

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Termokinetická charakterizace léčiva griseofulvinu

Diplomová práce

2024

Bc. Kateřina Kozlová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Kozlová**
Osobní číslo: **C22411**
Studijní program: **N0531A130035 Fyzikální chemie**
Téma práce: **Termokinetická charakterizace léčiva griseofulvin**
Téma práce anglicky: **Thermokinetic characterization of the griseofulvin drug**
Zadávající katedra: **Katedra fyzikální chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte teoretickou rešerši na téma diferenční skenovací kalorimetrie, termogravimetrie, Ramanova spektroskopie a jejich využití ve farmacii.
 2. Studujte termické chování vybrané farmaceutické substance metodou diferenční skenovací kalorimetrie, termogravimetrie, Ramanovy spektroskopie.
 3. Proveďte analýzu experimentálních DSC krystalizačních dat pomocí softwarového vybavení.
 4. Využijte metod strukturní analýzy k provedení strukturní charakterizace vybraného léčiva.
 5. Využijte metody disoluce k získání informace o farmakokinetickém chování studované účinné látky.
 6. Diskutujte výsledky krystalizační, strukturní analýzy a disolučního testu.
 7. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce.
- Seznam odborné literatury: Veškerá dostupná odborná literatura.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Daniela Košťálová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Roman Svoboda, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Datum zadání diplomové práce: **29. února 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Termokinetická charakterizace léčiva 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 9. května 2024

Kateřina Kozlová v.r.

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Daniele Košťálové, Ph.D. za přístup, odborný dohled a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marii Nevyhoštěné za odborný dohled a především panu Ing. Romanu Svobodovi, Ph.D. za obětovaný čas a za cenné rady při zpracování dat v této práci.

Obrovské poděkování patří také mojí rodině za podporu při studiu.

ANOTACE

Předložená diplomová práce je zaměřena na zkoumání amorfního léčiva griseofulvinu, které se používá jako antimykotikum k léčbě plísňové infekce. Griseofulvin byl zkoumán řadou metod. Ke zkoumání krystalizace sloužila optická mikroskopie a diferenční skenovací kalorimetrie. Diferenční skenovací kalorimetrie byla taktéž použita ke zkoumání kinetiky krystalizace a následně pomocí kinetického modelu byla určena predikce chování griseofulvinu. Další použitá metoda v této práci byla termogravimetrie, pomocí které byl zkoumán teplotní rozklad griseofulvinu. Nakonec byl griseofulvin podroben disoluční zkoušce, která je pro farmaceutický průmysl velmi důležitá.

KLÍČOVÁ SLOVA

termická analýza, diferenční skenovací kalorimetrie, termogravimetrie, Ramanova spektroskopie, mikroskopie, disoluční zkouška, stabilita, amorfní látky, griseofulvin, kinetika, krystalizace, tepelné rozklady

TITLE

Thermokinetic characterization of the Griseofulvin drug

ANNOTATION

The presented diploma thesis is focused on the investigation of the amorphous drug griseofulvin, which is used as an antifungal drug for the treatment of fungal infection. Griseofulvin has been investigated by a number of methods. Optical microscopy and differential scanning calorimetry were used to investigate crystallization. Differential scanning calorimetry was also used to investigate the kinetics of crystallization, and then a kinetic model was used to predict the behavior of griseofulvin. Another method used in this work was thermogravimetry, which was used to investigate the thermal decomposition of griseofulvin. Finally, griseofulvin was subjected to a dissolution test, which is very important for the pharmaceutical industry.

KEYWORDS

thermal analysis, differential scanning calorimetry, thermogravimetry, Raman spectroscopy, microscopy, dissolution test, stability, amorphous substances, griseofulvin, kinetics, crystallization, thermal decompositions

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM TABULEK.....	15
ÚVOD	16
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	17
1.1. GRISEOFULVIN.....	17
1.1.1. <i>POUŽITÍ A MECHANISMUS ÚČINKU</i>	18
1.1.2. <i>TOXIKOLOGIE</i>	18
1.2. GRISEOFULVIN A POLYMORFISMUS.....	19
1.3. AMORFNÍ LÁTKY.....	21
1.4. OPTICKÁ MIKROSKOPIE.....	22
1.5. TERMICKÁ ANALÝZA	24
1.5.1. <i>DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE</i>	25
1.5.1.1. KOMPENZAČNÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE.....	25
1.5.1.2. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE S TEPELNÝM TOKEM.....	26
1.5.1.3. VÝSTUP Z DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE.....	27
1.5.2. <i>TERMOGRAVIMETRIE</i>	29
1.6. RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	31
1.7. DISOLUČNÍ STUDIE	32
1.7.1. <i>METODY PROVEDENÍ DISOLUČNÍ ZKOUŠKY</i>	33
1.7.2. <i>DISOLUČNÍ MÉDIUM</i>	33
1.7.3. <i>MECHANISMUS UVOLŇOVÁNÍ LÉČIVA Z LÉKOVÉ FORMY</i>	34
1.8. KINETICKÁ ANALÝZA	35
1.8.1. <i>URČENÍ AKTIVAČNÍ ENERGIE</i>	36
1.8.1.1. KISSINGEROVA METODA	36
1.8.1.2. KISSINGER-AKAHIRA-SUNOSE (KAS) A FRIEDMANOVA METODA	36
1.8.2. <i>URČENÍ KINETICKÉHO MODELU</i>	37
1.8.2.1. JOHNSON-MEHL-AVRAMI MODEL	38
1.8.2.2. AUTOKATALYTICKÝ (ŠESTÁK-BERGGREN) MODEL.....	39
1.8.3. <i>URČENÍ PŘEDEXPONENCIÁLNÍHO FAKTORU</i>	39
1.8.4. <i>JEDNOKŘIVKOVÁ MULTIVARIAČNÍ KINETICKÁ ANALÝZA</i>	40
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
2.1. PŘÍPRAVA VZORKU.....	41
2.2. POSTUP MĚŘENÍ.....	45
2.2.1. <i>DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE</i>	45
2.2.2. <i>TERMOGRAVIMETRIE</i>	46
2.2.3. <i>RAMANOVA SPEKTROSKOPIE</i>	48

2.2.4.	<i>OPTICKÁ MIKROSKOPIE</i>	49
2.2.5.	<i>DISOLUCE</i>	50
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE	52
3.1.	CHARAKTERISTIKA DSC KŘIVEK AMORFNÍHO GRISEOFULVINU	52
3.2.	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	56
3.3.	TEPELNÁ DEGRADACE.....	58
3.4.	KINETIKA KRYSTALIZACE AMORFNÍHO GRISEOFULVINU	59
3.5.	KINETIKA TEPELNÉHO ROZKLADU	64
3.6.	OPTICKÁ MIKROSKOPIE KRYSTALIZUJÍCÍHO GRISEOFULVINU	66
3.7.	DISOLUČNÍ ZKOUŠKA AMORFNÍHO GRISEOFULVINU	67
4.	ZÁVĚR	72
5.	POUŽITÁ LITERATURA	74

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	předexponenciální faktor
AC	autokatalytický Šesták – Berggren model
API	účinná farmaceutická složka (Active Pharmaceutical Ingredient)
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
DTA	diferenční termická analýza
DTG	derivace termogravimetrické křivky
$\frac{d\alpha}{dt}$	rychlost reakce/transformace
E_A	aktivační energie
$f(\alpha)$	kinetický model
GIT	gastrointestinální trakt
GSF	griseofulvin
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny
IČ	infračervená oblast elektromagnetického záření
JMA	Johnson – Mehl – Avrami (model nukleačně-růstový)
$K(T)$	rychlostní konstanta závislá na čase
K_0	rychlostní konstanta nultého řádu
K_1	rychlostní konstanta prvního řádu
K_H	konstanta pro Higuchiho model
K_{KP}	konstanta pro Korsmeyer-Peppas model
K_W	konstanta pro model Weibull
KAHR	Kovacs-Aklonis-Hutchinson-Ramos
KAS	Kissinger – Akahira – Sunose

m	kinetický parametr JMA modelu
M	mitóza
M, N	kinetické parametry AC modelu
MCF-7	lidské buňky rakoviny prsu
M_t	množství uvolněného léčiva v čase t
M_∞	celkové množství léčiva
NMR	nukleární magnetická rezonance
n	exponent charakterizující mechanismus uvolňování léčiva
q^+	rychlost ohřevu
R	univerzální plynová konstanta
RDA	rentgenová difrakční analýza
STA	simultánní termická analýza
t	čas
T	teplota
TA	termická analýza
TEA	termoelektrická analýza
TG	termogravimetrie
TMA	termomechanická analýza
TOA	termooptická analýza
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_p	redukovaná aktivační energie v maximu DSC píku ($x_p = E_A/RT_p$)
$y(\alpha)$	charakteristická funkce definovaná vztahem (8) a (10)
$z(\alpha)$	charakteristická funkce definovaná vztahem (9) a (11)
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 modelu Weibull
ΔH	entalpická změna
Φ	tepelný tok
$\Phi\alpha$	tepelný tok pro stupeň přeměny α

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura griseofulvinu, chemicky (2S,6'R)-7-chlor-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-3H-spiro[benzofuran-2,1'-cyklohexan]-2'-en-3',4-dion.	17
Obrázek 2: Difrakční obrazce pro tři polymorfní formy griseofulvinu – shora dolů: krystalická forma I, krystalická forma II a krystalická forma III. [21]	20
Obrázek 3: Konstrukce optického mikroskopu. [29]	23
Obrázek 4: Schéma DSC s kompenzací příkonu [32]	26
Obrázek 5: Schéma DSC s tepelným tokem – příčný průřez [38]	26
Obrázek 6: Detail píku s jeho charakteristickými teplotami a liniemi. [32]	27
Obrázek 7: DSC záznam, který znázorňuje skelný přechod T _g , krystalizaci, tání degradaci. [upraveno z 32]	27
Obrázek 8: Schéma termováh. [41]	29
Obrázek 9: TG křivka zobrazující jednokrokový rozklad a charakteristické teploty T ₁ a T ₂ . [41]	30
Obrázek 10: a TG křivka zobrazující rozklad ve více než v jednom kroku, b derivace TG křivky. [43]	30
Obrázek 11: Elastické a neelastické rozptyly v Ramanově spektroskopii. [upraveno z 45]	31
Obrázek 12: Mechanismus rozpouštění. [50]	32
Obrázek 13: Schématické znázornění disolučního přístroje pro pádlovou (vlevo) a košíčkovou (vpravo) metodu. [49]	33
Obrázek 14: Algoritmus pro stanovení vhodného kinetického modelu založeného na hodnotách maxim funkcí y(α) a z(α). [2]	38
Obrázek 15: Ampule z křemenného skla a . naplněná krystalickým griseofulvinem. b . se vzniklým amorfním griseofulvinem.	41
Obrázek 16: Jednoplátkový vaříč, nádoba s rozeřtým olejem a ampule naplněná griseofulvinem.	41
Obrázek 17: Ampule se skelným griseofulvinem po rozbití kladivem.	42
Obrázek 18: Malé částice skelného griseofulvinu v třecí misce.	42
Obrázek 19: Použitá síta s různou velikostí ok.	42
Obrázek 20: Velikostní frakce griseofulvinu (20 – 50 μm, 50 – 125 μm, 125 – 180 μm, 180 – 250 μm, 250 – 300 μm, 300 – 500 μm a 500 – 1000 μm) získané prosetím přes síta s definovanou velikostí ok.	42
Obrázek 21: Práškový krystalický griseofulvin rozmístěný na mikroskopickém sklíčku.	43

Obrázek 22: Jednoplótnkový vařič se vzorkem.....	43
Obrázek 23: Vzniklý amorfni griseofulvin.....	43
Obrázek 24: Přístroj pro lisování tablet.....	44
Obrázek 25: Nalisované tablety, griseofulvin amorfni frakce 50 – 125 μ m, griseofulvin amorfni frakce 300 – 500 μ m a blank.....	44
Obrázek 26: DSC Q2000 přístroj.....	45
Obrázek 27: Přístroj NETZSCH (STA 449 F5 Jupiter).....	47
Obrázek 28: Ramanův spektroskop DXR2 (Nicolet, ThermoFisher).....	48
Obrázek 29: Optický mikroskop iScope PLMi (Euromex).....	49
Obrázek 30: Disoluční aparatura SOTAX AT 7 Smart.....	50
Obrázek 31: Získané DSC křivky pro velikost částic 50 – 125 μ m amorfniho griseofulvinu při různých rychlostech ohřevu. Exotermické efekty směřují směrem nahoru. Na detailu je zobrazen překrývající se efekt skelné transformace a krystalizace.	53
Obrázek 32: Získané DSC křivky pro velikost částic 50 – 125 μ m amorfniho griseofulvinu při různých rychlostech ohřevu. Exotermické efekty směřují směrem nahoru.....	54
Obrázek 33: Ramanova spektra griseofulvinu, vlevo krystalická forma a vpravo amorfni forma.....	56
Obrázek 34: Ramanova spektra griseofulvinu, vlevo krystalická forma, vpravo amorfni forma. ^[46]	56
Obrázek 35: Ramanova spektra griseofulvinu. Vlevo obrázek z literatury pro porovnání polymorfů. ^[upraveno z 68] Napravo změřená Ramanova spektra prvního krystalizační píky a dominantního krystalizační píky.....	57
Obrázek 36: Získané TG křivky griseofulvinu, nalevo při N ₂ atmosféře a napravo při atmosféře vzduchu.	58
Obrázek 37: Kissingerův graf pro dominantní krystalizační píky – vyhodnocení z dat reprezentovaných na Obrázcích 31 a 32.....	59
Obrázek 38: Závislosti E _A – α určené Friedmanovou a KAS metodou pro krystalizační dominantní píky.....	60
Obrázek 39: Závislost A na α	61
Obrázek 40: Kinetické exponenty vyhodnocené metodou sc-MKA pro krystalizační data. Vlevo fit dvěma krystalizačními píky, vpravo fit jedním krystalizačním píkem,	62
Obrázek 41: Predikce chování griseofulvinu při teplotě 85 °C.....	63
Obrázek 42: Kissingerův graf pro rozklad griseofulvinu v atmosféře N ₂ a ve vzduchu.	64

Obrázek 43: Závislosti $E_A - \alpha$ určené Friedmanovou a KAS metodou pro dekompoziční data.	65
Obrázek 44: Kinetické exponenty vyhodnocené metodou sc-MKA pro data rozkladu.	65
Obrázek 45: Fotografie z optického mikroskopu – amorfni griseofulvin se začínající krystalizací. Šipky směřují na krystaly.	66
Obrázek 46: Kalibrační křivka griseofulvinu, nalevo pro disoluční médium o pH 6,8; napravo pH 1,2; zvýrazněné regresní rovnice k přepočtu absorbance na koncentraci účinné látky.	67
Obrázek 47: Disoluční profil léčiva griseofulvin pro krystal a dané amorfni velikostní frakce (20 – 50 μm , 50 – 125 μm , 125 – 180 μm , 180 – 250 μm , 250 -300 μm a 300 – 500 μm), které jsou proloženy modelem Weibull.	68
Obrázek 48: Tablety po ukončení disoluční zkoušky. Nalevo nahoře tableta blanku a níže tablety s krystalickým griseofulvinem; napravo tablety s amorfni griseofulvinem (velikostní frakce 250 – 300 μm a 20 – 50 μm).	69
Obrázek 49: Disoluční profil do 60 % uvolněného griseofulvinu proložen modelem Korsmeyer-Peppas.	70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Základní metody termické analýzy.....	24
Tabulka 2: Proměnlivost pH v trávicím traktu, doba průchodu, a návrh pH pro disoluční zkoušku. * s potravou. [upraveno 48]	33
Tabulka 3: Kinetické modely uvolňování léčiva z lékové formy. M_t – množství uvolněného léčiva v čase t , M_{∞} - celkové množství léčiva, K_0 , K_1 , K_H a K_{KP} – příslušné konstanty, n – exponent charakterizující mechanismus uvolňování léčiva. [upraveno z 49,52]	34
Tabulka 4: Složení tablet.	44
Tabulka 5: Polymorfy griseofulvinu a jejich teploty tání T_m a entalpie tání $\Delta H_{\text{tání}}$	55
Tabulka 6: Hodnoty parametru n modelu Korsmeyer-Peppas pro dané velikostní frakce griseofulvinu.	70

ÚVOD

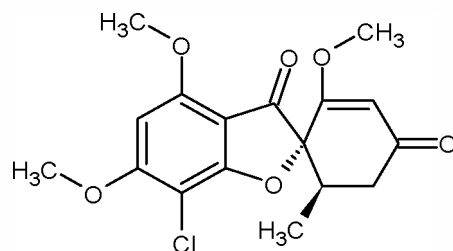
Do popředí farmaceutického výzkumu se v dnešní době dostávají právě amorfní léčiva. Díky amorfním léčivům můžeme dosáhnout vyšší rozpustnosti a tím i vyšší biologické dostupnosti obtížně rozpustných léčiv oproti jejich krystalickým protějškům. Právě nízká biologická dostupnost je odpovědná za ekonomické problémy, neboť při výrobě léku, je nezbytné použít větší množství farmaceuticky účinné látky. Dále může způsobit závažné vedlejší účinky, jestliže se absorbuje abnormálně velké množství léčiva v důsledku specifických účinků pacienta. Ovšem léčiva v amorfní formě mají v průběhu času (skladování nebo výroby) tendenci krystalizovat. Amorfní léčiva mají vyšší molekulární mobilitu a tím i daleko rychlejší povrchovou krystalizaci než objemovou. Tato povrchová krystalizace způsobuje pomalé rozpouštění léčiv a jejich horší stabilitu.

Léčivem, kterým se budeme zabývat v této diplomové práci, je griseofulvin, který se používá na léčbu plísňového onemocnění kůže, nehtů a vlasů. Griseofulvin spadá do skupiny léčiv, které jsou málo rozpustné ve vodě. Proto toto léčivo bude připraveno v amorfní formě a bude dále zkoumáno řadou důležitých metod.

Abychom dokázali predikovat chování amorfního griseofulvinu při jakýchkoliv podmínkách a určit tak jeho dlouhodobou fyzickou stabilitu, je nutné znát termické vlastnosti a kinetiku krystalizace griseofulvinu. Kinetika krystalizace griseofulvinu byla zkoumána pomocí metody termické analýzy, konkrétně diferenční skenovací kalorimetrií (DSC). Pomocí DSC metody byla zkoumána a charakterizována pouze nejkritičtější velikostní frakce částic griseofulvinu (50 – 125 μm), protože nejmenší částice bývají nejméně stabilní. Krystalizace amorfního griseofulvinu bude také zkoumána pomocí optické mikroskopie. Dále bude zkoumána kinetika rozkladu griseofulvinu pomocí termogravimetrie (TG). Jako poslední důležitá metoda bude vybrána disoluční zkouška, především díky své důležitosti pro farmaceutický průmysl. Disoluční zkouška nám umožní předpovědět vstřebání léčiva v lidském organismu (*in vivo*) a dále nám umožní určit mechanismus, kterým se léčivo uvolňuje z lékové formy. Disoluční zkouška byla provedena pro všechny velikostní frakce griseofulvinu.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. GRISEOFULVIN



Obrázek 1: Struktura griseofulvinu, chemicky (2*S*,6'*R*)-7-chlor-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-3*H*-spiro[benzofuran-2,1'-cyklohexan]-2'-en-3',4-dion.

Látka zkoumaná v této diplomové práci je griseofulvin (GSF) (Obr. 1), C₁₇H₁₇ClO₆, který byl poprvé separován z *Penicillium griseofulvum* [1] Albertem F. Oxfordem a dalšími v roce 1939. [1, 2] Dnes jsou známy další druhy hub rodu *Penicillium*, které též produkují griseofulvin (např. *P. urticae*, *P. raistrickii* a mnoho dalších). [3] GSF je krystalický prášek bílé, krémové až nažloutlé barvy [4]. Základní chemické a fyzikální vlastnosti griseofulvinu jsou uvedené v přehledu níže.

- **Teplota tání:** 220 °C [4]
- **Teplota krystalizace:** 130–150 °C [5]
- **Teplota skelného přechodu:** 88 °C [5]
- **Optická rotace:** $[\alpha]_D^{17} + 376^\circ$ [4]
- **Hustota:** 1,358 g/cm³ [1]
- **Relativní molekulová hmotnost:** 352,77 g/mol [4]
- **Rozpustnost:** rozpustný v acetonu, chloroformu a dimethylformamidu; málo rozpustný v ethanolu a methanolu; velmi málo rozpustný ve vodě (0,2 g/l při 25 °C) [4]

Z přehledu si můžeme všimnout, že griseofulvin je látka, která je velmi málo rozpustná ve vodě, [4] což má za následek velmi nízkou biologickou dostupnost. [6] Při nízké biologické dostupnosti se při výrobě léčiva používá větší množství aktivní farmaceutické substance (API), které může způsobit jednak ekonomické problémy, ale také vedlejší účinky, pokud se abnormálně absorbuje velké množství v důsledku specifických účinků pacienta. [7] Z důvodu těchto skutečností se do výzkumu dostávají léčiva v amorfni formě, jelikož díky nim lze dosáhnout vyšší rozpustnosti špatně rozpustných léčiv a tím pádem i jejich biodostupnosti. Více o výhodách a komplikacích amorfni léčiv v kapitole 1.3.

