]

1.3.2.1. JOHNSON-MEHL-AVRAMI MODEL

Johnson-Mehl-Avrami (JMA) model je jednoparametrový nukleačně-růstový model [52] patřící mezi nejpoužívanější modely, které jsou využívány k popisu kinetiky chemických reakcí a kinetiky fázové transformace (zejména kinetiky krystalizace). [51] Tento model byl platný pouze pro izotermické podmínky, nicméně Henderson ukázal, že platnost tohoto modelu může být rozšířená i na neizotermické podmínky za předpokladu, že celý nukleační proces probíhá v raných fázích transformace a stává se tak zanedbatelným během samotného růstu krystalů. Kinetika krystalizace může být popsána tímto modelem, pokud hodnota stupně konverze odpovídající maximu funkce $z(y)$ má hodnotu 0,632. Tato hodnota je charakteristickým "otiskem prstu" modelu JMA. Matematicky lze JMA model vyjádřit pomocí níže uvedené rovnice: [50,52]

$$f(\alpha) = m(1 - \alpha)[- \ln (1 - \alpha)]^{1 - \frac{1}{m}} \quad (7)$$

kde m je parametr odrážející mechanismy nukleace a růstu krystalů, jakož i morfologii krystalů. Hodnotu samostatného kinetického parametru m pak lze vypočítat z následující rovnice: [52]

$$m = \frac{1}{1 + \ln (1 - \alpha_{max,y})} \quad (8a)$$

Alternativní způsob pro stanovení parametru m je pomocí funkce dvojitého logaritmu: [52]

$$\frac{d \ln [- \ln (1 - \alpha)]}{d \left(\frac{1}{T} \right)} = - \frac{m.E}{R} \quad (8b)$$

1.3.2.2. AUTOKATALYTICKÝ (ŠESTÁK-BERGGREN) MODEL

Dále se používají i empirické modely, které slouží k popisu složitějších krystalizačních procesů. Kinetické parametry těchto modelů nenabývají fyzikálního významu. Mezi tyto modely se řadí například dvouparametrový autokatalytický (Šesták-Berggren) model. [55]

Autokatalytický (AC) model se používá v případech, kdy nelze použít např. model JMA, z toho důvodu je obvykle až druhým v pořadí při výběru vhodného kinetického modelu. AC model poskytuje vyšší flexibilitu v kinetickém popisu oproti modelu JMA. [53] AC model lze matematicky vyjádřit pomocí rovnice: [50,53]

$$f(\alpha) = \alpha^M(1 - \alpha)^N \quad (9)$$

kde parametry M a N jsou kinetické parametry popisující tvar měřené DSC křivky a jsou charakteristické pro konkrétní krystalizační proces. [55] Hodnoty parametrů tohoto modelu lze vyhodnotit na základě následujících rovnic: [52]

$$\frac{M}{N} = \frac{\alpha_{max,y}}{1 - \alpha_{max,y}} \quad (10a)$$

$$\ln\left(\Phi \cdot e^{\frac{E_A}{RT}}\right) = \ln(\Delta H \cdot A) + N \cdot \ln\left[\alpha^{\frac{M}{N}}(1 - \alpha)\right] \quad (10b)$$

1.3.3. STANOVENÍ PŘEDEXPONENCIÁLNÍHO FAKTORU

Závěrečným krokem kinetické analýzy je stanovení předexponenciálního faktoru A . Jeho hodnota může být stanovena přímo rovnicí (10b) nebo pomocí fitování nelineární DSC křivky. [52,54] Hodnoty A by samozřejmě měly být stejné bez ohledu na způsob stanovení. [52]

Hodnotu předexponenciálního faktoru lze také stanovit dle vztahu: [56]

$$A = \frac{q^+ \cdot x_p}{T \cdot f'(\alpha)} e^{x_p} \quad (11)$$

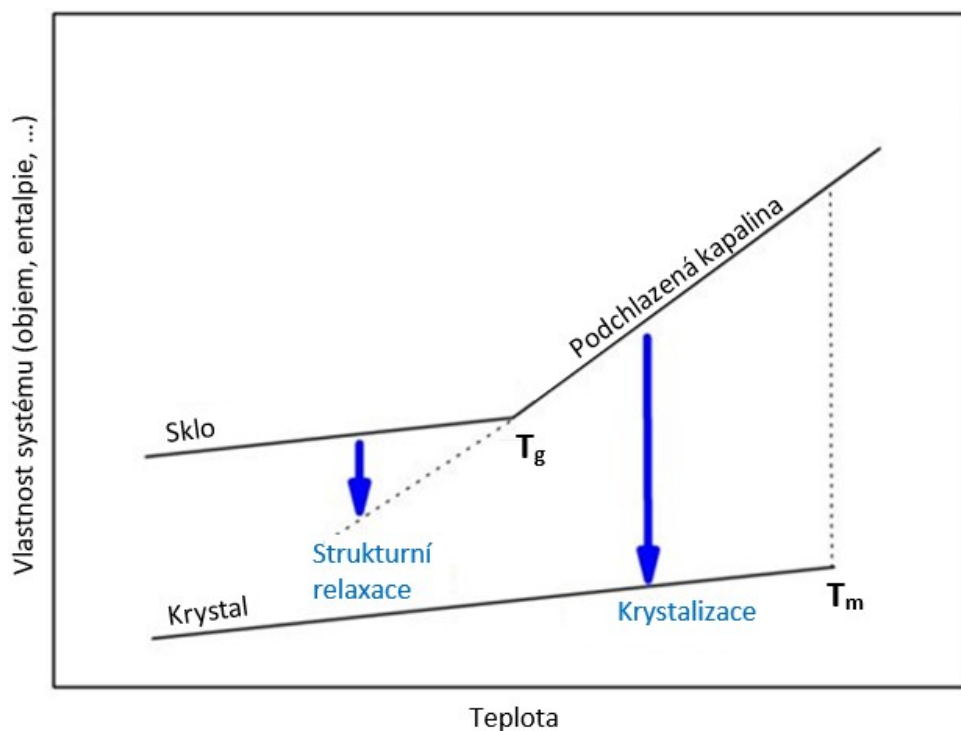
1.4. AMORFNÍ LÁTKY

Jak již bylo zmíněno, amorfni léčiva přitahují velkou pozornost, díky své velké rozpustnosti a zvýšené biologické dostupnosti ve srovnání s krystalickými protějšky. Neuspořádaná struktura amorfni farmaceutických výrobků je tvořena rychlým ochlazením roztaveného materiálu. [57]

Ovšem léčiva v amorfni formě mají tendenci v průběhu času (výroby nebo skladování) krystalizovat. V důsledku jejich vyšší molekulární mobility je jejich povrchová krystalizace daleko rychlejší než objemová, což může způsobit jejich špatnou stabilitu a pomalé rozpouštění léčivých přípravků. Krystalizace by tedy eliminovala výhody amorfni formy. [9,10,58] Pochopení molekulární mobility amorfni léčiv k určení jejich dlouhodobé fyzické stability je tedy pro farmaceutický průmysl zásadní. Molekulární mobilita je charakterizována relaxačními procesy v podchlazené kapalině a skelném stavu. [58]

1.4.1. STRUKTURNÍ RELAXACE

Je dobře známo, že nerovnovážná povaha skelného stavu vede k procesu zvanému strukturní relaxace. Tento proces je také často nazývaný jako "fyzikální stárnutí". Strukturní relaxace probíhá uvnitř oblasti a pod teplotou skelného přechodu a lze jej popsat jako pomalé přeskupování struktury materiálu směrem k jeho rovnovážnému [59,60] (metastabilnímu) [61] stavu, který je reprezentován podchlazenou kapalinou (Obr. 7). [59,60] Během tohoto relaxačního procesu dochází tedy ke snížení entalpie a objemu. [61] Strukturní relaxace je často klasifikována podle vlastnosti, která je pozorována – např. objemová nebo entalpická relaxace. Strukturní relaxace je neexponenciální a nelineární proces. [60]



Obrázek 7: Graf znázorňující změnu entalpie a objemu tvorby skla, strukturální relaxaci a krystalizaci. [62]

Obrázek 7 popisuje vlastnosti systému (objem nebo entalpii) jako funkci teploty kapaliny tvořící sklo. Při pomalém ochlazení z vysokých teplot může kapalina krystalizovat při teplotě T_m tvořící stabilní krystalický materiál. Pokud je však ochlazování v tomto teplotním rozsahu dostatečně rychlé, aby se zabránilo nukleaci a následnému růstu krystalů, je dosaženo metastabilního podchlazeného kapalného stavu. [62]

Pro studium skelného přechodu je právě kalorimetrie jednou z nejčastěji používaných experimentálních metod. Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) se tak často používá i ke studiu relaxačních procesů amorfních materiálů. [57] Pomocí DSC je vzorek opakovaně cyklicky chlazen a zahříván v oblasti skelné transformace T_g . [61,63]

1.4.1.1. KINETICKÁ ANALÝZA STRUKTURNÍCH RELAXAČNÍCH DAT DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE

Mezi nejčastěji používané modely, které popisují jak neexponencialitu, tak nelinearitu strukturální relaxace patří KAHR (Kovacs-Aklonis-Hutchinson-Ramos) model a model Tool-Narayanaswamy-Moynihan (TNM). [59,64]

1.4.1.1.1. TOOL-NARAYANASWAMY-MOYNIHAN MODEL

Fenomenologický Tool-Narayanaswamy-Moynihan (TNM) model je založený na rovnicích (12) a (13).^[59] Z těchto následujících rovnic si můžeme všimnout, že model TNM je poměrně složitý, protože zohledňuje všechny hlavní rysy strukturního relaxačního chování. Ovšem jeho velkou výhodou je velmi vysoká flexibilita, přesnost a relativně vysoké predikční schopnosti při popisu experimentálních dat.^[65]

Neexponencialita strukturní relaxace je často popisována rozdělením relaxačních časů, které je vyjádřeno Kohlrauschovou–Williamsovou–Wattsovou (KWW) protaženou exponenciální funkcí. Funkce KWW je definována takto:^[60]

$$\Phi(t) = e^{\left[-\left(\int_0^t \frac{dt}{\tau}\right)^\beta\right]} \quad (12)$$

kde $\Phi(t)$ je relaxační funkce, t je čas, τ je relaxační čas, který je funkcí teploty T a skutečné struktury materiálu a β je parametr neexponenciality.^[59,60,66]

Nelineární charakter strukturní relaxace je často popisován na základě Toolova návrhu, že doba relaxace závisí jak na teplotě, tak na skutečné struktuře materiálu. Tuto okamžitou strukturu systému lze popsat fiktivní teplotou T_f zavedenou Toolem. Fiktivní teplota je definována jako teplota podchlazené kapaliny, která má stejnou strukturu jako právě relaxující sklo. Toolův návrh byl poté upraven Narayanaswamym a Moynihanem:^[60]

$$\tau(T, T_f) = A \cdot e^{\left[x \frac{\Delta h^*}{RT} + (1-x) \frac{\Delta h^*}{RT_f}\right]} \quad (13)$$

kde A je preexponenciální faktor (což znamená relaxační čas při nekonečně vysoké teplotě), x je parametr nelinearity, který popisuje poměr teplota/struktura příspěvku k době relaxace, Δh^* je aktivační energie strukturní relaxace, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota a T_f je fiktivní teplota, která je definována jako teplota podchlazené kapaliny se stejnou strukturou, jako má relaxační sklo.^[59,60,66]

Nejdůležitějším parametrem TNM modelu je aktivační energie Δh^* .^[66]

1.4.1.1.1.1. METODY PRO VYHODNOCENÍ AKTIVAČNÍ ENERGIE

Aktivační energii Δh^* lze určit z cyklu konstantního poměru (CR, constant ratio cycles), nebo z cyklu konstantní rychlosti ohřevu (CHR, constant heating rate cycles). Tyto metody budou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách. [63,67]

1.4.1.1.1.1.1. VYHODNOCENÍ Δh^* z CR cyklů

Během CR cyklů zůstává poměr mezi rychlostí chlazení a následně aplikovanou rychlostí ohřevu q^-/q^+ konstantní. [63,65] Aktivační energie lze stanovit dle následující rovnice:

$$-\frac{\Delta h^*}{R} = \left[\frac{d \ln |q^+|}{d(1/T_p)} \right]_{\frac{q^-}{q^+} = konst} \quad (14)$$

kde T_p je teplota odpovídající maximu relaxačního píku a q^+ , q^- je rychlost ohřevu a chlazení. Tato rovnice byla odvozena za předpokladu, že T_p vykazuje podobnou závislost na $\ln(q)$ jako fiktivní teplota T_f . [65,67]

1.4.1.1.1.1.2. VYHODNOCENÍ Δh^* z CHR cyklů

V případě cyklů CHR se rychlosti chlazení mění, zatím co rychlost ohřevu zůstává konstantní. Tato metoda je založena na určení fiktivní teploty, která odpovídá T_g získanému z chlazení.

