

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití in-situ Ramanovy spektroskopie
pro studium kinetiky krystalizace léčiva indomethacin

Diplomová práce

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Nicola Koutná**
Osobní číslo: **C22410**
Studijní program: **N0531A130035 Fyzikální chemie**
Téma práce: **Využití in-situ Ramanovy spektroskopie pro studium kinetiky krystalizace léčiva indomethacin**
Téma práce anglicky: **Utilization of in-situ Raman spectroscopy in the crystallization kinetics study of indomethacin**
Zadávací katedra: **Katedra fyzikální chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zabývající se využitím metody in-situ Ramanovy spektroskopie a diferenční skenovací kalorimetrie při studiu krystalizačního chování amorfního indomethacinu.
 2. Proveďte kinetickou analýzu získaných dat z obou použitých metod pomocí softwarového vybavení.
 3. Diskutujte získané výsledky z in-situ Ramanovy spektroskopie a diferenční skenovací kalorimetrie.
 4. Využijte metod strukturní analýzy k provedení strukturní charakterizace vybraného léčiva.
 5. 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

Prohlášení autora

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití in-situ Ramanovy spektroskopie pro studium kinetiky krystalizace léčiva indomethacin 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 odevzdání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2024

Bc. Nicola Koutná

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce Ing. Daniele Košťálové, Ph.D., za vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Romanu Svobodovi, Ph.D. za jeho odborný dohled, trpělivost a vstřícnost během zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji prof. Ing. Romanu Bulánkovi, Ph.D. za poskytnutí teplotní cely pro in-situ Ramanovská spektra. Také bych ráda poděkovala své rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá studiem kinetiky krystalizace léčiva indomethacin. Indomethacin se řadí mezi antiflogistika, antipyretika a analgetika, a zároveň patří mezi nesteroidní protizánětlivé látky (NSAID). Kinetika krystalizace indomethacinu byla studována za neizotermních podmínek pomocí diferenční skenovací kalorimetrie a in-situ Ramanovy spektroskopie při 12 různých rychlostech ohřevu. Hlavním cílem této diplomové práce bylo porovnat kinetiku krystalizace sledovanou těmito dvěma metodami a následně určit aktivační energii krystalizačního procesu pomocí Kissingerovy metody.

KLÍČOVÁ SLOVA

Indomethacin, diferenční skenovací kalorimetrie, Ramanova spektroskopie, krystalizace

TITLE

Utilization of in-situ Raman spectroscopy in the crystallization kinetics study of indomethacin

ANNOTATION

This master's thesis focuses on studying the kinetics of the crystallization of the drug indomethacin. Indomethacin belongs to the class of anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic drugs, and it is also classified as a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID). The crystallization kinetics of indomethacin were investigated under non-isothermal conditions using differential scanning calorimetry and in-situ Raman spectroscopy at 12 different heating rates. The main objective of this master's thesis was to compare the crystallization kinetics determined by these two instrumental techniques, and to determine the activation energy of the crystallization proces by means of the Kissinger method.

KEYWORDS

Indomethacin, differential scanning calorimetry, Raman spectroscopy, crystallization

Obsah

SEZNAM ILUSTRACÍ	8
SEZNAM TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK	11
ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Amorfnní látky	15
1.1.1 Sklo	16
1.2 Amorfnní léčiva	18
1.3 Indomethacin	19
1.3.1 Nesteroidní protizánětlivé látky a mechanismus účinku	21
1.3.2 Farmakokinetika indomethacinu	22
1.3.3 Nežádoucí účinky a toxicita indomethacinu	23
1.4 Polymorfismus	24
1.5 Termická analýza	26
1.5.1 Diferenční skenovací kalorimetrie	28
1.6 Kinetická analýza DSC dat procesu krystalizace	33
1.6.1 Výpočet aktivační energie	34
1.6.2 Určení kinetického modelu	35
1.6.3 Jednokřivková multivariační kinetická analýza	39
1.7 Ramanova spektroskopie	39
1.7.1 Disperzní Ramanův spektrometr	42
1.7.2 Spektrometr s Fourierovou transformací	43
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1 Příprava vzorku	44
2.2 Měření pomocí diferenční skenovací kalorimetrie	45
2.3 Měření pomocí Ramanovy spektroskopie	52
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	61
3.1 Kinetika krystalizace z DSC měření	61
3.2 Kinetika krystalizace z Ramanovy spektroskopie	70
4. ZÁVĚR	76
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
PŘÍLOHA I	83

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Krystalická a amorfni struktura[2]	15
Obrázek 2: Diagram entalpie - teplota	18
Obrázek 3: Struktura indomethacinu	19
Obrázek 4: Fázový diagram dvou polymorfů[29]	25
Obrázek 5: Schématický nákras DSC s tepelným token[39]	29
Obrázek 6: Schématický nákras kompenzační DSC[39]	29
Obrázek 7: Kelímky pro DSC, (a) Typický kelímek pro DSC s víčkem, (b) Hermeticky uzavřený kelímek pro DSC, (c) Hermeticky uzavřený kelímek s obráceným víčkem, (d) Vsádková (batch) cela pro měření mikro-DSC[35]	30
Obrázek 8: Charakteristická DSC křivka[40]	31
Obrázek 9: Detail DSC křivky s charakteristickými pojmy[43]	32
Obrázek 10: Algoritmus pro stanovení vhodného kinetického modelu na základě maxim charakteristických funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$ [37]	36
Obrázek 11: Jablonského diagram[50]	40
Obrázek 12: Uspořádání pro 90°	42
Obrázek 13: Uspořádání pro 180°	42
Obrázek 14: Experimentální uspořádání pro melt-quench techniku	44
Obrázek 15: Indomethacin (Sigma-Aldrich čistota $> 98,5\%$, molekulová hmotnost $357,78$ g/mol)	45
Obrázek 16: Vlevo: Síta s definovanou velikostí ok; vpravo: Achátová miska	45
Obrázek 17: Kompletní uspořádání diferenčního skenovacího kalorimetru: Vlevo: Chladicí zařízení; uprostřed: DSC; vpravo: Tlakové lahve	46
Obrázek 18: Měřicí cela přístroje DSC Q2000 (TA Instruments)	46
Obrázek 19: Autosampler přístroje DSC Q2000 (TA Instruments)	47
Obrázek 20: a) Pinzeta; b) Laboratorní lžička; c) Hermeticky uzavřený kelímek; d) Víčko a kelímek naplněný připraveným vzorkem amorfniho IMC	48
Obrázek 21: DSC křivka připraveného IMC pro rychlost ohřevu $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	49
Obrázek 22: Program pro ovládání	50
Obrázek 23: Záložky programu DSC; nalevo: Záložka Summary; uprostřed: Záložka Procedure; vlevo: Záložka Notes	51
Obrázek 24: Ramanova spektroskopie; vlevo: Ramanův mikroskop; vpravo: Počítač	52

Obrázek 25: Ramanova spektroskopie; vlevo: Teplotní čidlo; vpravo: Ramanův mikroskop DXR2 (Nicolet).....	53
Obrázek 26: Teplotní cela CCR1000 Ramanova mikroskopu DXR2 (Nicolet).....	54
Obrázek 27: Detail komory se vzorkem a objektivu.....	54
Obrázek 28: Software teplotní cely CCR1000.....	55
Obrázek 29: Software OMNIC Macro.....	56
Obrázek 30: Software OMNIC záložka Collect.....	57
Obrázek 31: Software OMNIC záložka Bench.....	57
Obrázek 32: Série Ramanových spekter pro rychlost ohřevu $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$	58
Obrázek 33: Vzorová Ramanova spektra amorfního a plně krystalického IMC.....	59
Obrázek 34: Software OMNIC Spectra.....	60
Obrázek 35: DSC křivky: A) Rychlost ohřevu $0,2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$; B) Rychlost ohřevu $3\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$; C) Rychlost ohřevu $30\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$	63
Obrázek 36: DSC píky krystalizace: A) Rychlost ohřevu $0,2; 0,5; 1$ a $2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$; B) Rychlost ohřevu $3; 4; 5$ a $7\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$; C) Rychlost ohřevu $10; 15; 20$ a $30\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$	65
Obrázek 37: Kissingerova metoda: A) Lineární regrese; B) Závislost E_A na T pro lineární regresi; C) Polynom 2. stupně; D) Závislost E_A na T pro polynom 2. stupně.....	67
Obrázek 38: A) sc-MKA metoda; B) Rychlostní konstanta pro konstantní E_A a A; C) Rychlostní konstanta pro $E_A(T)$ a A(T).....	69
Obrázek 39: Rychlost ohřevu $0,2\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$: A) JMA model s jedním procesem; B) JMA model s dvěma procesy.....	70
Obrázek 40: α -T závislosti získané pomocí in-situ Ramanovy spektroskopie při nízkých rychlostech ohřevu.....	71
Obrázek 41: α -T závislosti získané pomocí in-situ Ramanovy spektroskopie při vysokých rychlostech ohřevu.....	72
Obrázek 42: Derivace stupně přeměny podle teploty pro $5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$	73
Obrázek 43: Kissingerovy závislosti pro data z DSC a in-situ Ramanovy spektroskopie.....	74

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Fyzikální a chemické vlastnosti indomethacinu	20
Tabulka 2: Lékové formy indomethacinu	21
Tabulka 3: Smrtné dávky čistého indomethacinu	24
Tabulka 4: Metody termické analýzy	27
Tabulka 5: Přehled kinetických modelů a jejich matematické vyjádření.....	37
Tabulka 6: Charakteristické teploty	74

SEZNAM ZKRATEK

A	předexponenciální faktor
AC(M,N)	autokatalytický Šesták-Berggren model
AKI	akutní poškození ledvin
API	aktivní farmaceutická substance
COX	cyklooxygenáza
DMA	dynamická mechanická analýza
DPA	diferenční tlaková analýza
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DTA	diferenční termická analýza
D1, D2, D3	difúzní modely
D4	Ginstling-Brounhtein model
E	intenzita vnějšího pole
E_A	zdánlivá aktivační energie
EGD	detekce uvolněných plynů
ETA	elektrotermická analýza
$f(\alpha)$	vyjádření kinetického modelu
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FT	Fourierova transformace
H	entalpie
IMC	indomethacin
IČ	infračervená spektroskopie
JMA	Johnson-Mehl-Avrami model
KAS	Kissinger-Akahira-Sunose metoda
$K(T)$	rychlostní konstanta závislá na teplotě
m	parametr JMA modelu
M,N	parametry AC modelu

NIR	blízká infračervená oblast záření
NSAID	nesteroidní protizánětlivé látky
q^+	rychlost ohřevu
R	univerzální plynová konstanta
RO	model reakčního řádu
RSS	suma čtverců odchylek
R2	model se zmenšující se plochou
R3	model se zmenšujícím se objemem
sc-MKA	jednokřivková multivariační kinetická analýza
STA	simultánní termická analýza
TD	termodilatometrická analýza
TG	termogravimetrická analýza
TMA	termomechanická analýza
TOA	termooptická analýza
t	čas
T	teplota
T_c	extrapolovaná koncová teplota
T_e	extrapolovaná počáteční teplota
T_f	koncová teplota píku
T_g	teplota skelného přechodu
T_i	počáteční teplota píku
T_p	teplota maxima píku
T_t	teplota tání
VIS	viditelná oblast záření
$w_{j,k}$	váhový faktor
XRD	rentgenová difrakce
YAG	ytrium-aluminium granát $Y_3Al_5O_{12}$

$y(\alpha)$	charakteristická funkce
Y_{cal}	vypočtené hodnoty DSC signálu
Y_{exp}	experimentálně naměřené hodnoty DSC signálu
$z(\alpha)$	charakteristická funkce
$z(\alpha)_{\text{max}}$	maximum funkce
α	stupeň konverze
$\alpha_{\text{max},y}$	hodnota stupně konverze v maximu funkce $y(\alpha)$
$\alpha_{\text{max},z}$	hodnota stupně konverze v maximu funkce $z(\alpha)$
α_P	polarizovatelnost
μ_D	dipólový moment
ν	frekvence
Φ	tepelný tok

ÚVOD

Amorfní léčiva představují důležitou třídu farmaceutických látek, které mají zásadní význam v oblasti lékařství a farmacie. Oproti krystalickým léčivům, které mají definovanou periodickou strukturu, jsou amorfní léčiva charakterizována náhodným uspořádáním molekul bez uspořádání na dlouhou vzdálenost. Díky absenci krystalického uspořádání mají amorfní léčiva tendenci vykazovat vyšší rozpustnost a rychlejší rozpouštění, což může vést k lepší absorpci v těle a zlepšení terapeutických účinků.

Nicméně, amorfní léčiva mohou být náchylná k různým formám nestability, jako je rekrystalizace nebo přechod do krystalické formy během skladování a expozice různým podmínkám. To může mít za následek změny v jejich vlastnostech a účinnosti. Z tohoto důvodu je důležité porozumět fyzikálním a chemickým vlastnostem amorfních léčiv a vyvinout strategii pro jejich stabilizaci a optimalizaci jejich formulací pro farmaceutické použití.

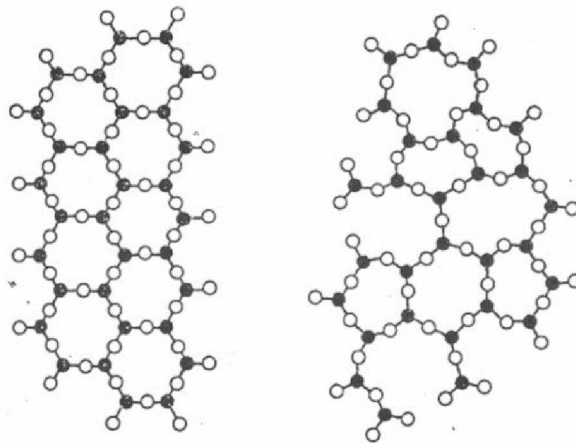
Mezi amorfní léčiva se řadí i léčivo indomethacin, které se využívá jako antiflogistikum, analgetikum a antipyretikum. Indomethacin je léčivo z kategorie nesteroidních protizánětlivých léčiv a využívá se především k léčbě artritidy, revmatoidní artritidy, osteoartritidy, dny a dalších zánětlivých onemocnění. Indomethacin se vyskytuje v sedmi polymorfních formách (γ , α , β , δ , ϵ , ζ , η), kdy každá z nich má jiné fyzikální a chemické vlastnosti. γ forma je termodynamicky stabilní a α forma je nejčastěji se vyskytující metastabilní forma. Charakterizace těchto polymorfních forem indomethacinu je nezbytná pro správnou manipulaci s léčivem během výroby a skladování.

Tato diplomová práce se zabývá studiem krystalizačního chování účinné látky indomethacinu. Pro toto studium byly využity dvě metody, diferenční skenovací kalorimetrie a in-situ Ramanova spektroskopie. Tyto dvě experimentální techniky byly použity k porovnání kinetiky krystalizace studovaného indomethacinu, kdy hlavním cílem bylo ověřit možnost použití in-situ Ramanovy spektroskopie jako plnohodnotné alternativy ke kalorimetrickým metodám.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Amorfní látky

Pevné materiály lze rozdělit do několika kategorií, přičemž jedno z hlavních rozdělení je na materiály krystalické a amorfní. Krystalické pevné látky mají pravidelnou strukturu a uspořádání na dlouhou vzdálenost, kdežto amorfní látky mají strukturu neuspořádanou a uspořádání na krátkou vzdálenost. Na Obrázku 1 můžeme vidět srovnání krystalické (vlevo) a amorfní (vpravo) struktury, kde je naznačeno, že u krystalických látek je struktura pravidelná.[1-3] Pro rozlišení obou typů struktur můžeme využít metody, jako jsou rentgenová difrakce (XRD), diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a izotermní kalorimetrie.[4]



Obrázek 1: Krystalická a amorfní struktura[2]

Amorfní pevný stav je obecně metastabilní, což znamená, že má tendenci samovolně přejít na termodynamicky stabilní krystalickou formu. Amorfní látky se často připravují rychlým chlazením taveniny nebo kapalně fáze. Díky rychlému chlazení, jehož rychlost je vyšší, než je rychlost krystalizace, nemá materiál dostatek času na uspořádání atomů a vytvoření pravidelné struktury, ale částice v podstatě zůstanou náhodně rozmístěné a zachovají si uspořádání krátkého dosahu.[1,3]

Mezi amorfní látky se řadí například sklo, vosky, tuky, asfalt, keramika, polymery, amorfní kovy, gely nebo některé farmaceutické látky. V principu je možné do amorfního stavu převést jakoukoli látku, jelikož záleží pouze na rychlosti chlazení taveniny.[1,3]

Základní vlastností amorfních látek je izotropie, což znamená, že jejich fyzikálně chemické vlastnosti jsou stejné ve všech směrech. Oproti krystalům nevykazují proces tání, což je dáno tím, že nemají pravidelnou krystalickou mřížku, která by se mohla během procesu

tání rozkládat. Rozpustnost amorfních látek ve vodě je mnohem vyšší než u jejich krystalických forem, tohoto jevu se často využívá ve farmaceutickém průmyslu. Také mechanické vlastnosti amorfních materiálů jsou zcela odlišné od jejich krystalických protějšků, což je způsobeno odlišným počtem a typem molekulových interakcí. Bylo například zjištěno, že při teplotách přesahujících 50 K pod teplotou skelného přechodu (T_g) amorfni farmaceutický přípravek vytvořil tuhé formy, které byly významně křehčí než ty, které byly vytvořeny z krystalické formy.[4,5]

Jednou z typických vlastností amorfních materiálů je teplota skelného přechodu. Skelný přechod je fázový přechod druhého druhu, kdy dochází ke změně tepelné kapacity. Tento fázový přechod se obvykle vyskytuje hluboko pod teplotou tání. Nad teplotou skelného přechodu se materiál stává měkčí a gumovější. Teplota skelného přechodu není konstantou pro danou látku, ale závisí na rychlosti ohřevu. Další z vlastností, kterou se od sebe amorfni a krystalické materiály odlišují, je schopnost absorbovat vodu. Amorfni materiály jsou schopny ve větší míře absorbovat vodní páru z okolního prostředí než materiály krystalické.[4]

Amorfni pevné látky vždy hrály klíčovou roli ve farmaceutickém výzkumu, avšak nedávný zájem o ně byl podnícen dvěma hlavními trendy: rostoucím zájmem o farmaceutické pevné látky obecně, zejména o polymorfni formy a solváty, a zájmem o vědu o skle a skelný přechod. Amorfni látky mohou vznikat jak úmyslně, tak neúmyslně během běžných výrobních procesů ve farmaceutickém průmyslu. Vlastnosti amorfních materiálů lze využít k optimalizaci vlastností farmaceutických dávkových forem, avšak tyto vlastnosti mohou také vést k nežádoucím účinkům, kterým je potřeba porozumět.[4]

1.1.1 Sklo

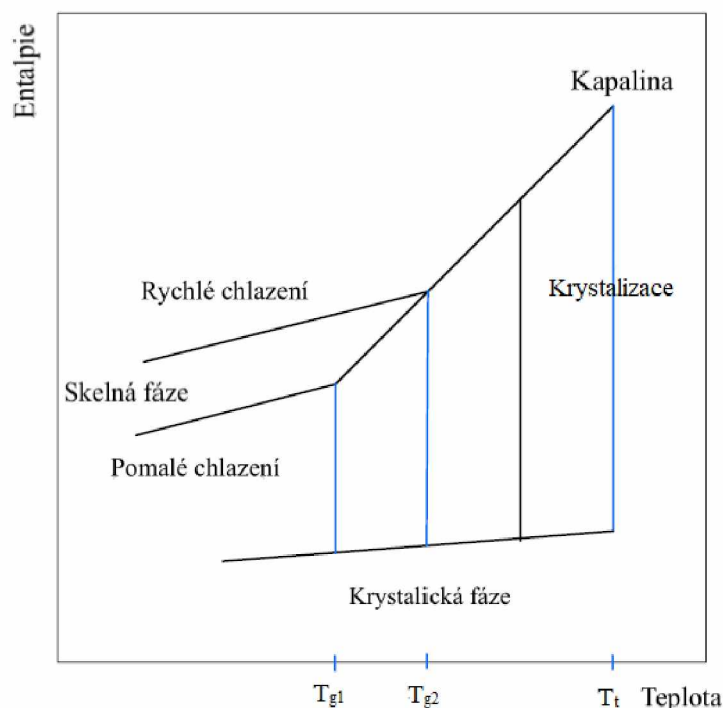
Sklo je jedním z nejdůležitějších materiálů v celé historii. Historie výroby skla sahá až do starověkého Egypta a Mezopotámie, kde zjistili, že písek a soda se při vysokých teplotách tavením mohou přeměnit na pevný, průhledný materiál. Následně řemeslníci, dnes už skláři, po celém světě rozvinuli různé techniky výroby skla, včetně foukání, litého skla či leptání. [6-8]