1.1.1. POUŽITÍ A MECHANISMUS ÚČINKU

Griseofulvin je API, která má využití v antifungálních léčivech, které se podávají perorálně k léčbě dermatofytózy tj. plísňová infekce kůže, nehtů a vlasů u lidí i zvířat, [8] kterou nelze vyléčit jinými antimykotiky. [3] Působí pouze na dermatofyty, což jsou houby, které ke svému růstu potřebují keratin, jsou tedy omezeny na vlasy, nehty a povrchovou kůži. [9] Z důvodu vzniklé rezistence, griseofulvin už dermatofyty nehubí, ale pouze umírňuje jejich růst. [10] Mechanismus, kterým griseofulvin inhibuje růst plísňových buněk, je založen na zablokování buněk v přechodu mezi fázemi G₂/M buněčného cyklu. [11] (v G₂ fázi se buňka chystá na přechod do fáze M (mitózy), kde se buňka rozdělí na dvě dceřiné buňky). [12]

Kromě toho, že je to antifungální léčivo, [8] nedávno bylo potvrzeno, že má antiproliferativní vlastnosti pro různé typy rakovinných buněk (inhibice růstu nádorů) u athymických myší. Griseofulvin inhibuje buňky MCF-7 [11] (lidské buňky rakoviny prsu). [13] Koncentrace GSF potřebná k inhibici růstu savčích buněk je daleko vyšší než koncentrace potřebná k inhibici houbových buněk kvůli jeho nižší afinitě k savčímu tubulinu proti houbovému tubulinu. [11, 14] Experimenty ukázaly, že griseofulvin inhibuje mitózu způsobem, který se podobá účinkům kolchicinu, [14] který se váže na tubulin a tím je schopen blokovat prodlužování mikrotubulů. Tyto látky jsou označovány jako mitotické jedy, inhibitory mikrotubulů nebo antitubulinové látky a jejich účinek na buňku je smrtící, ovšem cíleným zásahem těchto látek do nádorových buněk lze dosáhnout inhibice jejich růstu. Z tohoto důvodu se zájem o tyto látky neustále zvyšuje a prakticky se využívají v medicíně jako léčiva zhoubného bujení. [15]

1.1.2. TOXIKOLOGIE

Pokusy na zvířatech ukázaly existenci náznaku karcinogenní aktivity u některých druhů, [4, 6, 16] např. u potkanů griseofulvin mění homeostázu hormonů štítné žlázy a studie na myších prokázaly hepatokarcinogenní účinky. [4, 17] Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) nevyloučila karcinogenní účinky u člověka, protože neexistují dostatečné důkazy pro posouzení karcinogenity. [17]

Griseofulvin lze pokládat za genotoxický na základě své schopnosti způsobit aneuploidii v buňkách hlodavců in vitro a in vivo a v lidských buňkách in vitro. U zvířat, kterým byly podávány vysoké dávky griseofulvinu, se projeví embryotoxické a teratogenní účinky. Griseofulvin má taktéž schopnost projít přes lidskou placentu, z tohoto důvodu nejsou právě gravidní pacientky léčeny pomocí griseofulvinu. [18]

1.2. GRISEOFULVIN A POLYMORFISMUS

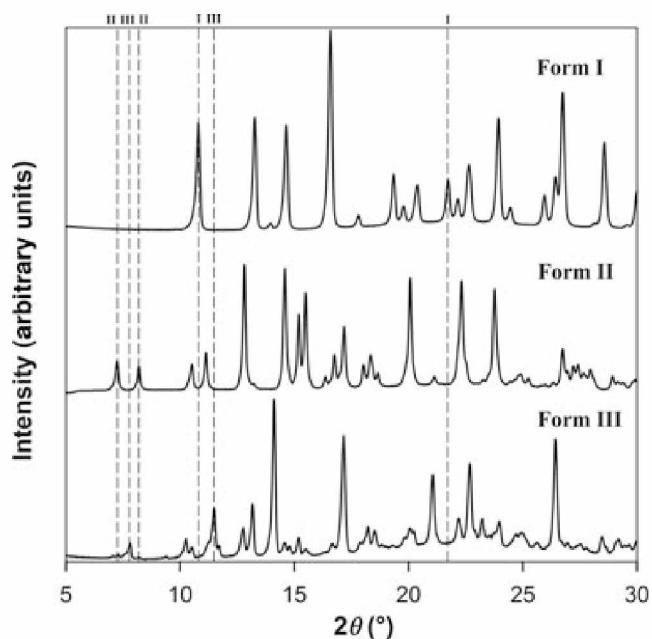
Polymorfismus je jev, při kterém jedna chemická látka může vykristalizovat ve dvou nebo více polymorfních modifikacích (polymorfech).^[19, 20] Jednotlivé polymorfy se od sebe odlišují svými fyzikálně – chemickými vlastnostmi. Mezi tyto vlastnosti patří barva, teplota tání, index lomu, rozpustnost, vodivost a tvrdost.^[20] Polymorfismus je tedy důležitým jevem při výrobě pigmentů, výbušnin a především léčiv.^[1]

U API hovoříme o pevných formách neboli fázích, tím jsou myšleny krystalické polymorfy, amorfy, solváty nebo hydráty.^[19] Stanovení různých polymorfů API je zásadním krokem ve vývoji farmaceutického léčiva, protože strukturální rozdíly mají silný vliv na terapeutické vlastnosti léčiv, jako je fyzikální a chemická stabilita včetně rozpustnosti, rychlost rozpouštění a biologická dostupnost.^[21] Polymorfie má mnoho výhod a zahrnuje zároveň několik problémů, které již byly zmíněny, a týkají se rozdílných fyzikálních a biologických vlastností. Generické firmy mohou najít v polymorfním chování substancí jisté výhody, které umožní obejít patenty originálních firem. Originální výrobce si ovšem může patentovat i všechny její nalezené formy.^[19]

Dodnes však neexistuje jednoznačná predikce počtu různých pevných forem dané aktivní molekuly. Proto jsou stále vylepšovány analytické metody pro rozlišení a stanovení polymorfů. Mezi nejdůležitější metody patří rentgenová difrakční analýza (RDA) – příklad tohoto měření je zobrazen na Obrázku 2, a dále infračervená (IČ) spektroskopie, nukleární magnetická rezonance (NMR) v pevné fázi a studium tepelného rozkladu.^[19, 20] Pro studium polymorfů se dále využívá diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), která umožní i charakterizaci jednotlivé krystalické modifikace zkoumané látky. Z DSC měření lze odhadnout jaká forma je stabilnější a při kterých teplotách.^[11] Jednotlivé polymorfy jsou značeny obvykle římskými číslicemi (I, II, III) nebo řeckými písmeny (α , β) a jsou stabilní v určitém charakteristickém teplotním rozmezí.^[20]

Griseofulvin je léčivo spadající do II. třídy podle biofarmaceutického klasifikačního systému (BCS), což znamená, že má nízkou rozpustnost a vysokou permeabilitu.^[22] První krystalová struktura tedy nejstabilnější forma (forma I) griseofulvinu byla popsána již v roce 1977. Ovšem následné pokusy získat další polymorfy pomocí krystalizací roztoku přinášely stále již známou krystalickou formu (formu I). Několik desetiletí bylo toto léčivo považováno za monomorfní (pouze jedna krystalická struktura). V nedávné studii, v roce 2013, Descamps a jeho spolupracovníci^[1] objevili pomocí krystalizace z taveniny dvě nové polymorfní formy

(forma II a forma III), které byly charakterizovány pomocí RDA a DSC. [1, 23] Přestože jsou nalezené nové formy metastabilní ve srovnání s formou I, mají při pokojové teplotě dlouhou životnost. [23] Pevné skupenství API může hrát důležitou roli v biologické dostupnosti, vzhledem k tomu, že metastabilní fáze vykazují vyšší rozpustnost než stabilní forma. [22]



Obrázek 2: Difrakční obrazce pro tři polymorfni formy griseofulvinu – shora dolů: krystalická forma I, krystalická forma II a krystalická forma III. [21]

1.3. AMORFNÍ LÁTKY

Jak již bylo uvedeno, amorfni léčiva mají velkou rozpustnost a zvýšenou biologickou dostupnost oproti jejich krystalickým protějškům, poutají tedy velkou pozornost. Jejich struktura je tvořena prudkým ochlazením roztaveného materiálu. ^[24] Bohužel ani léčiva v amorfni formě nejsou dokonalá a mají snahu v průběhu času (skladování či výroby) přecházet na stabilnější krystalické formy. Postupné přecházení amorfni formy na krystalickou může zapříčinit špatnou stabilitu a pomalé rozpouštění léčiva, a tím by se eliminovaly výhody amorfniho léčivého přípravku. ^[7, 25]

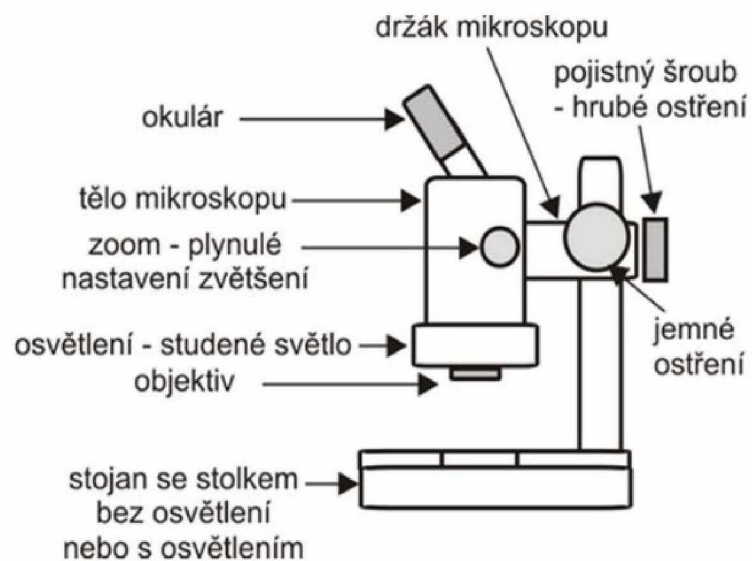
Krystalizaci amorfniích léčiv lze pozorovat pomocí několika experimentálních technik, které se dělí na přímé a nepřímé metody. ^[26] Mezi přímé metody se řadí mikroskopie. Průběh krystalizace lze taktéž sledovat metodami nepřímými, mezi které se řadí například metody termické analýzy. ^[27]

1.4. OPTICKÁ MIKROSKOPIE

Optická neboli světelná mikroskopie je jednoduchá a rychlá zobrazovací metoda. Tato metoda umožňuje rozlišit mikroskopické objekty a struktury, které jsou normálně naším okem nepozorovatelné. Nachází tedy využití pro svou přístrojovou i finanční nenáročnost v průmyslových, výzkumných a klinických pracovištích. Optická mikroskopie slouží především k přiblížení materiálů, jako jsou například rostlinné a živočišné buňky, stavební materiály a různé lékové formy, u kterých jsou sledovány morfologické vlastnosti, jako je velikost a tvar částic, případně tloušťka filmu. ^[28,29]

Jestliže sledujeme amorfni léčivo optickým mikroskopem, jehož krystalická a amorfni fáze mají rozdílné optické vlastnosti, můžeme pozorovat velikost a rychlost růstu krystalů, jejich tvar a četnost. Jsme také schopni určit, zda se krystaly nachází pouze na povrchu vzorku nebo v jeho objemu. ^[27]

Světelný mikroskop (Obrázek 3) se skládá ze tří hlavních částí – optická soustava, osvětlovací soustava a mechanické zařízení. Optická soustava zahrnuje objektiv, okulár a tubus. Objektiv je tvořen soustavou čoček vytvářející skutečný zvětšený a převrácený obraz objektu. Okulár dovoluje sledování vzorku vlastním okem a zobrazuje pozorovaný předmět zvětšený a skutečně orientovaný. Tubus udržuje okulár ve správné vzdálenosti od objektivu. ^[28, 30] Osvětlovací soustava obsahuje zdroj světla. Pozorujeme-li průhledný předmět, je osvětlen procházejícím světlem, pokud je naopak pozorován předmět neprůhledný, osvětluje se světlem odraženým. ^[30] Mechanická část neboli stativ drží stolek se vzorkem a tělo mikroskopu. ^[31]



Obrázek 3: Konstrukce optického mikroskopu. ^[29]

K pozorování se využívá viditelná část spektra, jedná se tedy o vlnové délky v rozpětí 420 – 760 nm. Optický mikroskop umožňuje rozlišit detaily až o velikosti 0,2 μm , bohužel tuto rozlišovací schopnost nejsme schopni zlepšit ani přidáním kvalitnějších nebo větších čoček, neboť je dána vlnovou délkou. ^[28]

1.5. TERMICKÁ ANALÝZA

Za počátek vzniku termické analýzy (TA) můžeme považovat rok 1887, kdy Le Chatelier vydal své výsledky výzkumu týkajícího se termického chování jílovitých hornin metodou, která se velmi podobá diferenční termické analýze (DTA) ovšem bez reference. Měřicí a přístrojová technika byla k dispozici koncem 19. století a tím byly položeny základy TA.^[32]

TA představuje skupinu metod, mezi které řadíme právě takové experimentální metody, které analyzují změny složení a změny fyzikálně chemických vlastností látek (např. hmotnost, vodivost, energii a další) působením stanovených teplotních změn jako dynamickou funkci teploty.^[32] Znalost těchto vlastností ve farmaceutickém průmyslu je důležitým krokem k formulaci stabilního a vyhovujícího lékového přípravku.^[33]

Názvy jednotlivých metod TA jsou obvykle odvozeny od vlastností, které jsou danou metodou zkoumány. Mezi primární metody TA se řadí metody uvedené v Tabulce 1, od těchto metod jsou odvozeny další metody tzv. sekundární jako je například dilatometrie.^[32]

Tabulka 1: Základní metody termické analýzy.

<i>Metoda</i>	<i>Zkratka</i>	<i>Sledovaná vlastnost</i>
Termogravimetrická analýza	TG	Hmotnost
Diferenční termická analýza	DTA	Rozdíl teplot
Diferenční skenovací kalorimetrie	DSC	Rozdíl teplot nebo energie
Termooptická analýza	TOA	Optické vlastnosti
Termomechanická analýza	TMA	Rozměr a mechanické vlastnosti
Termoelektrická analýza	TEA	Elektrické vlastnosti
Termoakustická analýza	--	Akustické vlastnosti

Moderní přístroje, které umožňují současné měření více vlastností během jednoho experimentu, se označují jako simultánní termická analýza (STA). Mezi nejvíce rozšířenou dvojici metod patří TG-DTA a TG-DSC, neboť se dobře doplňují.^[33]

V diplomové práci se bude využívat diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) a termogravimetrie (TG), které jsou nejčastěji využívanými metodami TA při výzkumu a vývoji léčiv.^[34]

1.5.1. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE

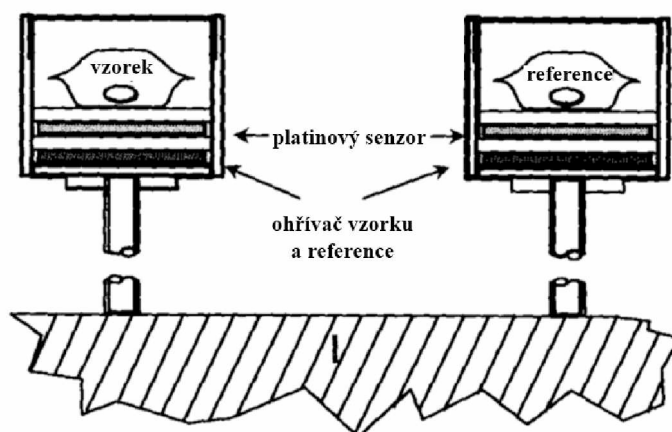
Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC, differential scanning calorimetry) je jednou z nejdůležitějších a nejčastěji používaných metod TA ve farmaceutickém průmyslu. Tato metoda má ovšem uplatnění i v ostatních odvětvích průmyslu zabývajících se např. výrobou skla, keramiky, potravin, plastů a polymerů. [33, 34, 35] DSC je nejčastěji využívána při určení skelných přechodů, teplot tání a krystalizací nejrůznějších materiálů.

Principem DSC metody je udržení stejné teploty analyzovaného a referenčního vzorku, které jsou současně zahřívány pod jednotným teplotním programem. [32] Výhodou DSC je použití malého množství vzorku, které se pohybuje od 1 mg do 100 mg. [33, 34] Pracovat s takto malou navázkou je doporučeno proto, aby se minimalizovaly tepelné gradienty a tepelné ztráty ve vzorku a byla tak zvýšena účinnost měření. [36] Navážené vzorky jsou umístěny nejčastěji v kovových kelímcích, které zajišťují dokonalý kontakt s topným tělesem a teplotními čidly. [33]

Existují dva typy DSC metod, buď kompenzační DSC (power compensation DSC) nebo DSC s tepelným tokem (heat flux DSC, hf-DSC). [32]

1.5.1.1. KOMPENZAČNÍ DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE

DSC s kompenzací příkonu (Obr. 4) udržuje nulový teplotní rozdíl mezi referenčním a analyzovaným vzorkem. Daný vzorek a reference jsou umístěny ve své měřicí cele, která má svůj tepelný zdroj a jsou zahřívány nebo ochlazovány stejnou rychlostí. Aby se zabránilo tepelnému toku mezi nimi, jsou od sebe tepelně izolovány. Kompenzační DSC tedy měří energii, která je potřebná k vyrovnání teplot mezi referencí a vzorkem. Pokud v analyzovaném vzorku dojde ke krystalizaci (exotermní děj), je teplota analyzovaného vzorku vyšší oproti referenčnímu vzorku a aby došlo k vyrovnání teplot s referenčním vzorkem, je do analyzovaného vzorku dodáno méně energie oproti referenčnímu vzorku. A naopak, v případě, že dojde k tání vzorku (endotermní děj), je dodána energie do analyzovaného vzorku a teplotní rozdíl mezi referencí a vzorkem je tak vynulován. Díky kompenzaci příkonu zůstává v obou vzorcích stejná teplota. Měrná veličina je tedy elektrický příkon, který je potřebný k udržení stejné teploty v obou identických celách. [33, 34]

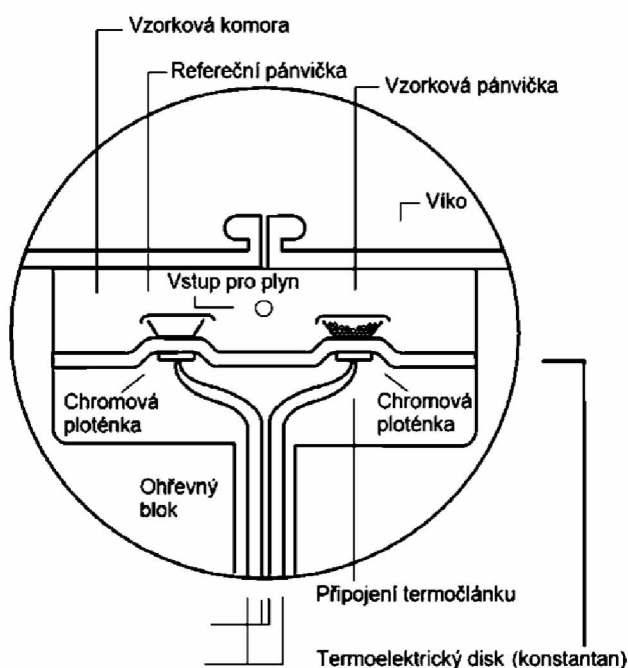


Obrázek 4: Schéma DSC s kompenzací příkoku [32]

1.5.1.2. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE S TEPELNÝM TOKEM

DSC s tepelným tokem měří rozdíl teplot referenčního a analyzovaného vzorku. Rozdíl teplot je určen z rozdílu termoelektrických napětí jednotlivých termočlánků a je zaznamenáván jako závislost tepelného toku na teplotě. Výstup z obou DSC metod je analogický a vzájemně porovnatelný. [32, 33, 34]

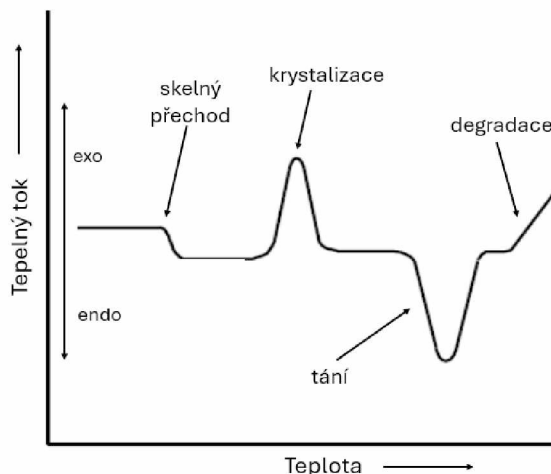
Přístroj pro DSC s tepelným tokem se skládá z jedné cely. Ve společné kalorimetrické cele jsou umístěny kelímky s referencí i analyzovaným vzorkem. Oba kelímky jsou položeny na samostatných teplotních čidlech a jsou navzájem spojeny tepelným mostem, jak je vidět na Obrázku 5. [34, 37]



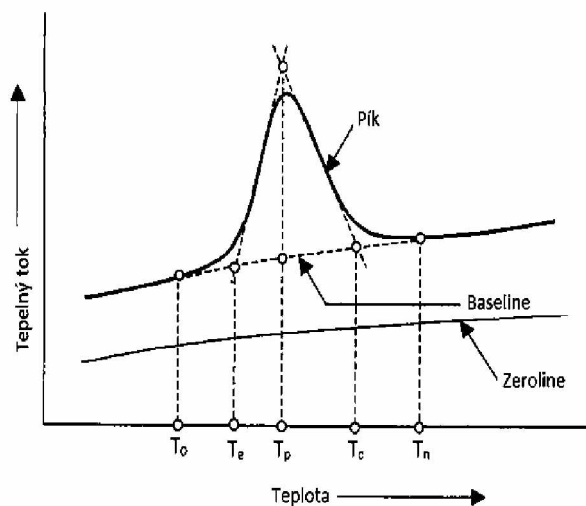
Obrázek 5: Schéma DSC s tepelným tokem – příčný průřez [38]

1.5.1.3. VÝSTUP Z DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE

Výsledný záznam z měření na DSC přístroji je tzv. DSC křivka. Pokud je měření prováděno za neizotermních podmínek, je výsledkem měření závislost tepelného toku Φ na teplotě T , která je zobrazena na Obrázku 6. Jednotlivé efekty na DSC křivce odpovídají tepelným procesům, které probíhají ve vzorku. Detail termického efektu společně s liniemi a charakteristickými teplotami je zobrazen na Obrázku 7. [39]



Obrázek 7: DSC záznam, který znázorňuje skelný přechod T_g , krystalizaci, tání degradaci. [upraveno z 32]



Obrázek 6: Detail piku s jeho charakteristickými teplotami a liniemi. [32]

Mezi charakteristické linie DSC křivky patří **nulová linie (tzv. zeroline)**, která představuje křivku na DSC záznamu získanou z měření, kdy kalorimetr obsahuje prázdné kelímky. [33,39] Druhou linií je **základní linie (tzv. baseline)**, která odpovídá měření, kdy vzorek nevykazuje termický efekt, jako je spotřeba nebo uvolnění tepla. Tato linie by tedy měla být v celé analýze neměnná. [32]

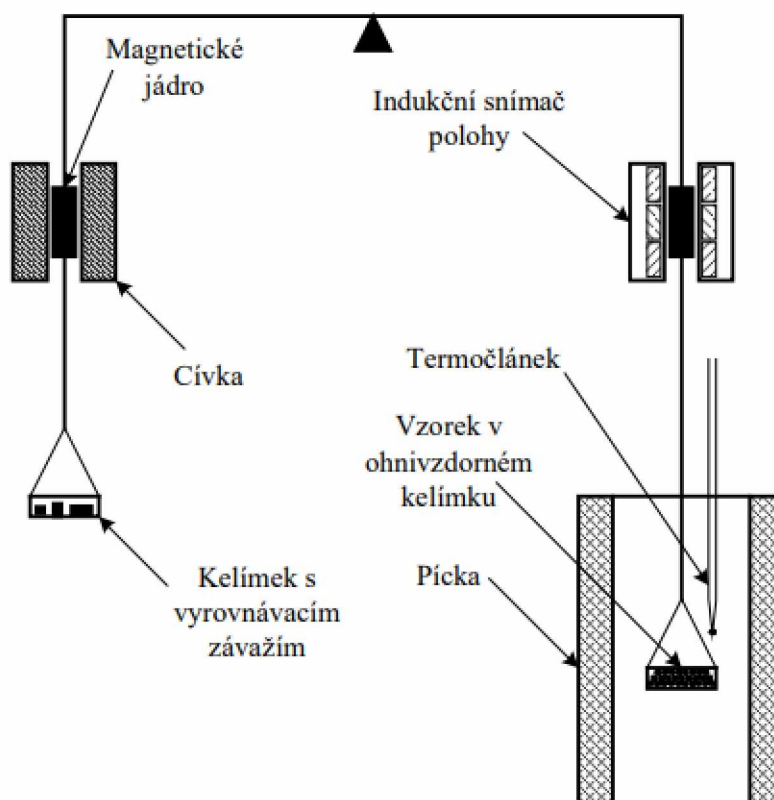
Typické teploty DSC křivky jsou definovány následovně. **Počáteční teplota piku T_0** je definována pro místo, kde se křivka začíná odchylovat od základní linie. **Extrapolovaná počáteční teplota T_e** neboli „teplota onset“ určuje teplotu fázového přechodu a nalezneme ji tam, kde čára vedená lineárním úsekem stoupajícího piku protíná základní linii. [31] **Teplota piku v jeho maximu T_p** je maximální rozdíl mezi DSC křivkou a základní linií. Dále **extrapolovaná koncová teplota T_c** a **teplota konce piku T_n** . [39,40]

Pokud je ustálený stav narušen produkcí nebo spotřebou tepla vzorkem, objeví se na DSC křivce typické efekty. Tyto tepelné přechody jsou na DSC křivce zobrazeny pomocí píků nebo pouze schodem na DSC křivce, který je způsoben skelným přechodem charakterizovaným teplotou skelné transformace. ^[39] Pík, který je spojený s endotermickým procesem – tání, charakterizuje čistotu látky a její znečištění. Pokud přechází amorfni fáze v krystalickou, je viditelný exotermický pík. ^[32] Entalpie ΔH probíhajícího procesu je přímo úměrná ploše píku nad nebo pod základní linií. ^[40]

1.5.2. TERMOGRAVIMETRIE

Termogravimetrie (TG, thermogravimetry) je další základní metodou termické analýzy a studuje změny hmotnosti probíhající v analyzovaném vzorku v závislosti na teplotě. Z termogravimetrického měření je možno získat přesné údaje o dehydrataci a oxidaci, ale také teplotu, při které dochází k rozkladu látky. [39,41,42]

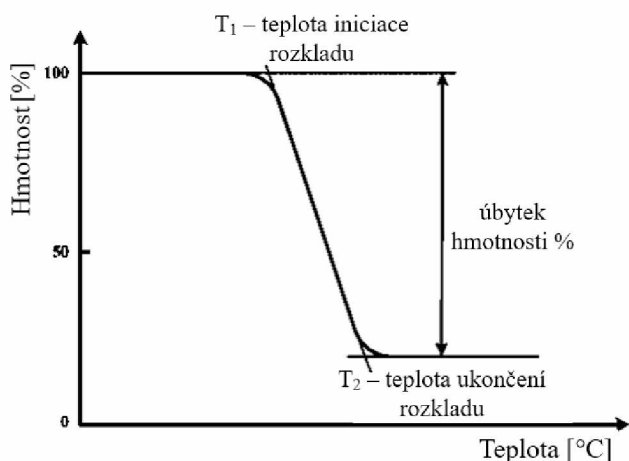
Přístroje pro termogravimetrii tzv. termováhy jsou schopny velmi přesně zaznamenat i velmi malé změny v hmotnosti analyzovaného vzorku v závislosti na teplotě. Dnes nejvyužívanější uspořádání aparatury je zobrazeno na Obrázku níže.