Na základě znalosti rychlosti chlazení a fiktivní teploty T_f určíme aktivační energii podle rovnice:

$$-\frac{\Delta h^*}{R} = \frac{d \ln |q^-|}{d(1/T_f)} \quad (15)$$

kde T_f je fiktivní teplota, která zde odpovídá teplotě T_g získané při ochlazování. Fiktivní teplotu lze vyhodnotit „metodou rovné plochy“ pomocí rovnice:

$$\int_{T^*}^{T_f} (C_{pl} - C_{pg}) dT_f = \int_{T^*}^{T'} (C_p - C_{pg}) dT \quad (16)$$

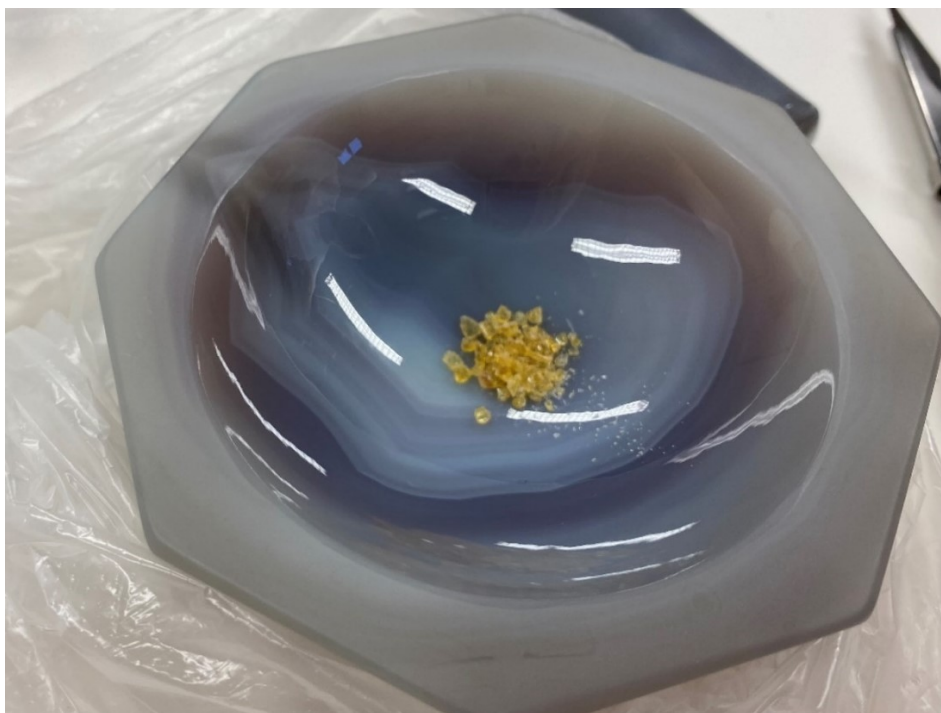
kde T^* je jakákoliv teplota nad T_g , při které se tepelná kapacita rovná rovnovážné hodnotě podchlazené kapaliny C_{pl} a T' je teplota výrazně nižší než T_g , kdy je tepelná kapacita rovna kapacitě skelné fáze C_{pg} . [63]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pozornost v této kapitole mé práce bude věnována způsobu přípravy vzorku, která je velmi důležitá k dosažení správných a přesných výsledků měření. A také zde bude popsána zásadní metoda této práce, a to diferenční skenovací kalorimetrie, která je zde použita pro studium kinetiky krystalizace a strukturní relaxace Griseofulvinu.

2.1. PŘÍPRAVA VZORKU

K přípravě vzorků Griseofulvinu byl použit kalibrovaný jednoplotýnkový vařič zahřátý na vysokou teplotu, konkrétně na teplotu 280 °C. Na tomto stolku byla umístěna nádoba s olejem zahřátým nad teplotu tání Griseofulvinu, tedy na 225 – 230 °C. V oleji byla umístěna skleněná lékovka obsahující 5 g práškového Griseofulvinu (Sigma Aldrich, z *Penicillium griseofulvum*, 97.0-102.0 %). Po dokonalém roztavení Griseofulvinu byla nádoba s taveninou vyjmuta z oleje a ochlazená ve vodě na laboratorní teplotu. Tímto způsobem přípravy byl obdržén Griseofulvin v amorfní formě. Ztuhlý Griseofulvin byl vyjmut z lékovky (Obr. 8), nadrcen v achátové misce a proset sítí s definovanou velikostí ok. Tímto způsobem byly získány následující dvě práškové frakce o daných velikostech částic (0 – 180 μm a 180 – 500 μm).



Obrázek 8: Amorfní Griseofulvin v achátové misce před nadrcením

Každá z frakcí byla ve formě velmi jemného prášku rovnoměrně rozprostřena na dno hliníkového kelímku, tím byl zajištěn co nejlepší tepelný kontakt vzorku se dnem kelímku, který umožnil minimalizovat tepelné gradienty ve vzorku. Je proto důležité dbát na umístění vzorku v kelímku. Dále je nutná opatrná manipulace s kelímkem obsahujícím vzorek, aby nedocházelo k naklánění kelímku, jeho otřesům, či dokonce pádům. V těchto případech hrozí, že se vzorek rozptýlí po celém kelímku, což může výrazně ovlivnit přestup tepla z a do vzorku, a zkreslit tak záznamy z měření. Navážka analyzovaných vzorků se pohybovala v rozmezí 2 – 3 mg. Každý hliníkový kelímek s naváženým vzorkem byl vložen na podložku speciálního lisu, přiklopen víčkem a hermeticky uzavřen (studeným svárem). Tento speciální lis je zobrazen na následujícím Obrázku 9. Takto připravený vzorek byl podroben experimentu, jenž je popsán v následující kapitole 2.2. Jako reference byl použit prázdný hliníkový kelímek.



Obrázek 9: Analytická váha k navážování vzorku amorfního Griseofulvinu a speciální lis k hermetickému uzavření kelímků se vzorky

2.2. POSTUP MĚŘENÍ

Krystalizační chování a strukturní relaxace připravených vzorků byly zkoumány pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru DSC Q2000 (TA Instruments), který je na Obrázku 10. Jedná se o DSC s tepelným tokem. Přístroj má následující vybavení autosampler (automatický podavač vzorků), chladicí zařízení RCS90 a T – zero technologie. Autosampler obsahuje 50 pozic pro umístění vzorků a tím umožňuje velmi rychle změřit všechny vzorky (celkem bylo změřeno 20 vzorků). Výhodou použití chladicího zařízení intracooler RCS90 je, že termoelektrické chlazení zaručuje bezúdržbový průběh přístroje, ale poskytne i výbornou linearitu a preciznost v dodržení nastavené rychlosti ohřevu. Zásadní výhodou tohoto DSC přístroje je ovšem T – zero technologie, která je patentovaná firmou TA Instruments. Tato technologie zaručuje především linearitu baseline/zeroline, která během této práce byla využita při odečtení termokinetického pozadí. Toto termokinetické pozadí reflektuje tepelnou kapacitu systému (vzorek + kelímek + platforma).

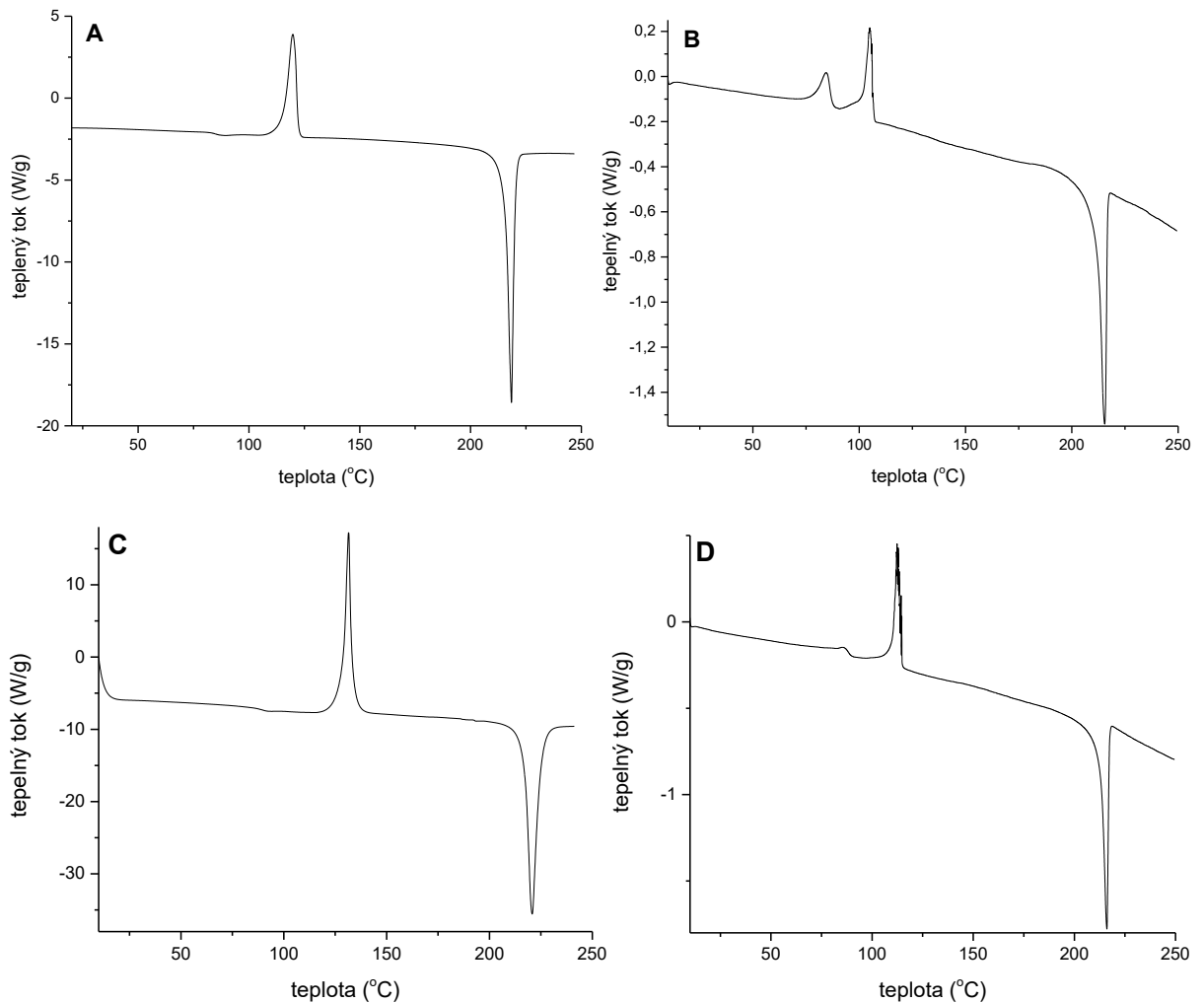


Obrázek 10: Diferenční skenovací kalorimetr (DSC)