Sklo se řadí mezi amorfni materiály, což znamená, že má náhodné uspořádání částic. Sklo je z fyzikálního hlediska v nerovnovážném stavu a jeho struktura vzniká dostatečně rychlým chlazením taveniny tak, aby nedošlo ke krystalizaci. Jeho vynikající vlastnosti, jako je průhlednost a odolnost vůči chemickým látkám, ho činí ideálním materiálem pro použití jako

stavební konstrukce, pro výrobu lahví, kontejnerů, součástí mikroskopů, teleskopů, optických vláken, senzorů či jiných optických zařízení, v oblastech fotoniky nebo jako polovodičový materiál.[6-8]

Optické vlastnosti skla jako je index lomu, disperze či propustnost, jsou silně závislé na chemickém složení a také částečně na jeho tepelné historii. Optické sklo, které se využívá jako čočky, okenní tabule nebo zrcadla, má index lomu 1,4 až 2,4, ale hodnota indexu lomu může být ovlivněna hustotou. Mezi indexem lomu a hustotou existuje přímá úměra, tedy roste-li hustota, roste i index lomu. Skla, která obsahují vyšší podíl alkalických prvků nebo prvků alkalických zemin jsou náchylnější ke korozi než jiná skla s jiným složením. Hustota skla závisí na chemickém složení, pohybuje se v rozmezí od 2,2 g/cm³ pro tavený oxid křemičitý do 7,2 g/cm³ pro husté křemenné sklo. Sklo je pevnější než většina kovů, jeho hodnota pevnosti v tahu činí 14 – 15 GPa, tato hodnota platí pro čisté, bezchybné křemičité sklo.[6-8]

Obrázek 2 zobrazuje diagram entalpie – teplota. Při pomalém chlazení má výchozí kapalina, která se nachází nad teplotou tání T_t , dostatek času k pohybu z aktuální pozice na termodynamicky stabilní bod v mřížce, a tak se uspořádat do krystalové struktury. Pokud je chlazení dostatečně rychlé, tak materiál nemá dostatek času na vytvoření nukleí a jejich následný růst a tím pádem nenastane krystalizace. Jakmile se materiál dostane pod teplotu tání T_t , začne se chovat jako podchlazená kapalina, kde se systém nachází v metastabilní oblasti. V bodě, kdy hodnota viskozity nabude hodnoty 10^{12} Pa·s, látka opouští kapalný stav a mění se na pevný systém, tento jev můžeme v diagramu entalpie – teplota pozorovat zlomem na křivce. Ovšem struktura této pevné látky zůstává v neuspořádaném stavu, který je podobný tomu v kapalině, tento stav se označuje jako „zatuhlá“ kapalina. Nerovnovážný stav má tendenci samovolně snižovat Gibbsovu energii a tento proces označujeme jako strukturní relaxace. Jelikož se nachází systém v termodynamické nerovnováze, tak má tendenci se dostávat do termodynamické rovnováhy, tomu ale při takto nízkých teplotách brání vysoké energetické bariéry.[9-11]



Obrázek 2: Diagram entalpie - teplota

1.2 Amorfní léčiva

Transformace do amorfní formy představuje jednu z nejslibnějších strategií pro řešení problému nízké rozpustnosti léčivých látek, který se stává stále významnější v rámci vývoje nových léčivých přípravků. I přestože mají amorfní léčiva své výhody, jejich aplikace v perorálních pevných formulacích je stále omezená, především kvůli nestabilitě amorfní formy. Oproti svým krystalickým protějškům jejich termodynamická nestabilita a vyšší molekulární mobilita vede ke spontánní krystalizaci. Tato krystalizace se může objevit již během výrobních, skladovacích či rozpouštěcích procesů, což vede ke ztrátě výhod rozpouštění a rozpustnosti amorfní formy. Z toho důvodu již bylo mnoho amorfních pevných lékových forem stáhnuto zpět Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (angl. Food and Drug Administration, FDA).[11]

Amorfní léčiva mají tendenci přecházet zpět do krystalické fáze z toho důvodu, že mají mnohem vyšší volnou energii než v krystalickém stavu, proto je zapotřebí zajistit vhodné podmínky, které zaručí, že léčivo nepřejde zpět do své krystalické formy.[1]

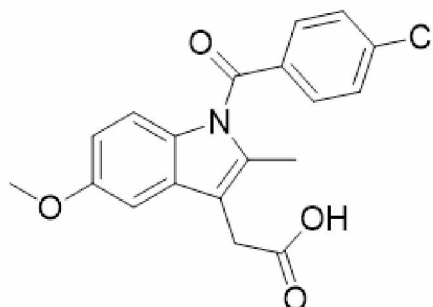
Mezi další výhody amorfních léčiv se řadí lepší orální biodostupnost, amorfní léčiva vykazují vyšší molekulární mobilitu oproti svým krystalickým protějškům, což se projeví

v lepším disolučním profilu a mají vyšší povrchovou energii. Naproti tomu amorfní léčiva mají nižší chemickou a fyzikální stabilitu a vykazují mnohem vyšší nároky na produkci, skladování a stabilizaci. Například při vystavení vlhkosti se sníží teplota skelného přechodu T_g , jelikož vlhkost působí jako plastifikátor, a tím se zvýší pravděpodobnost rekrystalizace amorfní látky.[1]

Amorfní léčiva se využívají především pro generické lékové formy, ale již existuje i několik originálních amorfních léčiv, k nimž se řadí i léčivo indomethacin.[1]

1.3 Indomethacin

Indomethacin (Obr. 3), jehož strukturní vzorec zní $C_{19}H_{16}ClNO_4$ a systematický název 1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl octová kyselina se řadí mezi nesteroidní protizánětlivé léky (angl. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) s výrazným antipyretickým, analgetickým a antiflogistickým účinkem. Poprvé byl schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (angl. Food and Drug Administration, FDA) v lednu 1965. Obchodní názvy indomethacinu mohou být Indocin a Tivorbex a jeho registrační číslo CAS je 53-86-1.[12-14]



Obrázek 3: Struktura indomethacinu

Indomethacin má bílou až nažloutlou barvu a jedná se o krystalický prášek. Je nerozpustný ve vodě ($< 1 \text{ mg/l}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$), ale naopak je rozpustný v ethanolu, etheru, acetonu a ricinovém oleji. Indomethacin je stabilní v neutrálním až mírně kyselém prostředí, naopak rychlý rozklad nastává v zásaditém prostředí, kde se rozkládá na 5-methoxy-2-methyl-3-indolooctovou kyselinu a p-chlorbenzoovou kyselinu. Souhrn vybraných fyzikálních a chemických vlastností indomethacinu se nachází v Tabulce 1.[12,14,15]

Tabulka 1: Fyzikální a chemické vlastnosti indomethacinu

Molekulová hmotnost, g/mol	357,79
pKa (25 °C)	4,5
Hustota při 25 °C, g/cm³	1,32
Bod tání polymorfních krystalů, °C	158 - 162
Bod tání amorfni formy, °C	55 - 57
Bod varu, °C (předpoklad)	499,4 ± 45

Indomethacin se využívá k léčbě pacientů se středně těžkou až těžkou revmatoidní artritidou, ankylozující spondylitidou (forma zánětlivé artritidy postihující primárně axiální skelet, známá pod názvem Bechtěrovova choroba), dnou (opakující se záchvaty akutní zánětlivé artritidy postihující palec u nohy), burzitidou (zánět tíhového vřáčku, který se nachází mezi kostí a měkkými tkáněmi nad ní), tendonitidou (zánět šlachy), osteoartritidou (kloubní onemocnění) a akutní bolestí.[16,17]

Doporučená denní dávka pro dospělého pacienta při léčbě zánětu nebo revmatického onemocnění je 50 – 200 mg rozdělená do 2 – 3 dávek indomethacinu. Pro léčbu burzitidy nebo tendinitidy je dávka o něco menší, 75 – 150 mg rozdělená do 3 – 4 dávek indomethacinu. Akutní záchvaty dny se léčí dávkou 50 mg indomethacinu každých 8 hodin po dobu 3 – 5 dnů. V dnešní době se již vyrábí indomethacin s prodlouženým uvolňováním. Jsou to 75mg tablety, z nichž se okamžitě uvolní 25 mg účinné látky a zbývajících 50 mg se uvolňuje postupně během následujících několika hodin. Tyto tablety jsou potaženy pomalu rozpustným polymerem. Indomethacin je dostupný ve formě tobolek, čípků, suspenzí, injekcí (roztok), gelů, očních kapek (roztok) a kožního spreje (roztok). Gely a kožní spreje se používají k potlačení bolestí různého původu. Indomethacin ve formě očních kapek se aplikuje při chirurgických zákrocích v oblasti přední oční komory a k potlačení bolestí po odstranění části rohovky. Injekce s indomethacinem se využívají v oboru porodnictví. Přehled lékových forem a jejich dávkování je uvedeno v Tabulce 2.[12,18-20]

Tabulka 2: Lékové formy indomethacinu

Léková forma	Podání	Dávkování
Tobolky	Orální	25 / 50 mg
Tobolky s prodlouženým uvolňováním	Orální	75 mg
Čípek	Rektální	50 /100 mg
Suspenze	Orální	25 mg/5 ml
Injekce	Intravenózní	0,1 – 0,25 mg/kg
Gel	Dermální	10 mg
Oční kapky	Oční	1 ml
Kožní sprej	Dermální	8 mg

Všechny formy indomethacinu by měly být uchovávány při pokojové teplotě, 15 – 30 °C a chráněny před světlem a vlhkostí.[12,18,19]

1.3.1 Nesteroidní protizánětlivé látky a mechanismus účinku

Nesteroidní protizánětlivé látky (angl. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) představují heterogenní skupinu léčiv, kde jednotlivé látky spolu chemicky nesouvisejí, ale většina z nich jsou organické kyseliny. Do této skupiny se například řadí extrakty z chinovníku či kůry vrby, které jsou již známé po staletí. Mezi nejznámější léčiva, která spadají do této skupiny spolu s indomethacinem, patří například aspirin nebo ibuprofen.[12,21]

Mechanismus účinku léčiv řadící se do skupiny NSAID spočívá v inhibici cyklooxygenázy (COX), což zabraňuje produkci prostaglandinů z arachidonové kyseliny. Prostaglandiny jsou skupina hormonů, které se účastní imunitních a zánětlivých procesů a jsou kritickými mediátory zánětu, horečky a bolesti. Tato skupina hormonů také udržuje funkci ledvin (regulace renálního krevního průtoku, regulace renálního krevního tlaku a ochrana ledvin před poškozením způsobeným zánětem) a aktivitu krevních destiček. Cyklooxygenáza se vyskytuje ve dvou izoformách – COX-1 a COX-2. První forma, COX-1 je přítomna ve všech tkáních těla a podílí se na syntéze prostaglandinů a tromboxanu A₂. Tromboxan A₂ je kritický mediátor agregace krevních destiček a inhibice tohoto enzymu je pravděpodobně zodpovědná za antiagregační účinky NSAID. Druhá forma, COX-2, se projevuje jako reakce na poranění či nějaký zánět.[12,21]

NSAID léčiva se dělí do dvou kategorií podle selektivity COX. První skupinou jsou látky neselektivní NSAID, které blokují obě formy COX, a druhou skupinou jsou inhibitory selektivní na formu COX-2. Pomocí modelů syntézy prostaglandinů in vivo a in vitro jsou porovnávány relativní účinnosti jednotlivých léčiv: indomethacin > naproxen > ibuprofen > fenylbutazon > aspirin.[12,21]

Indomethacin může ovlivnit účinky léků snižujících krevní tlak. K tomu může dojít, protože prostaglandiny hrají roli při regulaci krevního tlaku. Nebo pokud se indomethacin užívá společně s aspirinem, může to zvýšit riziko vzniku žaludečního vředu.[12,18]

Léčivo indomethacin disponuje též antivirotickou aktivitou, která snižuje replikaci virů. V literatuře se uvádí jeho antivirotická aktivita proti viru hepatitidy B a koronaviru, ale v současné době žádná data nepodporují jeho antivirotickou aktivitu proti koronaviru SARS-CoV-2.[22]

1.3.2 Farmakokinetika indomethacinu

Léčivo indomethacin podléhá lineární farmakokinetice. Indomethacin se téměř okamžitě vstřebává z trávicího traktu a po perorálním požití má 98% biodostupnost. Po rektálním podání je biologická dostupnost mezi 80 – 90 %. Maximální plazmatická koncentrace po jedné dávce na lačno nastává mezi $0,9 \pm 0,4$ a $1,5 \pm 0,8$ hodinami. Jeho distribuční objem činí $0,34 - 1,57$ l/kg.[12,23]

Užívání indomethacinu s jídlem má vliv na rychlost absorpce, nikoliv na biodostupnost. Největší efekt na rychlost absorpce má jídlo s vysokým obsahem sacharidů, poté s vysokým obsahem bílkovin a následně jídlo s vysokým obsahem tuků.[12]

Indomethacin se metabolizuje v játrech konjugací s kyselinou glukoronovou. Okolo 33 % dávky indomethacinu je vylučováno ve stolici jako demetylované metabolity v nekonjugované formě, přibližně 1,5 % je vylučováno také stolicí jako nezměněný indomethacin a zbytek dávky je vylučován močí prostřednictvím renální tubulární sekrece. Poločas eliminace indomethacinu je okolo 7 hodin, ale může se výrazně lišit (1,5 – 16 hodin), což je zapříčiněno enterohepatální cirkulací.[12,24]

1.3.3 Nežádoucí účinky a toxicita indomethacinu

Mezi nejčastější nežádoucí účinek indomethacinu se řadí bolest hlavy, která se vyskytuje nejméně u 10 % pacientů. Tento nežádoucí účinek je na dávce závislý a bylo zjištěno, že je častější ráno a může být doprovázen zvracením, třesem či závratěmi. Další nežádoucí účinky indomethacinu mohou být nevolnost, dyspepsie (nesnášenlivost, pálení žáhy), průjem, bolest břicha či zácpa. Okolo 30 – 60 % pacientů užívající indomethacin pociťuje nežádoucí účinky, přičemž 10 – 20 % z nich užívání přeruší. Aby nedocházelo ke zvýšení nežádoucích účinků na gastrointestinální trakt, nedoporučuje se současného podávání indomethacinu s jinými léčivy ze skupiny NSAID. Mezi méně časté vedlejší účinky, které se mohou u pacientů vyskytnout, jsou: vyrážka, zadržování tekutin, krevní sraženiny, infarkty, hypertenze neboli vysoký krevní tlak a selhání srdce. Jelikož má indomethacin celou řadu vedlejších nežádoucích účinků používá se jako léčivo druhé volby.[12]

U některých jedinců se prokázalo, že mohou být alergičtí na léky ze skupiny NSAID a mít pocit dušnosti při užívání těchto léků. Lidé trpící astmatem mají vyšší riziko závažné alergické reakce na léky ze skupiny NSAID.[12]

Čistý indomethacin je velmi toxická účinná látka. V literatuře je popsáno pouze několik případů předávkováním léčivem indomethacin. Toxické účinky popsané v literatuře popisují jako vedlejší příznaky bolest hlavy, tinnitus (zvonění, pískání, hučení nebo šumění v jednom nebo obou uších), závratě, letargii (stav sníženého stavu bdělosti a aktivity), ospalost, zmatenost, dezorientaci a neklid, a akutní poškození ledvin (AKI) jako následek toxicity indomethacinu. K předávkování indomethacinem neexistuje žádné vhodné antidotum, u dospělých pacientů se vyvolává zvracení nebo se podá 60 – 100 g aktivního uhlí z důvodu absorpce léčiva z gastrointestinálního traktu. V Tabulce 3 jsou uvedeny smrtelné dávky čistého indomethacinu.[25,26]

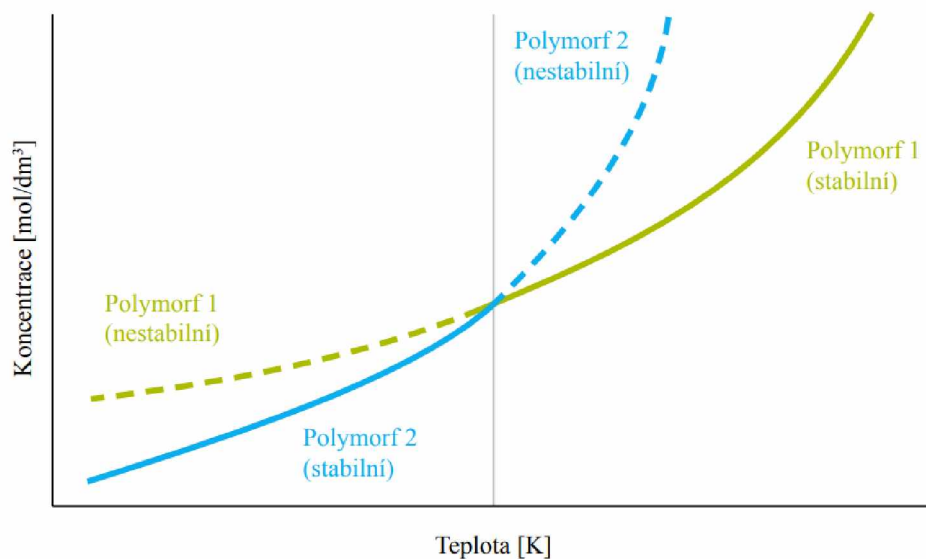
Tabulka 3: Smrtné dávky čistého indomethacinu

Organismus	Podání	Smrtná dávka, mg/kg
Myš	Perorální	11,8 – 25,6
Krysa	Perorální	11,5 - 15
Křeček	Perorální	81
Králík	Perorální	135
Kočka	Perorální	320
Pes	Perorální	160
Člověk (70 kg)	Perorální	50 – 500 (čajová lžička)

1.4 Polymorfismus

Polymorfismus je schopnost látek v závislosti na krystalizačních podmínkách krystalovat ve více krystalických strukturách neboli polymorfech. Tyto jednotlivé polymorfy se liší ve fyzikálních a chemických vlastnostech, např. rozpustnosti, kinetice nukleace a růstu krystalů, biologické dostupnosti, barvě, teplotě tání a hustotě.[27,28]

U polymorfů je vždy jeden stabilnější než ostatní polymorfy za určitých podmínek, například v určitém rozmezí teplot a tlaků, zatímco jiné polymorfy jsou stabilní za jiných podmínek. Je důležité znát stabilitu jednotlivých polymorfních forem molekuly a vědět, jak jednotlivé polymorfy připravit, jelikož i malá změna teploty či složení rozpouštědla může způsobit, že látka přejde z metastabilní formy do stabilní formy. Na Obrázku 4 můžeme vidět fázový diagram závislosti koncentrace na teplotě dvou polymorfů. Při vyšších teplotách je stabilní Polymorf 1 (vyšší rozpustnost), zatímco při nižších teplotách je stabilní Polymorf 2 (nižší rozpustnost).[29]



Obrázek 4: Fázový diagram dvou polymorfů[29]

Pro rozlišení jednotlivých polymorfů se využívá například rentgenová prášková difrakce. Rentgenové paprsky mají vysokou propustnost, a tím umožňují zkoumat i balená léčiva, nebo může být rentgenová prášková difrakce využita k detekci falešných léčivých přípravků. Dalšími z metod, které se využívají pro charakterizaci polymorfů, jsou diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), infračervená spektroskopie (IČ) nebo Ramanova spektroskopie.[27]

Velkým problémem, zejména u léčivých látek, jsou nekontrolovatelné polymorfni přechody, proto je podstatné polymorfismus podrobně prostudovat a monitorovat. Bylo prokázáno, že až jedna třetina krystalických organických molekul a přibližně polovina farmaceuticky aktivních substancí (angl. Active Pharmaceutical Ingredient, API) se vyskytuje ve více než jedné pevné formě. Charakterizace všech doposud známých polymorfů daných účinných látek jsou klíčové pro stanovení účinnosti, rozpustnosti nebo například trvanlivosti daného léčiva. Dále pokud dojde k objevu nových polymorfů s jinými chemickými a fyzikálními vlastnostmi, může dojít k vytvoření nové léčby, která bude efektivnější a bude mít snížené množství vedlejších účinků.[30]

Indomethacin je polymorfni molekula. Dosud bylo zaznamenáno sedm různých polymorfni modifikací – α , β , γ , δ , ϵ , ζ a η . V závislosti na přípravě amorfni formy indomethacinu a na podmínkách skladování léčiva dochází nejčastěji ke krystalizaci do α formy nebo do γ formy. α forma je metastabilní forma s teplotou tání $T_t = 154 - 155,5$ °C a γ forma je termodynamicky stabilní s teplotou tání $T_t = 160 - 161,5$ °C. Vznik γ formy při krystalizaci je pravděpodobnější, pokud je teplota pod teplotou skelného přechodu (T_g) a při nízké vlhkosti.