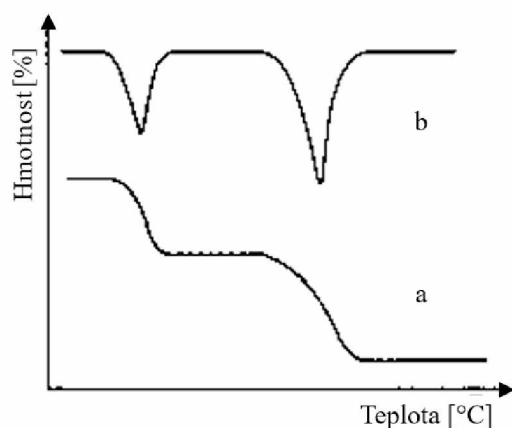
Obrázek 8: Schéma termováh. [41]

Přístroj je složen z tepelně řízené pece, do které se vkládá kelímek (nejčastěji keramický či platinový) se vzorkem, který je ve formě prášku. Kelímek se vzorkem je zavěšen na citlivých mikro váhách vážící ztrátu/přírůstek hmotnosti. Kelímek se nepohybuje, ani když vzorek ubývá či získává na své váze, protože je váha elektronicky vyrovnávána. Dále obsahuje termočlánek, který není v přímém kontaktu se vzorkem a systému proudícího inertního plynu sloužící k vytvoření stálé atmosféry pro dokonalé měření. Pokud dojde ke

změně hmotnosti, je tato změna ihned zaznamenána jako velikost proudu, který je vyvinut cívkou a je potřebný k vyrovnaní váhy do nulové polohy. Velikost tohoto proudu je úměrná k velikosti změně hmotnosti. Data sbírá a vyhodnocuje počítač. Výstupem měření je termogravimetrická křivka tzv. termogram (Obrázek 9, 10 a), jedná se o závislost změny hmotnosti vyjádřených v % nebo v mg na teplotě ve °C. [41]



Obrázek 9: TG křivka zobrazující jednokrokový rozklad a charakteristické teploty T_1 a T_2 . [41]



Obrázek 10: a TG křivka zobrazující rozklad ve více než v jednom kroku, b derivace TG křivky. [43]

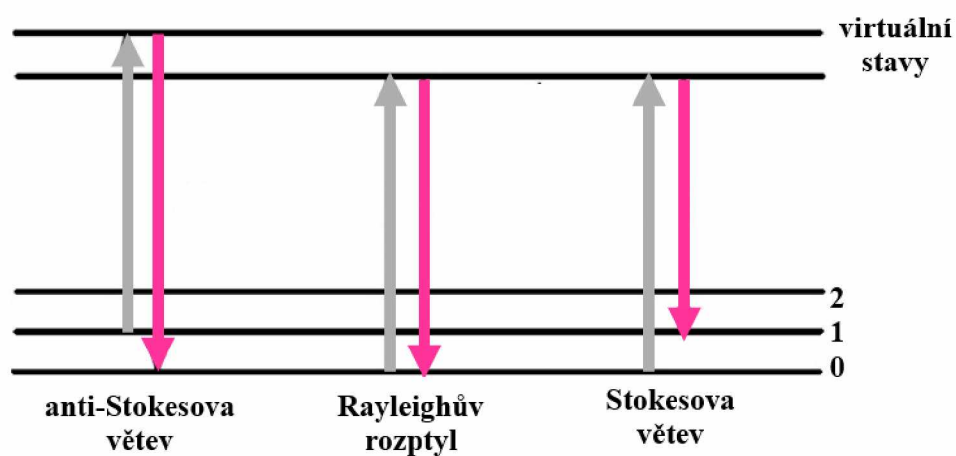
Z termogravimetrické křivky můžeme vyčíst, kolik rozkladných reakcí se ve vzorku uskutečňuje, při jakých teplotách tyto rozklady začínají a končí, a také kolik hmotnosti při dané reakci ubývá/přibývá. Hodnoty samostatných teplot a délka prodlevy mezi nimi jsou závislé na zvolených podmínkách. Pokud se nepodaří získat jednoznačně oddělené oblasti rozkladu a tím tedy ideální křivku, může při vyhodnocování pomoci derivace termogravimetrické křivky (DTG), která je zobrazena na Obrázku 10 b. [41]

Jak již bylo zmíněno, TG zaznamenává pouze takovou chemickou reakci, která je doprovázena změnou hmotnosti. Zároveň nám nesdělí dostatek informací o jejich charakteru, a proto se v praxi používá v kombinaci s DSC či DTA jako tzv. simultánní termická analýza (STA). Kombinací těchto metod lze odhalit právě i reakce, u kterých nedochází ke změně hmotnosti, např. tavení, skelný přechod a krystalizace. [41]

1.6. RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní molekulová metoda, kdy je zkoumaný vzorek vystaven viditelnému nebo blízkému infračervenému monochromatickému záření, jehož nejčastějším zdrojem je laser. Dopadající záření může být částečně absorbováno, propuštěno a rozptýleno. Zde se měří se rozptyl dopadajícího záření. Dochází ke dvěma typům rozptylu. Prvním a častějším typem je rozptyl elastický neboli Rayleighův rozptyl, u kterého nedochází k žádné změně energie. Druhým a méně častým typem rozptylu, je rozptyl neelastický nazývaný též jako Ramanův rozptyl, který se dále dělí na stokesovské a anti-stokesovské větve (Obr. 11). Při takovémto rozptylu se mění energie mezi rotačně vibračními stavy molekul.

Pokud částice z excitovaného stavu spadne do vibračního energetického stavu o hladinu vyšší, než byla hladina základního stavu, jedná se o Stokesovu větev. Anti-Stokesova větev je, kdy je základní stav částice o hladinu výše, než je hladina, do níž spadne z excitovaného stavu. V praxi se měří spektrum Stokesovy větve Ramanova spektra, protože má podstatně vyšší intenzitu. ^[45,46]



Obrázek 11: Elastické a neelastické rozptyly v Ramanově spektroskopii. ^[upraveno z 45]

Ramanova spektroskopie se využívá k identifikaci anorganických i organických sloučenin. Dále umožňuje určit, zda se jedná o krystalický nebo amorfni materiál. Toho se nejčastěji využívá při sledování kvality amorfni léčiv, kde je důležité detekovat a kvantifikovat obsah krystalické fáze během jejich zpracování a skladování. ^[46] Z tohoto důvodu je amorfni a krystalický griseofulvin v diplomové práci zkoumán pomocí Ramanovy spektroskopie.

1.7. DISOLUČNÍ STUDIE

Disoluční neboli rozpouštěcí studie mají ve farmaceutickém průmyslu důležitou úlohu. Disoluční zkouška (test rozpustnosti) poskytuje data k vyhodnocení uvolňování účinné látky z testované pevné lékové formy v předepsané kapalině (disoluční médium), v čase a v podmínkách *in vitro*. Tato zkouška se využívá k posouzení kvality a stability léčiva, především umožňuje odhadnout či predikovat vstřebání léčiva v lidském organismu (*in vivo*). Dále na základě výsledků těchto testů můžeme odhadnout biologickou dostupnost léčiva *in vivo* (procenta aplikované látky, která jsou organismem využita) a bioekvivalenci generických léčiv (shoda originálního a generického léčiva), což může být zlomové při vývoji nových generik. Výsledkem disoluční zkoušky je disoluční profil léčiva, zpravidla graf, který je nezbytný pro charakterizaci léčiva a je také nezbytnou součástí registrační dokumentace léků. Z tohoto grafu lze dále vyhodnotit rychlost uvolňování léčiva a mechanismus, kterým se léčivo uvolňuje. [47, 48, 49]

Zjednodušený mechanismus rozpouštění zahrnuje dva kroky (Obr. 12). Prvním krokem je tzv. dezintegrace, kdy dochází k rozpadu matrice. Druhým krokem je samotná disoluce, tedy rozpouštění léčiva v kapalném médiu. [50]



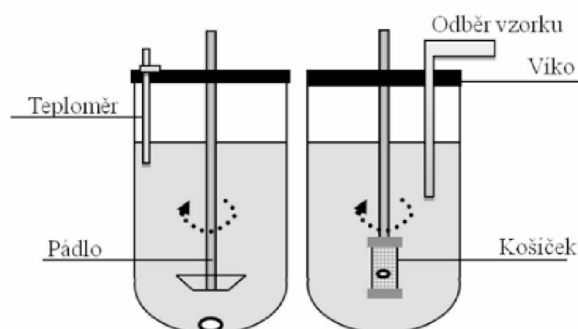
Obrázek 12: Mechanismus rozpouštění. [50]

Pro disoluční zkoušku je jasně stanoven postup a pravidla, která jsou dána Českým lékopisem. [51] Rozpustnost aktivní látky při disolučním testu může ovlivnit spo

usta faktorů. Proto je důležité u každé disoluční zkoušky specifikovat metodu provedení zkoušky (použitý přístroj), disoluční médium a jeho složení, teplotu a objem. Dále pak čas trvání disoluční zkoušky, rychlost otáček míchadel, způsob odebírání a množství vzorku a nakonec metodu stanovení obsahu účinné látky. [48,49]

1.7.1. METODY PROVEDENÍ DISOLUČNÍ ZKOUŠKY

Český lékopis popisuje čtyři metody disoluce a jejich volba závisí na vlastnostech daného léčiva – pádlová metoda, košíčková, s vratným válcem a ve zvláštních případech se používá přístroj s průtokovou celou. Nejpoužívanějšími metodami jsou první dvě zde zmíněné. **Pádlová metoda** (Obrázek 13) je vhodná pro tablety a bude detailněji popsána v experimentální části. **Košíčková metoda** je nejvíce využívána u pelet a mikročástic. Přístroj s košíčky pracuje na obdobném principu jako zařízení s pádélky. Rozdíl je v tom, že jsou zde lopatky na hřídelích nahrazeny košíčky, ve kterých je umístěna léková forma (Obr. 13).^[49]



Obrázek 13: Schématické znázornění disolučního přístroje pro pádlovou (vlevo) a košíčkovou (vpravo) metodu.^[49]

1.7.2. DISOLUČNÍ MÉDIUM

Perorálně podaná léčiva procházejí částmi trávicí soustavy (GIT, gastrointestinální trakt), kde se mění hodnoty pH. V každé části GIT se lék zdrží určitý časový interval (Tab. 2). Ideální disoluční kapalina neboli médium se volí tak, aby co nejlépe napodobovalo podmínky *in vivo* pro odhad korelace *in vitro/in vivo*, občas se doporučuje přidat do média některé pomocné látky, jako jsou povrchově aktivní látky a enzymy.^[48]

Tabulka 2: Proměnlivost pH v trávicím traktu, doba průchodu, a návrh pH pro disoluční zkoušku. * s potravou.^[upraveno 48]

Část GIT	pH	Doba průchodu	pH pro disoluční zkoušku
Žaludek	1,2 – 5*	1 – 2 h	1,2 nebo 3,0*
Dvanáctník	4,5* – 6,5	5 – 60* min	5,5
Proximální tenké střevo	6 – 7	3 – 5 h	6,8
Distální tenké střevo	6,5 – 7,5		6,8 a 7,5
Tračník	5,5 – 8*	15 – 72* h	6,8

1.7.3. MECHANISMUS UVOLŇOVÁNÍ LÉČIVA Z LÉKOVÉ FORMY

Pokud jsou získaná data z disoluce převedena do matematické podoby rovnic, kde je množství uvolněného léčiva funkcí času, poté lze předpovídat, jakým mechanismem se API uvolňuje z lékové formy. Pro tento účel slouží tzv. kinetické modely. Základní modely jsou uvedeny v následující tabulce. ^[49]

Tabulka 3: Kinetické modely uvolňování léčiva z lékové formy. M_t – množství uvolněného léčiva v čase t , M_∞ - celkové množství léčiva, K_0 , K_1 , K_H a K_{KP} – příslušné konstanty, n – exponent charakterizující mechanismus uvolňování léčiva. ^[upraveno z 49,52]

Kinetika nultého řádu	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 t$	Uvolňování léčiva není závislé na jeho koncentraci
Kinetika prvního řádu	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-K_1 t}$	Rychlost uvolňování léčiva je závislá na jeho koncentraci
Higuchi model	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t}$	Léčivo se z matrice uvolňuje procesem difuze
Korsmeyer – Peppas model	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} t^n$	Mechanismus uvolňování závisí na exponentu n $n = 0,5 \dots$ difuze podle Fickova zákona $n = 1 \dots$ kinetika 0. řádu $n = 0,5 - 1,0 \dots$ difuze léčiva a eroze matrice $n > 1$ super case II transport

Dalším modelem, který již není odvozen na kinetickém základě (není výsledkem integrace kinetických rovnic) je Weibullův model (rovnice 1) a tudíž není vhodný k interpretaci mechanismu uvolňování léčiva z lékové formy.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - e^{-K_W t^\beta} \quad (1)$$

Kde K_W je konstanta a parametr β charakterizuje tvar exponenciální křivky. Dle doporučení FDA je to jeden z modelů, který je vhodný k testování shody disolučních profilů. Jelikož je tento model více parametrický, vykazuje dobrou shodu s experimentálními daty i v případech, kdy se léčivo uvolní rychleji (burst efekt) nebo se zpožděním (lag time). Parametr β se využívá k charakterizaci vlivu technologie výroby nebo složení lékové formy na disoluci. ^[53]

1.8. KINETICKÁ ANALÝZA

Tato práce je především zaměřena na studium kinetiky krystalizace griseofulvinu. Znalost kinetiky krystalizačního procesu amorfních materiálů je důležitá pro přípravu a jejich další zpracování a také umožní předpovědět chování amorfních léčiv za různých podmínek.

Kinetika krystalizace amorfních látek se běžně studuje pomocí metod termické analýzy, mezi které patří DSC a DTA. ^[54] Kinetická analýza DSC dat je založena na hledání nejvhodnějšího kinetického modelu, který slouží k popisu daného kinetického procesu. Jestliže je možné oddělit tepelnou a rychlostní složku kinetické rovnice, je tedy vztah charakterizující reálnou rychlost procesu dán rovnicí:

$$\frac{d\alpha}{dt} = K(T) \cdot f(\alpha) \quad (2)$$

kde $\frac{d\alpha}{dt}$ je rychlost reakce/transformace, $f(\alpha)$ představuje vyjádření daného kinetického modelu (α je stupeň konverze) a $K(T)$ je rychlostní konstanta, která závisí na teplotě a lze vyjádřit dle známého Arrheniova zákona:

$$K(T) = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (3)$$

kde A je předexponenciální faktor, E_A je aktivační energie procesu, R je univerzální plynová konstanta, T je teplota. ^[54, 55, 56, 57]

Univerzální kinetickou rovnici krystalizačního píku lze tedy zapsat jako:

$$\Phi = \Delta H \cdot A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \cdot f(\alpha) \quad (4)$$

kde Φ je tepelný tok měřený DSC, ΔH je krystalizační entalpie. Tato rovnice obsahuje důležité kinetické parametry krystalizačního procesu, mezi které tedy patří aktivační energie, kinetický model s jeho parametry a předexponenciální faktor. Určení těchto parametrů je naznačeno v následujících podkapitolách. ^[58, 59]

1.8.1. URČENÍ AKTIVAČNÍ ENERGIE

Prvním krokem kinetické analýzy experimentálních DSC dat krystalizace je výpočet aktivační energie E_A .^[58, 59] Znalost E_A je nezbytná pro vyhodnocení základního kinetického modelu a také k popisu krystalizační procesy v analyzovaném vzorku. Pro výpočet tohoto parametru bylo vyvinuto několik metod. Mezi nejčastěji využívané metody patří Kissingerova, modifikovaná Kissinger-Akahira-Sunos (KAS) a dále Friedmanova metoda. Zde vyjmenované metody se využívají v případě neizotermních podmínek.^[59] V případě podmínek izotermních se využívají pouze metody izokonverzních řezů.^[61]

1.8.1.1. KISSINGEROVA METODA

Kissingerova metoda je jednoduchá a je založena na teplotním posunu maxima krystalizačního píku T_p , které je spojeno s různými rychlostmi ohřevu q^+ . Z tohoto důvodu se využívá pouze za neizotermních podmínek. Aktivační energie se určí podle následující rovnice:^[58, 59]

$$\ln\left(\frac{q^+}{T_p^2}\right) = -\frac{E_A}{RT_p} + konst. \quad (5)$$

Hodnota aktivační energie E_A je určena ze směrnice lineární závislosti, kde je na ose y vynesena vztah $\ln\left(\frac{q^+}{T_p^2}\right)$ a na ose x je vztah $\frac{1000}{T_p}$. Tato metoda poskytuje informace pouze pro dominantní krystalizační pík, což může působit potíže při vyhodnocování složitých procesů obsahujících více než jeden krystalizační pík.^[58, 60]

1.8.1.2. KISSINGER-AKAHIRA-SUNOSE (KAS) A FRIEDMANOVA METODA

Následující metody se řadí do skupiny izokonverzních metod, které jsou založeny na předpokladu, že reakční rychlost je v konstantním rozsahu konverze závislá pouze na teplotě. Stupeň konverze zůstává konstantní, tzn., že reakce nebo fázová transformace se nemění s měnící se rychlostí ohřevu. Tyto metody jsou použitelné pro neizotermní i pro izotermní měření.^[62, 63, 64]

Friedmanova metoda je diferenciální izokonverzní metoda a výpočet E_A je vyjádřeno rovnicí (6):

$$\ln(\Phi_\alpha) = -\frac{E_A}{RT_\alpha} + konst. \quad (6)$$

kde $\Phi\alpha$ je měrný tepelný tok, $T\alpha$ je teplota, která odpovídá zvolené hodnotě stupně konverze α . Interval hodnot α je definován jako $0,3 \leq \alpha \leq 0,7$ a právě v tomto intervalu jsou hodnoty stabilizované a nejsou ovlivněny nepřesnostmi, které jsou spojené se vzestupnou a sestupnou částí krystalizačního píku. Nepřesností při určení E_A může být závislost obou parametrů ($\Phi\alpha$ a $T\alpha$) na α . [59, 61, 62]

KAS metoda je integrální izokonverzní metoda a E_A se určí pomocí následujícího vztahu: [58]

$$\ln\left(\frac{q^+}{T_\alpha^{1,92}}\right) = -1,0008 \frac{E_A}{RT_\alpha} + konst. \quad (7)$$

1.8.2. URČENÍ KINETICKÉHO MODELU

Druhým krokem kinetické analýzy DSC dat krystalizace je hledání vhodného kinetického modelu, který je schopen popsat krystalizační proces. Toho lze dosáhnout použitím algoritmů založených na tvaru tzv. charakteristických kinetických funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$, [55, 62], které jsou odvozeny pomocí jednoduché transformace experimentálních DSC dat. V případě neizotermických podmínek lze tyto funkce vyjádřit jako: [54, 58, 59]

$$y(\alpha) = \Phi \cdot e^{E_A/RT} \quad (8)$$

$$z(\alpha) = \Phi \cdot T^2 \quad (9)$$

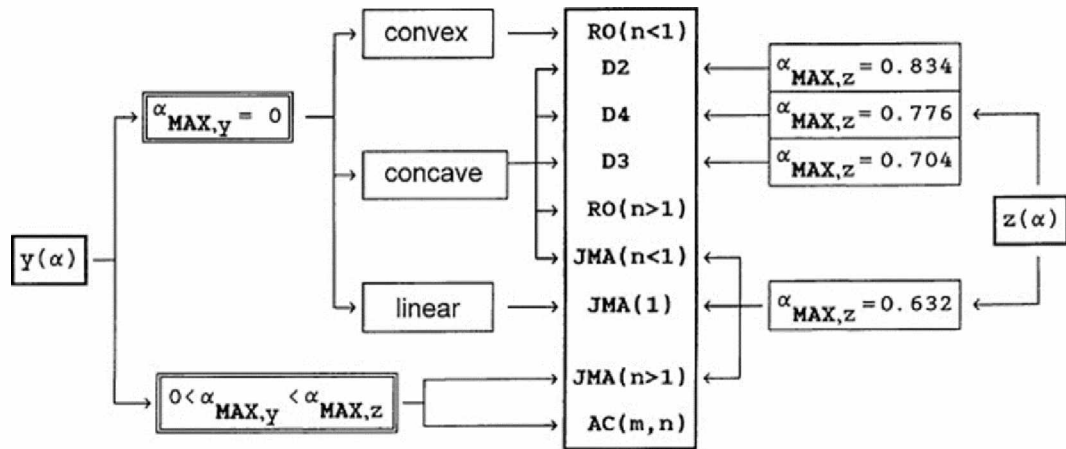
Pokud byla DSC data krystalizace získána za izotermických podmínek, funkce $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$ jsou určeny jako: [54]

$$y(\alpha) = \Phi \quad (10)$$

$$z(\alpha) = \Phi t \quad (11)$$

Hodnoty funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$ se obvykle normalizují v intervalu $\langle 0,1 \rangle$, což napomáhá jednodušší interpretaci dat a lze tak eliminovat vliv různých experimentálních podmínek. Díky přeměně experimentálních dat pomocí charakteristických funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$ je určení vhodného kinetického modelu jednodušší vzhledem k aktuálním kinetickým procesům. Maximum funkce $z(\alpha)$ se rovná hodnotě stupně konverze $\alpha_{\max, z}$ a shoduje se s maximální rychlostí procesu, dále neovlivněna hodnotou E_A . Naopak maximum funkce $y(\alpha)$ ($\alpha_{\max, y}$) je silně závislá na hodnotě E_A . Daný kinetický model lze tedy odhadnout pomocí hodnot stupně

konverze odpovídajících maximům charakteristických funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$. Dále z výsledného tvaru závislosti daných funkcí na stupni konverze. [55, 62, 64, 65]



Obrázek 14: Algoritmus pro stanovení vhodného kinetického modelu založeného na hodnotách maxim funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$. [2]

V praxi je kinetika krystalizace nejběžněji popisována pomocí dvou kinetických modelů. Prvním je nukleačně-růstový Johnson-Mehl-Avrami JMA a druhý je semiempirický autokatalytický model Šesták-Berggren (AC). [59, 60]

1.8.2.1. JOHNSON-MEHL-AVRAMI MODEL

JMA model je jednoparametrový nukleačně růstový model. Pokud hodnota stupně konverze α odpovídá maximům funkce $z(\alpha)$ a pohybuje se v rozmezí 0,62 až 0,64 (teoretická hodnota α_{max} , z se rovná 0,632), lze kinetiku krystalizace popsat pomocí modelu JMA. Matematicky lze model JMA vyjádřit pomocí této rovnice (12): [54, 59]

$$f(\alpha) = m(1 - \alpha)[- \ln(1 - \alpha)]^{1 - (\frac{1}{m})} \quad (12)$$

kde m je parametr, který odráží mechanismus nukleace a růstu krystalů. Hodnotu tohoto parametru lze určit z následující rovnice (13): [59]

$$m = \frac{1}{1 + \ln(1 - \alpha_{max,y})} \quad (13)$$

Druhý způsob, jak určit kinetický parametr m , je pomocí funkce dvojitého logaritmu: [59]

$$\frac{d \ln[- \ln(1 - \alpha)]}{d(\frac{1}{T})} = - \frac{m \cdot E}{R} \quad (14)$$

1.8.2.2. AUTOKATALYTICKÝ (ŠESTÁK-BERGGREN) MODEL

K popisu složitějších krystalizačních procesů se používají empirické modely. Ovšem kinetické parametry těchto modelů nemají fyzikální význam. K těmto modelům se řadí autokatalytický model AC, který má dva parametry. [66]

Pokud nelze použít JMA model, tak právě AC model představuje alternativní způsob k popisu krystalizačního procesu. Tento model je široce používán především díky vyšší flexibilitě k experimentálním datům oproti modelu JMA. AC model je matematicky vyjádřen jako: [60]

$$f(\alpha) = \alpha^M(1 - \alpha)^N \quad (15)$$

kde N a M jsou kinetické parametry, které popisují tvar naměřené DSC křivky. Tyto parametry jsou také charakteristické pro určitý krystalizační proces a jejich hodnoty lze spočítat dle níže uvedených rovnic: [59, 66]

$$\frac{M}{N} = \frac{\alpha_{max,y}}{1 - \alpha_{max,y}} \quad (16)$$

$$\ln\left(\Phi \cdot e^{\frac{E_A}{RT}}\right) = \ln(\Delta H \cdot A) + N \cdot \ln\left[\alpha^{\frac{M}{N}}(1 - \alpha)\right] \quad (17)$$

1.8.3. URČENÍ PŘEDEXPONENCIÁLNÍHO FAKTORU

Posledním krokem kinetické analýzy je stanovit hodnotu předexponenciálního faktoru A. Jeho hodnotu lze odhadnout se znalostí výše uvedených kinetických parametrů, tj. hodnoty aktivační energie a kinetického modelu a jeho parametrů.