DSC kalorimetry, podobně jako ostatní instrumentální přístroje, vyžadují před zahájením vlastního měření kalibraci. Kalibrace je prováděna proto, aby bylo dosaženo objektivně správných hodnot při měření. Kalibrace byla realizována za stejných podmínek, které byly použity při skutečném měření (stejný typ kelímků a víček, stejný průtok proplachovacího plynu). Nejprve byla uskutečněna kalibrace kapacity a rezistance DSC cely. V přístroji byl zapnut cyklický teplotní program střídavého chlazení a ohřevu od $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $550\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rychlost cyklického teplotního programu byla $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Tento teplotní program střídavého chlazení a ohřevu byl desetkrát zopakován. Poté byla DSC cela udržována na $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut a poté byl znovu proveden ohřev na $550\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na základě tohoto posledního ohřevu byla určena kalibrace pro základní zeroline. Dále byla provedena kalibrace teploty T a tepelného toku Φ přístroje. Kalibrace teploty DSC přístroje byla provedena pomocí standardu se známou teplotou tání. Jako kalibrační standard se nejčastěji používá zinek, indium, olovo, galium a rtuť. Samotný kalibrační proces je obvykle dán určitým softwarem, který se využívá k ovládní DSC přístroje. Náš DSC přístroj využívá software „Advantage“ firmy TA Instruments. Tento software umožňuje kalibraci teploty až na 8 kalibračních standardů. Obvykle již postačuje použít 3 standardy k dostatečně přesnému měření. V našem případě byly jako standardy použity In, Zn a H_2O . Námi vybrané standardy byly nejprve ochlazeny $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod jejich teplotu tání a poté následoval ohřev na teplotu zhruba $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ nad předpokládanou teplotou tání rychlostí $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Zaznamenal se endotermní pík tání, podle kterého byla vyhodnocena teplota onsetu a zadána do softwaru Advantage. Poté, co byly zadány všechny teploty standardů, přístroj automaticky provedl přepočty teploty podle zadané kalibrační řady. Kalibrace tepelného toku byla provedena v průběhu kalibrace teploty, kde se jako standard využilo In. Zaznamenaný pík během tání india byl integrován a ze získané plochy byl vypočten korekční faktor srovnáním s tabelovanou hodnotou entalpie tání In.

2.2.1. KRYSTALIZACE

Experiment byl proveden za neizotermních podmínek. Nejprve byl každý vzorek udržován při teplotě 10 °C po dobu 5 min a poté byl zahříván na teplotu 250 °C jednou danou rychlostí ohřevu (1; 2; 3; 5; 7; 10; 15; 20 a 30 °C.min⁻¹). Proměřením vzorků Griseofulvinu, jejichž příprava byla popsána v předešlé kapitole (2.1), byla získána pro každý vzorek charakteristická DSC křivka (Obr. 11) představující klíčový výsledek jednotlivých měření.



Obrázek 11: DSC křivka pro vzorek Griseofulvinu, A – frakce 0 – 180 μm, rychlost ohřevu 30 °C.min⁻¹, B – frakce 0 – 180 μm, rychlost ohřevu 1 °C.min⁻¹, C – frakce 180 – 500 μm, rychlost ohřevu 30 °C.min⁻¹, D – frakce 180 – 500 μm, rychlost ohřevu 1 °C.min⁻¹.

První méně znatelný efekt na DSC křivce (Obr. 11 A, C) je jev skelné transformace, jak si můžeme všimnout, není zde vytvořený pík, ale jedná se pouze o schod na DSC křivce. Skelná transformace je charakterizována teplotou skelné transformace T_g . V našem případě se tento jev objevuje při teplotě ≈ 85 °C a je velmi dobře oddělený od krystalizačního píku. To bohužel

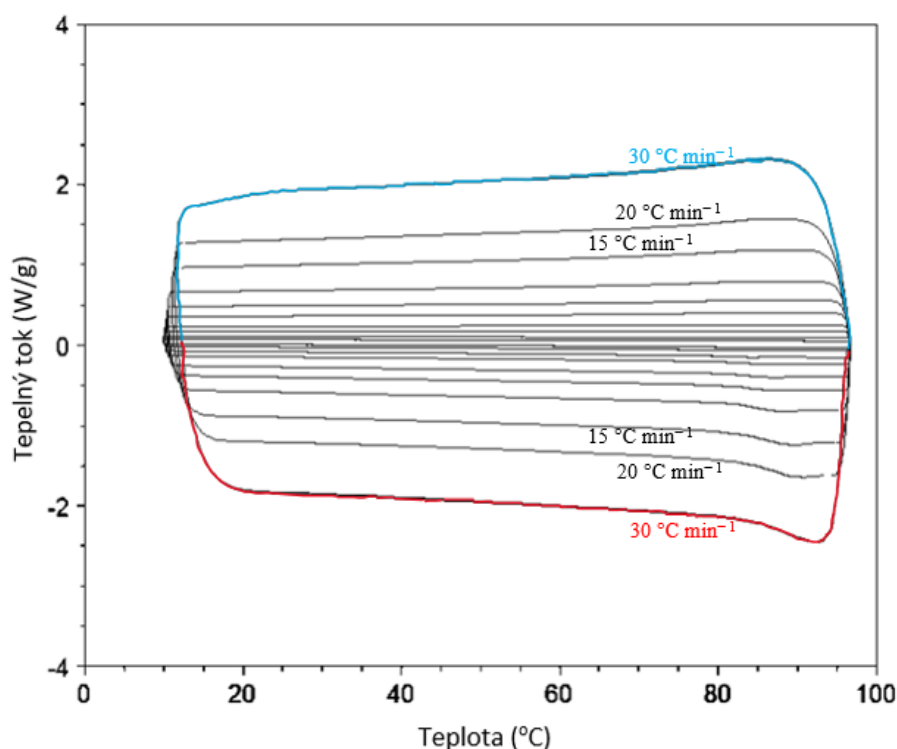
nemůžeme tvrdit ve všech případech našeho měření, jak je znatelné z Obrázku 11 B, D. Při nízkých rychlostech ohřevu (do $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) není možné oddělit krystalizaci od teploty skelné transformace, neboť se překrývají v jeden pík. Platí tedy, že čím větší je rychlost ohřevu, tím lépe je od sebe rozeznatelný jev skelné transformace a krystalizace.

Další tepelný přechod na DSC křivce je krystalizace (Obr. 11 A, C), kterou představuje jasně znatelný exotermní pík. Maximum krystalizačního píku T_p se zde pohybuje okolo $125\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na Obrázku 11 B, D jsou viditelné krystalizační píky dva. První maximum krystalizačního píku je zde už kolem $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čím vyšší je tedy rychlost ohřevu, tím je krystalizace posunuta k vyšším teplotám a to z důvodu, že materiál má při vyšších rychlostech ohřevu méně času na krystalizaci. Po tomto exotermickém ději (krystalizaci) následuje děj endotermní (tání). Tání viditelné na všech předešlých Obrázcích 11 A, B, C, D je zde poslední tepelný přechod.

2.2.2. STRUKTURNÍ RELAXACE

Ke studiu relaxačního chování byl použit cyklický teplotní program konkrétně cyklus konstantního poměru (CR), kde je vzorek střídavě ochlazován a zahříván přes T_g stejnou rychlostí, jak je znázorněno na Obrázku 12. Během cyklů CR poměr mezi rychlostí chlazení a následně aplikovanou rychlostí ohřevu q^-/q^+ zůstává konstantní (v našem případě rovno jedné). Při měření strukturní relaxace byl nejprve vzorek vytemperován na teplotu 10 °C a poté byl zahříván na teplotu 97 °C . Použité rychlosti chlazení byly $1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20$ a 30 °C min^{-1} a rychlosti ohřevu pro CR cykly byly stanoveny dle již zmíněné podmínky (poměr $q^-/q^+=1$).

Proměřením vzorků Griseofulvinu, jejichž příprava byla popsána v kapitole (2.1), byla získána pro každou frakci zobrazená závislost tepelného toku Φ na teplotě T (Obr. 12) představující klíčový výsledek jednotlivých měření. Na Obrázku 12 jsou vzestupně zobrazené tepelné toky pro rychlosti chlazení v horní části grafu, modrá křivka tedy odpovídá rychlosti chlazení 30 °C min^{-1} , a naopak pro rychlosti ohřevu jsou tepelné toky v dolní oblasti grafu seřazeny sestupně, červená křivka zobrazuje tepelný tok pro rychlost ohřevu 30 °C min^{-1} .



Obrázek 12: CR cykly Griseofulvinu (frakce: $0 - 180\ \mu\text{m}$)

Z tohoto obrázku je patrné, že teploty odpovídající relaxačnímu píku T_p se s rychlostí ohřevu q^+ zvyšují. Z tohoto grafu se vyhodnocuje extrém křivky ohřevu.

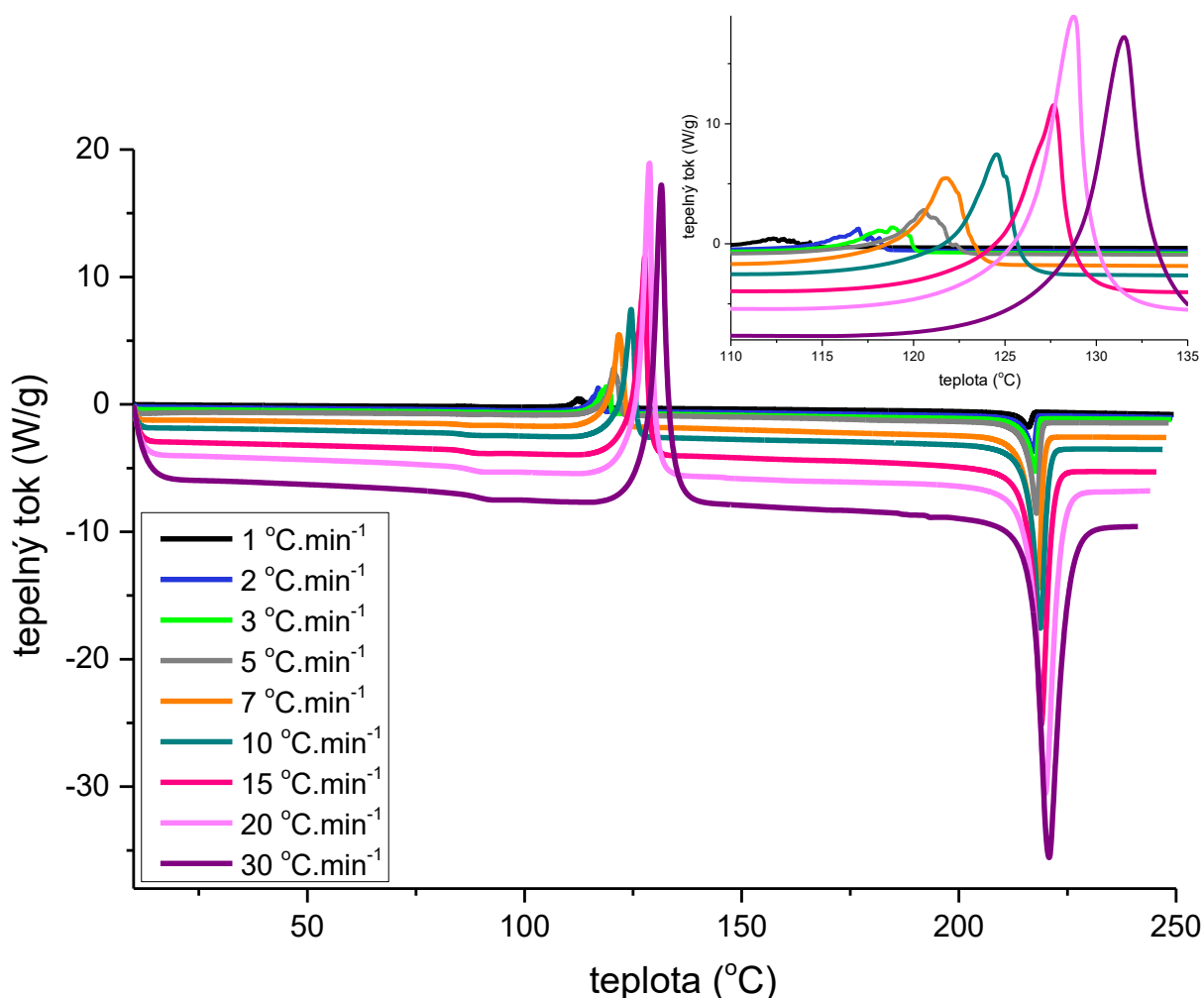
3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Připravené vzorky dvou získaných velikostních frakcí Griseofulvinu ve formě prášku byly studovány pomocí DSC a sloužily k měření kinetiky studovaného krystalizačního procesu a strukturní relaxace. U krystalizace a strukturní relaxace bude určen pouze základní parametr, a to aktivační energie.