Naopak α forma se objevuje při vysokých vlhkostech, při teplotách nad T_g a ve vodných prostředích. Další z forem, δ byla zaznamenána při krystalizaci z disperze indomethacinu s polyvinylpyrrolidonem při relativní vlhkosti 94 % a z methanolového roztoku indomethacinu při sušení. Forma β byla zaznamenána krystalizací z dioxanů a roztoků cyklodextrionu. Formy ϵ , ζ a η byly získány rekrystalizací amorfního indomethacinu v roztoku při různých hodnotách pH.[31,32]

1.5 Termická analýza

Termická analýza zahrnuje soubor metod, při nichž je v definované atmosféře sledována určitá vlastnost vzorku v závislosti na čase nebo teplotě. Pomocí termické analýzy můžeme sledovat děje, které probíhají při zahřívání nebo ochlazování vzorků nebo konstantní teplotě (izotermní měření). Mezi tyto děje se řadí dehydratace, desolvatace, skelné přechody, oxidace, krystalizace, tání, sublimace nebo další fázové přeměny, které jsou charakterizovány buď uvolněním nebo spotřebováním tepla. Mezi výhody metod termické analýzy se řadí malá spotřeba vzorku, naopak značná nevýhoda je, že se jedná o destruktivní metody. Jednotlivé metody termické analýzy rozdělujeme podle měřené vlastnosti. Přehled jednotlivých metod termické analýzy je shrnut v Tabulce 4.[33-35]

Tabulka 4: Metody termické analýzy

Metoda termické analýzy	Zkratka	Sledovaná veličina
Termogravimetrická analýza	TG	Hmotnost
Diferenční termická analýza	DTA	Rozdíl teplot
Diferenční skenovací kalorimetrie	DSC	Rozdíl teplot nebo toku energie
Termomechanická analýza	TMA	Rozměr a deformace vzorku
Termodilatometrická analýza	TD	Objem vzorku
Dynamická mechanická analýza	DMA	Viskoelastické vlastnosti
Diferenční tlaková analýza	DPA	Tlak
Elektrotermická analýza	ETA	Rozdíl elektrické vodivosti
Detekce uvolněných plynů	EGD	Detekce uvolněných plyných produktů
Termooptická analýza	TOA	Změna vzhledu

Dále mezi metody termické analýzy patří simultánní termická analýza (STA), která umožňuje měřit více vlastností materiálu během jednoho měření. Takto lze například spojit metody TG-DTA nebo TG-DSC.[33-35]

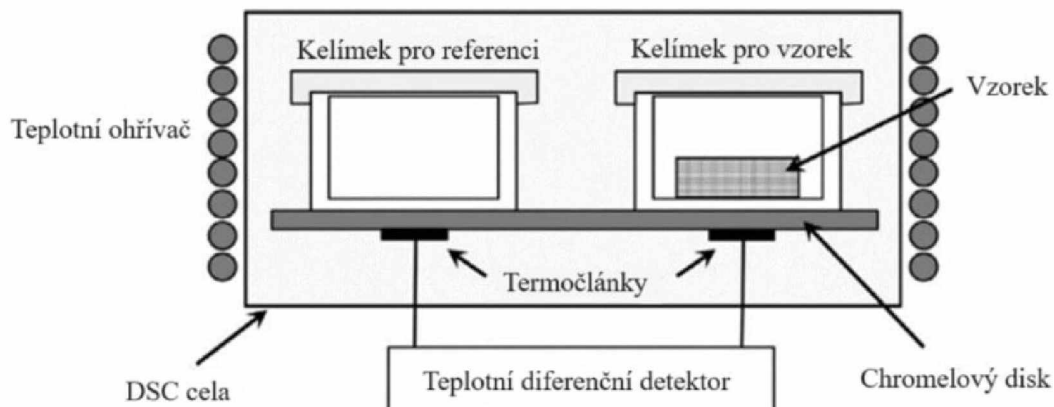
Z naměřených dat lze vyhodnotit a získat spoustu údajů o daném vzorku, jako je teplota skelného přechodu T_g , teplota tání T_t , teplota krystalizace T_c , mechanické vlastnosti (modul pružnosti, viskoelastické chování), specifickou tepelnou kapacitu, koeficient tepelné roztažnosti a další.[33-36]

Při výzkumu a vývoji léčiv je zásadní znát termické vlastnosti daného léčiva k formulaci stabilní lékové formy. Ke znalosti těchto vlastností se nejvíce využívají hlavně diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), diferenční termická analýza (DTA) a termogravimetrická analýza (TG).[35]

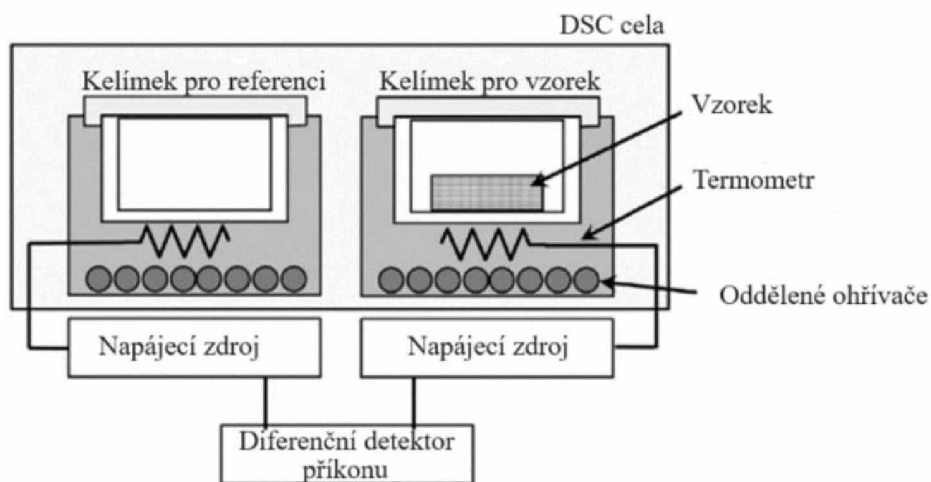
1.5.1 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie (angl. Differential scanning calorimetry, DSC) se řadí mezi termoanalytické metody a je nejvíce využívanou metodou ze všech metod termické analýzy ve farmaceutickém průmyslu. DSC vychází z diferenční termické analýzy (DTA) a byla vyvinuta okolo roku 1962. DSC se využívá pro charakterizaci tepelných vlastností různých sloučenin a materiálů a pro studium kinetiky různých procesů. Výstupem z DSC analýzy jsou pak charakteristické teploty tání, krystalizace, teplota skelného přechodu nebo množství tepla spojeného s fázovými přechody prvního a druhého druhu. Díky DSC můžeme sledovat všechny procesy, při kterých dochází k výměně tepla a poskytuje nám podrobné informace o fyzikálních vlastnostech studované látky. Principem DSC měření je lineární ohřev nebo chlazení vzorku, a zároveň se měří rozdíly teplot nebo energií, které je potřeba dodat, aby vzorek a referenční látka měly stejnou teplotu. Jako referenční materiál se používá nejčastěji prázdný kelímek. Mezi výhody této metody se řadí univerzálnost a vysoká citlivost.[35-38]

DSC má dva základní typy uspořádání – DSC s tepelným tokem (angl. Heat flux DSC) a DSC s kompenzací příkonu (angl. Power compensation DSC). Principem DSC s tepelným tokem (Obr. 5) je měření rozdílu teplot mezi vzorkem a referencí pomocí rozdílu termoelektrických napětí jednotlivých termočlánků. Prostor vzorku a prostor reference jsou od sebe tepelně odděleny, aby se zabránilo tepelnému toku mezi nimi, ale vzorek a reference mají jeden společný ohříváč. Výsledná křivka představuje závislost tepelného toku na teplotě. Principem kompenzační DSC (Obr. 6) je měření energie, která je potřeba pro vyrovnání teplot mezi vzorkem a referencí. Přístroj tedy měří elektrický příkon, který udržuje stejnou teplotu mezi vzorkem a referencí. Vzorek a reference jsou současně ohřívány nebo ochlazovány podle zvoleného teplotního programu. Jakmile dojde k nějakému tepelnému efektu u vzorku, např. k tání vzorku, což je endotermický děj, začne teplota cely vzorku zaostávat oproti teplotě cely reference, proto musí být energie dodána, aby se teploty vyrovnaly. Při exotermním ději je tomu naopak (např. krystalizace). Na rozdíl od DSC s tepelným tokem má kompenzační DSC dva oddělené ohříváče jak pro vzorek, tak pro referenci. Pec je vyrobena z kovu s vysokou tepelnou vodivostí, jako je například stříbro. Výhodou této metody je vysoké rozlišení, ale naopak má nižší citlivost.[35,39,40]



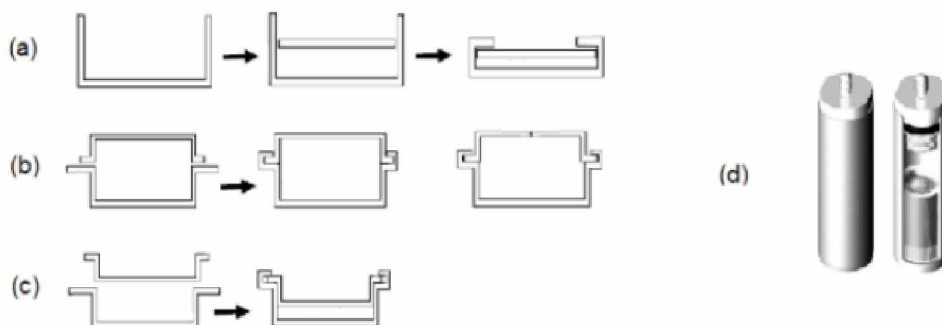
Obrázek 5: Schématický nákres DSC s tepelným tokem[39]



Obrázek 6: Schématický nákres kompenzační DSC[39]

Velká výhoda diferenční skenovací kalorimetrie je v nízké spotřebě vzorku, jelikož k analýze postačují vzorky v obvyklých navážkách okolo 1 – 100 mg. Tyto nízké navážky se doporučují z toho důvodu, aby byly co nejmenší tepelné ztráty a tepelné gradienty ve vzorku. Vzorky je možné měřit v jakékoli formě, jak pevné jako prášky, gely, v kusech nebo ve formě pasty, tak v kapalné formě či plynné. Měřené vzorky se umísťují do vhodně zvolených kelímků, které se volí podle typu experimentu i podle typu vzorku, který chceme měřit. Kelímky se vyrábějí z různých materiálů, včetně keramiky, hliníku, mědi, platiny, niklu, oceli, aluminy nebo křemene. Typická velikost kelímků se pohybuje v rozmezí od 40 μl do 100 μl . Pro měření, které se provádí do 600 $^{\circ}\text{C}$, se obvykle používají hliníkové kelímky, pro měření přes 1000 $^{\circ}\text{C}$ jsou vhodné kelímky vyrobené buď ze zlata, mědi nebo platiny. Kelímky vyrobené z křemene a aluminy jsou odolné i vůči mnohem vyšším teplotám. Kelímky

používané u DSC měření se mohou lišit jak tvarem, tak způsobem zavírání. Mezi základní typy se řadí například otevřené kelímky, plně uzavřené kelímky, crimpované kelímky nebo hermeticky uzavřené kelímky. Hermeticky uzavřené kelímky jsou uzavřené pomocí lisu (tzv. studený svár) a využívají se např. u vzorků, kde často hrozí, že během zahřívání bude docházet k sublimaci nebo se bude vzorek odpařovat. Na Obrázku 7 jsou znázorněny nákrsky základních typů kelímků pro DSC měření.[35,36]

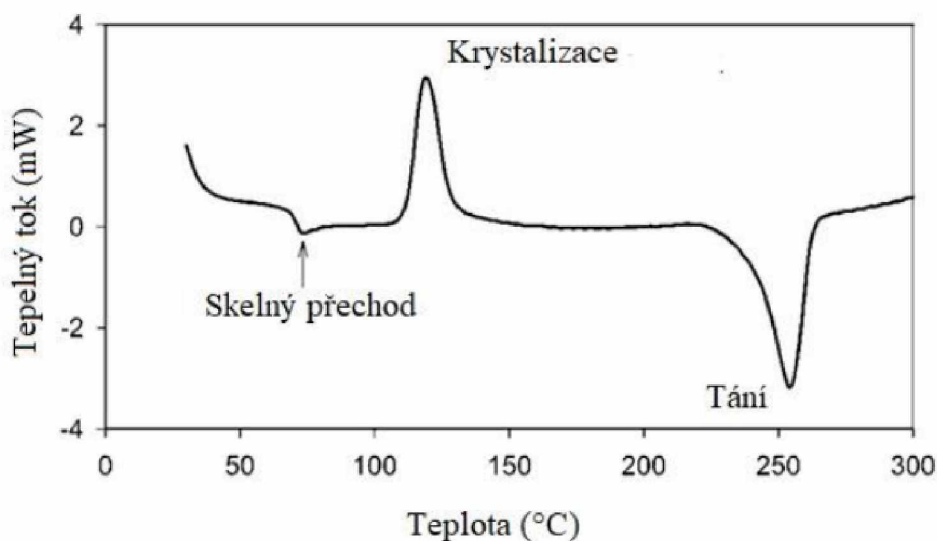


Obrázek 7: Kelímky pro DSC, (a) Typický kelímk pro DSC s víčkem, (b) Hermeticky uzavřený kelímk pro DSC, (c) Hermeticky uzavřený kelímk s obráceným víčkem, (d) Vsádková (batch) cela pro měření mikro-DSC[35]

Diferenční skenovací kalorimetr, jako všechny ostatní instrumentální přístroje, vyžaduje před zahájením vlastního měření kalibraci přístroje. Jako standardy se volí látky, u kterých je dobře známá teplota tání a entalpie tání, další z požadavků je stabilita standardu, nesmí být polymorfní, musí splňovat podmínku nízké těkavosti a mít vysokou čistotu, tepelně stálé a stálé na světle, nehygroskopické a inertní vůči DSC kelímkům a použité atmosféře. Nejčastěji se proto jako standardy volí čisté kovy – indium, galium, cín nebo olovo. Například indium má teplotu tání $156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ a entalpie tání činí $28,71\text{ J/g}$. [35,36]

Aby nedocházelo k reakcím vzorku s okolní atmosférou, provádí se měření v dusíkové atmosféře. Rozsah teplot, ve kterých DSC přístroje mohou měřit, se liší podle typu konkrétního přístroje, ale obvykle se pohybujeme v rozmezí od -150 do $1500\text{ }^{\circ}\text{C}$. U DSC se využívá velký rozsah rychlostí ohřevu, od $0,2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ až po $80\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, avšak nejpoužívanější rychlostí ohřevu je rychlost $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Plocha píků je přímo úměrná množství uvolněného nebo spotřebovaného tepla během reakce a pomocí integrace získáme hodnotu entalpie daného procesu. Výstupem každého měření pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru je graf, který se v tomto případě nazývá charakteristická DSC křivka (Obr. 8), což je závislost tepelného

toku Φ [mW] na teplotě T [K], případně čase t [s] při izotermických měření. Na Obrázku 8 vidíme typické píky charakterizující tepelné efekty, které proběhly v měřeném vzorku. Jako první je vidět skelný přechod, dále dochází ke krystalizaci a posledním efektem je efekt tání.[35,36]



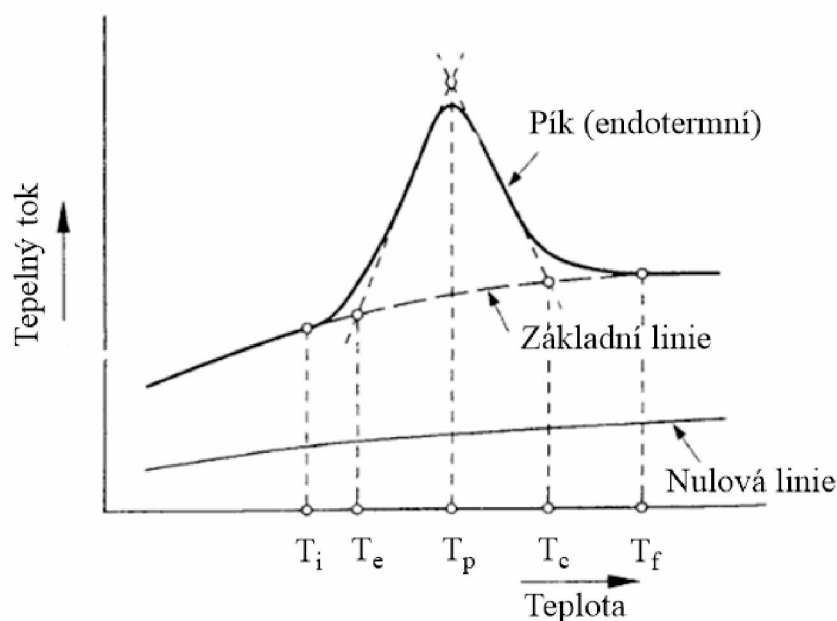
Obrázek 8: Charakteristická DSC křivka[40]

Skelný přechod je typický pro amorfni látky. Dochází při něm ke změně tepelné kapacity a řadí se mezi fázové přechody druhého druhu. Pod teplotou skelného přechodu se materiál nachází ve sklovitém stavu, což znamená, že je látka tvrdá, křehká a nepružná. Nad teplotou skelného přechodu se materiál dostává do stavu podchlazené taveniny, kde je látka pružnější a měkčí.[42]

Krystalizace je proces, při kterém se z roztoku, taveniny nebo plynné fáze vytvářejí krystaly pevné látky a řadí se mezi fázové přechody prvního druhu. Tyto krystaly mají pravidelné uspořádání a tvoří krystalovou mřížku. Krystalizace je exotermní proces, takže se uvolňuje teplo do okolí. Krystalizace se skládá ze dvou hlavních procesů – nukleace a následného růstu zárodků krystalické fáze.[42]

Tání je fyzikální proces, při kterém krystalická látka přechází do kapalného stavu. Je to endotermní děj, proto je potřeba látce dodat dostatečné množství tepla, aby tento proces mohl vůbec proběhnout. Stejně jako krystalizace se proces tání řadí mezi fázové přechody prvního druhu.[42]

Finální vzhled DSC křivek může být ovlivněn několika faktory. Mezi tyto faktory se řadí např. typ zařízení, rychlost ohřevu, hmotnost vzorku, složení atmosféry, fyzikální a chemické vlastnosti vzorku a mnoho dalších. Na Obrázku 9 je znázorněn detail DSC křivky s vyznačenými základními pojmy, které budou dále vysvětleny.