Pokud je kinetika krystalizace popsána pomocí autokatalytického AC modelu, lze předexponenciální faktor vyhodnotit přímo pomocí výše uvedené rovnice (17). Dále může být předexponenciální faktor stanoven pomocí fitování nelineární DSC křivky. Dalším způsobem, jak získat hodnotu A, je rovnice (18):

$$A = \frac{q^+ \cdot x_p}{T \cdot f'(\alpha)} e^{x_p} \quad (18)$$

kde $f'(\alpha)$ je diferenciální tvar kinetického modelu $f(\alpha)$. [55, 59, 62]

1.8.4. JEDNOKŘIVKOVÁ MULTIVARIAČNÍ KINETICKÁ ANALÝZA

Alternativou k postupům popsaným v kapitolách 1.8.2. a 1.8.3. je moderní postup takzvané jednokřivkové multivariační kinetické analýzy (sc-MKA) [67]. Základem této metody je původní Opfermanova multivariační kinetická analýza (MKA) [68] jež pomocí nelineární optimalizace řeší kombinaci rovnic (4), (15) a (19):

$$RSS = \sum_{j=1}^n \sum_{k=First_j}^{Last_j} w_{j,k} (Y_{exp_{j,k}} - Y_{cal_{j,k}})^2 \quad (19)$$

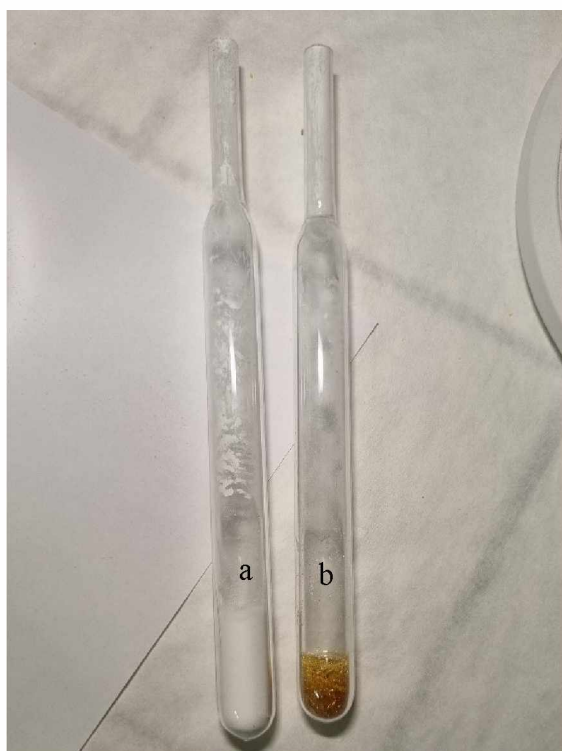
kde RSS je suma čtverců odchylek (minimalizovaná pomocí nelineární optimalizace), Y_{exp} a Y_{cal} jsou experimentálně naměřené a vypočtené hodnoty DSC nebo TGA signálu (v případě této diplomové práce Φ již po odečtení baseline, nebo hodnota úbytku hmotnosti Δm), $w_{j,k}$ je váhový faktor korigující zesílení signálu s rychlostí ohřevu u DSC techniky, index „i“ odpovídá jednotlivým měřeným bodům křivky, index „j“ odpovídá jednotlivým měřením. V případě jednokřivkové varianty sc-MKA odpadá váhový faktor a indexace přes „j“. Naopak je ale nutné zafixovat hodnotu E_A , aby nedošlo k divergenci v důsledku kompenzačního efektu mezi veličinami E_A a A . Hlavní výhodou sc-MKA metody je možnost získání závislosti kinetických parametrů A , M a N (popř. ΔH) na teplotě či rychlosti ohřevu, kdy extrapolace k nejnižším hodnotám těchto veličin umožňuje výrazně zpřesněné předpovědi kinetického chování.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

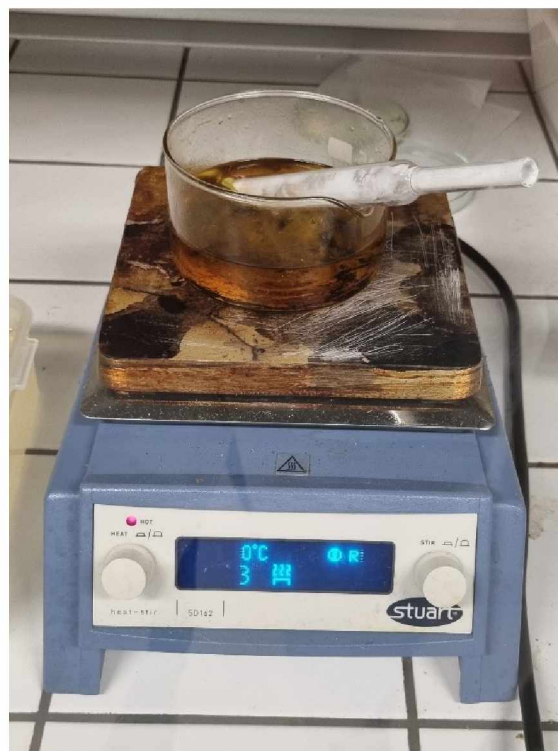
Tato kapitola se bude věnovat přípravě vzorku, která hraje důležitou roli k získání správných výsledků z měření. A následně zde bude věnována pozornost především metodám, které byly využity ke studiu stability, rozpustnosti a kinetiky griseofulvinu, jako jsou DSC, TG, disoluční zkouška, Ramanova spektroskopie a v neposlední řadě mikroskopie.

2.1. PŘÍPRAVA VZORKU

K přípravě amorfního griseofulvinu byl použit práškový griseofulvin (Sigma Aldrich, z *Penicillium griseofulvum*, 97.0-102.0 %), který byl převeden do křemenné ampule, tak aby jí byla ampule naplněna do 2 cm její výšky (Obr. 15 a). Takto naplněná ampule byla vložena do nádoby s olejem, který byl zahřátý nad teplotu tání griseofulvinu, tedy na 220 – 230 °C. Nádoba s olejem byla zahřáta na plotýnce, na které byla nastavená vysoká teplota, konkrétně 290 °C (Obr. 16). Poté, co byla všechna krystalická fáze zcela roztavena, byla ampule s taveninou griseofulvinu vyjmuta a rychle ochlazená ve studené vodě. Zcela ochlazená tavenina je vidět na Obrázku 15 b.



Obrázek 15: Ampule z křemenného skla
a. naplněná krystalickým griseofulvinem.
b. se vzniklým amorfním griseofulvinem.



Obrázek 16: Jednplotýnkový vařič, nádoba s rozeřtým olejem a ampule naplněná griseofulvinem.

Abychom z ampule vyjmuli amorfní fázi, byla ampule s amorfním vzorkem rozbita kladivem (Obr. 17), a skelný griseofulvin byl vybrán pinzetou do třecí misky (Obr. 18), kde byly příliš velké kousky převedeny na menší a menší zrna jemným poklepem. Pokud bychom získávali menší kousky třením, rozrušili bychom materiál a mohla by se projevit povrchová krystalizace, přestože je teplota pod T_g . Malé kousky amorfní fáze byly rozděleny na velikostní frakce pomocí sít s definovanou velikostí ok (Obr. 19). Prosetím bylo získáno sedm práškových frakcí (Obr. 20) o definovaných velikostech částic (20 – 50 μm , 50 – 125 μm , 125 – 180 μm , 180 – 250 μm , 250 – 300 μm , 300 – 500 μm a 500 – 1000 μm).



Obrázek 17: Ampule se skelným griseofulvinem po rozbití kladivem.



Obrázek 18: Malé částice skelného griseofulvinu v třecí misce.



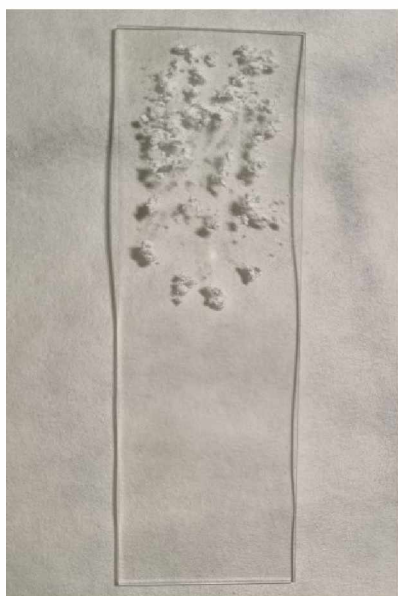
Obrázek 19: Použitá síta s různou velikostí ok.



Obrázek 20: Velikostní frakce griseofulvinu (20 – 50 μm , 50 – 125 μm , 125 – 180 μm , 180 – 250 μm , 250 – 300 μm , 300 – 500 μm a 500 – 1000 μm) získané prosetím přes síta s definovanou velikostí ok.

Takto připravený vzorek byl dále použit pro studium na DSC, TG a Ramanově spektroskopii.

Příprava vzorku amorfního griseofulvinu ke studiu pomocí mikroskopu se od předchozí liší. Práškový griseofulvin (Sigma Aldrich, z *Penicillium griseofulvum*, 97.0-102.0 %) byl rozmístěn na mikroskopické sklíčko (Obrázek 21), které bylo následně položeno přímo na jednoplotýnkový vaříč zahřátý na teplotu 240 °C (Obrázek 22). Po dokonalém roztavení bylo sklíčko odebráno a položeno na studené kachličky, aby tavenina rychle zatuhla a vznikla tak skelná fáze griseofulvinu (Obrázek 23).



Obrázek 21: Práškový krystalický griseofulvin rozmístěný na mikroskopickém sklíčku.



Obrázek 22: Jednoplotýnkový vaříč se vzorkem.



Obrázek 23: Vzniklý amorfni griseofulvin.

Na takto připravené kapky skelné fáze bylo zlehka poklepáno pinzetou, aby se narušila skelná fáze a podpořila se tak krystalizace. Pro další povzbuzení krystalizace bylo sklíčko vloženo do sušárny na teplotu 75 °C, po 10 minutách byla teplota zvýšena na 85 °C a vzorek byl ponechán v sušárně též 10 minut. Po uplynulém čase byl vzorek zkontrolován pod mikroskopem, a jelikož nevykazoval známky krystalizace, byl vrácen do sušárny, která byla nastavena na 95 °C, na dalších 10 minut. Po kontrole mikroskopem na vzorku nebyly objeveny žádné zárodky krystalů. Vzorek se tedy nechal volně ležet při laboratorní teplotě jeden měsíc a poté již byly viditelné známky krystalizace.

Pro disoluční zkoušku byly z původního krystalického práškového griseofulvinu a z připravených velikostních frakcí amorfního griseofulvinu připraveny tablety s hydrofilní matricí, šest pro práškový krystalický griseofulvin, šest pro každou velikostní frakci amorfního griseofulvinu a pro každou disoluci jeden blank, kde bylo dané množství griseofulvinu nahrazené suchým pojivem Prosolv[®] SMCC 90. Složení tablet je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 4: Složení tablet.

Látka	Množství [mg]
Griseofulvin	50
Prosolv [®] SMCC 90	245
Hypromelosa K4M	200
Stearát hořečnatý	5

Jedna tableta tedy dosahovala hmotnosti $500 \text{ mg} \pm 5 \text{ mg}$. Všechny zde uvedené látky byly přesně naváženy na analytických váhách do homogenizační patry, která byla poté vložena do homogenizéru. Homogenizér byl nastaven na jednu minutu na 10 kmitů za sekundu, následně minutu na 13 kmitů za sekundu a na poslední minutu na 15 kmitů za sekundu. Důkladně zhomogenizovaný prášek byl převeden do lisovací jednotky o průměru 13 mm (Obrázek 24) a udržován při tlaku 8 kN. Po pěti minutách byl tlak uvolněn a byla vyklepnutá pevná tableta (Obrázek 25). Tento postup byl použit pro nalisování všech tablet (krystal, amorf, blank). Takto připravené tablety byly použity při disolučním testu.



Obrázek 24: Přístroj pro lisování tablet.



Obrázek 25: Nalisované tablety, griseofulvin amorfni frakce 50 – 125 μm , griseofulvin amorfni frakce 300 – 500 μm a blank.

2.2. POSTUP MĚŘENÍ

Ke zkoumání stability, rozpustnosti, polymorfismu a kinetiky griseofulvinu byly využity metody, jako jsou DSC, TG, Ramanova spektroskopie, mikroskopie, a také disoluční zkouška.

2.2.1. DIFERENČNÍ SKENOVACÍ KALORIMETIE

Připravené vzorky byly zkoumány pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru s tepelným tokem DSC Q2000 (TA Instruments), který je zobrazen na Obrázku 26. Přístroj obsahuje autosampler s 50 pozicemi, který umožňuje velmi rychle změřit všechny připravené vzorky, dále chladičí zařízení RCS90, který zaručuje bezúdržbový průběh přístroje a poskytuje výbornou linearitu a preciznost při dodržení nastavené rychlosti ohřevu. Podstatnou výhodou tohoto přístroje je však T – zero technologie zaručující linearitu baseline/zeroline.



Obrázek 26: DSC Q2000 přístroj.

DSC přístroj se před vlastním měřením neobejde bez kalibrace, která je nezbytná k dosažení správných hodnot z měření. Kalibrace byla uskutečněna za shodných podmínek jako při reálném měření. První kalibrace, která byla provedena, se týká kapacity a rezistence DSC cely. Při této kalibraci je použit cyklický teplotní program, kde se střídá chlazení od

- 90 °C a ohřev do teploty 550 °C, a to s rychlostí teplotního programu 10 °C/min. Tento teplotní program byl proveden desetkrát. Následně byla DSC cela ochlazena na - 90 °C a tato teplota byla udržena po dobu 10 min. Potom byla cela zahřáta na teplotu 550 °C a právě z tohoto posledního ohřevu byla stanovena kalibrace pro zeroline. Dále byla provedena kalibrace teploty DSC přístroje, která byla uskutečněna pomocí látky se známou teplotou tání (standard). Kalibrace je dána určitým softwarem, v našem případě je to software „Advantage“ firmy TA Instruments, který povoluje kalibraci teploty až s osmi kalibračními standardy. Ovšem k uspokojivě přesnému měření je dostačující použít tři standardy. Námi použitými standardy byly In, Zn a H₂O. Každý z těchto standardů byl rychlostí 10 °C/min ochlazen 50 °C pod jeho teplotu tání a následný ohřev byl na teplotu 30 °C nad teplotu tání. Přístroj zaznamenal endotermní pík tání, ze kterého byla určena teplota onsetu a tato teplota pro každý standard byla zadána do softwaru Advantage. Poslední kalibrací je kalibrace tepelného toku přístroje, která byla realizována během kalibrace teploty, a využitým standardem zde bylo In. U endotermního píku tání In byla spočtena plocha pod křivkou a ze získané hodnoty byl stanoven korekční faktor porovnáním s tabelovanou hodnotou entalpie tání In.

Amorfní griseofulvin o velikostní frakci 50 – 125 µm byl na analytických vahách navážen do hliníkových kelímků a rovnoměrně rozprostřen na dno kelímku, čímž se zajistil co nejlepší tepelný kontakt vzorku se dnem kelímku a tím byly minimalizovány tepelné gradienty ve vzorku. Navážka se pohybovala v rozmezí 2 – 3 mg. Všechny hliníkové kelímky s naváženým vzorkem byly přiklopeny víčky, vloženy na podložku speciálního lisu a hermeticky uzavřeny. Takto připravené vzorky byly vloženy do autosampleru. Vlastní experiment byl proveden za neizotermních podmínek. Podmínky měření byly nastaveny pro každý vzorek zvlášť. Nejprve byl každý vzorek temperován po dobu 5 min při teplotě 10 °C. A následně byl nastaven ohřev vzorku na 250 °C, kdy pro každý vzorek byla volena jiná rychlost ohřevu (0,5; 1; 2; 5; 10 a 20 °C/min). Jejich proměřením byly získány charakteristické DSC křivky.

2.2.2. TERMOGRAVIMETRIE

Připravené vzorky byly také měřeny TG, konkrétně pomocí přístroje NETZSCH (STA 449 F5 Jupiter) zobrazeného na Obrázku 27. Tento přístroj je složen z temperovaných termovah a odporové pece s ohřevem odcházejících plynů bránícím jejich nežádoucí kondenzaci. Vzorky byly naváženy na analytických vahách do hliníkových kelímků, které byly následně umístěny po jednom vzorku pomocí pinzety na termováhy, které byly uzavřeny

do odporové pece. Navážka vzorků se pohybovala v rozmezí 2 – 3 mg. Na přístroji byly nastaveny parametry měření vzorku, což je navážka, typ měření a teplotní program.



Obrázek 27: Přístroj NETZSCH (STA 449 F5 Jupiter).

Měření bylo provedeno za neizotermních podmínek. Jedna série měření byla měřena při proplachování dusíkem a druhá série při proplachování stlačeným vzduchem s rychlostí průtoku 50 ml/min. Každá série měření byla uskutečněna s novým vzorkem s odlišnou rychlostí ohřevu (0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 10; 15; 20; 30 °C/min) v rozmezí teplot 30 – 400 °C. Program NETZSCH *Proteus Thermal Analysis* ke každému vzorku zaznamenal TG křivku, které byly následně v počítačovém programu převedeny na DTA křivky a nakonec tyto křivky byly vyhlazeny kvůli lepšímu stanovení maximálních bodů píků.

2.2.3. RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Daný vzorek amorfního griseofulvinu byl umístěn do hliníkového kelímku a pinzetou vložen do Ramanova spektroskopu DXR2 (Nicolet, ThermoFisher) Obrázek 28. Zaostření na jedno zrno vzorku bylo provedeno pomocí mikrošroubu, který ovládá posuvný stolek se vzorkem. Spektrum bylo měřeno při vlnové délce laseru 785 nm a výkonu laseru 25 mW s využitím různého expozičního času (0,2; 0,5; 1 s), který se opakoval 50krát nebo 100krát.



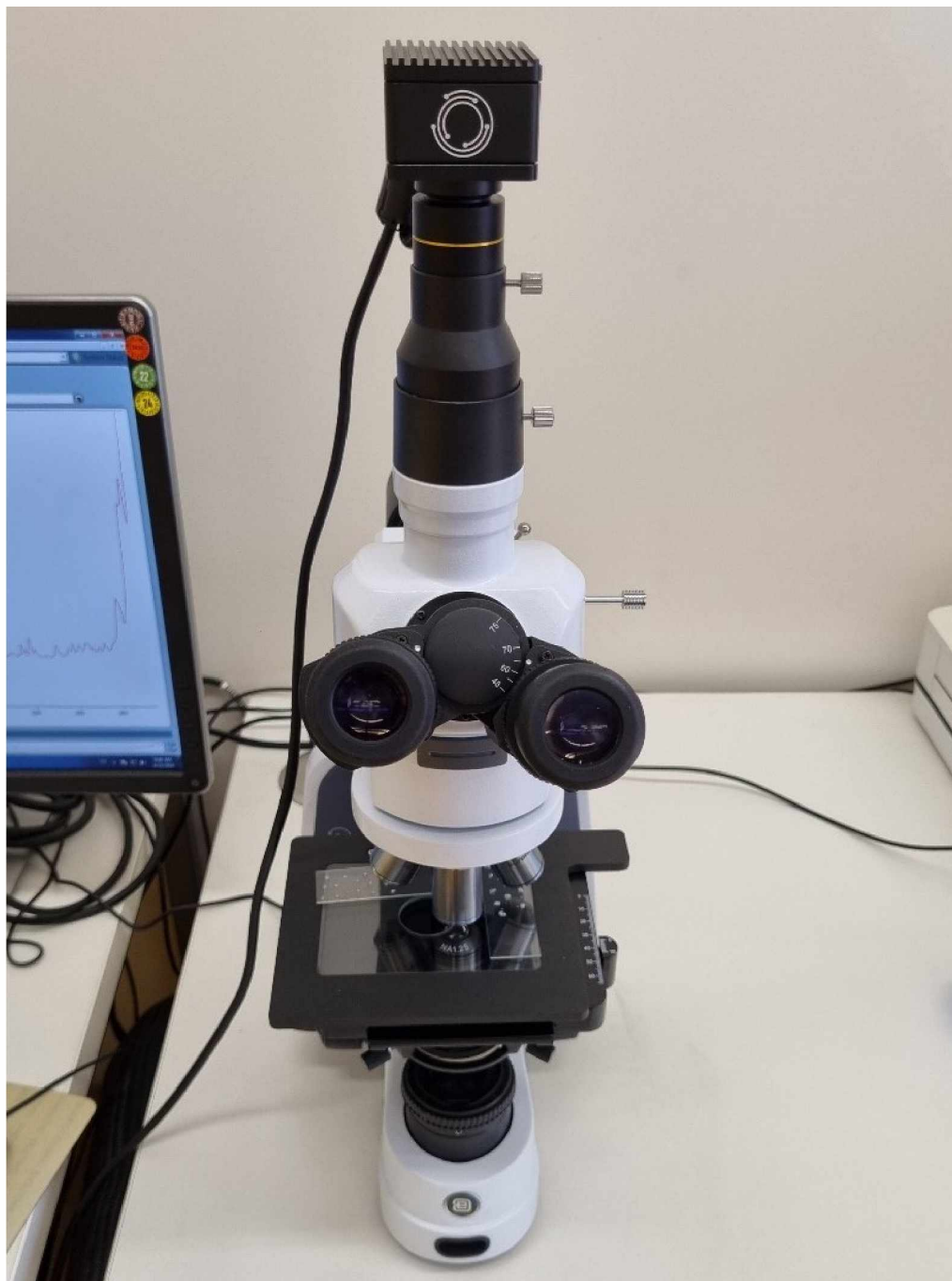
Obrázek 28: Ramanův spektroskop DXR2 (Nicolet, ThermoFisher).