3.1. KRYSTALIZACE

V této práci, jak již bylo několikrát zmíněno, bylo krystalizační chování amorfního léčiva Griseofulvinu studováno pomocí diferenční skenovací kalorimetrie DSC. Krystalizační chování bylo studováno na dvou velikostních frakcích (0 – 180 μm a 180 – 500 μm) za neizotermních podmínek.

Obrázek 13 zobrazuje tepelný tok Φ pro vzorky velikostní frakce 180 – 500 μm , kde je každý vzorek zahříván od 10 $^{\circ}\text{C}$ do 250 $^{\circ}\text{C}$ jinou rychlostí ohřevu v rozmezí od 1 do 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a také zobrazuje detail krystalizačních píků. Křivky pro jednotlivé rychlosti ohřevu jsou barevně odlišeny.



Obrázek 13: DSC křivka Griseofulvinu frakce 180 – 500 μm pro všechny studované rychlosti ohřevu s detailem krystalizačních píků.

Z přiblíženého detailu krystalizačních píků na Obrázku 13 si můžeme všimnout, že při nízkých rychlostech se objevují zubaté krystalizační píky. Právě u hrubší frakce jsou tyto nerovnosti krystalizačních píků pravděpodobně způsobené tím, že každé zrno materiálu ve vzorku při nízké rychlosti ohřevu krystalizuje zvlášť a nedochází tak ke slinutí materiálu během krystalizačního procesu.

Z Obrázku 13 je patrné, jako i z dalších nadcházejících Obrázků 15 – 16, že náběhová část píku je mírnější než sestupná. To může poukázat na krystalizaci, která neprobíhá pouze jedním jednoduchým krystalizačním mechanismem, ale zřejmě i na to, že zde pravděpodobně nekystalizuje jen jedna jediná krystalizační forma. Jedná se tedy o komplexní krystalizační proces, tzn., že nebude jenom jeden, ale budou tu probíhat nejméně dva krystalizační procesy. Pravděpodobně jedním z faktorů by tedy mohlo být to, že zde krystalizuje více polymorfů Griseofulvinu či existence více krystalizačních mechanismů.

Polymorfem se označuje látka existující ve více krystalických formách, jak již bylo popsáno v kapitole 1.1.6. a 1.1.6.1. Griseofulvin je schopen krystalizovat až ve třech formách, jejichž teploty tání a ΔH tání jsou v Tabulce 8. Forma I je termodynamicky stabilní, další dvě formy jsou metastabilní. Metastabilní forma II má neobvykle pomalou rychlost růstu krystalů ve srovnání s ostatními polymorfy.^[2] Každý polymorf navíc může krystalizovat jiným mechanismem, tzn., že může mít jiný mechanismus růstu krystalu (např. dislokační růst, pravidelný růst).

<i>Polymorf</i>	T_m (°C)	ΔH tání (J/g)
<i>Forma I</i>	219	116
<i>Forma II</i>	213	82
<i>Forma III</i>	204	78

Tabulka 8: Teploty tání T_m a entalpie ΔH polymorfů Griseofulvinu ^[2]

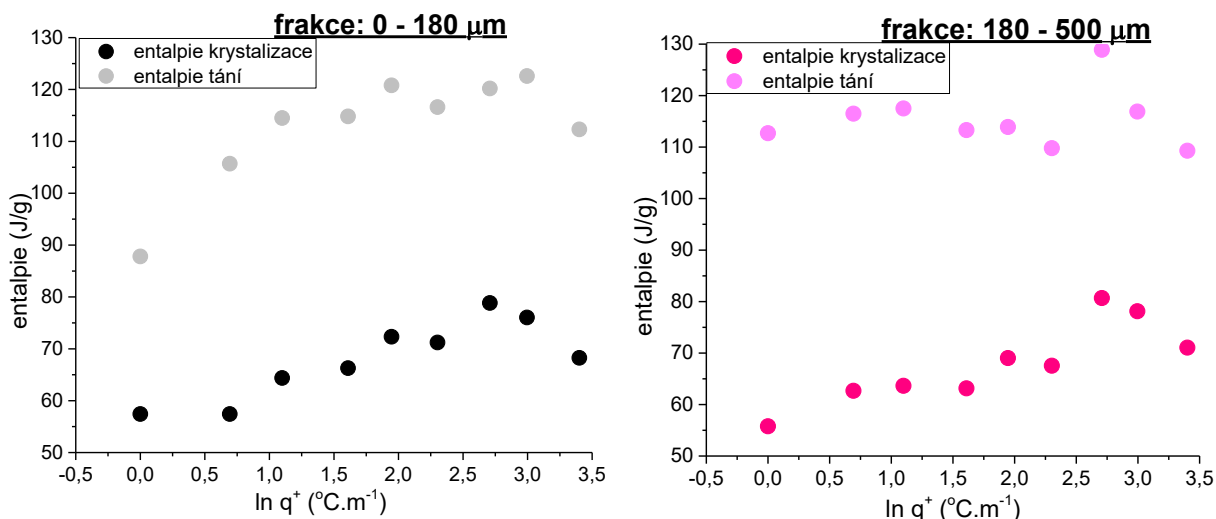
Zda v našem vzorku Griseofulvinu krystalizuje více jeho polymorfů, se může potvrdit pomocí metod strukturní analýzy (RDA, Ramanova mikroskopie/spektroskopie, IČ mikroskopie, mikroskopie ve VIS oblasti). Výsledky strukturní analýzy budou diskutovány v kapitole 3.2.

Dále je z Obrázku 13 zřejmé, že čím je větší rychlost ohřevu, tím je i lépe rozeznatelná oblast skelného přechodu tzn., že se nepřekrývá s krystalizačním píkem, jako je tomu u rychlosti ohřevu v rozmezí $1 - 3 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$. Tento překryv oblasti skelné transformace a krystalizace je zobrazen na Obrázku 15. Při vyšších rychlostech ohřevu se tedy posouvá

krystalizace k vyšším teplotám. Nicméně z této charakteristické DSC křivky můžeme určit i ΔH tepelného procesu.

Teplo uvolněné během růstu krystalů a teplo spotřebované táním amorfního Griseofulvinu může být snadno zjistitelné z plochy píku, protože teplo probíhajícího procesu je přímo úměrné ploše píku nad/pod základní linií.

Následující graf zobrazený na Obrázku 14 zachycuje závislost ΔH tání i ΔH krystalizace na přirozeném logaritmu všech námi studovaných rychlostech ohřevu pro jednotlivé velikostní frakce. Nalevo je graf pro jemnější velikostní frakci 0 – 180 μm , kde je ΔH tání zobrazeno světlejšími body v grafu a ΔH krystalizace představují body tmavé. Vpravo je graf pro velikostní frakci 180 – 500 μm , kde je ΔH tání a ΔH krystalizace vyznačena obdobně jako u grafu pro jemnější frakci.



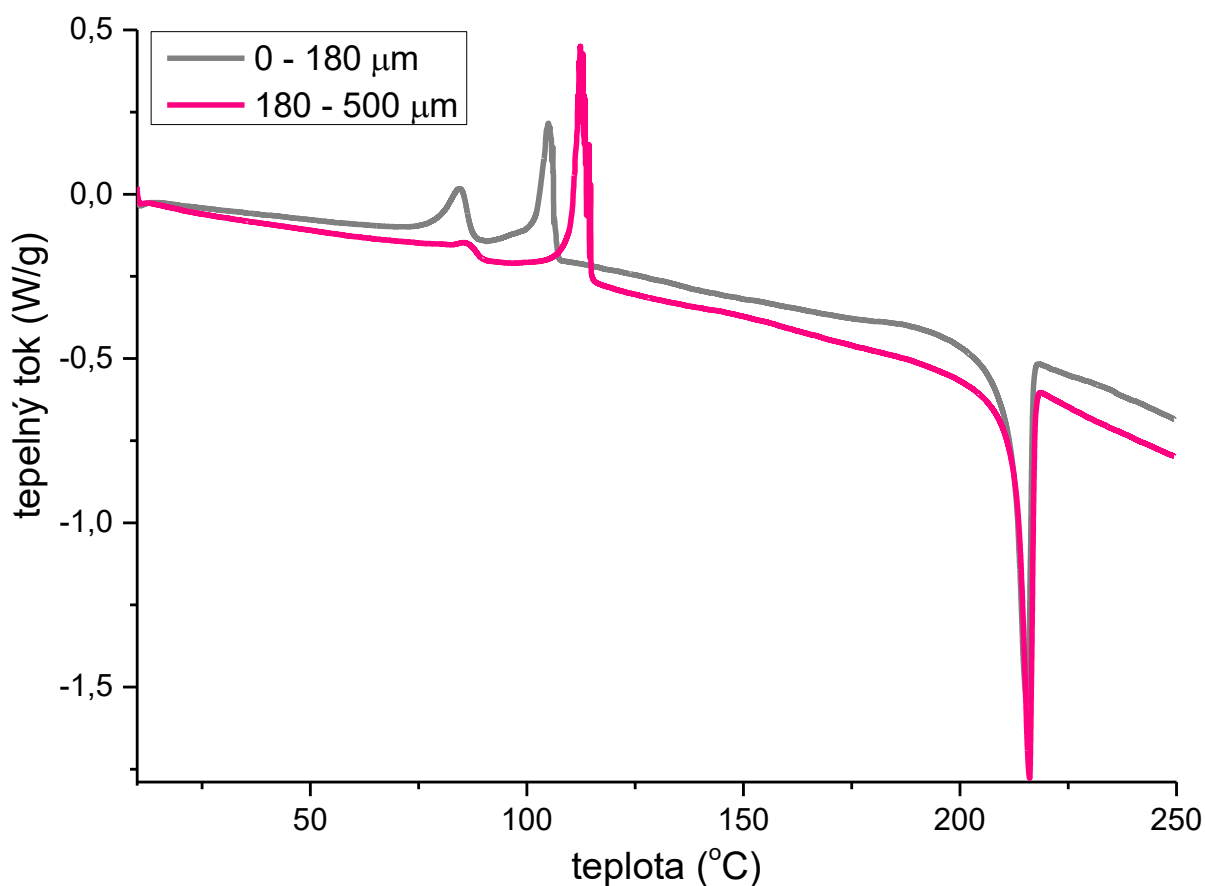
Obrázek 14: Závislost ΔH tání a ΔH krystalizace Griseofulvinu v závislosti na přirozeném logaritmu rychlosti ohřevu

Z Obrázku 14 je zřejmé, že spotřebované teplo během tání je zhruba 1,5x větší než teplo uvolněné během krystalizace. Ovšem hodnoty těchto tepel by měly být teoreticky srovnatelné. Zde si můžeme dovolit tvrdit, že hodnoty spotřebovaného tepla pro naměřená data tání jsou správné, protože u procesu tání, roztaje všechno, co se ve vzorku nachází ať už je to jakákoliv krystalická forma GSF. Můžeme tedy konstatovat, že existence v odlišnosti hodnot ΔH tání a ΔH krystalizace je způsoben hodnotami tepla krystalizace. Domníváme se, že odlišné hodnoty ΔH krystalizace by mohly být způsobeny následujícími jevy. Jednou možností by mohlo být, že se GSF mohl nacházet částečně v krystalickém stavu již před dominantní krystalizací, tedy už za teplotou skelné transformace T_g . Další z možností je to platnost Kirchhoffova zákona,

tedy závislost reakčního tepla (ΔH) jakéhokoli procesu na teplotě. Tepelné kapacity Griseofulvinu se před a po krystalizaci liší, tzn. je jiná hodnota tepelné kapacity amorfního Griseofulvinu a jiná hodnota tepelné kapacity krystalické fáze.