Obrázek 9: Detail DSC křivky s charakteristickými pojmy[43]

Charakteristická DSC křivka představuje závislost tepelného toku Φ na teplotě T , případně při izotermických měření na čase t . Nulová linie (angl. Zeroline) značí křivku získanou měřením bez vzorku a reference nebo jen s prázdnými kelímky a při tomto měření nedochází k žádným tepelným efektům. Základní čára (angl. Baseline) značí křivku, která byla získána měřením vzorku, při kterém nedochází k žádným tepelným efektům. Pík (angl. Peak) je odchylka od základní čáry směřující k maximum nebo minimum a znázorňuje probíhající tepelný efekt ve vzorku. Tento efekt může být buď endotermní nebo exotermní.[43]

U každého tepelného jevu můžeme určit několik charakteristických teplotních hodnot. První z nich je počáteční teplota píku T_i (angl. Initial peak temperature), což je bod, kde se naměřená křivka začíná odchylovat od základní linie. Naopak je tomu u teploty konce píku T_f (angl. Final peak temperature), což je bod, kde se naměřená křivka začíná vracet na základní linii. Další z charakteristických teplot je extrapolovaná počáteční teplota T_e (angl. Extrapolated peak onset temperature), je to bod, kde se lineární část křivky protíná se základní linií. Ten samý bod je pozorován na konci sledovaného tepelného efektu a označuje se jako extrapolovaná

koncová teplota T_c (angl. Extrapolated peak completion temperature). Poslední z charakteristických teplot je teplota maxima píku T_p (angl. Peak maximum temperature), což označuje maximální rozdíl mezi tepelným efektem a základní linií.[43]

1.6 Kinetická analýza DSC dat procesu krystalizace

V dnešní době se výzkum zaměřuje na zkoumání kinetiky procesu krystalizace v amorfních materiálech, jelikož mají široké využití v mnoha oblastech. Znalost kinetiky krystalizace materiálu je důležitá především pro predikci podmínek přípravy nebo využití materiálu v praxi. Pro analýzu kinetiky krystalizace lze využít sledování fyzikálních vlastností v závislosti na teplotě pomocí různých experimentálních metod (např. DSC, DTA, TMA). Cílem celé kinetické analýzy DSC dat procesu krystalizace je získání vhodného kinetického modelu, který adekvátně popíše analyzovaný proces.[37,44]

V diferenčním skenovacím kalorimetru s tepelným tokem je měřen teplotní rozdíl mezi vzorkem a referencí v závislosti na teplotě vzorku. Tato hodnota je následně převedena a registrována jako tepelný tok:

$$\Phi = \frac{dH}{dT} \quad (1)$$

kde H je entalpie a T je teplota.[45,46]

Aktuální rychlost procesu krystalizace je přímo úměrná měřenému tepelnému toku, proto kinetickou rovnicí můžeme vyjádřit následovně:

$$\Phi = \Delta H \cdot \left(\frac{d\alpha}{dt}\right) \quad (2)$$

kde α je stupeň konverze v rozmezí 0 – 1 a t je čas. Pokud máme neizotermní měření, tak se kinetická rovnice (2) musí upravit na tvar:

$$\Phi = \Delta H \cdot \left(\frac{d\alpha}{dT}\right) \cdot \left(\frac{dT}{dt}\right) \quad (3)$$

Aktuální rychlost procesu kinetiky můžeme vyjádřit pomocí následující rovnice:

$$\frac{d\alpha}{dt} = K(T) \cdot f(\alpha) \quad (4)$$

kde $K(T)$ je rychlostní konstanta závislá na teplotě a $f(\alpha)$ značí vyjádření vhodného kinetického modelu.[45,46]

Rychlostní konstanta bývá velmi často vyjadřována v Arrheniově tvaru:

$$K(T) = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \quad (5)$$

kde A je předexponenciální faktor, E_A je zdánlivá aktivační energie, R je univerzální plynová konstanta a T je teplota. Základní kinetická rovnice pro popis krystalizačního píku vznikne spojením rovnic (2), (4) a (5):

$$\Phi = \Delta H \cdot A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}} \cdot f(\alpha) \quad (6)$$

[45,46]

1.6.1 Výpočet aktivační energie

Výpočet aktivační energie je prvním krokem celé kinetické analýzy krystalizačních DSC dat. Existuje celá řada metod, které se využívají pro výpočet aktivační energie, ale nejčastěji se využívají tyto metody – Kissingerova metoda, Ozawova metoda, Friedmanova metoda (diferenciální metoda izokonverzních řezů) a Starrinkem modifikovaná Kissinger-Akahira-Sunose (KAS) metoda (integrální izokonverzní metoda). Pro měření za neizotermních podmínek lze využít všechny čtyři zmíněné metody, avšak pro měření za izotermních podmínek lze použít pouze metody izokonverzních řezů. V diplomové práci se zaměříme pouze na Kissingerovu metodu, kterou si detailněji probereme dále.[37,44]

Kissingerova metoda

Kissingerova metoda je založena na posunu maxima krystalizačního píku T_p s rychlostí ohřevu q^+ . Jak již bylo zmíněno, metoda se používá jen pro data měřená za neizotermních podmínek. Matematické vyjádření Kissingerovy metody je následující:

$$\ln\left(\frac{q^+}{T_p^2}\right) = -\frac{E_A}{RT_p} + konst. \quad (7)$$

Kissingerova metoda je nejvíce využívanou metodou v praxi. Aktivační energii získáme sestavením grafu, kde na osu y vynášíme hodnoty $\ln(q^+/T_p^2)$ a na osu x $1/T_p$, a směrnice má poté tvar $-E_A/R$. [37,44]

Tato metoda vychází z předpokladu, že stupeň konverze, který odpovídá maximální rychlosti krystalizace, je konstantní a nezávislý na experimentálních podmínkách. U této metody existují určité nejasnosti při vyhodnocování aktivační energie krystalizace. Důvodem je získání jedné hodnoty aktivační energie, která reprezentuje dominantní krystalizační proces, ale problém může nastat, pokud proces obsahuje více krystalizačních procesů.[37,47]

1.6.2 Určení kinetického modelu

Druhým krokem kinetické analýzy DSC dat krystalizace je určení kinetického modelu a jeho parametrů. Vhodný kinetický model pro popis experimentálních dat je posuzován na základě tvaru a hodnot maxim charakteristických funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$. Tyto charakteristické funkce jsou získány vhodnou transformací experimentálních DSC dat. Pro izotermní podmínky mohou být vyjádřeny jako:

$$y(\alpha) = \Phi \quad (8a)$$

$$z(\alpha) = \Phi \cdot t \quad (8b)$$

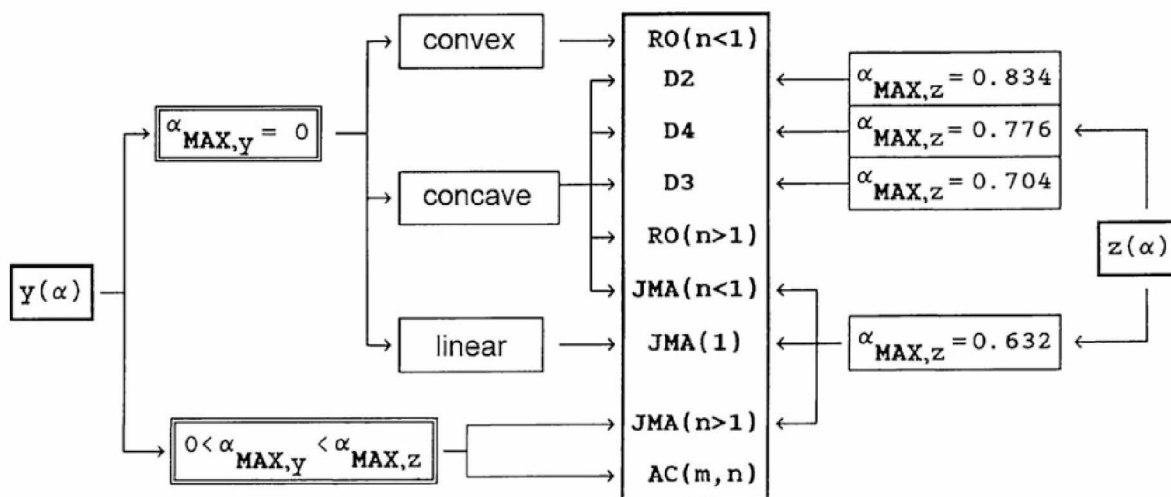
Pro neizotermní podmínky mohou být funkce vyjádřeny jako:

$$y(\alpha) = \Phi \cdot e^{E_A/RT} \quad (9a)$$

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

Pro snadnější porovnávání dat za různých podmínek jsou funkce $y(\alpha)$ i $z(\alpha)$ normované v intervalu $\langle 0,1 \rangle$. [37]

Tyto charakteristické funkce $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$ usnadňují zpracování DSC dat a slouží jako univerzální nástroj pro zvolení vhodného kinetického modelu pro jakýkoli fyzikální proces. Kinetický model se stanoví pomocí hodnot stupňů konverze v maximech charakteristických funkcí a můžeme určit i celkový tvar funkcí. Maximum funkce $z(\alpha)_{\max}$ je totožné s hodnotou stupně konverze $\alpha_{\max,z}$ a odpovídá maximální rychlosti procesu a nezávisí na hodnotě aktivační energie. Na základě těchto údajů můžeme nalézt vhodný kinetický model podle vytvořeného algoritmu zobrazeného na Obrázku 10. Dále z něho můžeme určit i konkrétní hodnoty parametrů kinetických modelů. [37]



Obrázek 10: Algoritmus pro stanovení vhodného kinetického modelu na základě maxim charakteristických funkcí $y(\alpha)$ a $z(\alpha)$ [37]

Existuje celá řada kinetických modelů, které se používají k popisu kinetiky krystalizace. Mezi ty nejběžněji používané se řadí například nukleačně růstový Johnson-Mehl-Avrami (JMA) model, difúzní modely (D1-3), Ginstling-Brounshtein model (D4), model se zmenšující se plochou (R2) nebo model se zmenšujícím se objemem (R3). Dále můžeme využít i empirické modely, mezi které se řadí například autokatalytický Šesták-Berggren (AC(M,N)) model nebo model reakčního řádu (RO). V následující Tabulce 5 jsou uvedeny základní kinetické modely, jejich zkratky a jejich matematické vyjádření.[37,45]

Tabulka 5: Přehled kinetických modelů a jejich matematické vyjádření

Kinetický model	Zkratka	$f(\alpha)$
Johnson-Mehl-Avrami	JMA	$m(1 - \alpha)[- \ln(1 - \alpha)]^{1 - \frac{1}{m}}$
1D – difuze	D1	$\frac{1}{2\alpha}$
2D – difuze	D2	$-\left[\frac{1}{\ln(1 - \alpha)} \right]$
3D – difuze (Jander)	D3	$\frac{3(1 - \alpha)^{\frac{2}{3}}}{2(1 - (1 - \alpha)^{\frac{1}{3}})}$
Ginstling-Brounhstein	D4	$\frac{3}{2((1 - \alpha)^{-\frac{1}{3}} - 1)}$
2D – reakce	R2	$2(1 - \alpha)^{\frac{1}{2}}$
3D - reakce	R3	$3(1 - \alpha)^{\frac{2}{3}}$
Autokatalytický Šesták-Berggren	AC(M,N)	$\alpha^M(1 - \alpha)^N$
Reakční řád	RO	$(1 - \alpha)^n$

Nukleačně růstový Johnson-Mehl-Avrami model

Nukleačně růstový Johnson-Mehl-Avrami (JMA) model je jednoparametrový kinetický model a lze ho vyjádřit následující rovnicí:

$$f(\alpha) = m(1 - \alpha)[- \ln(1 - \alpha)]^{1 - \frac{1}{m}} \quad (10)$$

kde m je parametr reprezentující mechanismus nukleace a růst krystalu.[36]

Tento model lze využít pro experimenty prováděné za izotermních podmínek, tak i za neizotermních podmínek, ale obě využití mají své předpoklady. Při měření prováděného za izotermních podmínek musí být rychlost růstu nově vytvořené fáze řízena pouze teplotou, je nezávislá na čase a na předchozí tepelné historii materiálu, dále musí mít rostoucí krystaly nízkou anizotropii, čili mají různé vlastnosti v různých směrech. Při měření prováděného za neizotermních podmínek lze tento model využít, pokud nukleace probíhá v prvotních fázích transformace a poté se stává bezvýznamný během samotného růstu krystalů.[37]

JMA model pro popis krystalizační kinetiky může být využit pouze v případě, pokud hodnota stupně konverze odpovídá maximu charakteristické funkce $z(\alpha)$, a zároveň platí $\alpha_{\max,z} = 0,632$. Pokud je tento předpoklad splněn, můžeme dále určit kinetický parametr m JMA modelu z rovnice:

$$m = \frac{1}{1 + \ln(1 - \alpha_{\max,y})} \quad (11)$$

Další způsob, jak určit parametr m je prostřednictvím dvojitého logaritmu podle následující rovnice:

$$\frac{d \ln[-\ln(1-\alpha)]}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = -\frac{m \cdot E}{R} \quad (12)$$

[37]

Autokatalytický Šesták-Berggren model

Autokatalytický Šesták-Berggren model (AC(M,N)) se využívá, pokud nelze použít již zmíněný JMA model. Tento model je dvouparametrový a byl odvozen empiricky, což znamená, že samotný model ani jeho parametry nemají žádný fyzikální smysl. Autokatalytický model lze popsat touto rovnicí:

$$f(\alpha) = \alpha^M (1 - \alpha)^N \quad (13)$$

kde M a N jsou parametry autokatalytického modelu, které popisují tvar dané DSC křivky. Podmínkou pro použití tohoto modelu je pouze, že $\alpha_{\max,y} < \alpha_{\max,z}$, což je ale prakticky splněno pro všechna experimentální data. Jeho dva parametry M a N lze vypočítat dle dvou následujících rovnic. V první rovnici se určí poměr těchto dvou parametrů M/N pomocí známé hodnoty $\alpha_{\max,y}$.

$$\frac{M}{N} = \frac{\alpha_{\max,y}}{(1 - \alpha_{\max,y})} \quad (14)$$

Pomocí další rovnice (15) se vynese závislost v intervalu $0,2 < \alpha < 0,8$ a ze směrnice se určí parametr N .

$$\ln \left[\Phi \cdot \exp \left(\frac{E}{RT} \right) \right] = \ln(\Delta H \cdot A) + N \cdot \ln[\alpha^{M/N} (1 - \alpha)] \quad (15)$$

[37,46]

1.6.3 Jednokřivková multivariační kinetická analýza

Alternativou k výpočtům popsaným v kapitole 1.6.2 je tzv. jednokřivková multivariační kinetická analýza (sc-MKA)[56]. Tato metoda funguje na principu nelineární optimalizace popisu experimentální křivky kombinací rovnic (6) + např. (10) či (13). Ve své základní (čili vícekřivkové) variantě lze tuto metodu vyjádřit rovnicí (16):

$$RSS = \sum_{j=1}^n \sum_{k=First_j}^{Last_j} w_{j,k} (Y_{exp_{j,k}} - Y_{cal_{j,k}})^2 \quad (16)$$

kde RSS je suma čtverců odchylek (minimalizovaná pomocí nelineární optimalizace), Y_{exp} a Y_{cal} jsou experimentálně naměřené a vypočtené hodnoty DSC signálu (v případě této diplomové práce Φ již po odečtení baseline), $w_{j,k}$ 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 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 .

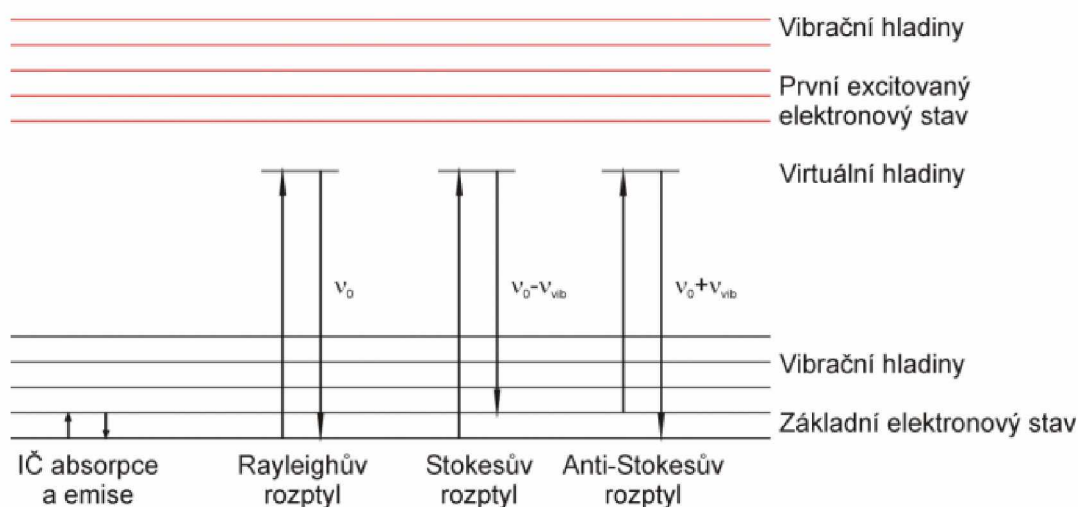
1.7 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní analytická metoda založená na tzv. Ramanově jevu neboli Ramanově rozptylu. Využívá se jak pro kvantitativní, tak pro kvalitativní analýzu a poskytuje informace o struktuře atomů či molekul. Ramanův jev byl poprvé pozorován v roce 1928 indickým fyzikem Chandrasakharem Venkatou Ramanem, který pozoroval rozptyl slunečního záření na molekulách kapalin. V roce 1930 mu byla za tento objev udělena Nobelova cena. Tato metoda je komplementární s IČ spektroskopií.[48,49]

Principem Ramanovy spektroskopie je ozáření měřeného vzorku monochromatickým zářením z laserového zdroje v ultrafialové, viditelné až blízké infračervené oblasti. Monochromatizovaný světelný paprsek prochází analyzovaným prostředím, kde se z části absorbuje, z části rozptýlí a zbytek paprsku projde skrz beze změny. Pro Ramanovu

spektroskopii je nejdůležitější již zmíněný rozptyl světelného paprsku a současně dochází ke změně rotačních a vibračních stavů molekul vzorku.[48,49]

Při rozptylu světla, který vzniká ozářením vzorku laserem, mohou nastat dva typy srážek fotonu záření s molekulou analytu – elastické (Rayleighův rozptyl) a neelastické (Ramanův rozptyl). Elastické srážky jsou srážky dokonale pružné, foton energii molekule nepředá, po srážce foton změni pouze směr a světlo se rozptýlí, aniž by se změnila vlnová délka. Naopak je tomu při neelastických srážkách, kdy dochází k výměně energie při srážce fotonu s molekulou vzorku. Neelastické srážky, tedy nepružné, jsou velice málo pravděpodobné – přibližně jeden foton z milionu fotonů vymění energii s molekulou vzorku (0,0001 %), ale jsou důležité pro vznik Ramanovských spekter. K výměně energie mezi fotonem a molekulou může dojít dvěma způsoby. První možností je, kdy molekula vzorku absorbuje foton ze vstupního záření a následně emituje foton s nižší energií. Tento proces vede ke vzniku rozptýleného záření s nižší frekvencí než původní záření ($\nu_0 - \nu_{\text{vib}}$), což odpovídá delší vlnové délce. Tento jev se nazývá Stokesův rozptyl a je zobrazen na Obrázku 11. Druhou možností je, kdy molekula vzorku ztrácí energii a emituje foton s vyšší energií, než má foton vstupního záření. V důsledku toho vzniká rozptýlené záření s vyšší frekvencí, než má původní záření ($\nu_0 + \nu_{\text{vib}}$), což odpovídá kratší vlnové délce, protože foton přijme vibrační energii od molekuly. Tento jev je zobrazen na Obrázku 11 jako Anti-Stokesův rozptyl. Anti-Stokesův rozptyl je méně pravděpodobný než Stokesův rozptyl a má menší intenzitu z toho důvodu, že velmi málo molekul se při normální teplotě nachází na vyšší vibrační hladině. Na Obrázku 11 je znázorněn Jablonského diagram, který znázorňuje elektronové stavy molekul a přechody mezi nimi.[48,49]



Obrázek 11: Jablonského diagram[50]

Výstupem Ramanovy spektroskopie je tzv. Ramanovo spektrum (závislost intenzity Ramanova rozptylu na vlnočtu), ve kterém se projeví pouze ty pásy, u kterých dojde ke změně polarizovatelnosti molekul α_p , což je míra schopnosti molekul reagovat na vnější elektrické pole prostřednictvím posunu jejich elektronů. Změnu polarizovatelnosti lze označit za výběrové pravidlo pro Ramanovu spektroskopii, které je odlišné od infračervené spektroskopie, kde hlavním výběrovým pravidlem je změna dipólového momentu. Polarizovatelnost lze matematicky vyjádřit následujícím vztahem:

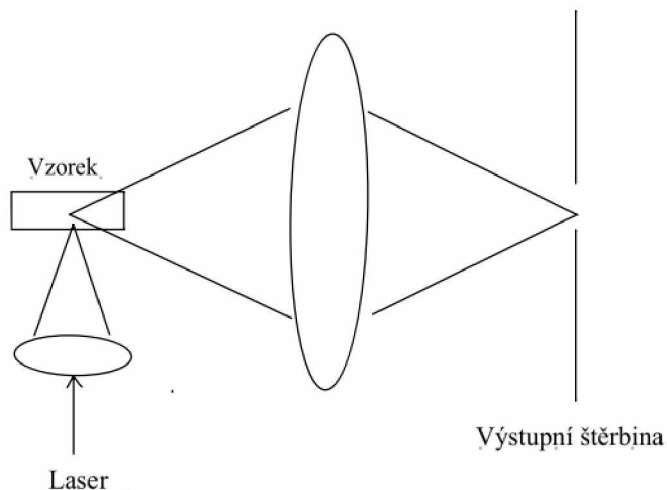
$$\alpha_p = \frac{E}{\mu_D} \quad (17)$$

kde E je intenzita vnějšího pole a μ_D je dipólový moment, který popisuje nesymetrické rozložení elektrického náboje.[50,51]