Dále bylo měřeno spektrum na Ramanově spektroskopu tak, že byl nejdříve vložen kelímek s griseofulvinem do DSC přístroje na nízkou rychlost ohřevu (0,5 °C/min) a poté, co se vykreslil první krystalizační pík (85 °C), byl kelímek vyjmut a byl měřen na Ramanově spektroskopu za stejných podmínek uvedených výše. A poté byl experiment opakován, jen byla na DSC zvolena vyšší rychlost ohřevu 20 °C/min, protože při takto vysoké rychlosti ohřevu vzniká pouze dominantní krystalizační pík.

Získaná Ramanova spektra budou zobrazena a diskutována v kapitole 3.2.

2.2.4. OPTICKÁ MIKROSKOPIE

Podložní sklíčko se vzorkem bylo vloženo do optického mikroskopu, konkrétně do přístroje iScope PLMi (Euromex) vybaveného objektivy se škálou zvětšení 4x – 80x. (Obrázek 29). Pomocí mikrošroubů byl vzorek zaostřen na amorfni části vzorku, kde začala krystalizace. Fotografie bude uvedena v kapitole 3.



Obrázek 29: Optický mikroskop iScope PLMi (Euromex).

2.2.5. DISOLUCE

Pro experiment byla použita disoluční aparatura SOTAX AT 7 Smart – SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o. (Obrázek 30), je to přístroj s pádelky, který se skládá z míchadla, ze sedmi válcovitých nádob s kulatým dnem o objemu 1 litr, které jsou potopené ve vodní lázni. Nad vodní lázní se nachází příklop, ve kterém jsou umístěny otvory pro hnací hřídel, teploměr a otvor pro odběr disoluční kapaliny. Míchadlo je sestaveno z hnací hřídele, na jehož spodním konci se nachází dvě lopatky, které by měly být správně umístěny přibližně 2,5 cm ode dna nádoby. Horní konec hřídele je připojen k motorové jednotce, která reguluje otáčky. Poslední neméně důležitou součástí přístroje je vodní lázeň. Jejím úkolem je udržování konstantní teploty během celé disoluční zkoušky na teplotě $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.



Obrázek 30: Disoluční aparatura SOTAX AT 7 Smart.

V průběhu disolučních testů se používala disoluční média o pH 1,2 a 6,8, které simulují hodnoty pH v části GIT, konkrétně v žaludku (pH 1,2) a v tenkém střevě (pH 6,8). Tato disoluční média byla připravena v souladu s českým lékopisem. ^[51] K přípravě disolučního média o hodnotě pH 1,2 byla použita dvoulitrová odměrná baňka, do které bylo kvantitativně převedeno 500 ml 0,2 M roztok chloridu sodného (NaCl) a 850 ml 0,2 M roztoku kyseliny chlorovodíkové (HCl). Poté byl tento roztok doplněn redestilovanou vodou na celkový objem 2 l. Pro přípravu disolučního média o pH 6,8 byla taktéž použita dvoulitrová odměrná baňka, do které bylo kvantitativně převedeno 500 ml 0,2 M roztoku

dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 224 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného (NaOH). Tento roztok byl doplněn redestilovanou vodou na celkový objem 2 l. [66]

S lisovanými tabletami byly vykonány série disolučních testů. Zkouška byla provedena vždy pro jeden blank a šest tablet s danou velikostní frakcí griseofulvinu. Test byl realizován podle podmínek uvedených v českém lékopise [51] Do jednotlivých nádob, které byly umístěny v aparatuře, bylo vždy odměřeno 900 ml disolučního média o hodnotě pH 1,2, po vytemperování teploty na $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ byly vhozeny tablety a nastaven disoluční program. V této hodnotě pH byly tablety 2 hodiny, což je obvyklá doba, kterou se léčivo zdrží v žaludku. Následoval tzv. přehoz, kdy bylo z nádoby vysáto pouze disoluční médium s hodnotou pH 1,2 a bylo neprodleně nahrazeno vytemperovaným médiem o hodnotě pH 6,8. Disoluční zkouška tak následovala dalších 22 hodin. Celková doba disoluce tedy byla 24 hodin a vodní lázeň udržovala po celou tuto dobu teplotu v nádobách na $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$. Frekvence míchání byla 100 otáček za minutu.

Disoluční přístroj provedl odběr vzorků v daných časových intervalech u pH 1,2 3x po 10 minutách, 3x po 30 minutách a poté u pH 6,8 22x po 1 hodině. Tyto odebrané vzorky byly proměřeny na UV/VIS spektrometrii a stanovilo se tak uvolněné množství léčiva. Byla měřena absorbance při absorpčním maximu v daném pH a v dané tříbodové korekci pozadí. Hodnoty absorbance byly vždy měřené proti hodnotě absorbance tablety blanku. Získané absorbance pro dané léčivo v určitém disolučním médiu byly přepočteny pomocí metody kalibrační křivky na procenta uvolněné API, které byly následně vyneseny do grafu v závislosti na čase. Tento graf se nazývá disoluční profil léčiva.

Kalibrační křivka byla určena pomocí kalibračních roztoků. Byly připravené zásobní roztoky obsahující griseofulvin o koncentraci 0,1 M pro každou hodnotu pH 1,2 a 6,8. Na analytických vahách bylo do lodičky naváženo 10 mg griseofulvinu a kvantitativně bylo převedeno do odměrné baňky o objemu 100 ml. Následně byl rozpuštěn a doplněn na celkový objem disolučním médiem o hodnotě pH 1,2 a 6,8. Kalibrační roztoky byly připraveny pomocí podvojného ředění, tzn., že z koncentrovanějšího roztoku bylo vždy odebráno 3 ml a doplněno 3 ml daného disolučního média. Takto byla připravena kalibrační řada pro každou hodnotu pH o pěti roztocích a proměřena na UV/VIS spetrometru.

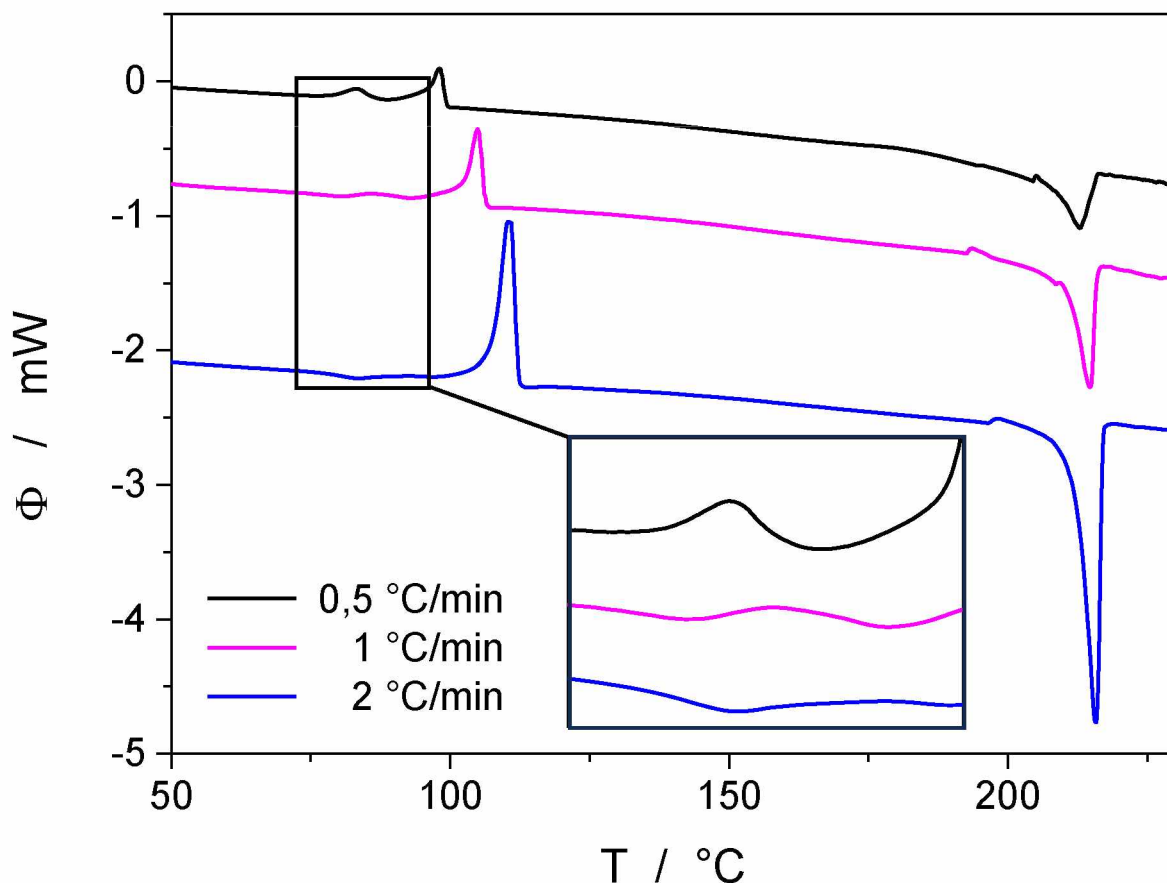
Disoluční profily a kalibrační křivky jsou uvedené v následující kapitole.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Připravené vzorky amorfního griseofulvinu (viz kapitola 2.1) byly zkoumány pomocí metod TA, konkrétně metodou DSC a TG za neizotermních podmínek. DSC sloužila ke studiu kinetiky krystalizace griseofulvinu a TG ke studiu kinetiky rozkladu griseofulvinu. Jako pomocné a ověřovací metody byly zvoleny mikroskopie a Ramanova spektroskopie. Poslední výsledky, které budou v této práci diskutovány, jsou disoluční profily, které jsou nezbytné k predikci vstřebávání léčiva v lidském organismu (in vivo).

3.1. CHARAKTERISTIKA DSC KŘIVEK AMORFNÍHO GRISEOFULVINU

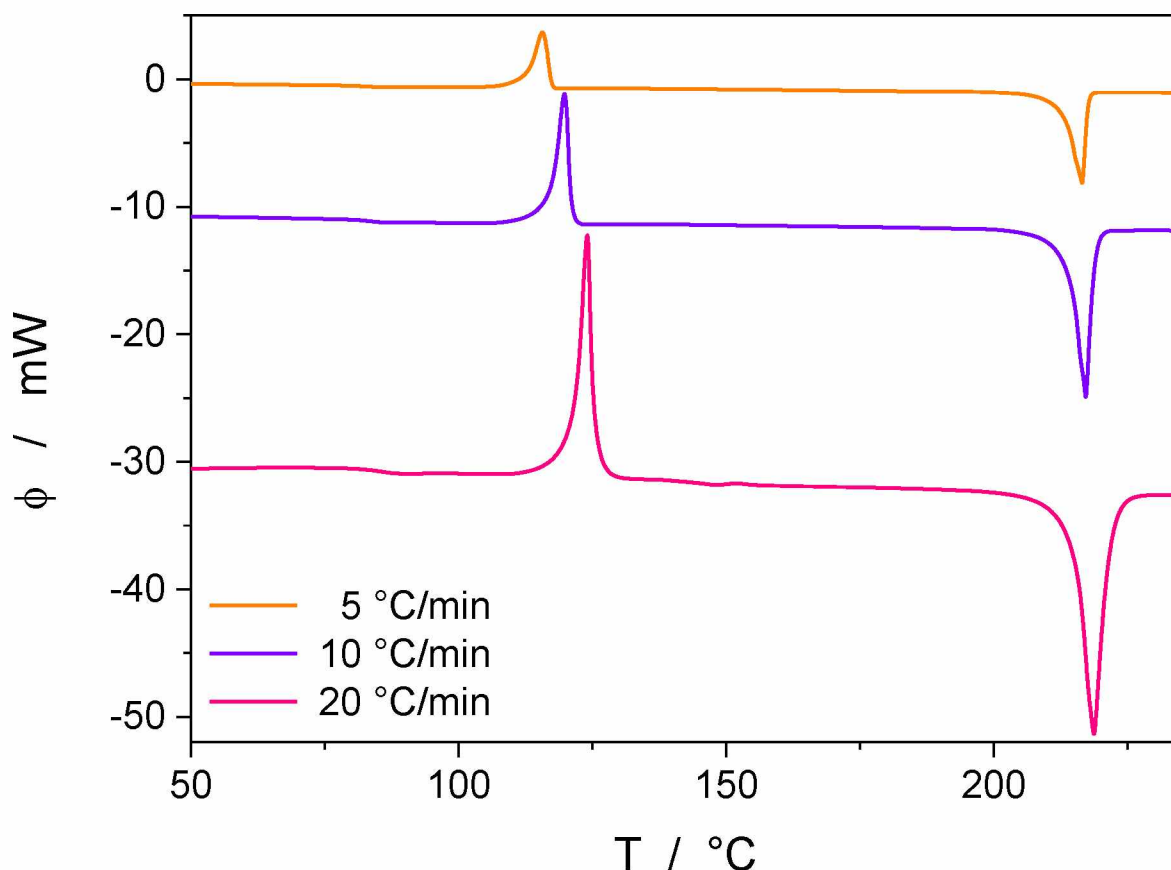
Základní kalorimetrická charakterizace připraveného amorfního griseofulvinu (velikostní frakce 50 – 125 μm) je znázorněna na Obrázcích 31 a 32, které zobrazují DSC křivky, tedy závislosti tepelného toku Φ na teplotě T . Každý vzorek je zahříván jinou rychlostí ohřevu od 0,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Jevy charakteristické pro ohřev amorfního materiálu lze identifikovat na většině zobrazených DSC křivek. V případě griseofulvinu se v teplotním rozsahu 75 – 90 $^{\circ}\text{C}$ se nachází endotermická schodová změna představující skelný přechod. Můžeme si všimnout, že signál skelného přechodu je přítomný u všech rychlostí ohřevu. Tento signál je ve srovnání s ostatními zobrazenými signály velmi slabý, a proto je těžko rozpoznatelný. Při nízkých rychlostech ohřevu (0,5 – 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) se skelný přechod překrývá s menším exotermickým píkem odpovídajícím částečné krystalizaci (detail Obr. 31). I po ukončení tohoto procesu je stále přítomná určitá část amorfního griseofulvinu, protože dochází k druhému ostrému exotermickému efektu při vyšší teplotě, konkrétně v rozmezí teplot 95 $^{\circ}\text{C}$ a 130 $^{\circ}\text{C}$ (v závislosti na rychlosti ohřevu), který odpovídá hlavní krystalizaci griseofulvinu. Posledním pozorovaným efektem na DSC křivce je relativně ostrý endotermický pík, který je v rozsahu teplot 200 – 220 $^{\circ}\text{C}$. Tento pík má extrapolovaný počátek při teplotě 215 $^{\circ}\text{C}$ a značí začátek tání krystalického griseofulvinu.



Obrázek 31: Získané DSC křivky pro velikost částic 50 – 125 μm amorfního griseofulvinu při různých rychlostech ohřevu. Exotermické efekty směřují směrem nahoru. Na detailu je zobrazen překrývající se efekt skelné transformace a krystalizace.

Na Obrázku 31 je z detailu patrné, že při takto nízkých rychlostech ohřevu (0,5 – 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) se na DSC křivce objevují dva krystalizační píky. První, méně patrný pík, se při nejnižší rychlosti ohřevu plně překrývá s oblastí skelné transformace, jejíž charakteristická teplota je tudíž neidentifikovatelná. Při nepatrně vyšších rychlostech (1 – 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) je již oddělitelná oblast skelné transformace od prvního krystalizačního píku. Výskyt dvou krystalizačních píků by tedy mohl být způsoben tzv. bezdifúzním povrchovým růstem krystalů, který se zpravidla objevuje u farmaceutických substancí právě pod teplotou skelné transformace T_g a v její blízkosti. Tento neobvyklý růst krystalů se uskutečňuje na povrchu léčiva, ačkoli je v objemu dané léčivo zatuhlé a nemá tak dostatek energie ani prostoru, aby se molekuly mohly začít hýbat a zahájila se objemová krystalizace. Povrchové molekuly jsou oproti tomu velice pohyblivé a schopné krystalizace, přestože není jejich objemová mobilita vysoká. Bezdifúzní povrchový růst krystalů je jednoznačně spojen s povrchovou mobilitou molekul pod teplotou skelné transformace, jelikož růst krystalu nepřetržitě vytváří volné

povrchy a dutiny v důsledku vyšší hustoty krystalu oproti amorfní fázi, tudíž se urychluje povrchová mobilita a tím i krystalizace. Krystalizace griseofulvinu vyvolá velké zvýšení hustoty až o 8 % (ostatní amorfní látky pouze zvýšení hustoty o 5 % a méně) a tím se během krystalizačního procesu vytvoří velké množství volného povrchu a prázdného prostoru, což vede k urychlení krystalizace. Dále rychlost růstu krystalů ovlivňuje mechanické poškození – čím větší mechanické poškození, tím rychlejší růst krystalů ^[69] (v případě těchto dat se jednalo o poměrně jemnou práškovou frakci). Právě kombinace těchto dvou krystalizačních mechanismů může způsobit jev, který pozorujeme u nejnižších rychlostí ohřevu, tj. velmi rychlý ale prostorově omezený růst krystalické fáze v oblasti T_g . Předpokládáme iniciaci bezdifúzním mechanismem a následné šíření v oblasti mechanických defektů.



Obrázek 32: Získané DSC křivky pro velikost částic 50 – 125 μm amorfního griseofulvinu při různých rychlostech ohřevu. Exotermické efekty směřují směrem nahoru

Dále si na Obrázcích 31 a 32 můžeme všimnout, že náběhová část hlavního krystalizačního píku a píku tání je pozvolnější než sestupná část. To je typické pro nukleačně-růstový mechanismus krystalizace. Nelze ovšem vyloučit, že krystalizace probíhá více než

jedním krystalizačním mechanismem. Je také potřeba zvážit, zda se během krystalizace nevytváří více polymorfů. Jak již bylo zmíněno (v kapitole 1.2.), polymorfem se rozumí látka, která existuje ve více krystalických formách. U griseofulvinu byly doposud objeveny tři polymorfy, kde forma I je termodynamicky stabilní a forma II a forma III jsou metastabilní. Forma II je zajímavá v tom, že rychlost růstu krystalů je neobvykle pomalá oproti ostatním krystalickým formám. Jejich teploty tání T_m a entalpie tání $\Delta H_{\text{tání}}$ jsou uvedeny v následující tabulce. ^[1]

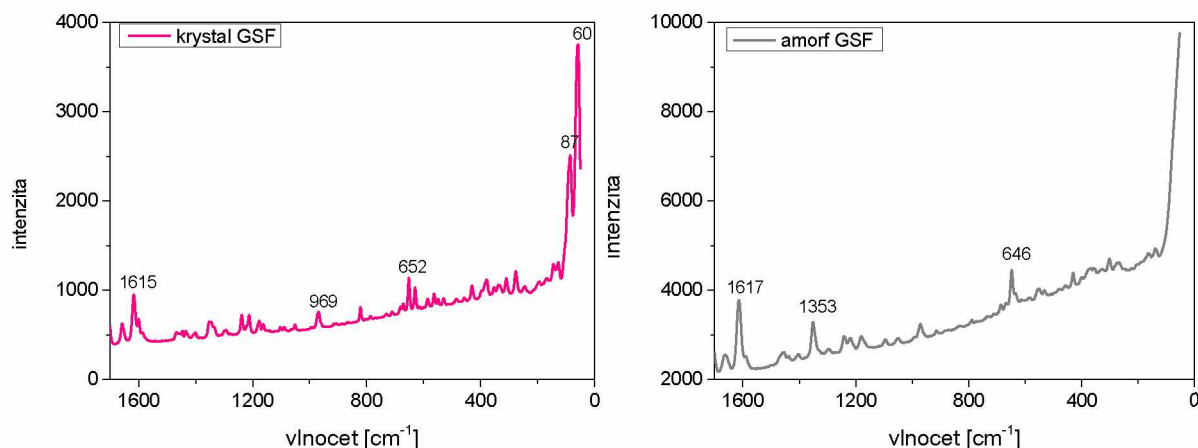
Tabulka 5: Polymorfy griseofulvinu a jejich teploty tání T_m a entalpie tání $\Delta H_{\text{tání}}$.

krystalická forma	T_m [°C]	$\Delta H_{\text{tání}}$ [J/g]
forma I	219	116
forma II	213	82
forma III	204	78

Stanovení různých polymorfů API je zásadním krokem ve vývoji farmaceutického léčiva, protože strukturální rozdíly mají silný vliv na terapeutické vlastnosti léčiv, jako je fyzikální a chemická stabilita včetně rozpustnosti, rychlost rozpouštění a biologická dostupnost. ^[21] Pro rozlišení a odhad polymorfů byla v této práci použita Ramanova spektroskopie. Její strukturální analýza bude diskutována v následující kapitole 3.2.

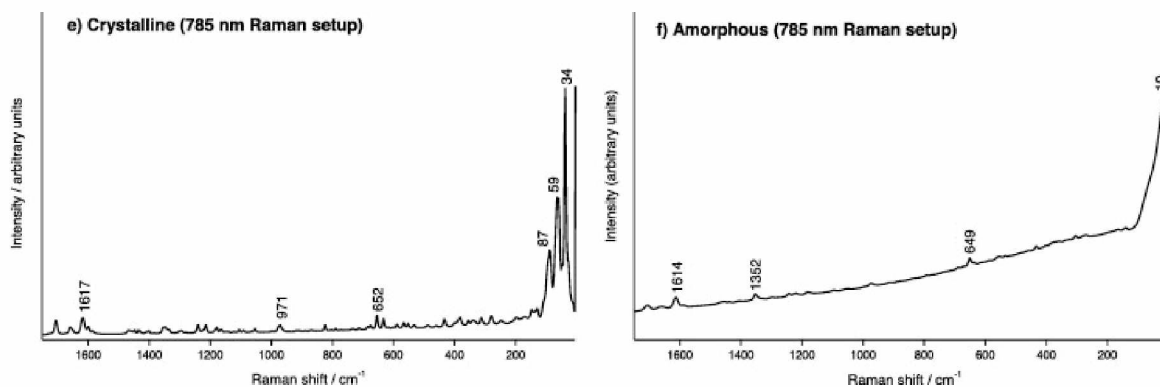
3.2. RAMANOVA SPEKTROSKOPIE

Pomocí Ramanovy spektroskopie bylo nejprve ověřeno, zda bylo reálně připraveno amorfní léčivo. Na Obrázku 33 můžeme vidět spektra, která byla naměřena na Ramanově spektroskopu a ukazují rozdíly mezi krystalickou a amorfní fází griseofulvinu



Obrázek 33: Ramanova spektra griseofulvinu, vlevo krystalická forma a vpravo amorfní forma.