Na grafech (Obr. 14) jsou znatelné poklesy entalpie tání i entalpie krystalizace v rámci různých rychlostí ohřevu, která by mohly být pravděpodobně zapříčiněné tím, že látka v amorfní fázi neměla příležitost zkrystalizovat celá, tedy ze 100 %.

Obrázek 15 zobrazuje charakteristické DSC křivky, které byly změřeny pro obě zkoumané velikostní frakce při nejnižší rychlosti našeho experimentu. Tato závislost je pro velikostní frakci 0 – 180 μm znázorněna šedou křivkou a pro hrubší frakci 180 – 500 μm růžovou křivkou.

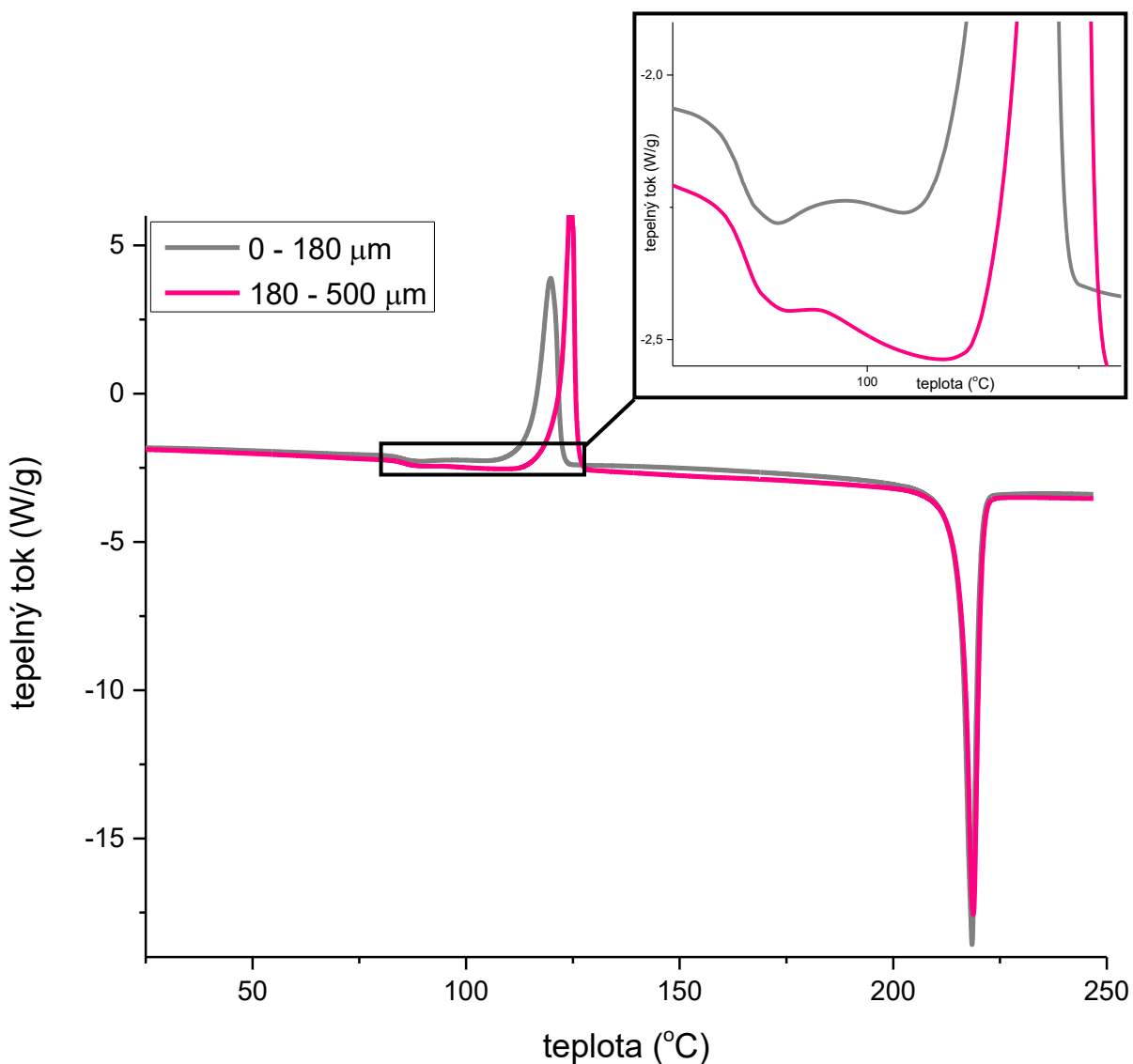


Obrázek 15: DSC křivka pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu při rychlosti $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$

Na Obrázku 15 si nelze nevšimnout, že při takto nízké rychlosti ohřevu ($1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) se na záznamu z DSC u obou velikostních frakcí objevují dva krystalizační píky a není zde jasně

oddělená oblast skelné transformace. U obou frakcí se tedy první krystalizační pík překrývá s oblastí skelné transformace.

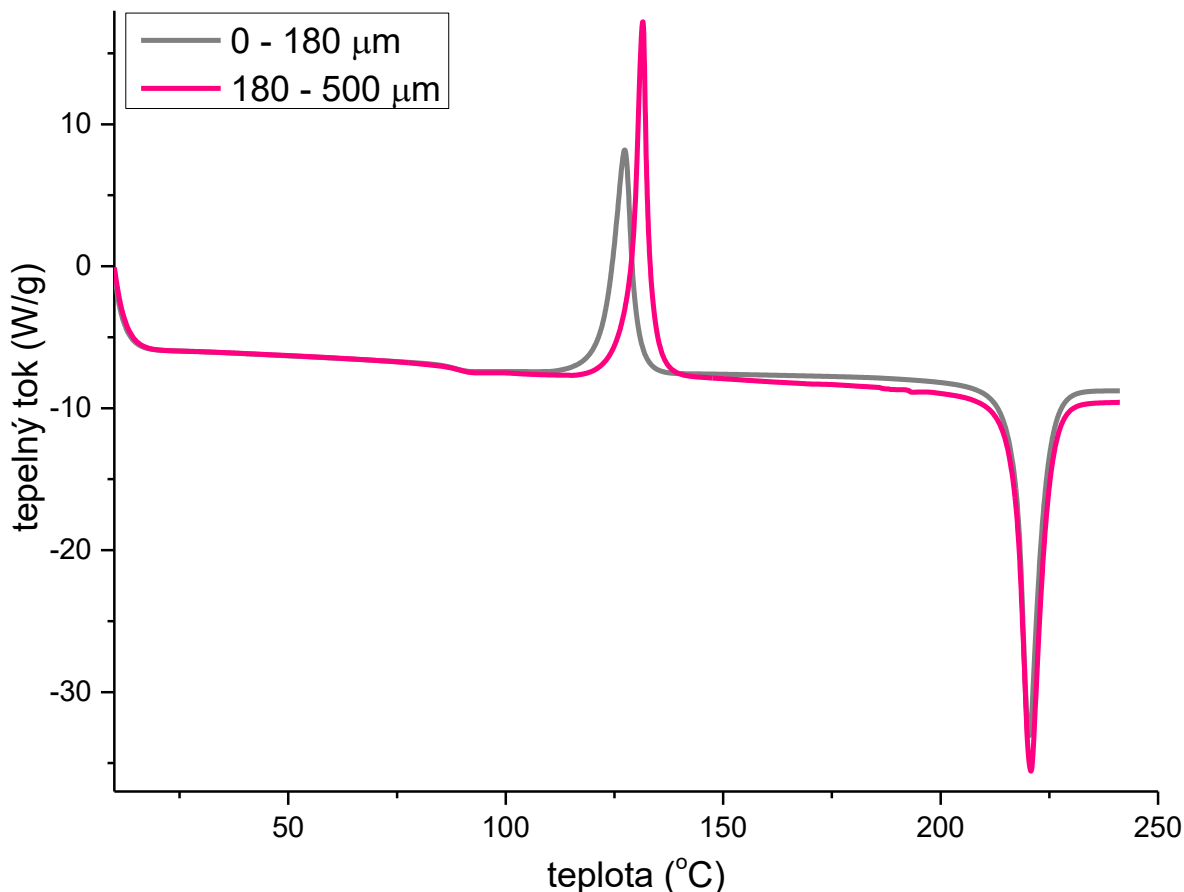
U následujícího Obrázku 16, který též vyobrazuje charakteristickou DSC křivku pro obě velikostní frakce (0 – 180 μm šedá křivka a 180 – 500 μm růžová křivka) ovšem už při vyšší rychlosti ohřevu, konkrétně $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, si můžeme všimnout, že se zde rovněž ještě vyskytují dva krystalizační píky. Z detailu je zřejmé, že u této vyšší rychlosti je již jednoznačně oddělitelná oblast skelné transformace od prvního krystalizačního píku. Takto viditelně oddělená oblast skelné transformace se vyskytuje od rychlosti $5\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ včetně. Vývoj teploty skelné transformace bude diskutován později.



Obrázek 16: DSC křivka pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu při rychlosti $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$

Při nízkých rychlostech ohřevu se u obou velikostních frakcí objevují dva krystalizační píky. Pravděpodobně to může být způsobené jevem, který se často objevuje u většiny farmaceutických substancí a nazývá se jako tzv. bezdifúzní povrchový růst krystalů. Tento růst krystalů probíhá již v blízkosti a pod teplotou skelné transformace T_g i přesto, že léčivo v takovém stavu je zatuhlé, nemá dostatek energie a dostatek prostoru, aby se molekuly začaly hýbat a mohla začít objemová krystalizace léčiva. Bezdifúzní růst krystalů amorfního Griseofulvinu probíhá pouze na volném povrchu a jedná se tak o povrchovou krystalizaci. To naznačuje, že povrchové molekuly jsou vysoce mobilní a schopné krystalizovat, ačkoli je jejich objemová mobilita nízká. Bezdifúzní růst je tedy zásadně spojen s mobilitou molekul na povrchu, protože proces růstu krystalu neustále vytváří dutiny a volné povrchy (důsledek vyšší hustoty krystalu než skla), což zase urychluje místní krystalizaci prostřednictvím vysoké povrchové mobility. Krystalizační proces GSF způsobuje velké zvýšení hustoty o 8 %, tato hodnota je větší než hodnoty uváděné pro jakékoli jiné amorfní látky (5 % nebo méně). To naznačuje, že krystalizační proces může vytvořit velké množství prázdného prostoru a volných povrchů, což zase urychluje lokální krystalizaci. Růst krystalů je rychlejší, čím je povrch více mechanicky poškozen (v našem případě byl prášek rozdrcen).^[68]

Následující Obrázek 17 ilustruje DSC křivky pro obě studované velikostní frakce při rychlosti ohřevu $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Z tohoto obrázku si můžeme všimnout, že při takto rychlém ohřevu se zde objevuje pro každou frakci pouze dominantní krystalizační pík.