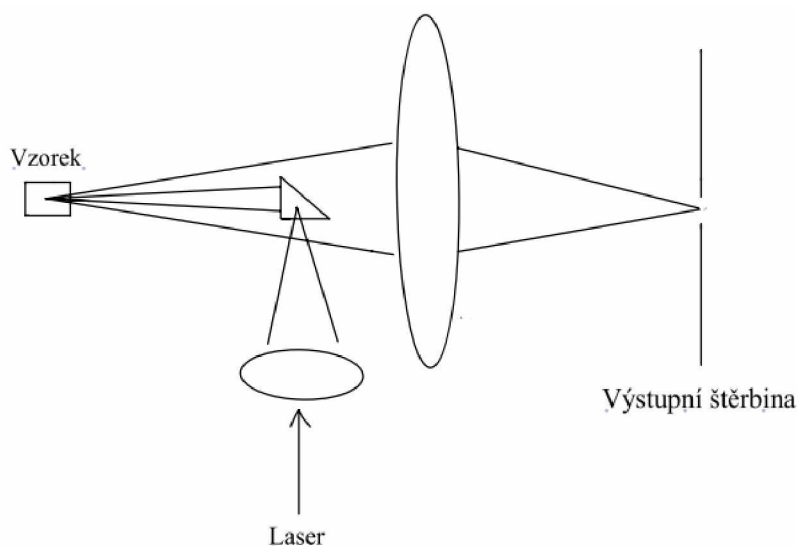
Tuto schopnost mají hlavně nepolární části molekul, zatímco polární části jsou méně polarizovatelné, proto v Ramanově spektru pozorujeme zejména vibrace nepolárních vazeb, jedná se o tyto vazby: C-C, C-S, S-S, C≡C, C=C a N=N. Intenzita čar je přímo úměrná koncentraci dané složky ve vzorku.[51]

Vzorky mohou být jak v pevné, kapalné, tak v plynné formě (roztoky, suspenze, gely, tenké vrstvy, vlákna, prášky) a k analýze postačuje velmi malé množství zkoumané látky. Vzorek se vkládá do kyvety, která je vyrobená buď ze skla nebo křemene. V dnešní době se nejvíce využívá Ramanova spektroskopie spojená s mikroskopem, což je velmi výhodné pro analýzu vzorků o velikosti 5 – 10 μm , takové přístroje se nazývají mikrospektrometry. Ramanova spektroskopie se využívá v mnoha vědních oborech, jako je environmentální chemie, archeologie a forenzní vědy.[51]

Rozptýlené záření se nejčastěji měří pod úhlem 90° ke směru záření, ale ve speciálních případech lze rozptýlené záření měřit i pod úhlem 0° nebo 180° . Uspořádání pod úhlem 90° se využívá především pro měření kapalných vzorků (Obrázek 12) a uspořádání pod úhlem 180° („back-scattering“) je využíváno hlavně pro pevné vzorky (Obrázek 13). Většina přístrojů v dnešní době nabízí oba základní typy uspořádání.[52]



Obrázek 12: Uspořádání pro 90°



Obrázek 13: Uspořádání pro 180°

Ramanovy spektrometry mohou být dvojího typu – disperzní spektrometry a spektrometry s Fourierovou transformací (FT). Každý spektrometr obsahuje zdroj excitačního záření (laser), vzorkovací prostor, sběrnou optiku, pro disperzní spektrometry dále disperzní prvek, pro spektrometry s FT je to interferometr a každý spektrometr musí mít detektor.[53]

1.7.1 Disperzní Ramanův spektrometr

Pro separaci rozptýleného záření na jednotlivé vlnové délky využíváme disperzního prvku, v tomto případě mřížku nebo hranol. Paprsek je dále z mřížky veden na CCD detektor (charge-coupled device). CCD detektory v průběhu 90. let nahradily používané jednonálové

fotonásobiče. Jako zdroj monochromatického záření se využívají různé typy laserů. Ve viditelné oblasti (VIS) se využívají He-Ne lasery ($\lambda = 632,8$ nm), argonový iontový laser ($\lambda = 488$ nm nebo $514,5$ nm) nebo kryptonový laser ($\lambda = 530,9$ nm nebo $647,1$ nm). Výhoda excitace ve viditelné oblasti oproti blízké infračervené oblasti je vyšší intenzita rozptylu (intenzita rozptylu klesá se čtvrtou mocninou vlnové délky excitující záření), nevýhodou je ale naopak velice intenzivní fluorescence a nežádoucí fotochemická reakce. Pokud bude mít laser vyšší energii, tak s větší pravděpodobností dojde ke vzniku fluorescence. Fluorescence vykazuje mnohem silnější emisi, obvykle o několik řádů vyšší, než Ramanův rozptyl, což znamená, že i malý podíl fluorescence může překrýt požadované získané spektrum daného vzorku. Tento jev vykazují především organické molekuly a k fluorescenci dochází hlavně v modré a zelené oblasti viditelného záření.[53]

1.7.2 Spektrometr s Fourierovou transformací

Spektrometry s Fourierovou transformací byly přivedeny na trh kolem 80. let 20. století. U disperzní Ramanovy spektrometrie se využívá disperzní mřížka, u tohoto typu spektrometrie se místo mřížky využívá Michelsonův interferometr. Jako zdroj monochromatického záření se využívá laser v blízké infračervené oblasti (NIR) Nd-YAG laser (YAG = yttrium-aluminium granát $Y_3Al_5O_{12}$) o vlnové délce 1064 nm. U těchto spektrometrů se jako detektory používají indium galium arsenidové (InGaAs) detektory nebo kapalným dusíkem chlazené Ge detektory, které jsou provozovány při kryogenních teplotách, aby se snížil šum.[53,54]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Příprava vzorku

Pro přípravu amorfního indomethacinu (IMC) byla použita melt-quench technika – způsob roztavení krystalického IMC je naznačen na Obrázku 14. Indomethacin v práškové formě byl zakoupen od společnosti Sigma-Aldrich (čistota > 98,5 %, molekulová hmotnost 357,78 g/mol) (Obr. 15). Pro přípravu amorfní formy bylo naváženo cca 5 g účinné látky a vzorek byl vložen do ampule. Melt-quench technika spočívá v ohřátí materiálu (v tomto případě za pomoci olejové lázně, aby nedošlo k degradaci účinné látky) nad teplotu tání tak, aby došlo k úplnému roztavení dané látky (teplota tání indomethacinu je 155 °C), a jeho následném rychlém zchlazení pod teplotu skelné transformace (v tomto případě cca na laboratorní teplotu). Tímto procesem vznikl amorfní indomethacin žluté barvy. Jelikož vzorek v ampuli zatuhl, ampule musela být rozbита, aby bylo možné dále se vzorkem pracovat. Indomethacin byl následně nadrcen na jemnější prášek v achátové misce a proset síty s definovanou velikostí ok (Obr. 16). Bylo použito pět sít s definovanou velikostí ok, ale dále byla ke studiu indomethacinu používána pouze jedna velikostní frakce, a to 50 – 125 μm .



Obrázek 14: Experimentální uspořádání pro melt-quench techniku



Obrázek 15: Indomethacin (Sigma-Aldrich čistota > 98,5 %, molekulová hmotnost 357,78 g/mol)



Obrázek 16: Vlevo: Síta s definovanou velikostí ok; vpravo: Achátová miska

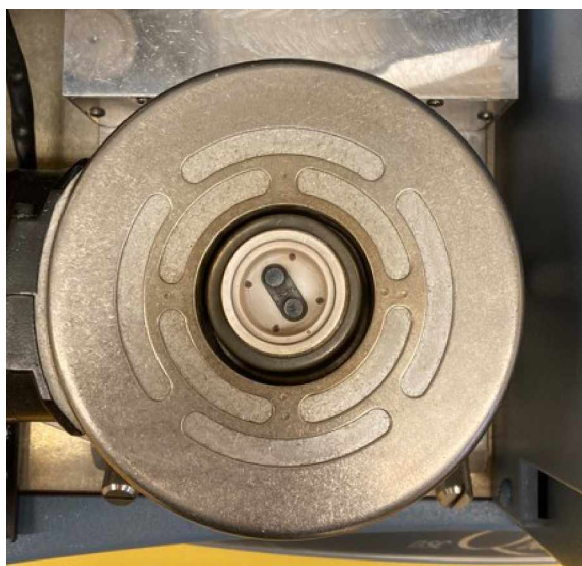
2.2 Měření pomocí diferenční skenovací kalorimetrie

Krystalizační chování připravených vzorků indomethacinu bylo studováno pomocí diferenčního skenovacího kalorimetru DSC Q2000 (TA Instruments) v uspořádání s tepelným tokem (Obr. 17). Přístroj obsahuje autosampler, chladicí zařízení a T-zero technologii. T-zero technologie je patentovaná společností TA Instruments a zajišťuje lepší plochost a linearitu základní linie či nulové linie. Teplotní rozsah tohoto typu DSC je od -90 °C do 550 °C a je možné nastavit rozsah lineárních rychlostí ohřevu od $0,1\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ až $100\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ke zpracování získaných DSC křivek se využívá program TA Instruments Universal Analysis 2000.



Obrázek 17: Kompletní uspořádání diferenčního skenovacího kalorimetru: Vlevo: Chladicí zařízení; uprostřed: DSC; vpravo: Tlakové lahve

Chladicí zařízení, které je zobrazené na Obrázku 17, zajišťuje možnost dosažení nízkých teplot, při kterých je možné měřit. Tyto teploty mohou dosahovat až $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Na Obrázku 18 je zobrazená samotná měřící cela – uprostřed stříbrného bloku je umístěna platforma s termočlánky, které jsou uloženy pod dvěma měrnými pozicemi. V cele je možné použít proplach plynem; standardními volbami jsou vzduch, dusík nebo argon. Stálé teplotní pole v cele je udržováno nepřetržitým prouděním plynu, přičemž obvyklé hodnoty se pohybují kolem $30\text{ až }50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.



Obrázek 18: Měřící cela přístroje DSC Q2000 (TA Instruments)

Na Obrázku 19 je zobrazen autosampler (automatický podavač vzorků), který zajišťuje kontinuální měření většího množství vzorků. Autosampler obsahuje až 50 pozic.

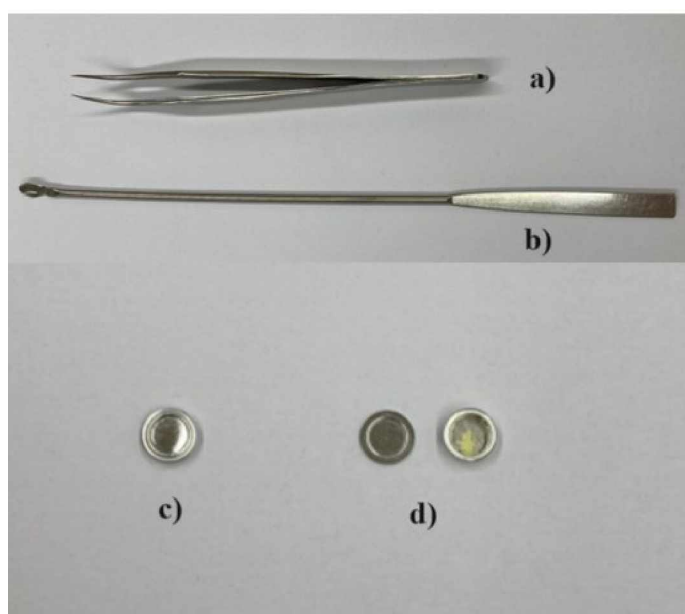


Obrázek 19: Autosampler přístroje DSC Q2000 (TA Instruments)

Diferenční skenovací kalorimetr je potřeba před vlastním měřením zkalibrovat. Kalibrace se provádí z důvodu zajištění přesnosti měření a ověření funkčnosti zařízení. Kalibrace proběhla za identických podmínek, jaké byly použity během reálného měření. Nejdříve se provádí kalibrace kapacity a tepelného odporu DSC cely. To se provede pomocí cyklického teplotního programu, kdy dochází ke střídavému chlazení a ohřevu od -90 °C do 550 °C a rychlosti chlazení a ohřevu byly stejné, $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. Tento cyklický teplotní program byl spuštěn desetkrát za sebou. Dále byla DSC cela temperována na teplotu -90 °C po dobu 10 minut a následně došlo k ohřevu na teplotu 550 °C . Tento poslední ohřev byl využit jako zeroline kalibrace. V následujícím kroku byla provedena kalibrace teploty T a tepelného toku Φ přístroje. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, ke kalibraci teploty se využívá např. tání čistých kovů (indium, galium, zinek, olovo nebo rtuť). Samotná kalibrace je dána určitým softwarem, který se využívá k ovládání DSC přístroje. V laboratoři je k dispozici software „Advantage“ od firmy TA Instruments, který dovoluje kalibraci teploty až na osm kalibračních standardů, obvykle ale postačují již tři standardy. Pro naši kalibraci DSC přístroje jsme zvolili indium, zinek a H_2O . Každý standard byl nejdříve ochlazen 50 °C pod jeho teplotu tání, poté byl proveden ohřev na teplotu 30 °C nad teplotou tání daného standardu rychlostí ohřevu

$10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Na DSC křivce byl zaznamenán endotermní pík, jehož teplota onsetu byla zadána do softwaru Advantage. Během kalibrace teploty byla zároveň provedena i kalibrace tepelného toku, kde bylo využito jako standard indium. Endotermní pík byl integrován a ze získané plochy byl vypočítán korekční faktor porovnáním s tabelovanou hodnotou entalpie tání india.

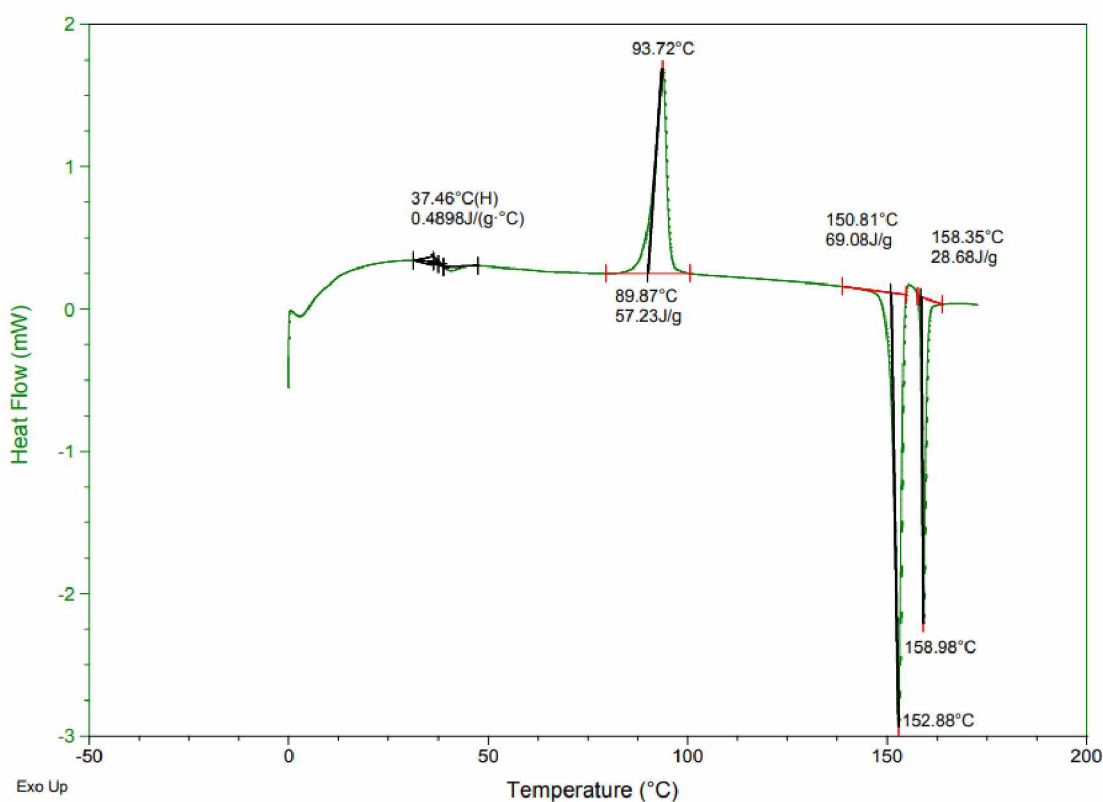
K proplachování cel byl použit dusík s čistotou 4.0 při rychlosti průtoku $50\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako referenční materiál byl použit prázdný hliníkový kelímek. Jednotlivé kelímky byly uzavřeny hermeticky neboli studeným svárem, kdy se víčko s kelímkem slisovaly pomocí speciální lisu. Na Obrázku 20 lze vidět již slisovaný kelímek, kelímek naplněný indomethacinem a použité chemické nádoby.



Obrázek 20: a) Pinzeta; b) Laboratorní lžička; c) Hermeticky uzavřený kelímek; d) Víčko a kelímek naplněný připraveným vzorkem amorfního IMC

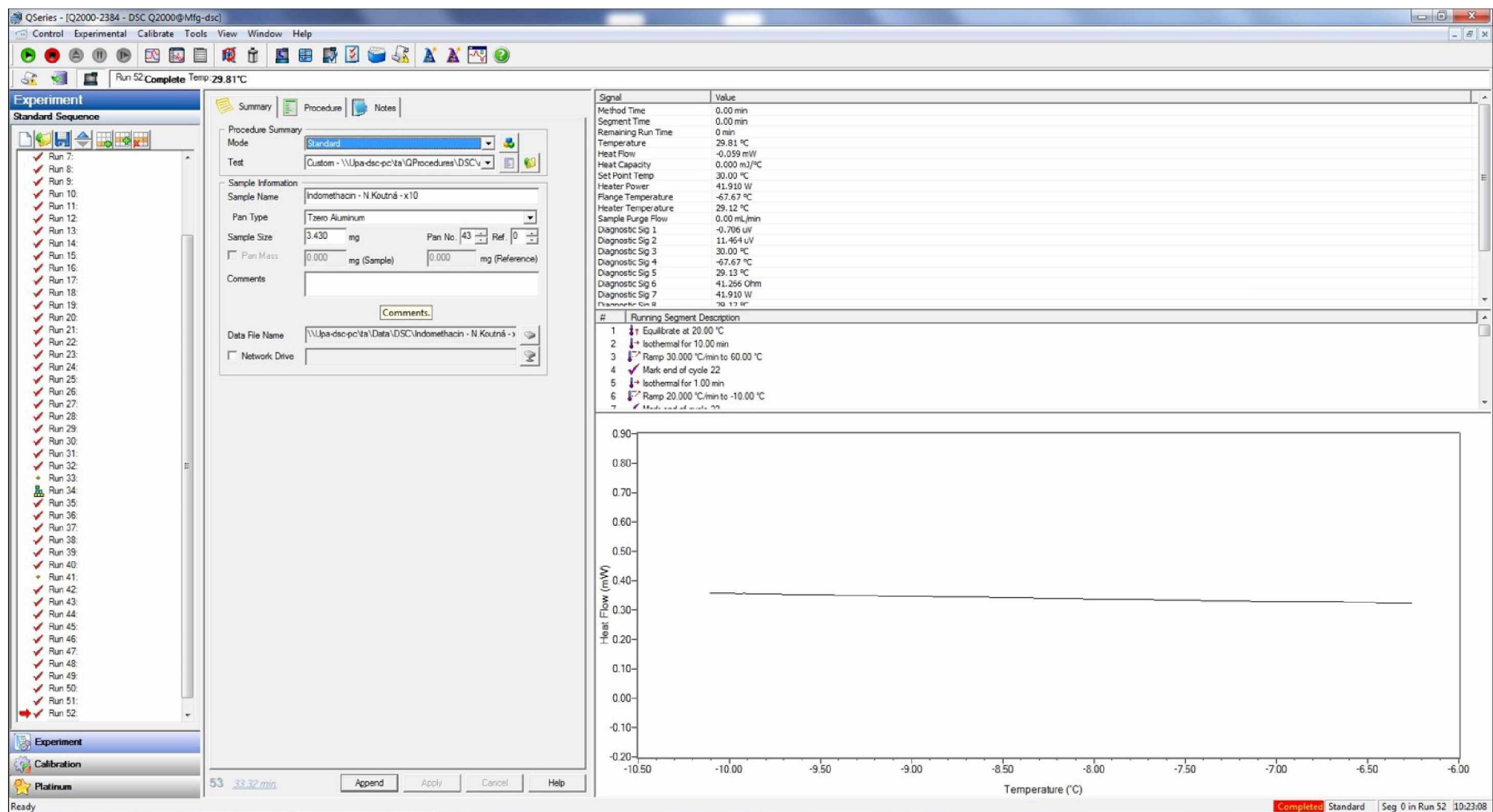
Hmotnost jednotlivých vzorků se pohybovala v rozmezí od 0,8 do 3,2 mg. Měření bylo prováděno za neizotermních podmínek od $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bylo použito 12 různých rychlostí ohřevu – 0,13; 0,32; 0,65; 1,3; 1,95; 2,6; 3,25; 4,55; 6,5; 9,75; 13 a $19,51\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Tyto rychlosti ohřevu korelují se skutečnými rychlostmi ohřevu produkovanými teplotní celou Ramanova mikroskopu při programovaných rychlostech 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 15; 20 a $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Faktor přepočtu byl $\times 0,65$. Pro jednoduchost bude v dalších textech použito značení programovaných rychlostí (tj. $0,2 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), ve výpočtech byly ale všude použity skutečné rychlosti ohřevu, tj. $0,13 - 19,51\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Na Obrázku 21 je na ukázkou zobrazena DSC křivka pro rychlost ohřevu $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. Jako první efekt, který můžeme pozorovat, je oblast skelného přechodu, kde byla vyhodnocena změna tepelné kapacity a teplota skelného přechodu (metodou half-height midpoint). Dále dochází ke krystalizaci, kde byla určena teplota maxima exotermního píku, teplota extrapolovaného onsetu a entalpie krystalizace. Další efekt, který můžeme vidět, je tání metastabilního polymorfu a následuje tání stabilního polymorfu. U těchto dvou efektů byla opět určena teplota maxima píku, teplota extrapolovaného onsetu a entalpie tání. Tímto způsobem byly vyhodnoceny všechny křivky pro všechny rychlosti ohřevu.