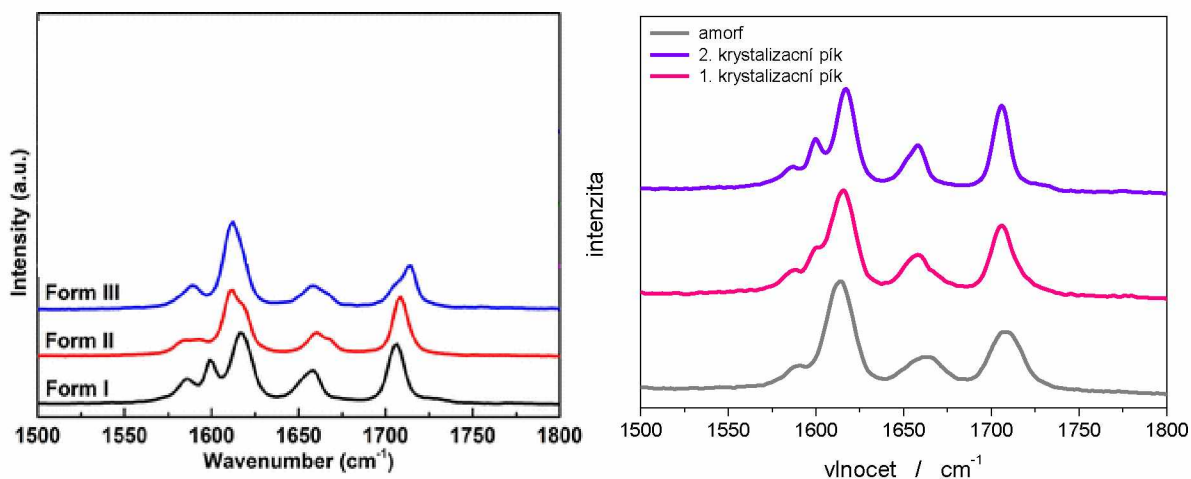
Na Obrázku 34 jsou též naměřená spektra pro krystalický a amorfní griseofulvin, která byla ovšem převzata z literatury k porovnání.



Obrázek 34: Ramanova spektra griseofulvinu, vlevo krystalická forma, vpravo amorfní forma.^[46]

Na Obrázcích 33 a 34 si můžeme všimnout, že u amorfní fáze vidíme daleko méně piků než u krystalické formy. Nejlépe viditelné je to na hraně Rayleighova pásu, tj. okolo vlnočtu 0-100 cm⁻¹, kde u amorfní formy je vidět hladký náběh píku, kdežto u krystalické formy nikoliv.

Dále byla Ramanova spektroskopie použita k ověření, že během krystalizace u prvního píku dochází k produkci stejného materiálu jako během krystalizace u druhého neboli dominantního píku. Ramanova spektra griseofulvinu změřená po vyjmutí vzorku v danou chvíli z DSC přístroje jsou zobrazena na následujícím Obrázku 35 vpravo.

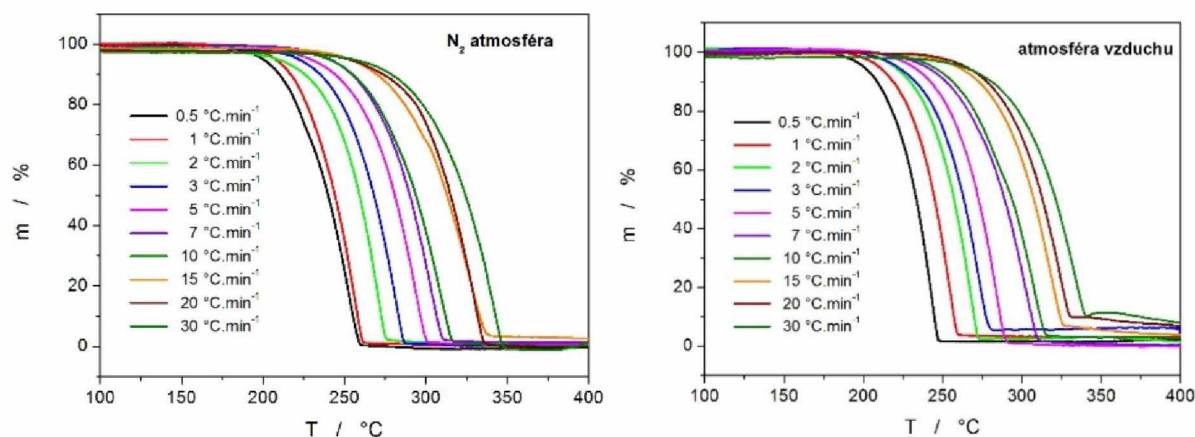


Obrázek 35: Ramanova spektra griseofulvinu. Vlevo obrázek z literatury pro porovnání polymorfů. ^[upraveno z 68] Napravo změřená Ramanova spektra prvního krystalizační pik a dominantního krystalizační píku.

Pokud porovnáme Ramanovo spektrum pro tři polymorfy griseofulvinu převzaté z literatury (Obrázek 35 vlevo) s naměřeným Ramanovým spektrem (Obrázek 35 vpravo) můžeme si všimnout, že dominantní neboli druhý krystalizační pik, znázorněn na Obrázku 35 vpravo fialovou barvou, zcela odpovídá polymorfní formě I, tedy termodynamicky stabilní krystalické formě griseofulvinu. Ovšem u prvního krystalizačního píku objevujícího se pouze při nízkých rychlostech ohřevu, který je zobrazen na Obrázku 35 vpravo růžovou barvou, můžeme vidět, že zde signál plně neodpovídá krystalické fázi, ale že se mixuje se signálem amorfní fáze, který je zobrazen na obrázku 35 vpravo šedou barvou. Jelikož vzorek v toto chvíli ještě není zcela zkrystalizovaný a obsahuje určité množství amorfního griseofulvinu.

3.3. TEPELNÁ DEGRADACE

Tepeelná degradace amorfního griseofulvinu byla zkoumána pomocí termogravimetrie. Křivky úbytku hmotnosti pro atmosféru vzduchu a pro atmosféru dusíku (N_2) jsou znázorněny na Obrázku 36.



Obrázek 36: Získané TG křivky griseofulvinu, nalevo při N_2 atmosféře a napravo při atmosféře vzduchu.

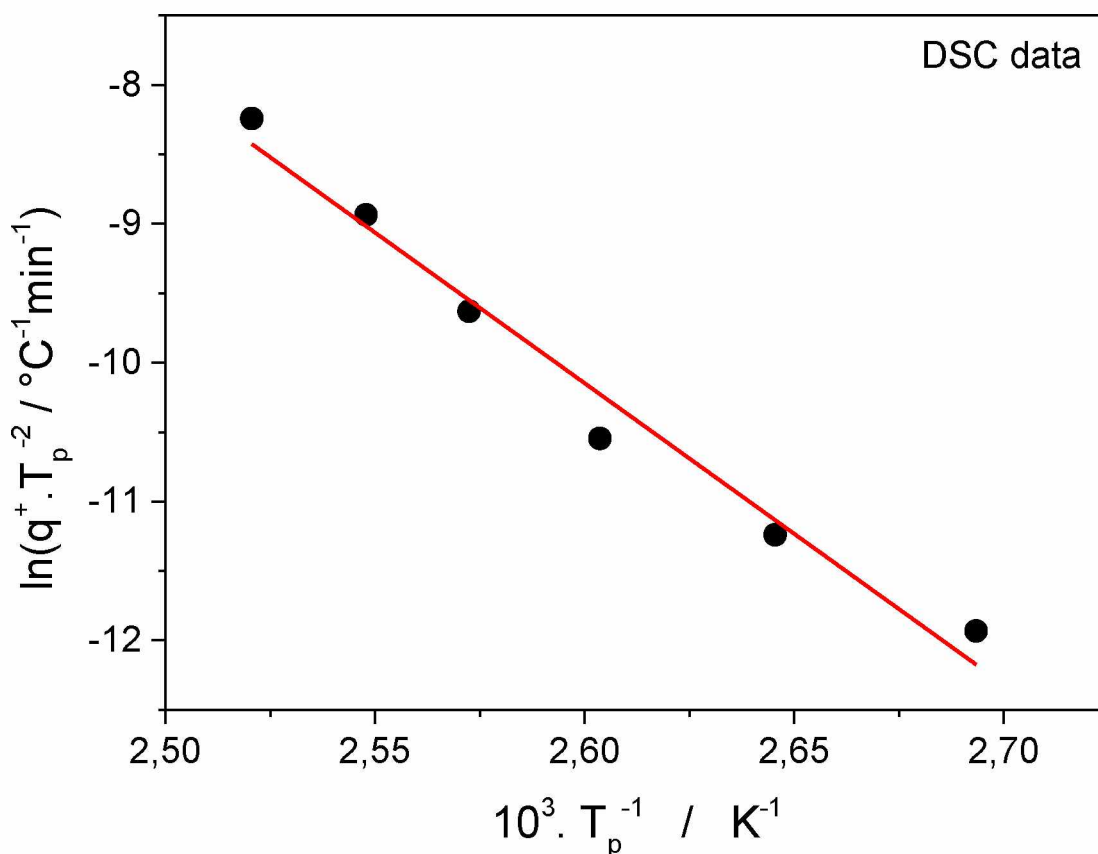
Z Obrázku 36 je patrné, že počáteční teploty pro proces rozkladu griseofulvinu jsou podobné při obou použitých atmosférách, které s rostoucí rychlostí ohřevu rostou, což potvrzuje, že potenciální oxidace významně neovlivňuje rozklad griseofulvinu. Atmosféra vzduchu nevede při vyšších rychlostech ohřevu k úplnému zplynění (v hliníkových kelímcích byl zaznamenán uhelnatý zbytek pohybující se hmotností okolo 5 – 10 %). Celkově se ovšem velmi pravděpodobně jedná o jednoduchý proces rozkladu. Alternativou může být pouze proces odpařování; této variantě nahrává fakt, že k první ztrátě hmotnosti dochází těsně po roztátí vzorku.

Znalost teploty onsetu léčiv je důležitá, při použití moderních metod ve farmacii, protože při extruzi nebo u 3D tisku je nutné vědět, při jakých teplotách dochází k rozkladu vzorku. Rozklad léčiva totiž může způsobit vznik toxických látek, což je ve farmacii samozřejmě nežádoucí. Hot melt extruze se pohybuje kolem 140 – 150 °C, ovšem u 3D tisku už je zapotřebí vyšších teplot (190 – 210 °C). Z Obrázku 36 můžeme vyčíst, že teplota onsetu se při velmi nízkých rychlostech ohřevu vzorku griseofulvinu pohybuje kolem 200 – 210 °C, proto je potřeba upozornit, jakou teplotou by se 3D tisk prováděl.

3.4. KINETIKA KRYSTALIZACE AMORFNÍHO GRISEOFULVINU

Prvním a důležitým krokem kinetické analýzy experimentálních DSC dat, je určit aktivační energii krystalizace E_A . Právě hodnota E_A je klíčová při zvolení správného kinetického modelu předpovídající chování griseofulvinu za jakýchkoli podmínek. Dále je nezbytná k popisu průběhu děje ve vzorku. Ke stanovení E_A se dá použít několik metod, které jsou uvedeny v kapitole 1.8.1.

Zvolená metoda je nejčastěji metoda používaná v praxi, Kissingerova metoda. Kissingerova závislost (rovnice 5) monitorující vývoj maxima dominantního krystalizačního píku je znázorněna na Obrázku 37. Hodnota E_A byla vypočtena ze směrnice lineární závislosti, tedy z tvaru $-\frac{E_A}{R}$. Hodnota E_A je $173,95 \pm 13,05$ kJ/mol.

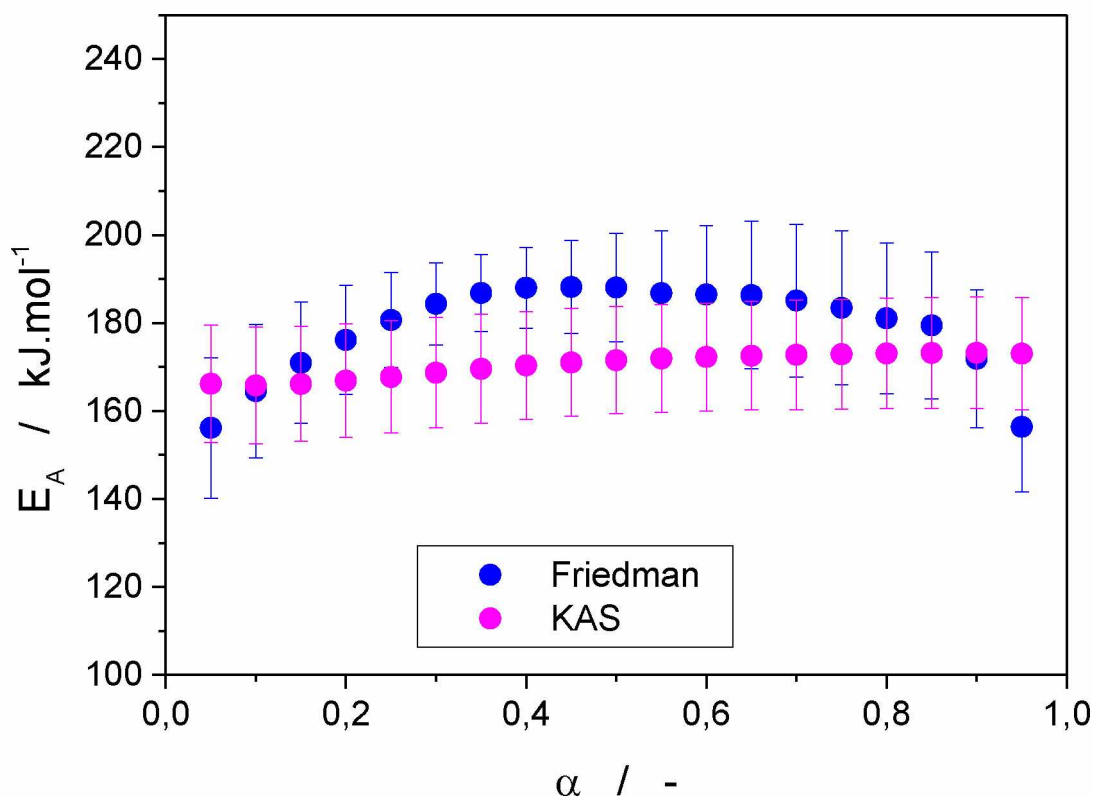


Obrázek 37: Kissingerův graf pro dominantní krystalizační píky – vyhodnocení z dat reprezentovaných na Obrázcích 31 a 32.

Je třeba zdůraznit, že ne všechny body v Kissingerově grafu splňují lineární uspořádání. Tento defekt není způsoben tepelnými gradienty ve vzorku, které by byly způsobeny příliš vysokou rychlostí ohřevu nebo nadměrnými navážkami vzorku. Mohlo by to

být způsobeno tím, že při nízkých rychlostech se objevují dva krystalizační píky a krystalizace se tak urychluje (objevuje se při nižších teplotách).

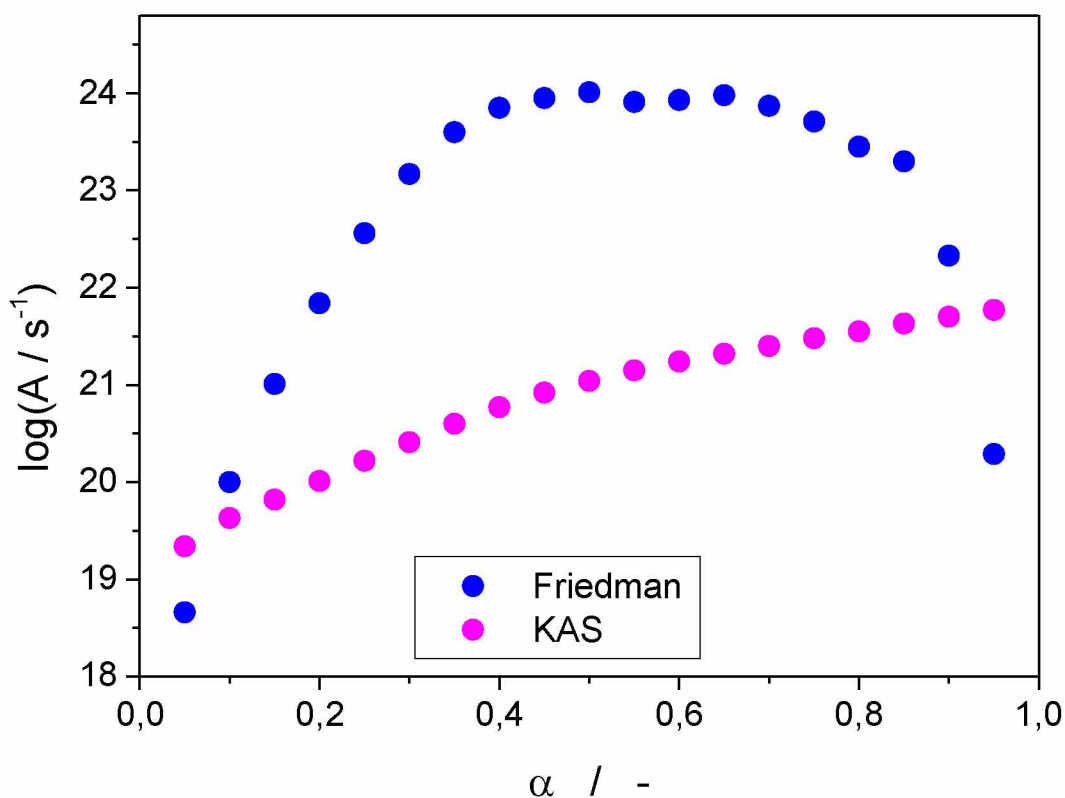
Další metody, kterými byla ověřena hodnota E_A , jsou izokonverzní diferenciální Friedmanova metoda a izokonverzní integrální KAS metoda. Z Obrázku 38 je vidět, že hodnoty E_A odpovídající KAS metodě se téměř podobají hodnotě, která byla určena Kissingerovou metodou, tudíž tuto hodnotu můžeme považovat za vhodnou. Pokud se zaměříme na data vyhodnocené pomocí metody Friedman, tak si můžeme všimnout, že nesedí na hodnotu E_A vyhodnocenou Kissingerem, to může být následek toho, že body v Kissingerově grafu (Obrázek 37) nejsou uspořádány lineárně. Friedmanova metoda bere více v potaz data, která jsou vyhodnocena pro vyšší rychlosti ohřevu než ty při nižších rychlostech.



Obrázek 38: Závislosti $E_A - \alpha$ určené Friedmanovou a KAS metodou pro krystalizační dominantní píky.

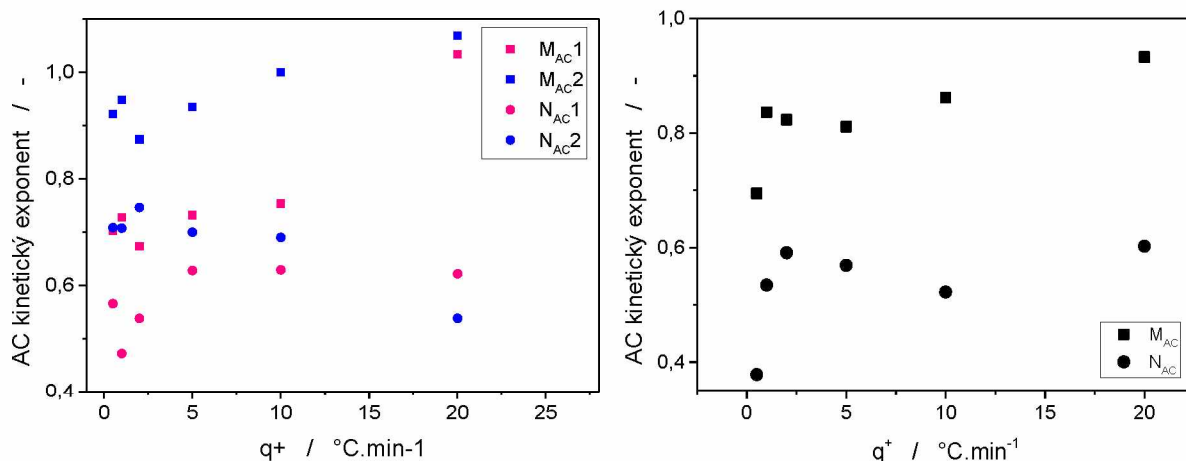
Vyhodnocení pomocí izokonverzních metod není vhodné, protože se s rostoucí rychlostí ohřevu mění i tvar píku. Pokud se tedy mění asymetrie píku s rychlostí ohřevu, tak nemá význam fyzikálně-chemicky interpretovat vývoj závislosti E_A na α .

Díky kompenzačnímu efektu trendy A na α (Obrázek 39) odpovídají trendům E_A na α .



Obrázek 39: Závislost A na α .

Podle vizuálního posouzení tvarů krystalizačních píků (Obrázky 31 a 32) je jasné, že není vhodné použít k popisu kinetiky krystalizačních dat JMA model, a proto byl uplatněn model AC. Pomocí jednokřivkové multivariační kinetické analýzy (sc-MKA), kdy byla zafixována hodnota E_A z Kissingerovy metody, byly vyhodnoceny parametry N a M. Nejdříve bylo provedeno fitování pouze jedním (dominantním) krystalizačním píkem, kde byl korelační faktor R roven hodnotě 0,989. Poté byl proveden fit přes oba krystalizační píky, kde je hodnota R rovna 0,999. Vzhledem ke korelačním faktorům, byl vybrán fit s lepší hodnou R, když byl fit veden přes oba krystalizační píky. Výsledné hodnoty N a M parametrů jsou znázorněny na Obrázku 40, vpravo je výsledek odpovídající fitu pouze jedním krystalizačním píkem a vlevo je výsledek, který odpovídá fitu obou krystalizačních píků.