Obrázek 17: DSC křivka pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu při rychlosti $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$

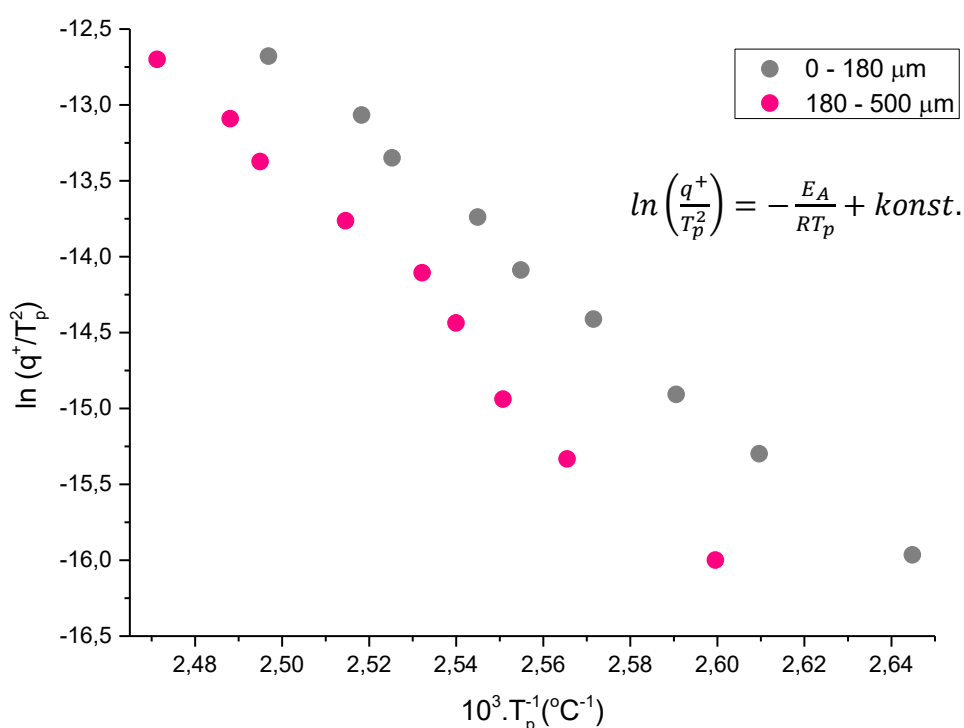
Z Obrázků 15 – 17 je u hrubší velikostní frakce vzorku patrná krystalizace probíhající při vyšších teplotách oproti frakci jemnější. Je to způsobené tím, že se u hrubší frakce výrazně zmenšuje povrch pro krystalizaci a s tím související koncentrace povrchových zárodků krystalizace.

3.1.1. ZÁKLADNÍ KINETICKÁ ANALÝZA KRYSTALIZACE

Jedním z prvních, a tudíž nejdůležitějších kroků při kinetické analýze experimentálních krystalizačních DSC dat, je určení aktivační energie krystalizace E_A . Hodnota aktivační energie pro krystalizaci v daném léčivu je potřebná k popisu průběhu děje ve vzorku a také umožní zvolit správný kinetický model, který předpoví chování tohoto léčiva za jakýchkoli dalších podmínek. Pro stanovení aktivační energie se dá využít několik metod, které jsou popsány v kapitole 1.3.1.

V mé práci je aktivační energie stanovena pomocí Kissingerovy metody. Tato metoda je jednoduchá a bývá tak nejčastěji využívána v praxi. Tato metoda je založená na posunu maxima píku T_p s rychlostí ohřevu q^+ . Z tohoto důvodu se využívá pouze za neizotermních podmínek. Princip této metody se řídí podle rovnice (2). Hodnota aktivační energie E_A lze stanovit ze směrnice (ve tvaru $-\frac{E_A}{R}$) lineární závislosti, kde je osa y reprezentována vztahem $\ln\left(\frac{T_p^2}{q^+}\right)$ a osa x vztahem $\frac{1000}{T_p}$.

Vývoj maxima krystalizačního píku s rychlostí ohřevu a s velikostí částic je zobrazen na Obrázku 18. Tento graf je nazýván jako „Kissinger plot“.



Obrázek 18: Kissingerova metoda – určení E_A krystalizačního procesu ze směrnice závislosti pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu

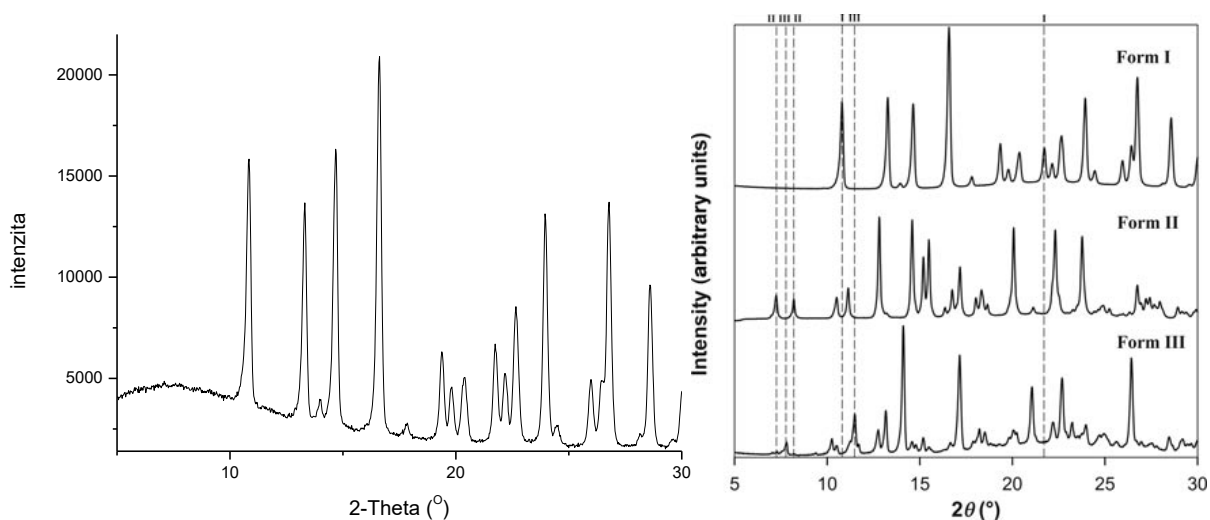
Hodnoty aktivační energie krystalizace Griseofulvinu pro obě velikostní frakce vypočítané pomocí rovnice (2) jsou vypsány v následující Tabulce 9.

Frakce (μm)	Hodnota E_A (kJ/mol)
0-180	190,3
180-500	220,9

Tabulka 9: Hodnoty aktivační energie krystalizace pro obě studované velikostní frakce Griseofulvinu

3.2. RENTGENOVÁ DIFRAKČNÍ ANALÝZA

V této práci je strukturní analýza vzorku Griseofulvinu určena pomocí RDA. RDA metoda se ve farmacii používá především k popisu polymorfismu farmaceutických molekul a pevných substancí. [30] Difrakční obraz krystalického Griseofulvinu, který jsme získali ozáření vzorku monochromatickým RTG zářením, můžeme vidět na následujícím Obrázku 19 vlevo.



Obrázek 19: Vlevo je náš výsledek z RDA pro vzorek zkoumaného krystalického Griseofulvinu a vpravo difrakční obrazce pro tři polymorfni formy Griseofulvinu – shora dolů: krystalická forma I, krystalická forma II a krystalická forma III. [69]

Jestliže na obrázku výše porovnáme graf námi naměřeného difrakčního obrazce krystalického Griseofulvinu (graf vlevo) s grafem difrakčního obrazce pro tři krystalické polymorfy Griseofulvinu (pravý graf), zjistíme, že píky našeho vzorku Griseofulvinu jednoznačně kopírují píky formy I z pravého obrázku. Dominantním polymorfem obsaženým v našem vzorku je tedy forma I. To že forma I má dominantní zastoupení potvrzuje i následující tabulka.

<i>Rychlost ohřevu</i> $q+$ ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)	<i>Frakce 0 – 180 μm</i>		<i>Frakce 180 – 500 μm</i>	
	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (J/g)
1	215,45	87,81	216,09	112,7
2	216,53	105,7	217,05	116,5
3	217,22	114,5	217,55	117,5
5	217,85	114,8	217,89	113,3
7	218,39	120,8	218,23	113,9
10	218,47	116,6	218,75	109,8
15	219,32	120,2	218,98	128,9
20	219,9	122,6	219,92	116,9
30	220,43	112,3	220,78	109,3
<i>Průměrné hodnoty:</i>	218,17	112,81	218,36	115,42

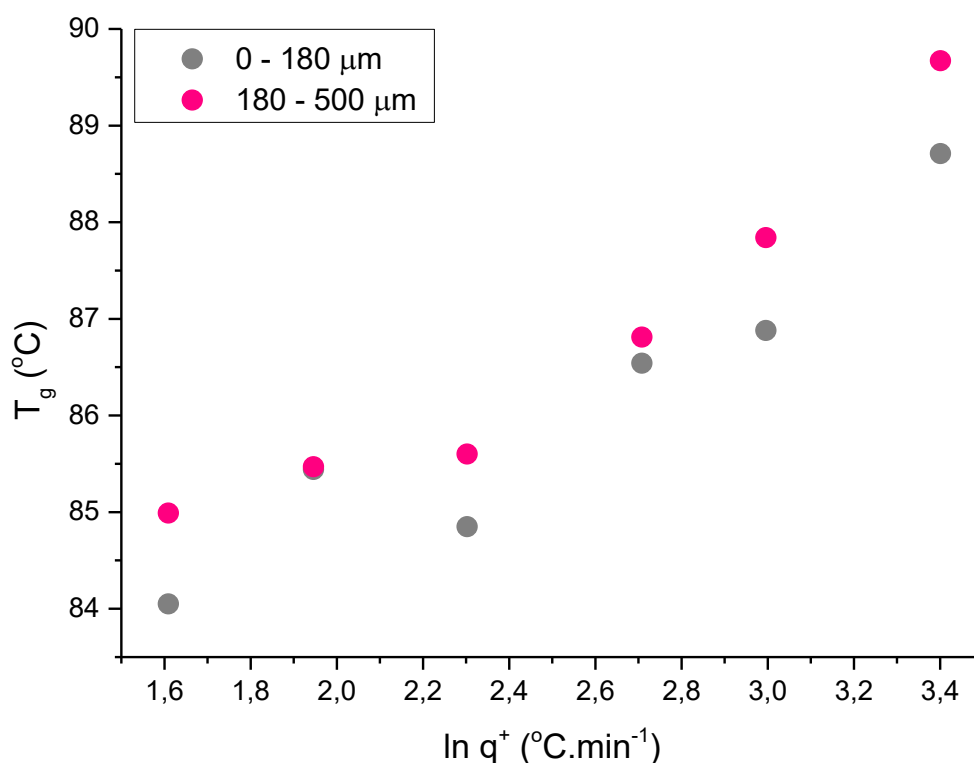
Tabulka 10: Odečtené hodnoty z DSC křivky obou velikostních frakcí Griseofulvinu pro teplotu tání T_m a entalpii ΔH

V Tabulce 10 jsou uvedené hodnoty obou studovaných velikostních frakcí pro teplotu tání T_m a entalpii ΔH , které byly vyhodnoceny z DSC křivky při různých rychlostech ohřevu. Průměrné hodnoty se téměř podobají hodnotám z Tabulky 8, kde je pro formu I definována teplota tání $219\text{ }^{\circ}\text{C}$ a entalpie 116 J/g .

V případě nejjemnější frakce při nejnižších rychlostech ohřevu existuje podle hodnot T_m a ΔH pravděpodobnost, že by Griseofulvin mohl krystalizovat v metastabilní formě II. Ostwaldovo pravidlo nám říká, že amorfni léčiva za kineticky řízených podmínek mají tendenci krystalizovat v takové formě, v jaké se nacházela v původním vzorku. U amorfniích léčiv se tedy vyskytuje kineticky řízená krystalizace, která podporuje výskyt polymorfů a záleží na experimentálních podmínkách, jak moc se která forma právě projeví.

3.3. SKELNÁ TRANSFORMACE

Vývoj teploty skelné transformace T_g v závislosti na přirozeném logaritmu rychlostí ohřevu q^+ vzorku ilustruje Obrázek 20. Zobrazené hodnoty T_g pro každou studovanou velikostní frakci zvlášť byly vypočteny z experimentálních dat. Tato závislost je pro velikostní frakci 0 – 180 μm znázorněna šedými body a pro hrubší frakci 180 – 500 μm růžovými body.



Obrázek 20: Závislost teploty skelné transformace Griseofulvinu na rychlostech ohřevu pro obě velikostní frakce

Na obrázku výše si můžeme všimnout, že rychlost ohřevu má velký vliv na hodnoty T_g , protože čím vyšší je rychlost ohřevu, tím vyšší je hodnota T_g .