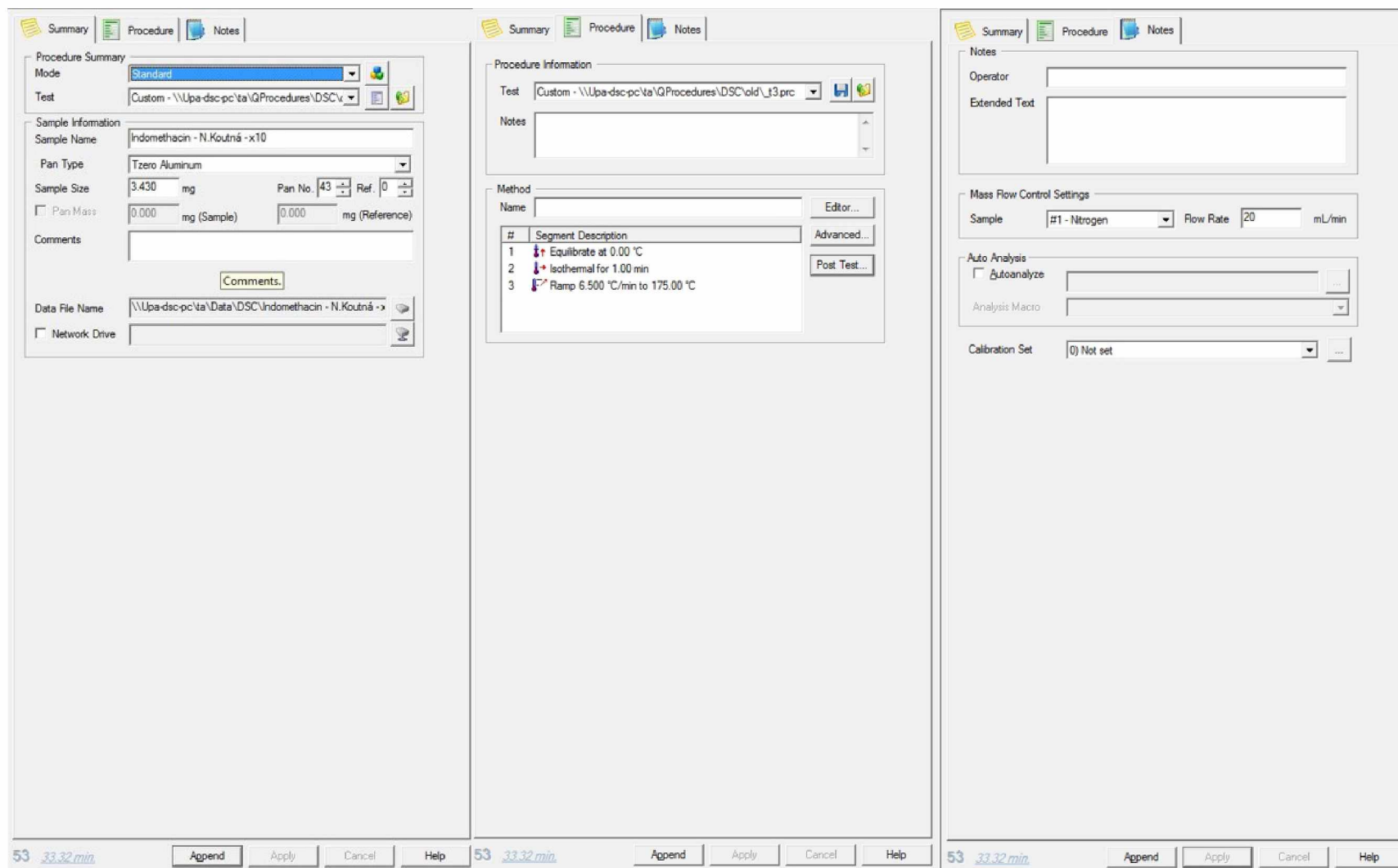


Obrázek 21: DSC křivka připraveného IMC pro rychlost ohřevu $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$

Před spuštěním samotného měření je nutné nastavit parametry v programu, který je znázorněn na Obrázku 22. Nalevo je zobrazena fronta vzorků, které se budou měřit. Červená šipka, která nám ukazuje na vzorek 52, označuje vzorek, jenž je právě analyzován. Uprostřed jsou tři důležité záložky – Summary, Procedure a Notes, ve kterých se nastavují jednotlivé parametry měření. Tyto záložky jsou zobrazeny na Obrázku 23.



Obrázek 22: Program pro ovládání



Obrázek 23: Záložky programu DSC; nalevo: Záložka Summary; uprostřed: Záložka Procedure; vpravo: Záložka Notes

V záložce Summary zadáváme hmotnost měřeného vzorku, adresář, kam se změřená data mají ukládat, název souboru, typ kelímku, který používáme k měření, a pozici měřeného vzorku v autosampleru. V záložce Procedure se nastavují specifické podmínky daného experimentu, jako je rychlost ohřevu a chlazení, teplotní rozsah nebo jak dlouho mají trvat izotermní cykly. V poslední záložce Notes se nastavuje průtok plynu a kalibrace, ale tyto hodnoty se nastaví pouze na začátku experimentu a po celou dobu se nemění. Poté, co máme všechny tyto parametry zadané, můžeme vzorek buď přidat do fronty, nebo rovnou zapnout měření zelenou šipkou vlevo nahoře (Obr. 22).

2.3 Měření pomocí Ramanovy spektroskopie

K měření Ramanovských spekter byl k dispozici disperzní Ramanův mikroskop (Obr. 24). Jeho spektrální rozlišení je 5 cm^{-1} a standardní spektrální rozsah má tento přístroj $3250 - 50 \text{ cm}^{-1}$. Přístroj má k dispozici laser o vlnové délce 785 nm , CCD detektor a mikroskop od firmy Olympus, který obsahuje pět objektivů se zvětšením – 4x, 10x, 20x, 50x a 100x. K našemu měření bylo využíváno zvětšení 10x. Pro nastavování parametrů měření je k dispozici software Omnic.



Obrázek 24: Ramanova spektroskopie; vlevo: Ramanův mikroskop; vpravo: Počítač

Než se mohlo přistoupit k samotnému měření, musela se jako u diferenční skenovací kalorimetrie provést nejdříve kalibrace přístroje. Nejdříve je potřeba provést kalibraci souososti laseru a optické dráhy a následně zkalibrovat vlnovou délku snímanou CCD detektorem.

Opět bylo prováděno měření pro 12 různých rychlostí ohřevu (0,13; 0,32; 0,65; 1,3; 1,95; 2,6; 3,25; 4,55; 6,5; 9,75; 13 a 19,51 °C·min⁻¹) za pomoci teplotního čidla (Obr. 25). Tyto rychlosti ohřevu korelují se skutečnými rychlostmi ohřevu produkovanými teplotní celou Ramanova mikroskopu při programovaných rychlostech 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 15; 20 a 30 °C·min⁻¹. Faktor přepočtu byl x0,65. Jak již bylo zmíněno výše, pro jednoduchost bude v dalších textech použito značení programovaných rychlostí (tj. 0,2 – 30 °C·min⁻¹), ve výpočtech byly ale všude použity skutečné rychlosti ohřevu, tj. 0,13 – 19,51 °C·min⁻¹.

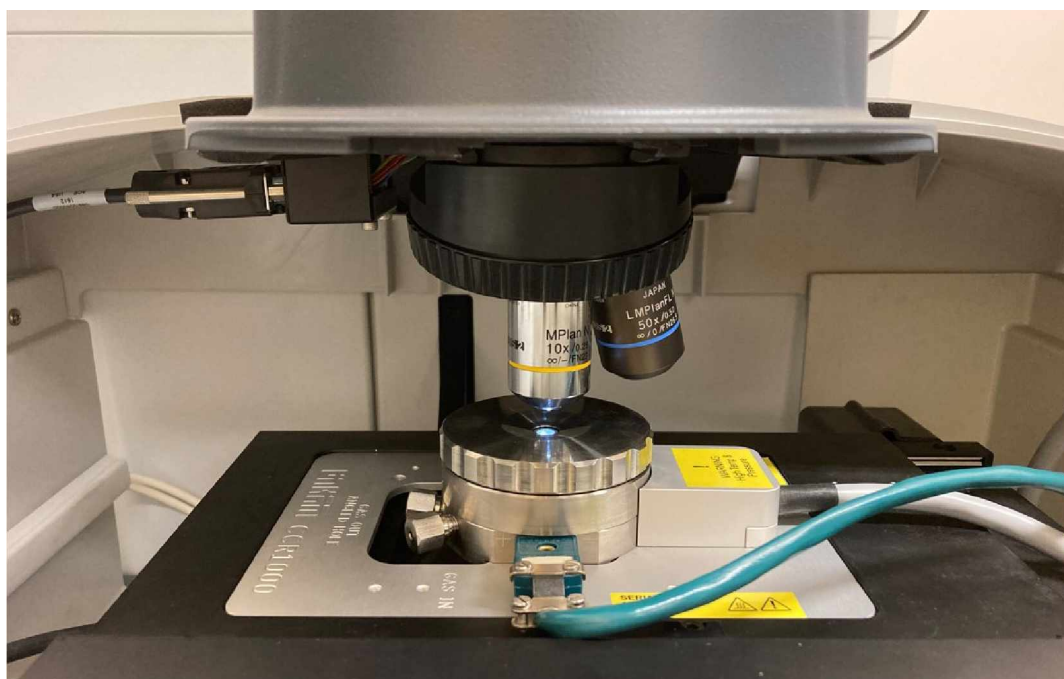


Obrázek 25: Ramanova spektroskopie; vlevo: Teplotní čidlo; vpravo: Ramanův mikroskop DXR2 (Nicolet)

Pevné vzorky se ve většině případů nemusí nijak upravovat. Vzorek indomethacinu byl navážen na analytických vahách (cca 1 mg) do hliníkového kelímku jako u metody DSC. Tentokrát ale kelímek nebyl hermeticky uzavřen, ale byl vložen opatrně pinzetou do teplotní cely CCR1000 (Obr. 26). Kelímek byl přikryt křemenným sklíčkem, přikryt víčkem teplotní cely a vložen do mikroskopického stolku. Byl vybrán objektiv mikroskopu se zvětšením 10x (Obr. 27). Mikroskop byl dále fokusován na povrch jednoho zrna indomethacinu.

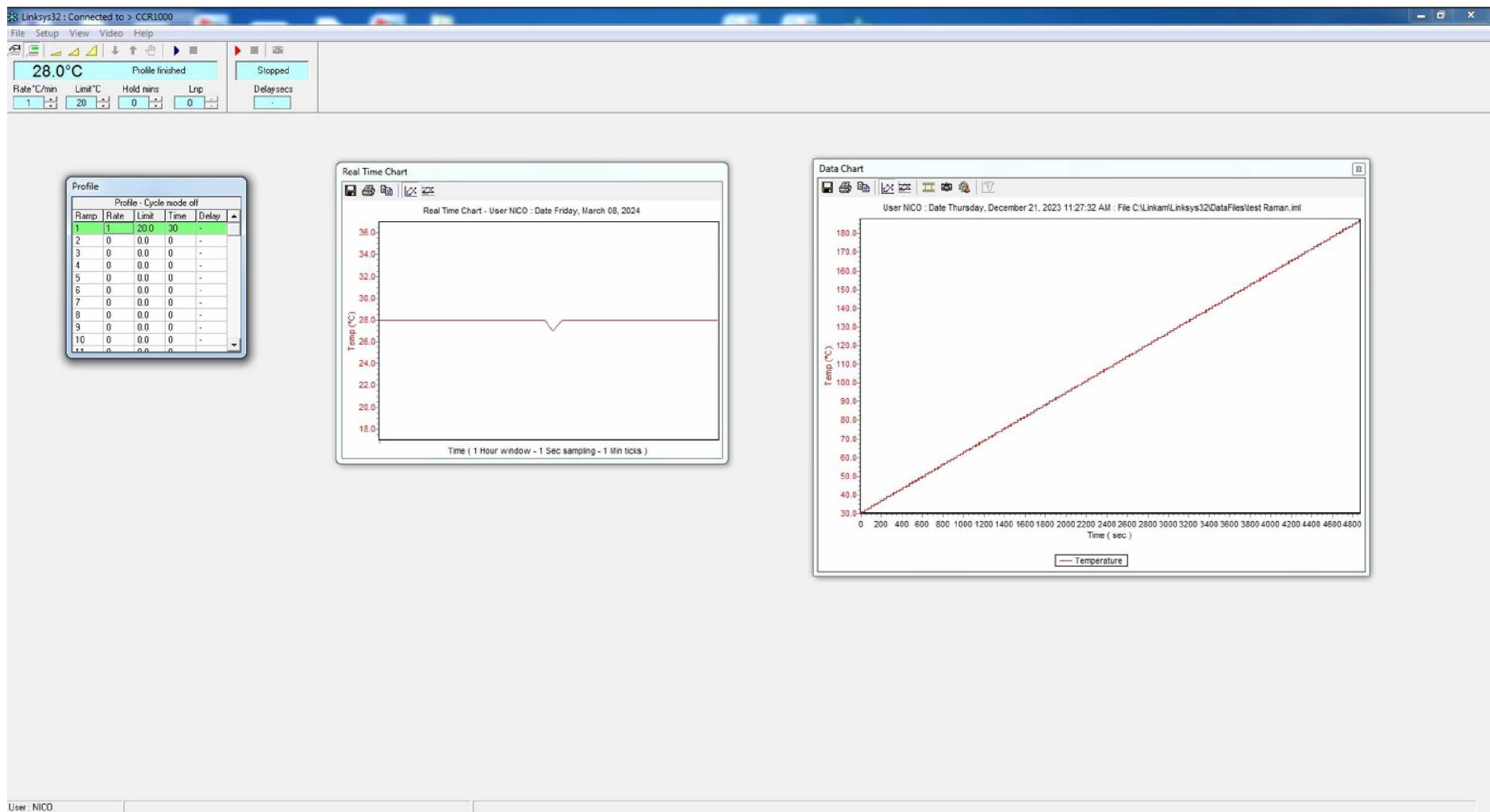


Obrázek 26: Teplotní cely CCR1000 Ramanova mikroskopu DXR2 (Nicolet)



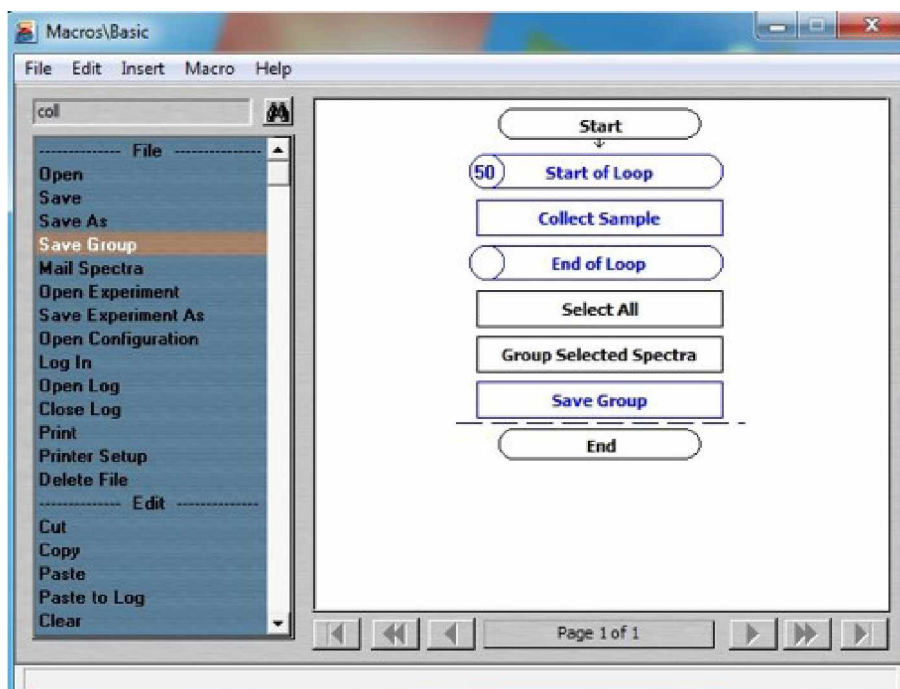
Obrázek 27: Detail komory se vzorkem a objektivu

V softwaru teplotní cely CCR1000 (Obr. 28) byl nastaven teplotní program. Zadávají se údaje pro rychlost ohřevu a do jaké teploty má ohřev probíhat (v našem případě 120 °C). Dále zde můžeme vidět, jak dlouho měření bude probíhat a na jaké teplotě se aktuálně nacházíme.



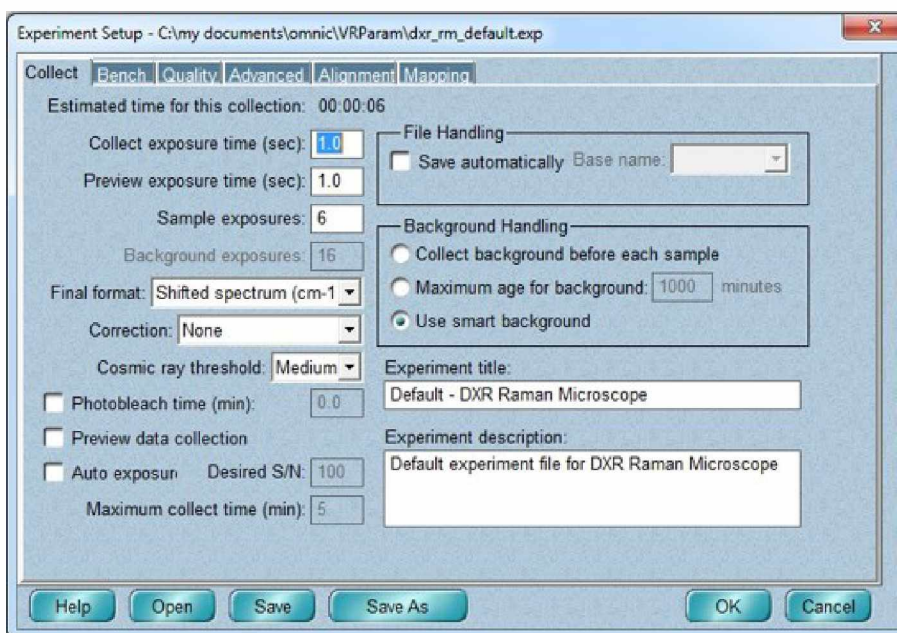
Obrázek 28: Software teplotní cely CCR1000

V dalším softwaru OMNIC Macro (Obr. 29) se nastavují úkony, které se opakují po celou dobu měření jednoho vzorku.