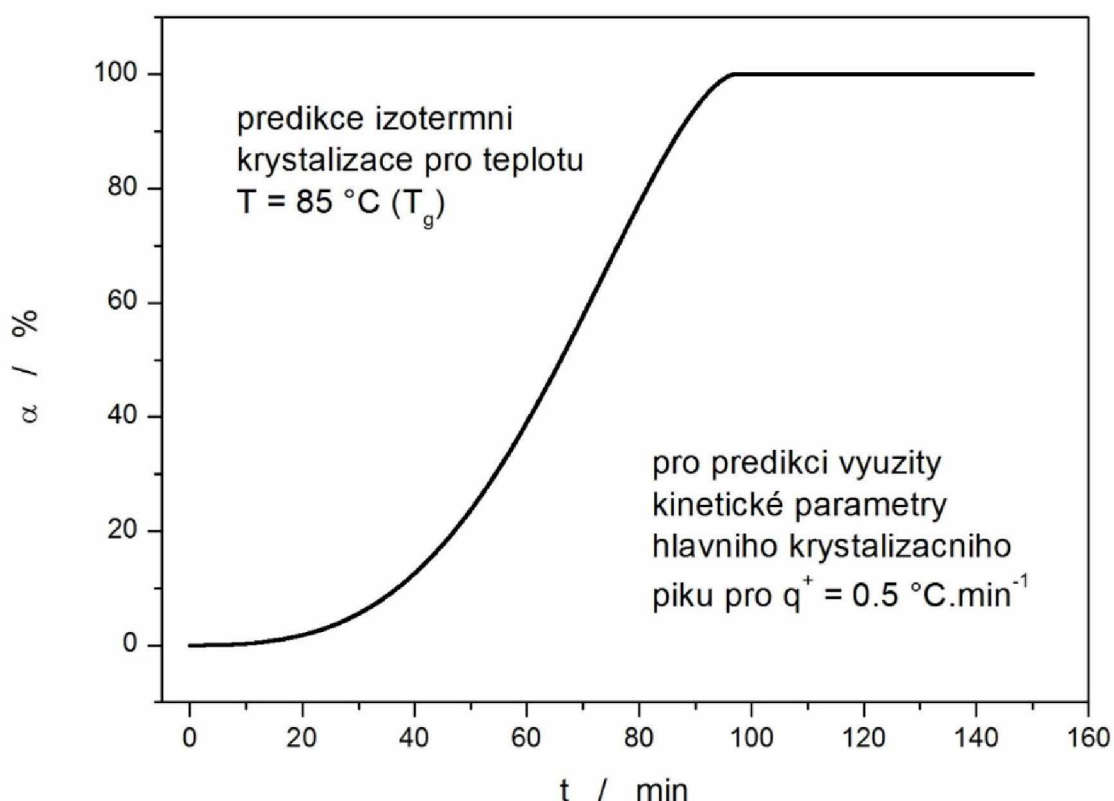


Obrázek 40: Kinetické exponenty vyhodnocené metodou sc-MKA pro krystalizační data.
 Vlevo fit dvěma krystalizačními píky, vpravo fit jedním krystalizačním píkem,

Hlavní výhodou sc-MKA metody je možnost získání závislosti kinetických parametrů A , M na teplotě či rychlosti ohřevu, a především možnost predikovat chování materiálu (v případě této diplomové práce průběh procesu krystalizace) za různých, obvykle těžko měřitelných podmínek. Griseofulvin je jako amorfni léčivo v tomto ohledu poněkud specifický, neboť jeho T_g je narozdíl od velkého množství ostatních účinných látek vysoko nad laboratorní teplotou – přibližně u 85 °C. V takovém případě je kinetická predikce pro laboratorní teplotu (25 °C) bezpředmětná, protože je jisté, že jakékoli (i dlouhodobé) skladování amorfniho griseofulvinu při takové teplotě nepovede pouze vlivem teploty ke vzniku krystalické fáze. I kdybychom ignorovali vliv snížené objemové difúze pod T_g , predikce vycházející z krystalizačních parametrů hlavního krystalizačního píku udává, že by tvorba signifikantního množství krystalické fáze trvala roky. Podobně je ale diskutabilní účelnost kinetické predikce pro teploty charakteristické například pro proces hot melt extruze (typicky 110 – 130 °C), protože tyto teploty jsou zase už na úrovni krystalizačních píků získaných při rychlostech ohřevu 5 – 20 °C.min⁻¹. V takovém případě by podle kinetické predikce došlo ke krystalizaci amorfniho léčiva prakticky okamžitě, neuvažujeme-li případnou stabilizaci amorfni formy dalšími excipienty.

Velmi zajímavé je ovšem použití kinetické predikce krystalizačního chování pro oblast T_g . Při výzkumu strukturní relaxace probíhající paralelně s prací na této diplomové práci bylo zjištěno, že krystalizaci z bezdifúzně vytvořených povrchových nukleí (odpovídající 1. krystalizačnímu píku pozorovanému u T_g při nízkých rychlostech ohřevu) lze úspěšně potlačit rychlým zahřátím materiálu těsně nad T_g , kdy velmi pravděpodobně dochází k tzv.

efektu self-healingu mechanicky indukovaných defektů, jež figurují v propagaci růstu krystalů. Tato data byla získána nad rámec diplomové práce a jsou publikována v [71]; jedná se o velmi významnou a pro farmaceutickou praxi užitečnou možnost stabilizace amorfní fáze. Jelikož lze takto v případě griseofulvinu efektivně potlačit rychlou (prakticky okamžitou) tvorbu krystalické fáze v oblasti T_g , stává se pro tuto proceduru relevantní růst krystalů probíhající nezávisle na nízkoteplotní povrchové difúzi, charakterizovaný hlavním krystalizačním pikem, pro který byla provedena podrobná kinetická analýza. Kinetická predikce spočítaná z těchto dat je uvedena na Obrázku 41.

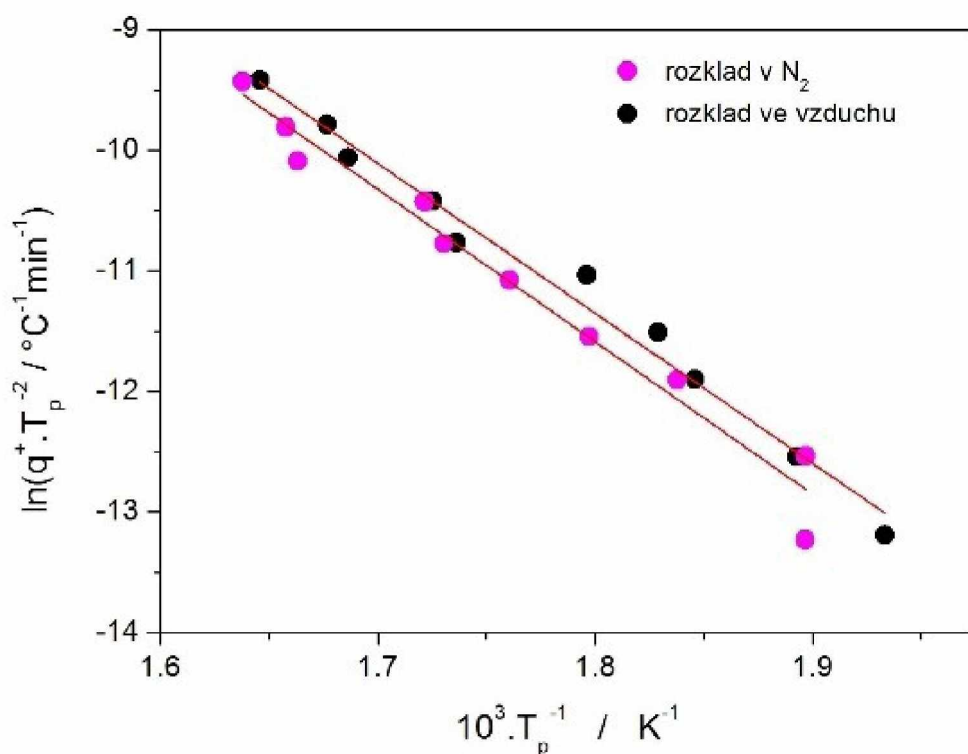


Obrázek 41: Predikce chování griseofulvinu při teplotě $85 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Jak je zřejmé, signifikantní množství krystalické fáze se začíná formovat přibližně po dvaceti minutách temperace při $85 \text{ } ^\circ\text{C}$. Toto je tedy odhadovaný limit pro aplikaci navrhované techniky stabilizace amorfního griseofulvinu ohřevem na/nad teplotu T_g . Ovšem tuto přesnost nelze brát za zcela spolehlivou, protože byla brána v úvahu pouze průměrnou E_A . Další věc, na kterou je potřeba dát si pozor je, že tato predikce platí pouze pro danou velikost částic griseofulvinu, v této diplomové práci je to frakce $50 - 125 \text{ } \mu\text{m}$.

3.5. KINETIKA TEPELNÉHO ROZKLADU

Termogravimetrické křivky griseofulvinu vysokoteplotního rozkladu byly zpracovány podobným způsobem jako dříve diskutovaná krystalizační data. Kissingerovy závislosti podle rovnice (5), které odpovídají rozkladu ve dvou reakčních atmosférách (N₂ a vzduch), jsou znázorněny na Obrázku 42.

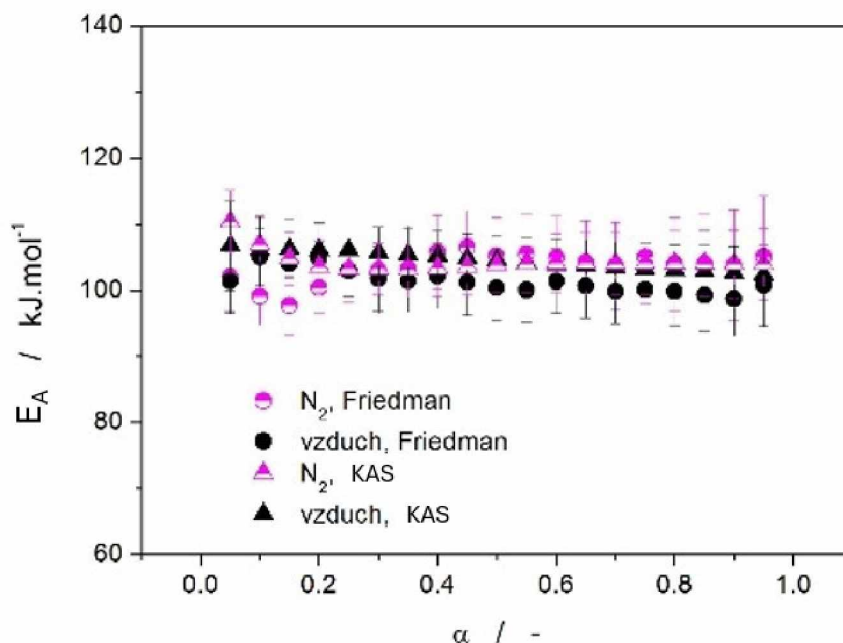


Obrázek 42: Kissingerův graf pro rozklad griseofulvinu v atmosféře N₂ a ve vzduchu.

Vzájemná poloha obou závislostí na Obrázku 42 naznačuje, že rozklad ve vzduchu může probíhat o něco rychleji, ale s prakticky podobnou aktivační energií:

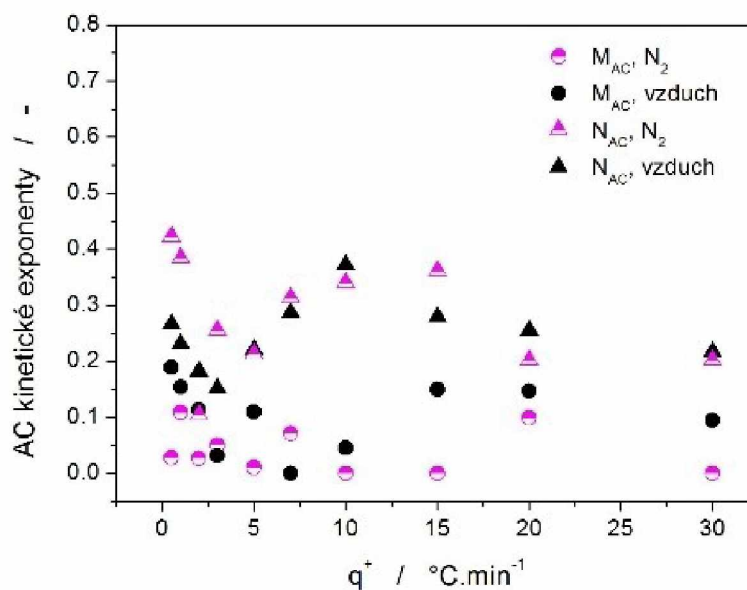
- Pro vzduch: $E_A = 104,0 \pm 4,2 \text{ kJ/mol}$ a $\log(A/\text{s}^{-1}) = 7,48$
- Pro N₂: $E_A = 105,8 \pm 5,8 \text{ kJ/mol}$ a $\log(A/\text{s}^{-1}) = 7,53$

Velmi podobné hodnoty aktivační energie byly získány též z izokonverzní diferenciální Friedmanovy metody (rovnice 6) a z izokonverzní integrální KAS metody (rovnice 6). Graf je zobrazen na Obrázku 43.



Obrázek 43: Závislosti $E_A - \alpha$ určené Friedmanovou a KAS metodou pro dekompoziční data.

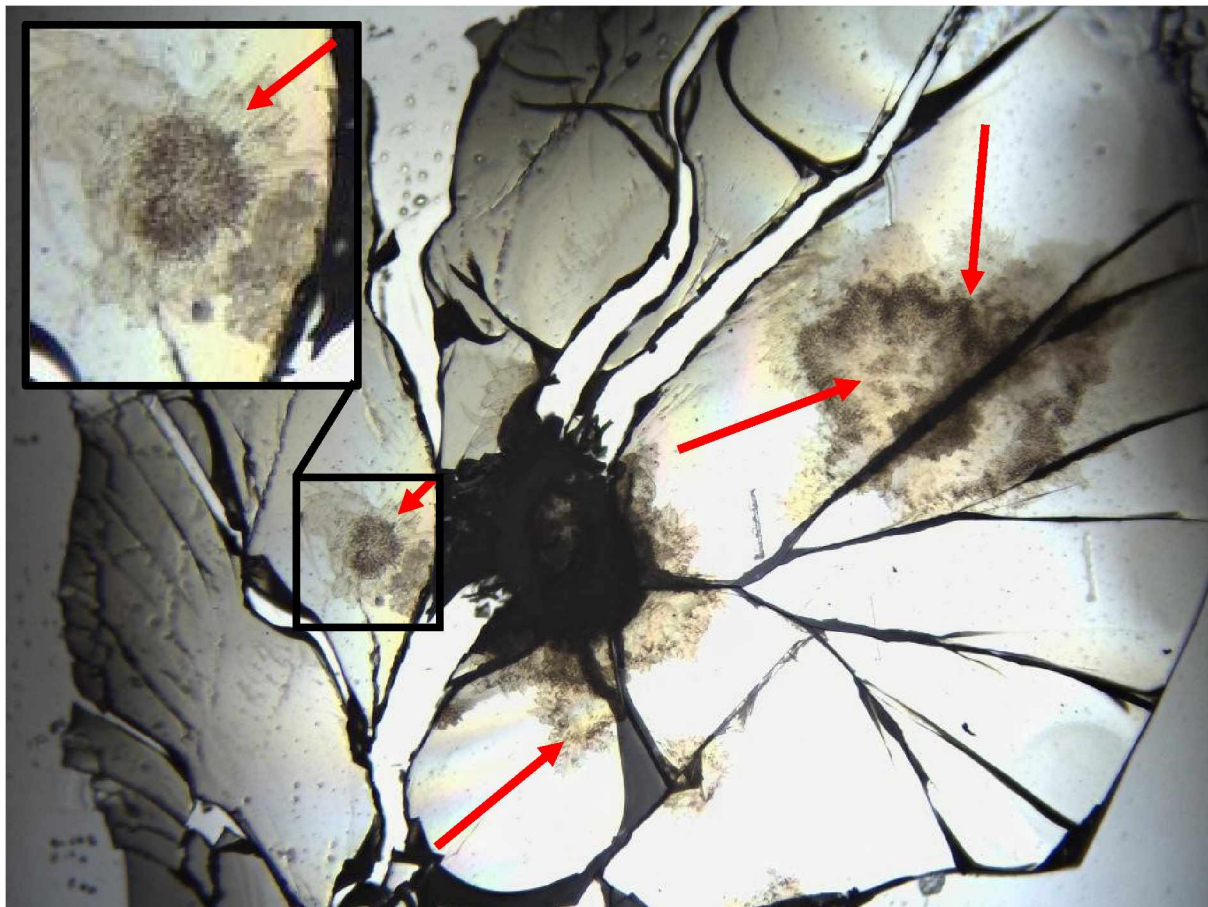
Na rozdíl od krystalizačních dat vykazuje tepelný rozklad pozoruhodně konstantní závislosti $E_A - \alpha$, což naznačuje rovnoměrnost a reprodukovatelnost mechanismu rozkladné reakce. Protože fyzikální smysluplnost kinetiky růstu nukleace je pro tepelný rozklad sporná, byl AC model použit jako výchozí pro popis TG dat. Úbytek hmotnosti spojený s rozkladem byl skutečně popsán dvouparametrovým autokatalytickým modelem AC s mimořádně vysokou přesností (průměr $R^2 > 0,9999$). Kinetika založená na AC modelu je pro TG data vyjádřena prostřednictvím vývoje kinetických exponentů M a N (Obrázek 44)



Obrázek 44: Kinetické exponenty vyhodnocené metodou sc-MKA pro data rozkladu.

3.6. OPTICKÁ MIKROSKOPIE KRYSTALIZUJÍCÍHO GRISEOFULVINU

Dále byla krystalizace amorfního léčiva griseofulvinu pozorována pomocí přímé experimentální techniky, a to mikroskopie. Na Obrázku 45 je zobrazena fotografie z optického mikroskopu, která zobrazuje vyrůstající krystaly griseofulvinu při teplotě 75 °C z mikrotrhliny, která byla uměle vytvořena na hladkém povrchu kapky amorfního griseofulvinu. Rozměry snímku jsou 0,5 x 0,5 mm.



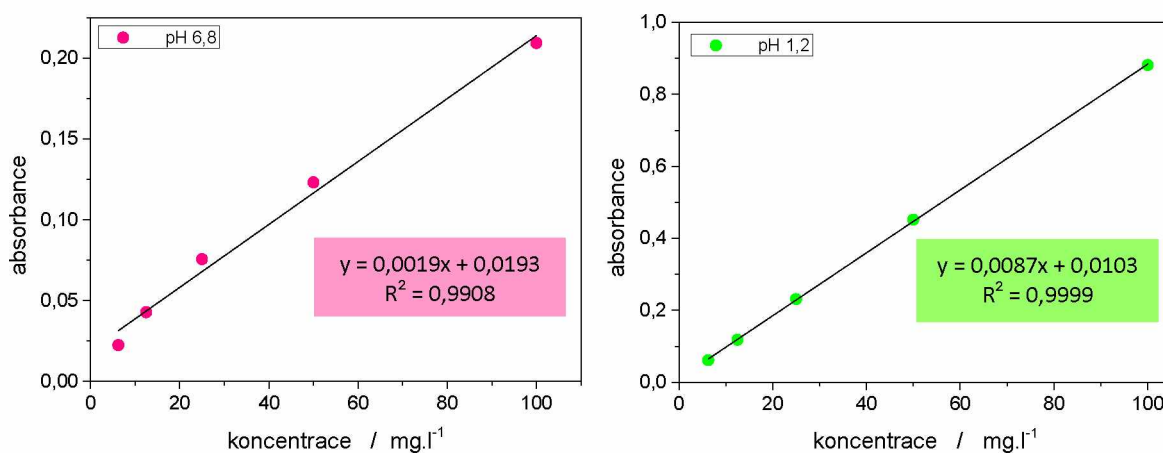
Obrázek 45: Fotografie z optického mikroskopu – amorfní griseofulvin se začínající krystalizací. Šipky směřují na krystaly.

Tmavá místa na Obrázku 45 představují primární krystalickou formu vytvořenou z poškozeného povrchu. Světle hnědý stín představuje tenkou povrchovou vrstvu krystalické fáze. Ostré a dlouhé okraje povrchové krystalické fáze naznačují, že se růst krystalů šíří podél mikrotrhlin vzniklými během škrábání.

3.7. DISOLUČNÍ ZKOUŠKA AMORFNÍHO GRISEOFULVINU

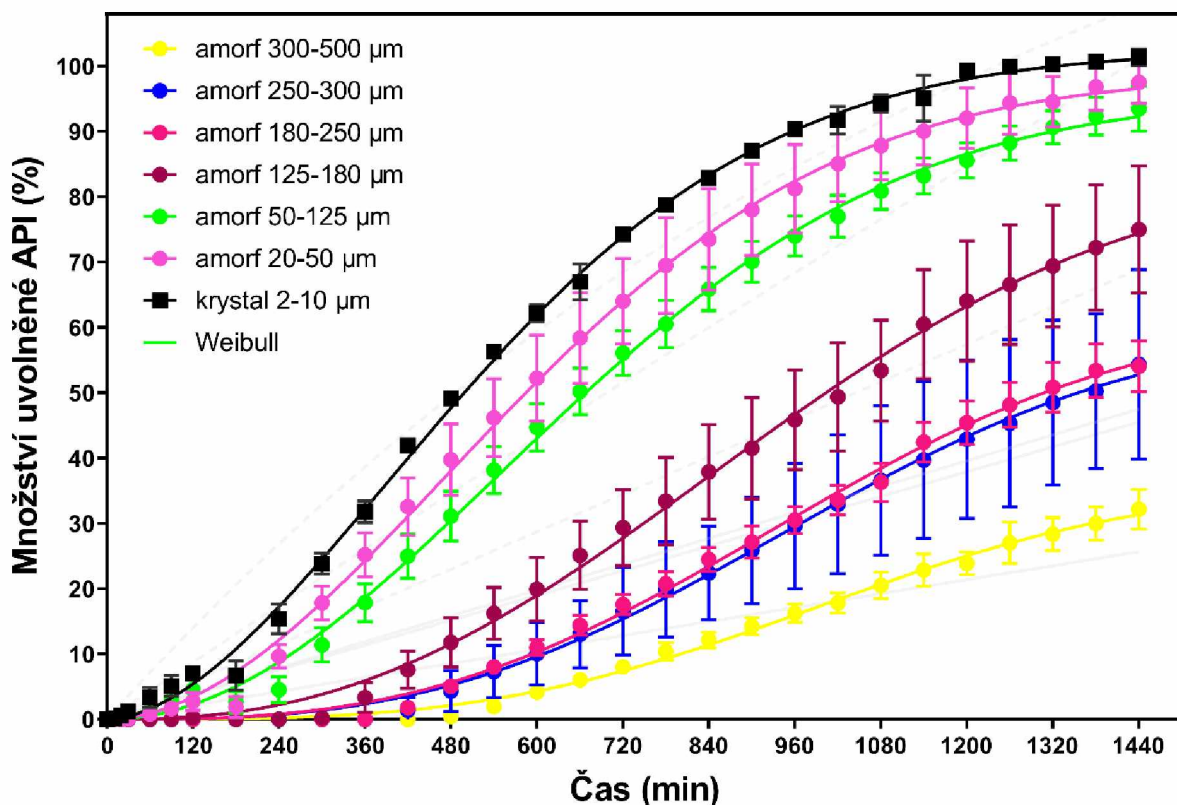
Jako součást diplomové práce byl dále vybrán experiment v podobě disoluční zkoušky, která představuje důležitou úlohu pro farmaceutický průmysl. Disoluční zkouška se používá k posouzení kvality a stability léčiva, ale především umožní předpovědět vstřebávání léčiva v lidském organismu (*in vivo*). Dále lze z disolučního profilu určit mechanismus, kterým se léčivo uvolňuje z lékové formy. [47, 48, 49]

K získání disolučního profilu bylo nejprve potřeba stanovit kalibrační křivku z připravených kalibračních roztoků neboli závislost absorbance na koncentraci léčiva pro pH 1,2 a pH 6,8 (Obrázek 46). Metodou lineární regrese byly získány regresní rovnice, které jsou zvýrazněné v Obrázku níže.



Obrázek 46: Kalibrační křivka griseofulvimu, nalevo pro disoluční médium o pH 6,8; napravo pH 1,2; zvýrazněné regresní rovnice k přepočtu absorbance na koncentraci účinné látky.