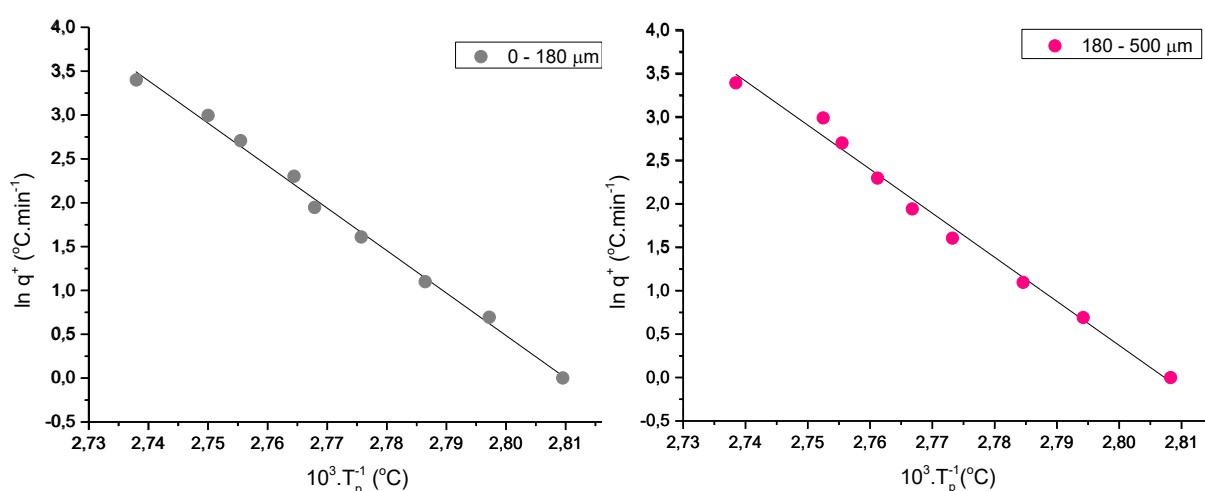
3.3.1. ZÁKLADNÍ KINETICKÁ ANALÝZA STRUKTURNÍ RELAXACE

Aktivační energie patří k nejdůležitějším veličinám pro každý fyzikální proces, včetně strukturní relaxace. K vyhodnocení aktivační energie strukturní relaxace Δh^* se dá využít několik metod, které jsou popsány v kapitole 1.4.1.1.1.1.

Zde jsme využili ke stanovení Δh^* metodu využívající výhod tepelných cyklů s konstantním poměrem rychlosti chlazení a ohřevu ($q^-/q^+ = \text{konst}$), tedy metodu z CR cyklů.

Tato metoda vychází z posunu teploty odpovídající maximu relaxačního píku T_p s aplikovanou rychlostí ohřevu a je dána rovnicí (14). Hodnota aktivační energie Δh^* je zde tedy stanovena ze směrnice (ve tvaru $-\frac{\Delta h^*}{R}$) lineární závislosti, kde osa y je tvořena vztahem $\ln(q^+)$ a osa x vztahem $\frac{1000}{T_p}$. Tato závislost pro obě frakce je zobrazena na následujícím Obrázku 21.

Obrázek 21 tedy znázorňuje závislost přirozeného logaritmu rychlosti ohřevu (30, 20, 15, 10, 7, 5, 3, 2, 1 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$) na převrácené hodnotě teploty náležící extrému křivky, která byla určena z výsledků DSC měření. Příklad výsledku měření pro frakce 0 – 180 μm je znázorněn na Obrázku 12.



Obrázek 21: Stanovení Δh^* pomocí CR cyklů ze směrnice závislosti pro obě studované frakce *Griseofulvinu*

Z obrázku výše lze vyčíst, že aktivační energie pro nižší rychlosti ohřevu bude vyšší, a naopak pro vyšší rychlosti ohřevu bude získána nižší aktivační energii strukturní relaxace.

V následující Tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty aktivační energie strukturní relaxace Δh^* , které byly stanoveny dle rovnice (14) pro jednotlivé frakce *Griseofulvinu*.

Frakce (μm)	Hodnota E_A (kJ/mol)
0 – 180	402,8
180 – 500	421,5

Tabulka 11: Hodnoty aktivační energie strukturní relaxace pro obě studované velikostní frakce *Griseofulvinu*

4. ZÁVĚR

V této bakalářské práci byla pomocí metody diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) studována krystalizace a strukturní relaxace léčiva Griseofulvinu v amorfní formě při neizotermních podmínkách. Výzkum amorfních léčiv je důležitý, neboť pomocí amorfních léčiv ve srovnání s krystalickými protějšky lze dosáhnout vyšší rozpustnosti léčiva a tím i biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv.

V první části práce byla zpracována literární rešerše o léčivu Griseofulvin, ve které jsou popsány jeho fyzikální a chemické vlastnosti, použití, toxicita a mnoho dalších zajímavých informací. Následně byla také představena zásadní metoda této práce, a to diferenční skenovací kalorimetrie. V neposlední řadě byla popsána kinetická analýza krystalizačních a strukturních relaxačních dat diferenční skenovací kalorimetrie.

Cílem práce byla interpretace výsledných DSC křivek vzorků Griseofulvinu pro dvě studované velikostní frakce při různých rychlostech ohřevu a následné vyhodnocení aktivační energie, která patří k důležitým veličinám pro každý fyzikální proces, včetně strukturní relaxace a krystalizace.

Pomocí diferenční skenovací kalorimetrie byly pozorovány pravděpodobně dvě různé krystalické formy (polymorfy) Griseofulvinu, termodynamicky stabilní forma I a metastabilní forma II. U amorfních léčiv se vyskytuje kineticky řízená krystalizace a záleží na experimentálních podmínkách, jak moc se která forma právě projeví. Pouze v případě nejjemnější frakce při nejnižších rychlostech ohřevu existuje pravděpodobnost, že by Griseofulvin mohl dominantně krystalizovat v metastabilní formě II. Pro ověření existence polymorfů ve vzorku Griseofulvinu byla v mé práci uplatněna rentgenová difrakční analýza, která potvrdila, že dominantním polymorfem obsaženým v našem vzorku je forma I.

5. POUŽITÁ LITERATURA

1. PAGUIGANA, Noemi D., AL-HUNITI, Mohammed H., RAJA, Huzefa A., CZARNECKI, Austin, BURDETTE, Joanna E., GONZÁLEZ-MEDINA, Mariana, MEDINA-FRANCO, José L., POLYAK, Stephen J., PEARCE, Cedric J., CROATT, Mitchell P. a OBERLIES, Nicholas H.. *Chemoselective fluorination and chemoinformatic analysis of griseofulvin: Natural vs fluorinated fungal metabolites*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2017**, 25 (20), 5238-5246.
2. SU, Yuan, XU, Jia, SHI, Qin, YU, Lian a CAI Ting. Polymorphism of griseofulvin: concomitant crystallization from the melt and a single crystal structure of a metastable polymorph with anomalously large thermal expansion. *Chemical Communications*. **2018**, 54 (4), 358-361.
3. PETERSEN, Asger B., RØNNEST, Mads H., LARSEN, Thomas O. a CLAUSEN Mads H.. The Chemistry of Griseofulvin. *Chemical Reviews*. **2014**, 114 (24), 12088-12107.
4. NIGAM, Poonam a SINGH, Dalel. Production of Secondary Metabolites – Fungi. In: ROBINSON, Richard K. *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press, **2000**, s. 1323. Vol. 1-3. ISBN: 0-12-227070-3.
5. STEGLICH, Wolfgang, FUGMANN, Burkhard a LANG-FUGMANN, Susanne. GABA to Gyroporin. *RÖMPP Encyclopedia Natural Products*. New York: Thime Medical Publishers Inc., **2000**, s. 273. ISBN: 0-86577-988-0.
6. IARC Working Group. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans - Some Thyrotropic Agents*. Lyon: IARC, **2001**, s. 291-315. Vol. 79. ISBN: 978-92-832-1579-0.
7. SHI, Qin a CAI, Ting. Fast crystal growth of amorphous griseofulvin: relations between bulk and surface growth modes. *Crystal Growth & Design*. **2016**, 16 (6), 3279-3286.
8. MEHTA, S. C., KAR, Ashutosh. Chemotherapy of Leprosy, Fungal Diseases, Viral Diseases and Sexualit Transmitted Disease. *Pharmaceutical Pharmacology*. London: New Academic Science Limited, **2014**, s. 778. ISBN: 978 1 781830 68 0.
9. KAWAKAMI, Kohsaku a PIKAL, Michael J.. Calorimetric investigation of the structural relaxation of amorphous materials: Evaluating validity of the methodologies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2005**. 94 (5), 948-965.

10. LI, Yuhui, YU, Janguang, HU, Shenye, CHEN, Zhenxuan, SACCHETTI, Mark, SUN, Changquan Calvin, a YU, Lian. Polymer Nanocoating of Amorphous Drugs for Improving Stability, Dissolution, Powder Flow, and Tableability: The Case of Chitosan-Coated Indomethacin. *Molecular Pharmaceutics*. **2019**, 16 (3), 1305-1311.
11. HAINER, B. L.. Dermatophyte Infections. *Am. Fam. Physician*. **2003**, 67 (1), 101-109.
12. SOUZA, Pedro F. N., LIMA, Patrícia G., FREITAS, Cleverson D. T., SOUSA, Daniele O. B., NETO, Nilton A. S., DIAS, Lucas P., VASCONCELOS, Ilka M., FREITAS Larissa B. N., SILVA, Rafael G. G., SOUSA, Jeanlex S., SILVA, Ayrles F. B. a OLIVEIRA, Jose T. A.. Antidermatophytic activity of synthetic peptides: Action mechanisms and clinical application as adjuvants to enhance the activity and decrease the toxicity of Griseofulvin. *Mycoses Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*. **2020**, 63 (9), 889-1001.
13. RATHINASAMY, Krishnan, JINDAL, Bhavya, ASTHANA, Jayant, SINGH, Parminder, BALAJI, Petety V. a PANDA, Dulal. Griseofulvin stabilizes microtubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. *BMC Cancer*. **2010**, 10 (213), 1-13.
14. BERTHIER, Jean. Cell manipulations in EWD: In *Micro-Drops and Digital Microfluidics*. 2nd Edition. Oxford: Elsevier, **2013**, s.376. ISBN: 978-1-4557-2550-2.
15. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for CID 13342, Vinblastine; [citováno 10.4.2022]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinblastine>
16. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for CID 441140, Griseofulvin; [citováno. 13.4.2022]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Griseofulvin>
17. WOODWARD, K. N., The toxicity of particular veterinary drug residues. In: WATSON, David H.. Pesticide, veterinary and other residues in food. Boca Raton: CRC Press, **2004**, s.175-177. ISBN: 0-8493-2558-7.