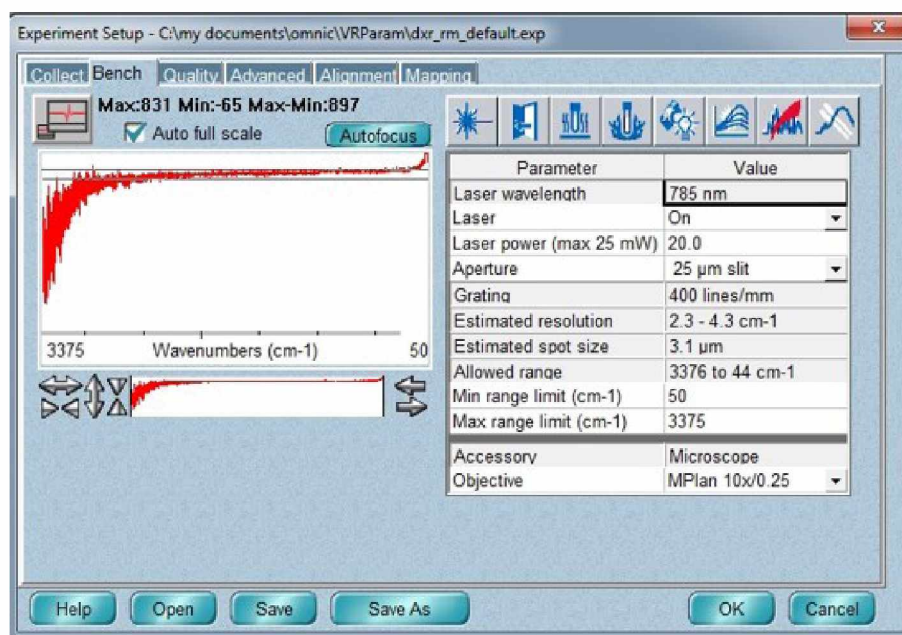


Obrázek 29: Software OMNIC Macro

V softwaru OMNIC bylo otevřeno nastavení Experimental Setup. V záložce Collect (Obr. 30) byly nastaveny podmínky měření. Jako první se nastavila doba vystavení vzorku laseru (angl. Collect exposure time), počet opakování (angl. Sample exposures) a jak má finální záznam vypadat. Ve druhé záložce Bench (Obr. 31) se nastavila síla laseru (v našem případě 20 mW) a zvětšení objektivu (10x). Poté co bylo vše nastavené, mohl být spuštěn experiment.

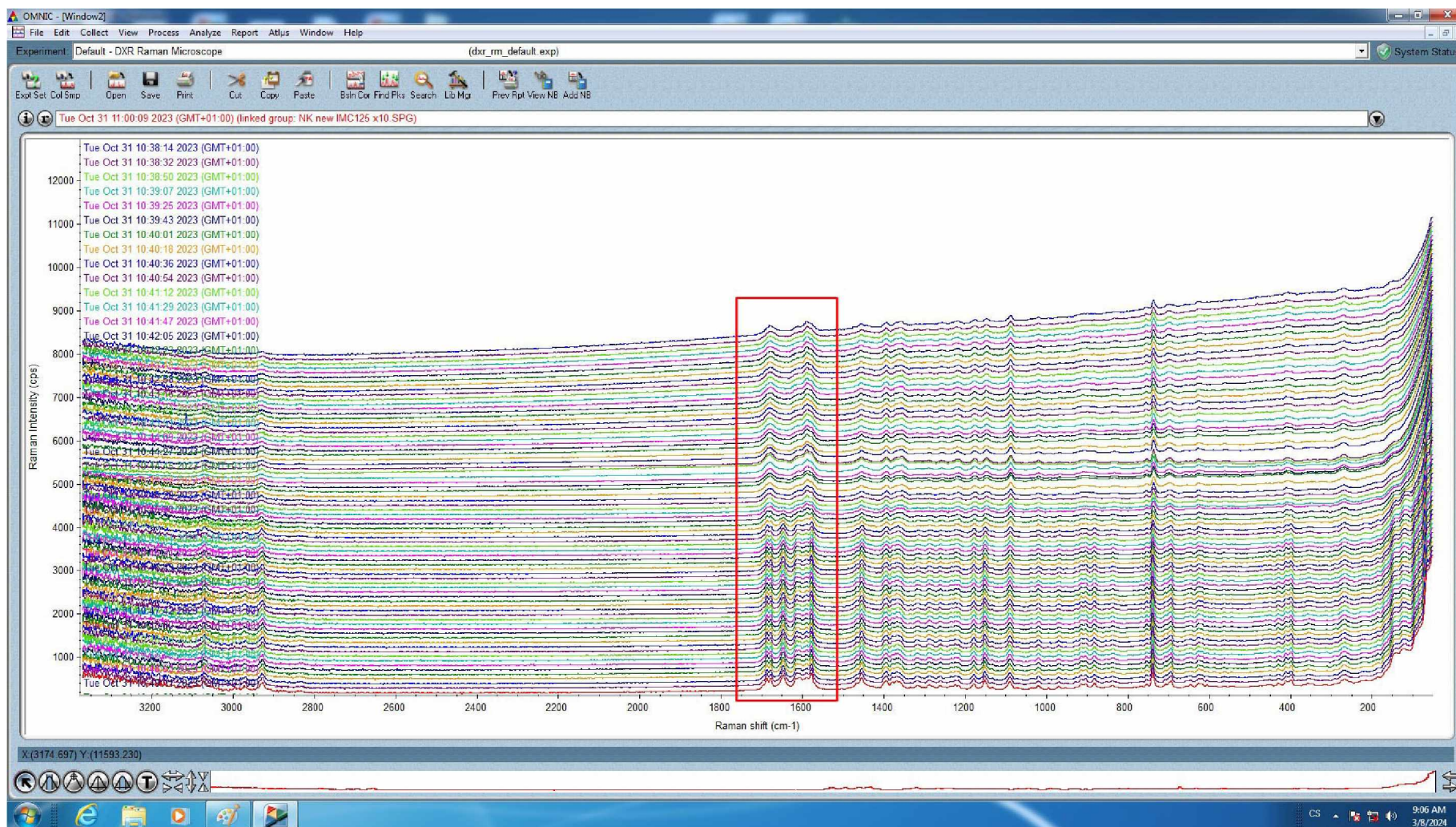


Obrázek 30: Software OMNIC záložka Collect



Obrázek 31: Software OMNIC záložka Bench

Na Obrázku 32 je na ukázkou zobrazeno Ramanovo spektrum pro rychlost ohřevu $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

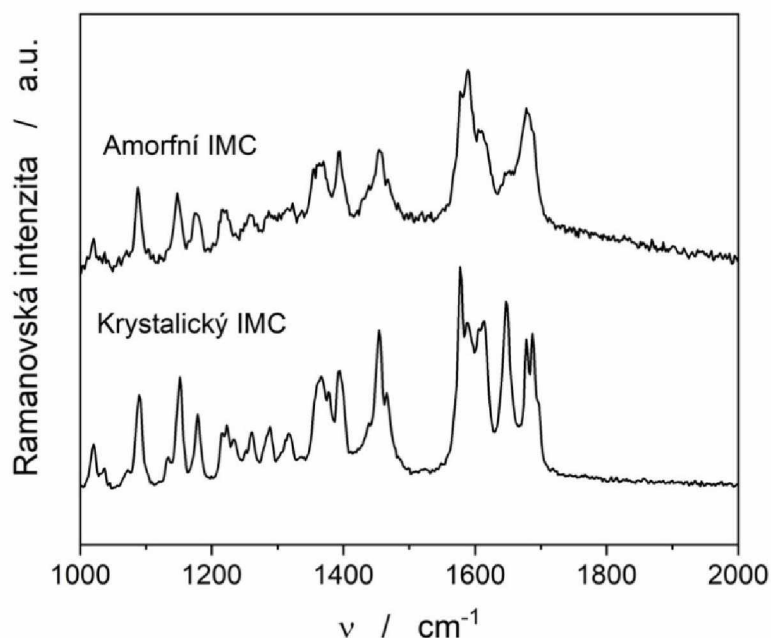


Obrázek 32: Série Ramanových spekter pro rychlost ohřevu $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

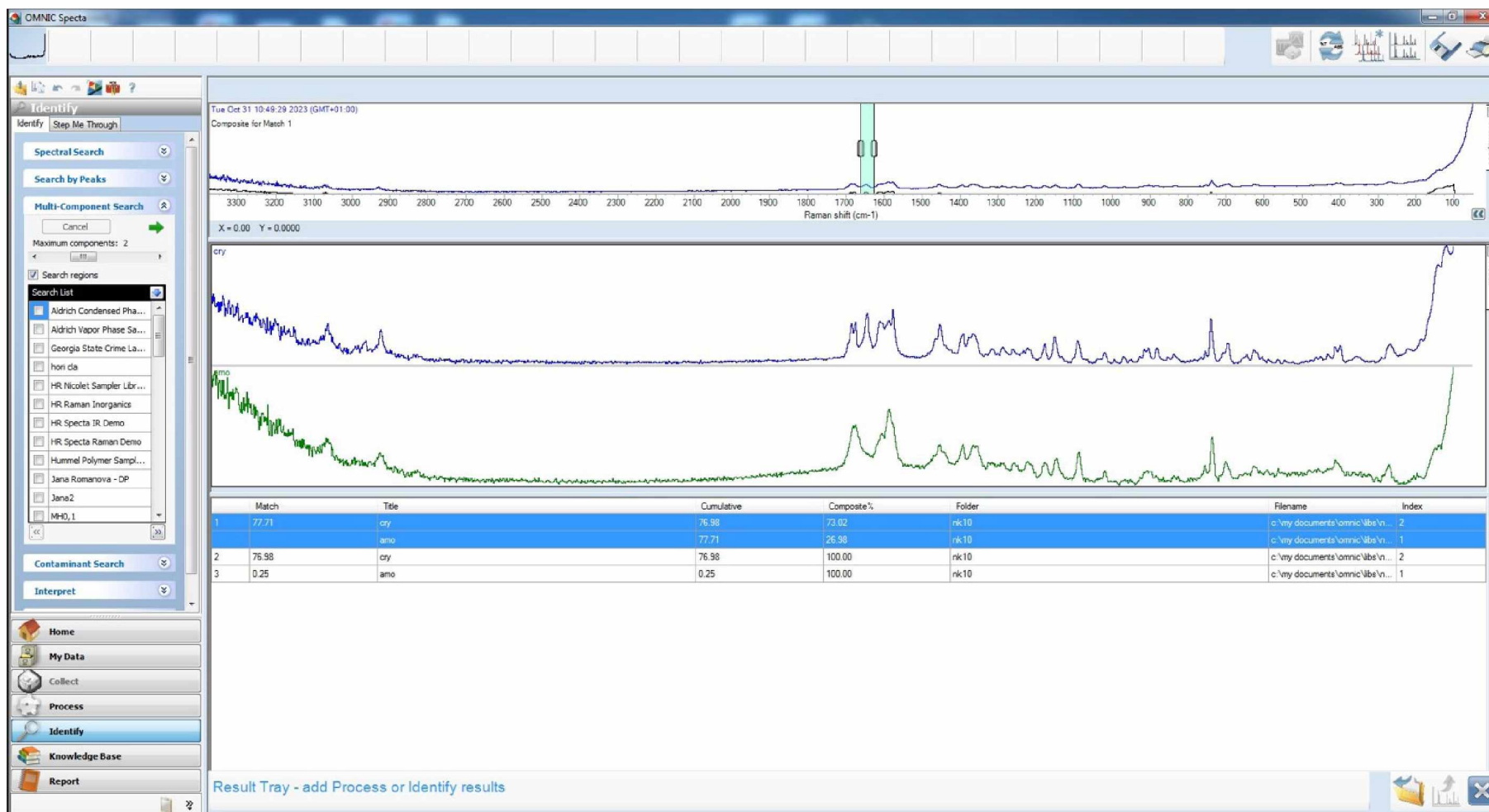
Ve spektrech jsme se zaměřovali na oblast mezi $1750 - 1550 \text{ cm}^{-1}$. V této oblasti by se měly vyskytovat píky, které dokazují přítomnost krystalických polymorfů indomethacinu γ a α . Tato oblast je naznačena na Obrázku 32.

Některé významné pásy v Ramanových spektrech můžeme přiřadit jednotlivým vibracím. Vibrace při 1685 cm^{-1} se přiřazuje amorfnímu indomethacinu. Dále při 1700 cm^{-1} vibraci přiřazujeme γ formě indomethacinu (benzoyl C=O vibrace) a při 1650 cm^{-1} vibraci přiřazujeme druhé nejznámější formě indomethacinu, a to α formě (benzoyl C=O vibrace). Vibrace při 1680 cm^{-1} přiřazujeme vibracím benzoylu C=O a 1692 cm^{-1} vibracím kyseliny O-C=O.

Dalším krokem bylo nahrát spektra do softwaru OMNIC Spectra, v němž byla provedena multikomponentní analýza. Dané spektrum bylo porovnáváno s knihovnou spekter, kam byla předem nahrána spektra zcela amorfního indomethacinu a zcela krystalického indomethacinu (Obr. 33). Díky této metodě (Obr. 34) bylo vypočítáno procentuální zastoupení amorfní a krystalické fáze v daném vzorku. Na Obrázku 34 tedy vidíme, že náš měřený vzorek obsahuje 73,02 % krystalické fáze a 26,98 % amorfní fáze.



Obrázek 33: Vzorová Ramanova spektra amorfního a plně krystalického IMC



Obrázek 34: Software OMNIC Spectra

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Ke studiu krystalizačního chování účinné látky indomethacinu byly využity dvě metody, diferenční skenovací kalorimetrie a in-situ Ramanova spektroskopie. Na základě výsledků těchto dvou metod byla porovnávána kinetická data odpovídající krystalizaci amorfního indomethacinu. DSC poskytuje informace o tepelných efektech, jako je tepelná kapacita, teplota skelného přechodu, teplota tání a krystalizační teplota, což umožňuje sledovat kinetiku krystalizace na základě množství vyvinutého tepla během exotermní přeměny z amorfní na krystalickou fázi. Na druhé straně in-situ Ramanova spektroskopie umožňuje monitorovat změny v molekulové struktuře během krystalizace, což poskytuje přesnější stanovení fázových přeměn a identifikaci jednotlivých polymorfů indomethacinu. Srovnání výsledků těchto dvou metod dovoluje studovat kinetiku krystalizace z různých perspektiv a získat komplexní porozumění o probíhajících procesech.

3.1 Kinetika krystalizace z DSC měření

Výstupem z DSC měření jsou DSC křivky (Obr. 35). Na Obrázku 35 jsou znázorněny příklady DSC křivek pro rychlosti ohřevu 0,2; 3 a 30 °C·min⁻¹. První efekt, který můžeme pozorovat u všech třech rychlostí ohřevu je skelný přechod. Tento endotermní jev se objevuje v rozmezí teplot 28 až 40 °C a je přímo závislý na použité rychlosti ohřevu, tedy čím je vyšší rychlost ohřevu, tím je vyšší teplota skelného přechodu. Dále lze u skelného přechodu vyhodnotit změnu tepelné kapacity, která se pohybovala v rozmezí 0,34 – 0,86 J/(g·°C). V porovnání s ostatními tepelnými efekty, které se objevují dále na křivce, je skelný přechod méně zřetelný. Pozorujeme, že při nižších rychlostech ohřevu je skelný přechod téměř nezatelný, naopak při vyšších rychlostech ohřevu je tento efekt již zcela patrný. V uvedených DSC křivkách se endotermní efekty projevují směrem dolů a exotermní efekty směrem nahoru. Skelný přechod se řadí mezi endotermní jevy, proto se na Obrázku 35 objevuje jako schod směrem dolů. Skelný efekt je zřetelně oddělen od efektu krystalizace, což naznačuje tomu, že indomethacin měl dostatek času na to, aby tyto dva procesy proběhly nezávisle na sobě.

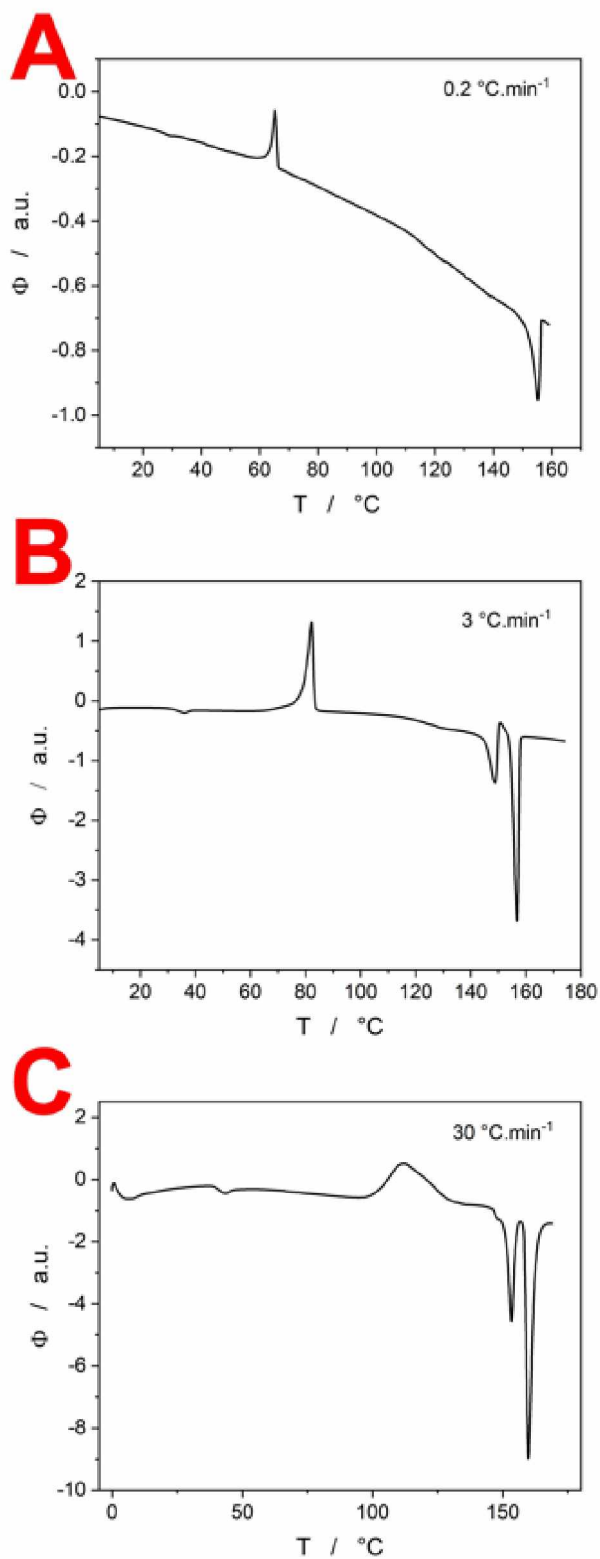
Druhým tepelným efektem, který můžeme pozorovat na Obrázku 35, je pík krystalizace. Krystalizace je exotermní proces, proto se v získaných DSC křivkách objevuje směrem nahoru. U krystalizace se vyhodnocuje teplota maxima píku, která se pohybovala v rozmezí 65 – 112 °C. Opět jako u skelného přechodu je teplota maxima píku přímo závislá na použité rychlosti ohřevu, tedy při nejrychlejší rychlosti ohřevu (30 °C·min⁻¹) měl pík krystalizace

nejvyšší hodnotu teploty maxima píku. Při rychlejších rychlostech ohřevu můžeme sledovat posun píku krystalizace k vyšším teplotám a dochází k nedostatečnému oddělení od následujícího efektu tání. Při pomalých rychlostech ohřevu lze pozorovat krystalizační píky s extrémně negativní asymetrií, což může naznačovat, že nejprve došlo k tvorbě krystalů na povrchu indomethacinu a poté probíhal postupný růst povrchové krystalické vrstvy směrem dovnitř zrn materiálu. Dále můžeme pozorovat, že náběhová hrana u píků krystalizace nemá monotónní tendenci rychlosti vzestupu. Tento jev naznačuje, že krystalizace neprobíhá pouze jedním jednoduchým krystalizačním mechanismem a že nejspíš nekrytalizuje pouze jedna krystalická forma. Jedná se tedy nejspíš o komplexní krystalizační proces, v tomto případě jde pravděpodobně o dva krystalizační procesy. Nejspíš se jedná o krystalizaci dvou polymorfů indomethacinu.

Jak již bylo zmíněno v teoretické části diplomové práce, indomethacin může krystalizovat až v sedmi formách – γ , α , β , δ , ϵ , ζ a η . γ forma je termodynamicky stabilní s teplotou tání $159,1 \pm 0,1$ °C a entalpií tání $106,3 \pm 1,5$ J/g. α forma je metastabilní forma s teplotou tání $152,8 \pm 0,1$ °C a entalpií tání $97,5 \pm 2,6$ J/g. Dalších pět zmíněných polymorfů je méně stabilních se zřejmě nižší pravděpodobností výskytu než výše zmíněné dvě formy.[54]

Dalším tepelným efektem pozorovaným na křivkách na Obrázku 35 je hlavní pík tání indomethacinu. Tání je endotermní efekt, proto se v DSC křivkách objevuje směrem dolů. Na rozdíl od krystalizačních píků se u tání vyhodnocuje teplota extrapolovaného onsetu, která se pohybovala od 152 °C do 158 °C. U všech rychlostí ohřevu je tento pík velmi zřetelný, avšak u nejvyšší rychlosti ohřevu (30 °C·min⁻¹) je tento pík nejostřejší.