Pomocí těchto rovnic byla přepočtena změřená absorbance z disolučních testů (pro všechny tablety) na koncentraci a na procenta uvolněného léčiva. Procenta uvolněného léčiva v závislosti na čase pro krystal a různé velikostní frakce amorfů byla vnesena do grafu a kvantitativní vyhodnocení bylo uskutečněno pomocí programu GraphPad Prism metodou nelineární regrese analýzy. K proložení disolučního profilu byl využit model Weibull (Obrázek 47).

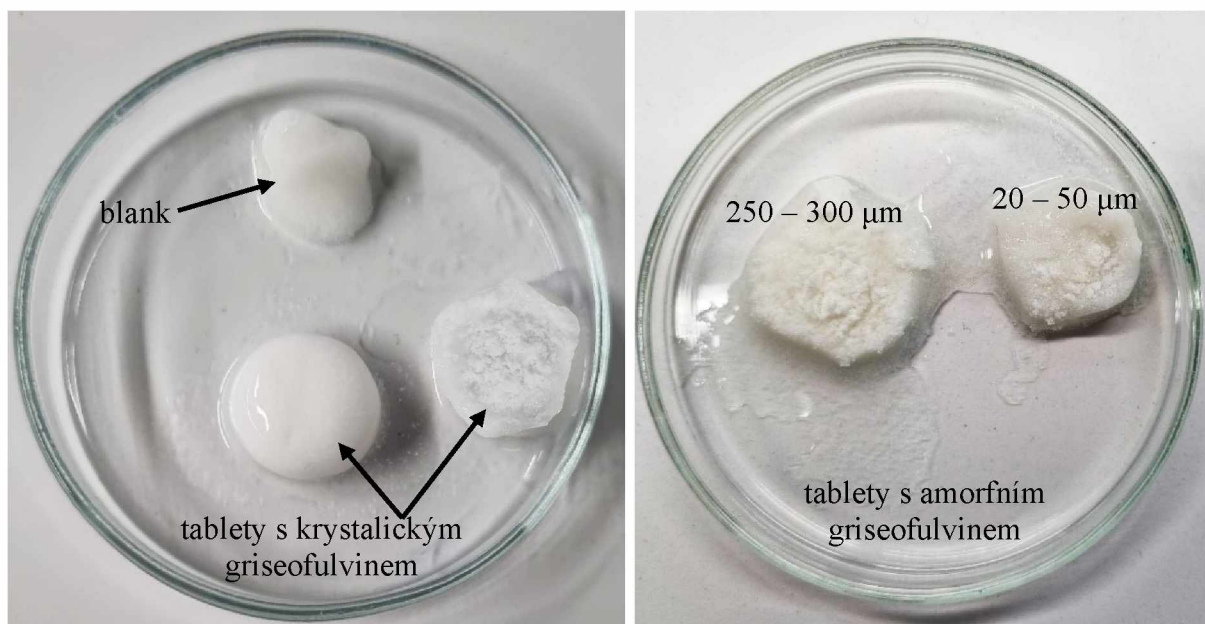


Obrázek 47: Disoluční profil léčiva griseofulvin pro krystal a dané amorfni velikostní frakce (20 – 50 μm , 50 – 125 μm , 125 – 180 μm , 180 – 250 μm , 250 – 300 μm a 300 – 500 μm), které jsou proloženy modelem Weibull.

Podle informací uvedených v teoretické části, konkrétně to, že amorfni léčiva jsou lépe rozpustná než krystalická, bylo rozhodnuto tuto skutečnost ověřit právě pomocí disoluční zkoušky. Ovšem ze získaného disolučního profilu výše si můžeme všimnout, že při rozpouštění hraje roli primárně velikost částic a nikoli to, zda se jedná o krystalickou či amorfni formu. Rozdíl v rozpustnosti mezi krystalickou a amorfni formou není tedy v tomto případě až tak výrazný. Dále je z Obrázku 47 zřejmé, že z tablety obsahující amorfni griseofulvin velikostní frakce 300 – 500 μm se uvolnilo za 24 hodin pouze kolem 30 % griseofulvinu. Kolem 100 % uvolněného griseofulvinu se pohybují pouze tablety, které obsahovaly krystal (2 – 10 μm) a amorf o velikostní frakci 20 – 50 μm .

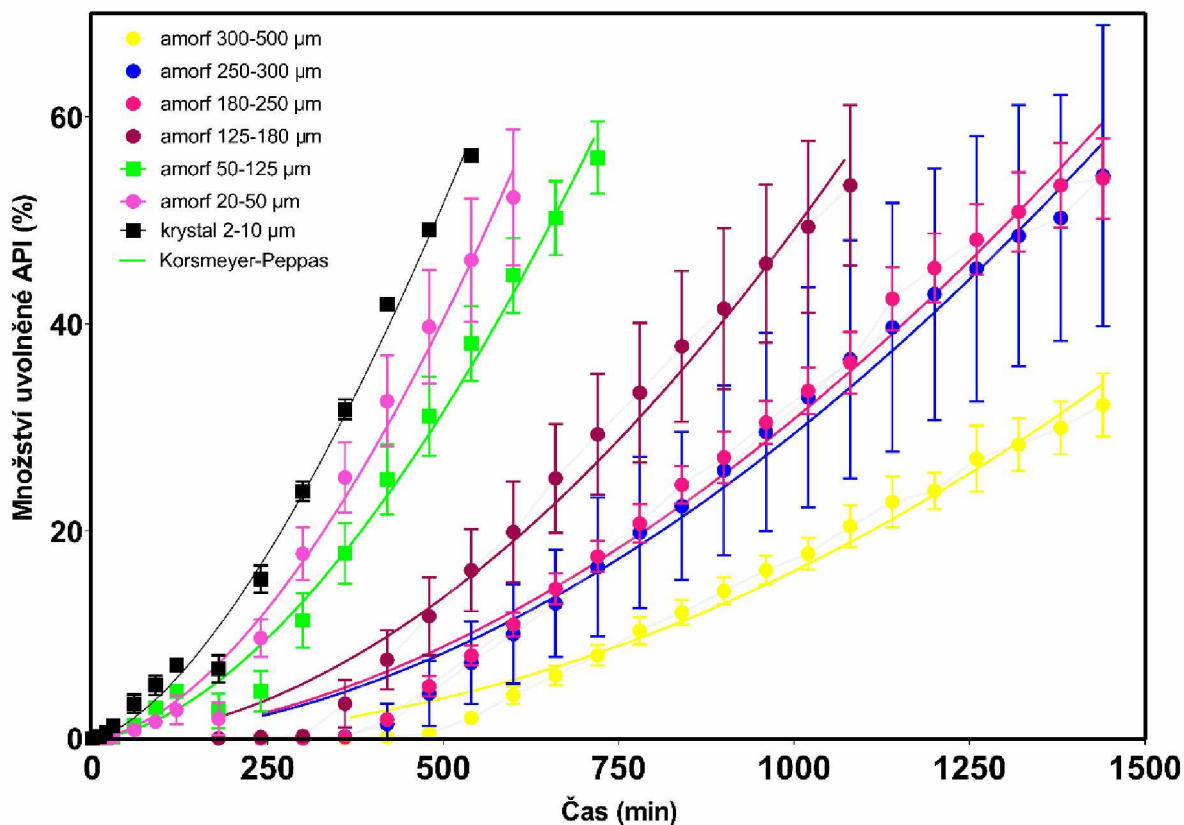
U hydrofilních tablet dochází k bobtnání v důsledku nasátí disolučního média. Bobtnání má za následek rozvolnění polymerních řetězců v tabletě a uvolnění API z tablety na základě difúze. Během tohoto bobtnání se vytváří gelová vrstva tablety, do které se dostává účinná látka z jádra tablety. Gelová vrstva společně s API se odmyvá za konstantního tvoření další gelové vrstvy a následného odmyvání. V případě, že je API málo rozpustná mohlo by

docházet k zadržování účinné látky uvnitř tablety. Na Obrázku 48 jsou zobrazené tablety po ukončení disolučního testu. Tablety nalevo obsahovaly krystalický griseofulvin, přestože se podle disolučního testu (Obrázek 47) uvolnilo 100 % API, můžeme v jádru tablety pozorovat zbylou nerozpuštěnou matici (pomocné látky). Tablety na pravé straně obrázku obsahují amorfni griseofulvin. U tablety s nejjemnější amorfni frakcí, konkrétně 20 – 50 μm , kde se uvolnilo necelých 100 % látky, taktéž můžeme tvrdit, že uvnitř tablety zůstaly nerozpuštěné pouze pomocné látky. Ovšem u tablety s velikostní frakcí amorfniho griseofulvinu 250 – 300 μm můžeme vidět na disolučním profilu (Obrázek 47) to, že se API rozpustila pouze z 55 %. Uvnitř této tablety ale nejsou znatelné nažloutlé kousky amorfniho griseofulvinu, můžeme tedy předpokládat, že kousky API jsou v gelovém obalu nabobtnané tablety. Jde ale vidět, že zbytek tablety po disoluci je značně větší ve srovnání s frakcí 20 – 50 μm .



Obrázek 48: Tablety po ukončení disoluční zkoušky. Nalevo nahoře tableta blanku a níže tablety s krystalickým griseofulvinem; napravo tablety s amorfniím griseofulvinem (velikostní frakce 250 – 300 μm a 20 – 50 μm).

Abychom popsali mechanismus, kterým byl griseofulvin uvolňován z tablety při pH 1,2 a následně při pH 6,8, byl použit model Korsmeyer-Peppas, který platí pouze do 60 % uvolněného léčiva. ^[53] Fitování modelu a vyhodnocení jeho parametru bylo provedeno v programu GraphPad Prism. Výsledný graf je uveden na následujícím Obrázku 49 a výsledek parametru n , který charakterizuje transportní mechanismus léčiva z lékové formy, je zobrazen v Tabulce 6.



Obrázek 49: Disoluční profil do 60 % uvolněného griseofulvinu proložen modelem Korsmeyer-Peppas.

Tabulka 6: Hodnoty parametru n modelu Korsmeyer-Peppas pro dané velikostní frakce griseofulvinu.

griseofulvin	parametr $n \pm SD$
krystal 2 – 10 μm	$1,53 \pm 0,05$
amorf 20 – 50 μm	$1,69 \pm 0,09$
amorf 50 – 125 μm	$1,70 \pm 0,07$
amorf 125 – 180 μm	$1,85 \pm 0,12$
amorf 180 – 250 μm	$1,80 \pm 0,6$
amorf 250 – 300 μm	$1,84 \pm 0,17$
amorf 300 – 500 μm	$2,06 \pm 0,08$

Ze zjištěných hodnot parametru n si můžeme všimnout, že mechanismus a rychlost uvolňování léčiva jsou výrazně ovlivněny velikostí částic připraveného amorfního griseofulvinu. Výsledné hodnoty parametru n se pohybují výrazně nad hodnotu 1. Pokud je hodnota parametru $n > 1$ mechanismem uvolňování léčiva je tzv. super case II transport. Tato forma transportu se nejčastěji vyskytuje tam, kde dochází k modifikacím matrice a představuje relaxaci, difúzi a erozi polymerů. [52]

4. ZÁVĚR

V diplomové práci bylo studováno léčivo v amorfnní formě, konkrétně griseofulvin, protože právě pomocí amorfnních léčiv ve srovnání s krystalickými protějšky lze dosáhnout vyšší rozpustnosti léčiva a tím i biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv.

V první části práce byla vypracována literární rešerše, která zahrnuje základní informace o léčivu griseofulvinu a dále o metodách, které byly použity ke zkoumání tohoto léčiva. Následně byly popsány experimentální postupy přípravy vzorku a jeho měření na daných přístrojích, jako jsou diferenční skenovací kalorimetr, termogravimetr, Ramanův spektroskop, optický mikroskop a nakonec přístroj k provedení disoluční zkoušky. V závěrečné části práce byly diskutovány výsledky.

Jedním z cílů práce byla charakterizace výsledných DSC křivek vzorku griseofulvinu při různých rychlostech ohřevu a následná kinetická analýza krystalizačních dat, ke které patří vyhodnocení aktivační energie, a následná predikce chování griseofulvinu okolo teploty skelné transformace. Z predikce můžeme předpokládat, že griseofulvin vydrží necelých 20 minut při tepercaci na teplotě 85 °C, aniž by došlo k jeho krystalizaci. Což je tedy odhadovaný limit pro aplikaci námi navrhované techniky stabilizace amorfnního griseofulvinu ohřevem na/nad teplotu T_g .

V dnešní době je populární zavádět amorfnní léčivo do léku také pomocí hot melt extruze a 3D tisku, proto byla ověřována teplota rozkladu griseofulvinu pomocí termogravimetrie. Termogravimetrie odhalila, že griseofulvin se při nízkých rychlostech ohřevu rozkládá již kolem 200 – 210 °C. Toto léčivo by tedy mohlo být připravováno pomocí hot melt extruze bez problému a pomocí 3D tisku pouze s velkou opatrností, protože zde bude potřeba hlídat každý °C, abychom zamezili rozkladu léčiva na nežádoucí případně toxické produkty pro živý organismus.

Pomocí DSC nebyla pravděpodobně pozorována pouze jedna krystalická forma griseofulvinu. K prověření existence více polymorfů v měřeném vzorku griseofulvinu byla použita Ramanova spektroskopie. Pomocí porovnání naměřených Ramanových spekter se spektry z literatury, bylo potvrzeno, že vzorek griseofulvinu zcela dominantně obsahoval formu I, která je termodynamicky stabilní.

Dalším záměrem práce bylo prokázání, že amorfnní griseofulvin se daleko lépe rozpouští a tím pádem se i lépe vstřebává v organismu. Ovšem pomocí disoluční zkoušky

bylo zjištěno, že rozdíl v rozpustnosti mezi amorfem a krystalem není až tak výrazný, protože primární roli hraje velikost částic, nikoli forma. Dále byla odhalena zajímavá možnost řízení rychlosti rozpouštění (zpomalení) a to pomocí velikosti amorfních částic. Různá velikost amorfních částic se připravuje snadno, zatímco připravit krystal ve větších velikostních frakcích je daleko složitější.

5. POUŽITÁ LITERATURA

1. 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.
2. PETERSEN, Asger B., RØNNEST, Mads H., LARSEN, Thomas O. a CLAUSEN Mads H.. The Chemistry of Griseofulvin. *Chemical Reviews*. **2014**, 114 (24), 12088-12107.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. HAINER, B. L.. Dermatophyte Infections. *Am. Fam. Physician*. **2003**, 67 (1), 101-109.
10. 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.
11. RATHINASAMY, Krishnan, JINDAL, Bhavya, ASTHANA, Jayant, SINGH, Parminder, BALAJI, Petety V. a PANDA, Dulal. Griseofulvin stabilizes mikrotubule dynamics, activates p53 and inhibits the proliferation of MCF-7 cells synergistically with vinblastine. *BMC Cancer*. **2010**, 10 (213), 1-13.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. PATOČKA, Jiří, STRUNECKÁ, Anna a STIBOROVÁ, MARIE. Inhibitory Mikrotubulů. *Chemické Listy*. **2001**, 95 (11), 700-707.
 16. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA), National Center for Biotechnology Information; 2004. PubChem Compound Summary for CID 441140, Griseofulvin; [citováno. 13.4.2024]. 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. KRATOCHVÍL, Bohumil, HUŠÁK, Michal a JEGOROV, Alexandr. Polymorfie a solvatomorfie pevných substancí ve farmacii. *Chemické listy*. **2002**, 96, 330-335.
 20. WAGNER, Matthias. Polymorphism. In: *Thermal Analysis in Practice - Fundamental Aspects*. Mnichov: Hanser Publishers, **2018**, s. 283-286. ISBN 978-1-56990-643-9.
 21. 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.
22. DINIZ, Mariana, O., SPOLETTI, Enrico, GHOSH, Peuli, LUSI, Matteo, SVÄRD, Michael, RASMUSON, Åke a HUDSON, Sarah, P.. New Solid Forms of Griseofulvin: A Solvate and a Relict Polymorph Related to Reported Solvates. *Crystal Growth & Design*. **2023**, 23 (12), 8953-8961.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. FRUMAR, M. *Chemie pevných látek*. Pardubice: VŠCHT, **1992**, ISBN 80-85113-41-4
 27. ŠULCOVÁ, P. a BENEŠ, L. *Experimentální metody v anorganické technologii*. Pardubice: Univerzita Pardubice, **2002**. ISBN 80-7194-420-3.
 28. MASLEN, Charlie, KROPÁČEK, Jindřich. Optická (světelná) mikroskopie [online]. [cit. 21.4.2024] Dostupné z: <https://nano.vscht.cz/wp-content/uploads/navody/charakterizace/OM.pdf>
 29. MUSELÍK J., KEJDUŠOVÁ M., KREJČOVÁ K., DVOŘÁČKOVÁ K., Vybrané instrumentální metody ve farmaceutické technologii. Brno. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2012. ISBN 978-80-7305-640-7.
 30. Popis mikroskopu [online]. [cit. 21.4.2024] Dostupné z: <https://intracomicro.cz/teorie/popis-mikroskopu/>
 31. MORAVEC, Zdeněk. Mikroskopie [online]. [cit. 21.4.2024] Dostupné z: <http://z-moravec.net/fyzikalne-chemicke-metody/mikroskopie/>
 32. ŠTARHA, Pavel; TRÁVNÍČEK, Zdeněk. Termická analýza. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, **2011**.
 33. KLOUŽKOVÁ, A., ZEMENOVÁ, P., KLOUŽEK, J. a PABST, W.. *Termická analýza*. Praha: VŠCHT, **2012**.

34. 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.
35. VŠCHT. *Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)* [online]. [cit.23.3.2024] Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/cwl2js87vLAsPwUA.pdf?redirected>
36. AUROUX, Aline. The Differential Scanning Calorimetry Technigue. In: *Calorimetry and Thermal Methods in Catalysis*. Berlin: *Springer-Verlag*, **2013**, s 58-71. ISBN: 978-3-642-11953-8.
37. 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.
38. Termická analýza [online]. [cit. 23.3.2024] Dostupné z: https://ufmi.ft.utb.cz/texty/kzm/KZM_06.pdf
39. 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
40. VŠCHT. *Diferenciální skenovací kalorimetrie* [online]. [cit.23.3.2024] Dostupné z: <https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0014043/0022~cw12j|coysxKzTMymLQAAA.pdf?redirected>
41. POLANSKÝ, R.. Teorie a praxe termogravimetrické analýzy [online]. [cit. 21.4.2024] Dostupné z: <https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/449/1/r1c1c5.pdf>
42. ŠULCOVÁ, P. a BENEŠ, L. *Experimentální metody v anorganické technologii*. Pardubice: Univerzita Pardubice, **2002**. ISBN 80-7194-420-3.
43. LITOŠ, J., *Experimentální metody* [online]. [cit.15.4.2024] Dostupné z: <http://ecentrum.fsv.cvut.cz>
44. Ramanova spektroskopie [online]. [cit. 21.4.2024] Dostupné z: <https://www.optixs.cz/aplikace-53/spektroskopie-145/ramanova-spektroskopie-198>
45. NĚMCOVÁ, Irena, ČERMÁKOVÁ, Ludmila a RYCHLOVSKÝ, Petr. *Spektrometrické analytické metody I*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, **2004**. ISBN 80-246-0776-X.
46. MAH Pei T., FRASER Sara J., REISH Matthew E., RADES Thomas, GORDON Keith C. a STRACHAN Clare J. Use of low-frequency Raman spectroscopy and chemometrics for

- the quantification of crystallinity in amorphous griseofulvin tablets. *Vibrational Spectroscopy*. **2015**, 77, 10–16.
47. NICKERSON, Beverly, KONG, Angela, GERST, Paul a KAO, Shangming. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2018**, 150, 333-340.
48. DVOŘÁČKOVÁ, Kateřina, Tereza BAUTZOVÁ, Miloslava RABIŠKOVÁ. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické Listy*. **2011**, 105, 50-54. ISSN 0009-2770.
49. MUSELÍK, Jan, KEJDUŠOVÁ, Martina, KREJČOVÁ, Kateřina a DVOŘÁKOVÁ, Kateřina. *Vybrané instrumentální metody ve farmaceutické technologii*. BRNO: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, **2012**. ISBN 978-80-7305-640-7.
50. PHILLIPS, Daniel J., PYGALL, Samuel R., COOPER, V. Brett a MANN, James C.. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **2012**, 64 (11), 1549 – 1559.
51. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. Český lékopis 2017: Doplněk 2021. ČR: GRADA, **2021**. ISBN 978-80-271-3253-9.
52. FOSCA, Marco, RAU, Julietta a USKOKOVIC, Vuk. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements. *Bioactive Materials*. **2022**, 341-363.
53. MUSELÍK, J., KOMERSOVÁ, A., LOCHAŘ, V. a KUBOVÁ, K. Regresní analýza disolučního profilu léčiva a odhad mechanismu uvolňování léčiva. *Chemické listy*. **2019**, 113 (5), 328-336.
54. MÁLEK, Jiří. Kinetic analysis of crystallization processes in amorphous materials. *Thermochimica Acta*. **2000**, 355 (1-2), 239-253.
55. MÁLEK Jiří, Habilitační práce. **1996**.
56. BROWN, M. E.. Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications, *Kluwer Academic Publishers*. **2001**. ISBN 1-4020-0472-9.
57. ŠESTÁK J.. Měření termofyzikálních vlastností pevných látek. *Academia*. Praha. **1982**.
58. SVOBODA, Roman a MÁLEK Jiří. How nucleation-growth kinetics is influenced by initial degree of material crystallinity. *Thermochimica Acta*. **2016**, 631, 28-35.
59. SVOBODA, Roman a MÁLEK, Jiří. Interpretation of crystallization kinetics results provided by DSC. *Thermochimica Acta*. **2011**, 526, 237–251.

60. 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.
61. SVOBODA, Roman a MÁLEK, Jiří. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*. **2012**.
62. VYAZOVKIN, Sergey, BURNHAM, Alan K., CRIADO, José M., PÉREZ-MAQUEDA, Luis A., POPESCU, Crisan a SBIRRAZZUOLI, Nicolas . ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data. *Thermochimica Acta*. 2011, 520 (1–2), 1-19.
63. STARINK, M.J.. The determination of activation energy from linear heating rate experiments: a comparison of the accuracy of isoconversion methods. *Thermochimica Acta*. **2003**, 404 (1–2), 163-176
64. MÁLEK, Jiří a SMRČKA, Vít. The kinetic analysis of the crystallization processes in glasses. *Thermochimica Acta*. 1991, 186 (1), 153-169.
65. MÁLEK, Jiří. The kinetic analysis of non-isothermal data. *Thermochimica Acta*. **1992**, 200 (8), 257-269.
66. 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.
67. SVOBODA, R., CHOVANEC, J., SLANG, S., BENEŠ, L., KONRÁD, P. J. Single-curve multivariate kinetic analysis: Application to the crystallization of commercial Fe-Si-Cr-B amorphous alloys. *Alloys Compd*. **2022**, 889, 161-672.
68. OPFERMANN, J. Kinetic analysis using multivariate non-linear regression. *J. Therm. Anal. Calorim*. 2000, 60, 641-58.
69. 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.
70. OU, Xiao, LI, Shuting, CHEN, Yunyun, RONG, Haowei, LI, Ao a LU, Ming. Polymorphism in Griseofulvin: New Story between an Old Drug and Polyethylene Glycol. *Cryst. Growth Des*. **2022**, 22, 6, 3778–3785.
71. SVOBODA, Roman a KOZLOVÁ, Kateřina. Thermo-Structural Characterization of Phase Transitions in Amorphous Griseofulvin: From Sub-T_g Relaxation and Crystal Growth to High-Temperature Decomposition. *Molecules*. **2024**, 29, 1516.