18. KING, Coleman T., ROGERS, P. David, CLEARY, John D. a CHAPMAN, Stanley W.. Antifungal Therapy During Pregnancy. *Clinical Infectious Diseases*. **1998**, 27, 1157.
19. MURO-CACHO, Carlos A. Carcinogenesis. In: HARBISON, Raymond D., BOURGEOIS, Marie M. a JOHNSON, Giffe T.. Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology (6th Edition). Hoboken: John Wiley & Sons, **2015**, 1149. ISBN: 978-0-470-92973-5.
20. REBACZ, Blanka, LARSEN, Thomas O., CLAUSEN, Mads H., RØNNEST. Mads H., LÖFFLER, Harald, HO, Anthony D., a KRÄMER, Alwin. Identification of Griseofulvin as an Inhibitor of Centrosomal Clustering in a Phenotype-Based Screen. *Cancer Research*. **2007**, 67 (13), 6342-6350.
21. PATOČKA, Jiří, STRUNECKÁ, Anna a STIBOROVÁ, MARIE. Inhibitory Mikrotubulů. *Chemické Listy*. **2001**, 95 (11), 700-707.
22. BUCHTA, Vladimír, SLEZÁK, Radovan, ŠPAČEK, Jiří, KOŠTÁLOVÁ, Marie, VEJSOVÁ, Marcela a DOLEŽAL, Martin. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Aktuální farmakoterapie*. **2009**, 5 (6), 279-288.
23. BUCHTA, Vladimír, SLEZÁK, Radovan, ŠPAČEK, Jiří, KOŠTÁLOVÁ, Marie, VEJSOVÁ, Marcela a DOLEŽAL, Martin. Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz. *Klin Farmakologie a Farmacie*. **2008**, 22 (2), 72-75.
24. OLSON, Jazmine M. a TROXELL, Todd. Griseofulvin. National Library of Medicine [online]. StatPearls Publishing LLC, © 2022. Last Revised: 2021 [cit. 2. 5. 2022]. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537323/#_article-22435_s4
25. ARONSON, J.K. Griseofulvin. In: *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions*. Sixteenth Edition. Elsevier, **2016**, 628. ISBN: 978-0-444-53716-4.
26. GRISEOFULVIN-griseofulvin suspension. National Library of Medicine [online]. Actavis Pharma, Inc., Last Revised: 2020. [cit. 2. 5. 2022]. Dostupné z: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/fda/fdaDrugXsl.cfm?setid=af318d5d-cc39-4a63-a590-b87c50f2694f>

27. WAGNER, Matthias. Polymorphism. In: *Thermal Analysis in Practice - Fundamental Aspects*. Mnichov: Hanser Publishers, **2018**, s. 283-286. ISBN 978-1-56990-643-9.
28. ZHAO, Shaolei, MA, Yiming, GONG, Junbo, HOU, Baohong a TANG, Weiwei. Solid-liquid phase equilibrium and thermodynamic analysis of griseofulvin in twelve mono-solvents. *Journal of Molecular Liquids*. **2019**, 296, 1-10.
29. KRATOCHVÍL, Bohumil, HUŠÁK, Michal, BRYNDA, Jiří a SEDLÁČEK Juraj. Co nabízí současná RTG strukturní analýza? *Chemické Listy*. **2008**, 102, 889-901.
30. KRATOCHVÍL, Bohumil, HUŠÁK, Michal, KOROTKOVA, Elena I. a JEGOROV, Alexandr. Význam stanovení RTG krystalových struktur pro farmacii. *Chemické Listy*. **2016**, 110, 40-47.
31. SMALLMAN, R.E. BISHOP, R.J. (1999). The characterization of materials. In: *Modern Physical Metallurgy and Materials Engineering - Science, Process, Applications*. 6th Edition. Oxford: Butterworth-Heinemann, **1999**, s. 133-138. ISBN: O 7506 4564 4.
32. BUNACIU, Andrei A., UDRIȘTIOIU, Elena Gabriela a ABOUL-ENEIN, Hassan Y. X-Ray Diffraction: Instrumentation and Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2015**, 45 (4),s. 289.
33. VIJAYAN, Smitha a SHAIKMOIDEEN, Jisha Manakulam. Chitosan Conjugate of Biogenic Silver Nanoparticles: A Promising Drug Formulation with Antimicrobial and Anticancer Activities. In: RAI, Mahendra, RAZZAGHI-ABYANEH, Mehdi a INGLE, Avinash P.. *Nanobiotechnology in Diagnosis, Drug Delivery, and Treatment*. John Wiley & Sons., **2021**, s. 276-277. ISBN: 978-1-119-67177-0.
34. VRANÍKOVÁ, Barbora, FRANC, Aleš a GAJDZIOK, Jan. Inovativní lékové formy pro těžce rozpustná léčiva. *Remedia*. **2014**, 24, 312-314.
35. KRATOCHVÍL, Bohumil. Rozpustnost, rozpouštěcí rychlost, prostupnost (permeabilita), biodostupnost. Předmět: Chemie a fyzika pevných léčiv. Vysoká škola Chemicko-technologická v Praze. ©2015. [cit. 30.4.2022]. Dostupné z: <http://uchpel.vscht.cz/files/uzel/0022888/Rozpustnost%202015.pdf?redirected>

36. OKÁČOVÁ, Ladislava, VETCHÝ, David, FRANC Aleš, RABIŠKOVÁ, Miroslava a KRATOCHVÍL Bohumil. Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací. *Chemické listy*. **2010**, 104 (1), 21-26.
37. DAHAN, Arik, WOLK, Omri, KIM, Young Hoon, RAMACHANDRAN, Chandrasekharan, CRIPPEN, Gordon M., TAKAGI, Toshihide, BERMEJO, Marival a AMIDON, Gordon L.. Purely in Silico BCS Classification: Science Based Quality Standards for the World's Drugs. *Mol. Pharmaceutics*. **2013**, 10 (11), 4378–4390.
38. CHAVDA, Hitesh V., PATEL C.N. a ANAND, Indermeet Singh. Biopharmaceutics Classification System. *Systematic Reviews in Pharmacy*. **2010**, 1(1), 62-69.
39. FUJIOKA, Yoshitsugu, METSUGI, Yukiko, OGAWARA, Ken-ichi, KAZUTAKA, Higaki a KIMURA, Toshikuro. Evaluation of in vivo dissolution behavior and GI transit of griseofulvin, a BCS class II drug. *International Journal of Pharmaceutics*. **2008**, 352 (1–2), 36-43.
40. KARAMI, Thomas K., HAILU, Shumet, FENG, Shaoxin, GRAHAM, Richard a GUKASYAN, Hovhannes J.. Eyes on Lipinski's Rule of Five: A New “Rule of Thumb” for Physicochemical Design Space of Ophthalmic Drugs. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. **2022**, 38 (1), 43-55.
41. BLAŽEK, Antonín. *Termická analýza*. 1st. ed. Praha: STNL – Nakladatelství technické literatury, **1972**, 296.
42. SEILEROVÁ, Lenka, BRUSOVÁ, Hana, KRATOCHVÍL, Bohumil a KREJČÍK, Lukáš. Využití metod termické analýzy ve výzkumu a vývoji léčiv. *Chemické listy*. **2012**, 106 (10), 890-895.
43. KLOUŽKOVÁ, A., ZEMENOVÁ, P., KLOUŽEK, J. a PABST, W.. *Termická analýza*. Praha: VŠCHT, **2012**.
44. VŠCHT. *Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)* [online]. [cit.23.3.2022] Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/cwl2js87vLAsPwUA.pdf?redirected>
45. ŠTARHA, Pavel; TRÁVNÍČEK, Zdeněk. *Termická analýza*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, **2011**.

46. AUROUX, Aline. The Differential Scanning Calorimetry Technique. In: *Calorimetry and Thermal Methods in Catalysis*. Berlin: Springer-Verlag, **2013**, s 58-71. ISBN: 978-3-642-11953-8.
47. MENCZEL, Joseph D., JUDOVITS, Lawrence, PRIME, R. Brauce, BAIR, Harvey E., READING, Mike a SWIER, Steven. Differential Scanning Calorimetry (DSC). In: MENCZEL, Joseph D. a PRIME, R. Brauce. *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*. Hoboken: John Wiley, **2009**, s 7-241. ISBN: 978-0-471-76917-0.
48. BROWN, Michael. E.. Differential thermal analysis (DTA) and Differential scanning calorimetry (DSC). In: *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications*. 2nd ed. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers **2004**, s. 57-88. ISBN: 1-4020-0211-4
49. VŠCHT. *Diferenciální skenovací kalorimetrie* [online]. [cit.23.3.2022] Dostupné z: <https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0014043/0022~cw12jlc0ysxKzTMyMLQAAA.pdf?re-directed>
50. MÁLEK, Jiří. Kinetic analysis of crystallization processes in amorphous materials. *Thermochimica Acta*. **2000**, 355 (1-2), 239-253.
51. SVOBODA, Roman a MÁLEK Jiří. How nucleation-growth kinetics is influenced by initial degree of material crystallinity. *Thermochimica Acta*. **2016**, 631, 28-35.
52. SVOBODA, Roman a MÁLEK, Jiří. Interpretation of crystallization kinetics results provided by DSC. *Thermochimica Acta*. **2011**, 526, 237–251.
53. SVOBODA Roman, BRANDOVÁ Daniela a MÁLEK Jiří. Non-isothermal crystallization kinetics of GeTe₄ infrared glass. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **2016**, 123, 195–204.
54. SVOBODA, Roman a MÁLEK, Jiří. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*. **2012**.
55. HUANG, L.J., LI, Lu, LIANG, G.Y. GUO, Yong-Li, WU, D.C.. Crystallization kinetics of Mg₆₅Cu₂₅Nd₁₀ amorphous alloy. *Journal of Non-Crystalline Solids*. **2008**, 354 (10-11), 1048-1053.
56. MÁLEK, Jiří. Habilitační práce. **1996**.

57. PHAN, Anh D., WAKABAYASHI, Katsunori, PALUCH, Marian a LAM, Vu D.. Effects of cooling rate on structural relaxation in amorphous drugs: elastically collective nonlinear Langevin equation theory and machine learning study. *RSC Advances*. **2019**, 9, 40214-40221.
58. PHAN, Anh D., KNAPIK-KOWALCZUK, Justyna, PALUCH, Marian, HOANG, Trinh X. a WAKABAYASHI, Katsunori. Theoretical Model for the Structural Relaxation Time in Coamorphous Drugs. *Mol. Pharmaceutics*. **2019**, 16 (7), 2992–2998.
59. SVOBODA, Roman, HONCOVÁ, Pavla a MÁLEK, Jiří. Apparent activation energy of structural relaxation for Se₇₀Te₃₀ glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*. **2010**, 356 (3), 165-168.
60. SVOBODA, Roman, PUSTKOVÁ, Pavla a MÁLEK Jiří. Structural relaxation of polyvinyl acetate (PVAc). *Polymer*. **2008**, 49 (13–14), 3176-3185.
61. KAWAKAMI, Kohsaku a PIKAL, Michael J.. Calorimetric investigation of the structural relaxation of amorphous materials: Evaluating validity of the methodologies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2005**. 94(5), 948-965.
62. MÁLEK, Jiří a SVOBODA, Roman. Kinetic Processes in Amorphous Materials Revealed by Thermal Analysis: Application to Glassy Selenium. *Molecules*. **2019**, 24 (15), 2725.
63. SVOBODA, Roman, SETNIČKA, Michal, ZMRHALOVÁ, Zuzana, BRANDOVÁ, Daniela a MÁLEK, Jiří. Structural interpretation of the enthalpy relaxation kinetics of (GeTe₄)_y(GaTe₃)_{1-y} far-infrared glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*. **2016**, 447, 110–116.
64. WEYER, Stefan, MERZLYAKOV, Mikhail a SCHICK, Christoph. Application of an extended Tool–Narayanaswamy–Moynihan model: Part 1. Description of vitrification and complex heat capacity measured by temperature-modulated DSC. *Thermochimica Acta*. **2001**, 377 (1–2), 85-96.
65. SVOBODA, Roman. Utilization of “q+/q- = const.” DSC cycles for physical aging studies. *European Polymer Journal*. **2014**, 59, 180-188.

66. SVOBODA, Roman a MÁLEK, Jiří. Interpretation of Tool–Narayanaswamy–Moynihan Relaxation Parameters. *Scientific papers of the University of Pardubice. Series A, Faculty of Chemical Technology*. **2012**, 47-65.
67. SVOBODA, Roman. Novel equation to determine activation energy of enthalpy relaxation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. **2015**, 121, 895-899.
68. HUANG, Chengbin, RUAN, Shigang, CAI, Ting a YU, Lian. Fast Surface Diffusion and Crystallization of Amorphous Griseofulvin. *The Journal of Physical Chemistry B*. **2017**, 121 (40), 9463-9468.
69. MAHIEU, Aurelien, WILLART, Jean-francois, DUDOGNON, Emeline EDDLESTON, Mark D., JONES, William, DANÈDE, Florence a DESCAMPS, Marc. On the Polymorphism of Griseofulvin: Identification of Two Additional Polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2013**, 102 (2), 462-468.