Dále jsou pozorovány další dva píky mezi píky označující krystalizaci a hlavní tání. Tyto dva píky se neprojevují u rychlostí ohřevu $0,2$ a $0,5$ °C·min⁻¹, ale u vyšších rychlostí ohřevu už jsou zřetelně vidět. Tento jev dokazuje přítomnost polymorfismu, kdy nejdříve dochází k tání nestabilního polymorfu s teplotou maxima píku v rozmezí 148 °C až 153 °C, následuje rekrystalizace a tání stabilního polymorfu. První tání přiřazujeme polymorfni formě indomethacinu α a druhé tání přiřazujeme formě γ .

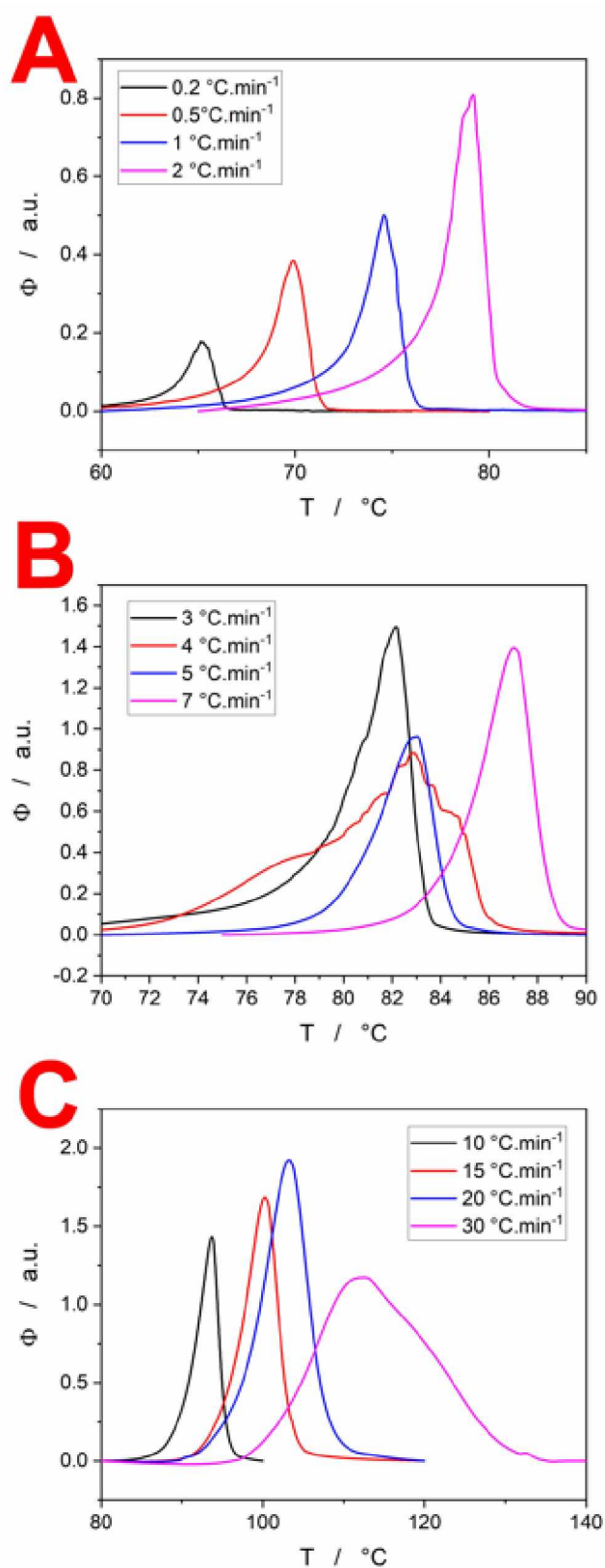


Obrázek 35: DSC křivky: A) Rychlost ohřevu $0,2 \text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$; B) Rychlost ohřevu $3 \text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$; C) Rychlost ohřevu $30 \text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$

Na Obrázku 36 jsou zobrazeny přibližné krystalizační píky pro všech 12 rychlostí ohřevu. Jedná se o data, kde je již odečtená baseline. Na Obrázku 36A jsou znázorněny DSC křivky pro čtyři nejnižší rychlosti ohřevu – 0,2; 0,5; 1 a 2 °C·min⁻¹. Lze pozorovat, že s rostoucí rychlostí ohřevu se pík krystalizace posouvá k vyšším teplotám a stává se výraznějším.

Na Obrázku 36B jsou znázorněny DSC křivky pro rychlosti ohřevu – 3; 4; 5 a 7 °C·min⁻¹. Můžeme sledovat, že při rychlosti ohřevu 4 °C·min⁻¹ není průběh píku monotónní, vypadá spíše jako překryv dvou výrazně posunutých krystalizačních píků. To může být způsobeno tím, že dochází k více krystalizačním procesům, kdy nejpravděpodobnější vysvětlení je, že došlo k výrazné nukleaci vzorku ještě před proběhnutím DSC experimentu. V takovém případě se signál níže-teplotní krystalizace příslušného polymorfu může výrazně zvýšit, jako je tomu v případě těchto dat.

Na Obrázku 36C jsou znázorněny DSC křivky pro 4 nejvyšší rychlosti ohřevu – 10; 15; 20 a 30 °C·min⁻¹. Pík krystalizace pro nejvyšší rychlost ohřevu je výrazně sešikmený k nižším teplotám, tj. vykazuje pozitivní asymetrii. Tento poznatek bude velmi důležitý pro následné zpracování krystalizačních dat pomocí kinetické analýzy.



Obrázek 36: DSC píky krystalizace: A) Rychlost ohřevu 0,2; 0,5; 1 a 2 °C·min⁻¹; B) Rychlost ohřevu 3; 4; 5 a 7 °C·min⁻¹; C) Rychlost ohřevu 10; 15; 20 a 30 °C·min⁻¹

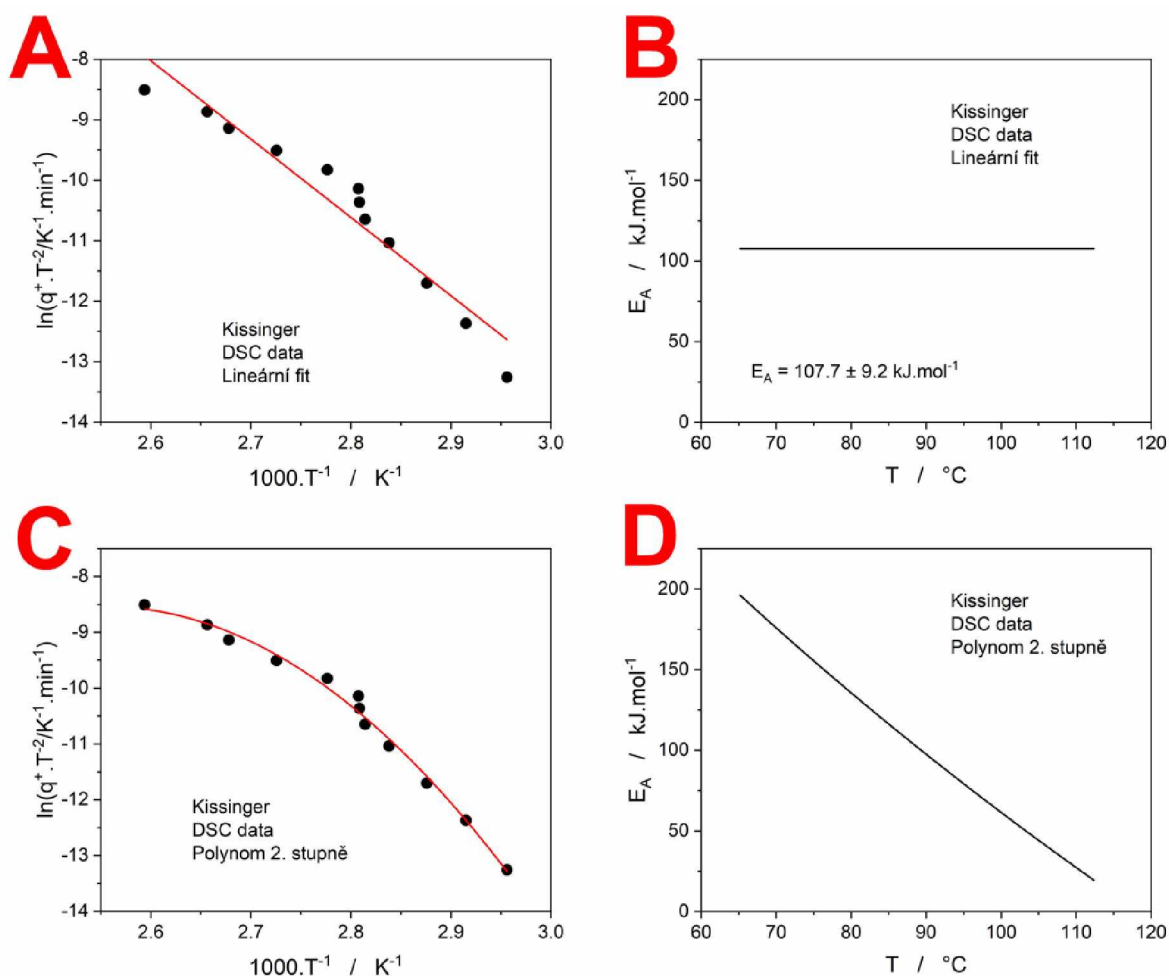
DSC data odpovídající čistým krystalizačním signálům (Obrázek 36) byla následně podrobena kinetické analýze. Hlavním cílem kinetické analýzy je určení kinetický parametrů, jako je entalpie daného procesu, aktivační energie, předexponenciální faktor nebo reakční mechanismus, které nám poskytují hlubší vhled do průběhu a chování studovaných procesů (v našem případě krystalizace). S pomocí poznatků o kinetice těchto procesů v materiálech jsme schopni úspěšně předpovídat chování materiálů za různých podmínek. Tato znalost má široké uplatnění od průmyslového zpracování materiálů po farmaceutický výzkum a vývoj nových léčiv.

Prvním krokem celé kinetické analýzy krystalizačních dat je určení aktivační energie E_A . V diplomové práci byla aktivační energie stanovena pomocí Kissingerovy metody. Tato metoda se v praxi využívá nejčastěji, neboť je velmi jednoduchá. Principem Kissingerovy metody je posun krystalizačního píku T_p s rychlostí ohřevu q^+ . Kissingerovu metodu lze využít jen pro data změřená za neizotermních podmínek. Tato metoda je vyjádřena pomocí rovnice (7). Hodnotu aktivační energie E_A lze stanovit ze směrnice ve tvaru $(-E_A/R)$, závislosti $\ln\left(\frac{q^+}{T_p^2}\right)$ na $\frac{1000}{T_p}$. Tato závislost je zobrazena na Obrázku 37A. Jednotlivé hodnoty byly vyneseny do grafu a proloženy lineární regresí.

Ze směrnice byla vypočtena hodnota aktivační energie E_A , která činila $107,7 \pm 9,2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Na Obrázku 36B je vynesena závislost aktivační energie E_A na teplotě.

Jak je patrné z Obrázku 37A, lineární regrese příliš nevystihuje skutečný průběh dat, proto bylo využito proložení polynomem druhého stupně, který je znázorněn na Obrázku 37C. Hodnoty aktivační energie byly získány zderivováním rovnice polynomu druhého stupně. Odpovídající závislost aktivační energie E_A na teplotě je zobrazena na Obrázku 37D.

Jedním z faktorů, které mohou způsobit, že Kissingerova závislost není lineární, jsou vysoké teplotní gradienty v důsledku například vysoké rychlosti ohřevu nebo velké hmotnosti vzorku. Tyto faktory jsou v případě těchto dat vyloučeny. Pravděpodobným důvodem je tedy změna samotné kinetiky procesu (ať už spojená s polymorfní změnou či nikoliv), která vede k teplotní závislosti kinetických parametrů z rovnice (6).



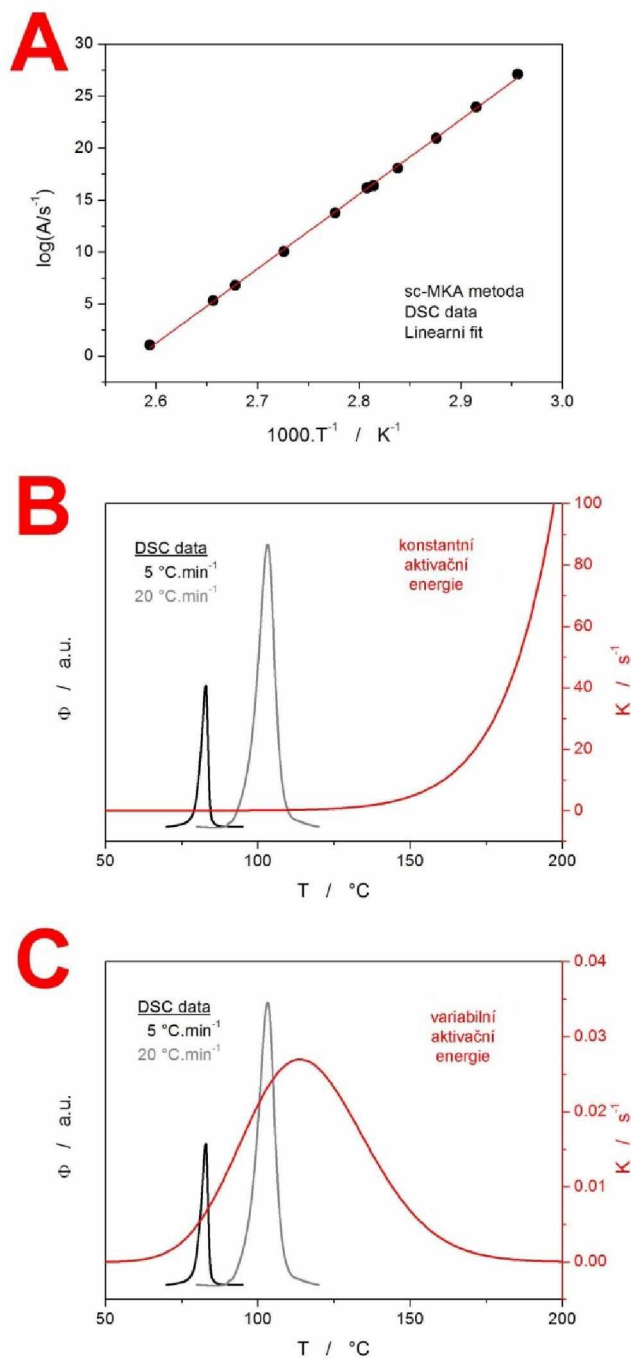
Obrázek 37: Kissingerova metoda: A) Lineární regrese; B) Závislost E_A na T pro lineární regresi; C) Polynom 2. stupně; D) Závislost E_A na T pro polynom 2. stupně

K dalšímu vyhodnocování DSC dat byl využit program Thermokinetics 3.1. Následujícím krokem kinetické analýzy procesu krystalizace je určení předexponenciálního faktoru A . Pokud budeme uvažovat konstantní aktivační energii E_A , která je znázorněna na Obrázku 37B lze získat logaritmus předexponenciálního faktoru pomocí již zmíněného programu $\log(A/s^{-1}) = 13,96$ na základě fitování dat. Druhá varianta byla reflektovat vývoj aktivační energie E_A s teplotou, jak je znázorněno na Obrázku 37D.

Pro získání hodnot logaritmu předexponenciálního faktoru bylo nutné stanovit aktivační energie E_A ze závislosti aktivační energie na teplotě pro každou jednotlivou křivku měřenou při různých rychlostech ohřevu. Tato hodnota aktivační energie byla určena v maximu daného piku, neboť tato hodnota nejlépe reprezentuje celý proces. Pomocí programu byly získány hodnoty $\log A$ a byl vytvořen graf závislosti $\log A$ na teplotě (Obr. 38A).

Pokud máme funkce popisující závislost aktivační energie E_A a logaritmu předexponenciálního faktoru na teplotě, můžeme pomocí těchto informací spočítat závislost rychlostní konstanty K na teplotě. Rychlostní konstanta je vyjádřena pomocí rovnice (5). Na Obrázku 38B je znázorněna závislost rychlostní konstanty K na teplotě při konstantních hodnotách aktivační energie a předexponenciálního faktoru. Při konstantních hodnotách dochází k exponenciálnímu nárůstu křivky K - T (červená křivka). Na Obrázku 38C je rychlostní konstanta určena z teplotně závislých hodnot aktivačních energií a předexponenciálních faktorů. U teplotně závislých veličin vzniká na závislosti K - T pík s maximem, který značí oblast maximální rychlosti růstu krystalů. Toto maximum se nachází při teplotě 115 °C.

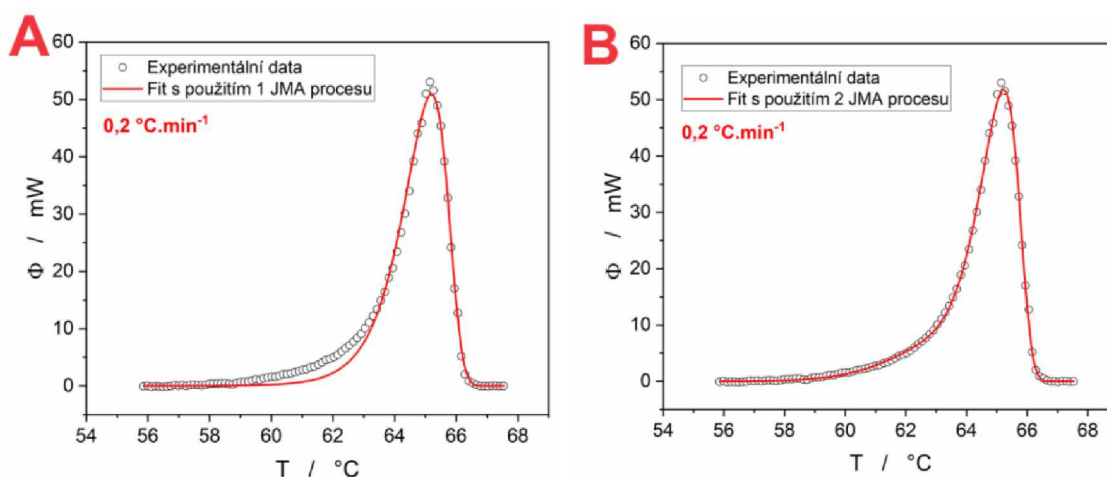
Pokud předpokládáme konstantní hodnotu aktivační energie a předexponenciálního faktoru a máme proces popsáný JMA modelem, pak tvar DSC píku bude stále stejný - mírně nakloněný doprava, při jakékoli rychlosti ohřevu. Avšak pokud máme teplotně závislé hodnoty aktivační energie a předexponenciálního faktoru a dostáváme se se zvolenou rychlostí ohřevu do takových hodnot, kdy se DSC pík vyskytuje blízko maxima rychlostní konstanty K (Obr. 38C – červená křivka), tak dochází k zešíklování píku k nižším teplotám (tzv. pozitivní asymetrie). V tomto případě k tomuto zešíklování dochází u rychlosti ohřevu 30 °C·min⁻¹. Toto zešíklování není důsledkem změny mechanismu krystalizace, ale je čistě dáno důsledkem blízkosti maxima rychlostní konstanty.[57] DSC pík pro rychlost ohřevu 20 °C·min⁻¹ má své maximum 12 °C pod maximem rychlostní konstanty a DSC pík pro rychlost ohřevu 30 °C·min⁻¹ má své maximum 3 °C pod maximem rychlostní konstanty. I přes poměrně velkou vzdálenost maxim krystalizačního píku a K - T píku je i pro rychlost ohřevu 20 °C·min⁻¹ zřejmá změna asymetrie krystalizačního píku. Z typicky negativně asymetrického JMA procesu se v tomto případě stal prakticky symetrický krystalizační pík, opět jako důsledek blízkosti obou výše zmíněných maxim.



Obrázek 38: A) sc-MKA metoda; B) Rychlostní konstanta pro konstantní E_A a A ;
C) Rychlostní konstanta pro $E_A(T)$ a $A(T)$

V dalším kroku byly všechny krystalizační píky pro všechny rychlosti ohřevu fitovány pomocí JMA modelu. Na Obrázku 39 je znázorněn příklad pro rychlost ohřevu $0,2 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, kde byl nejprve pík proložen jedním JMA procesem (graf A) a následně byl proložen dvěma JMA procesy (graf B). Je zjevné, že lepší shodu s experimentálními daty poskytuje JMA model s dvěma procesy, což může být znakem vzniku dvou polymorfů, simultánně vznikajících

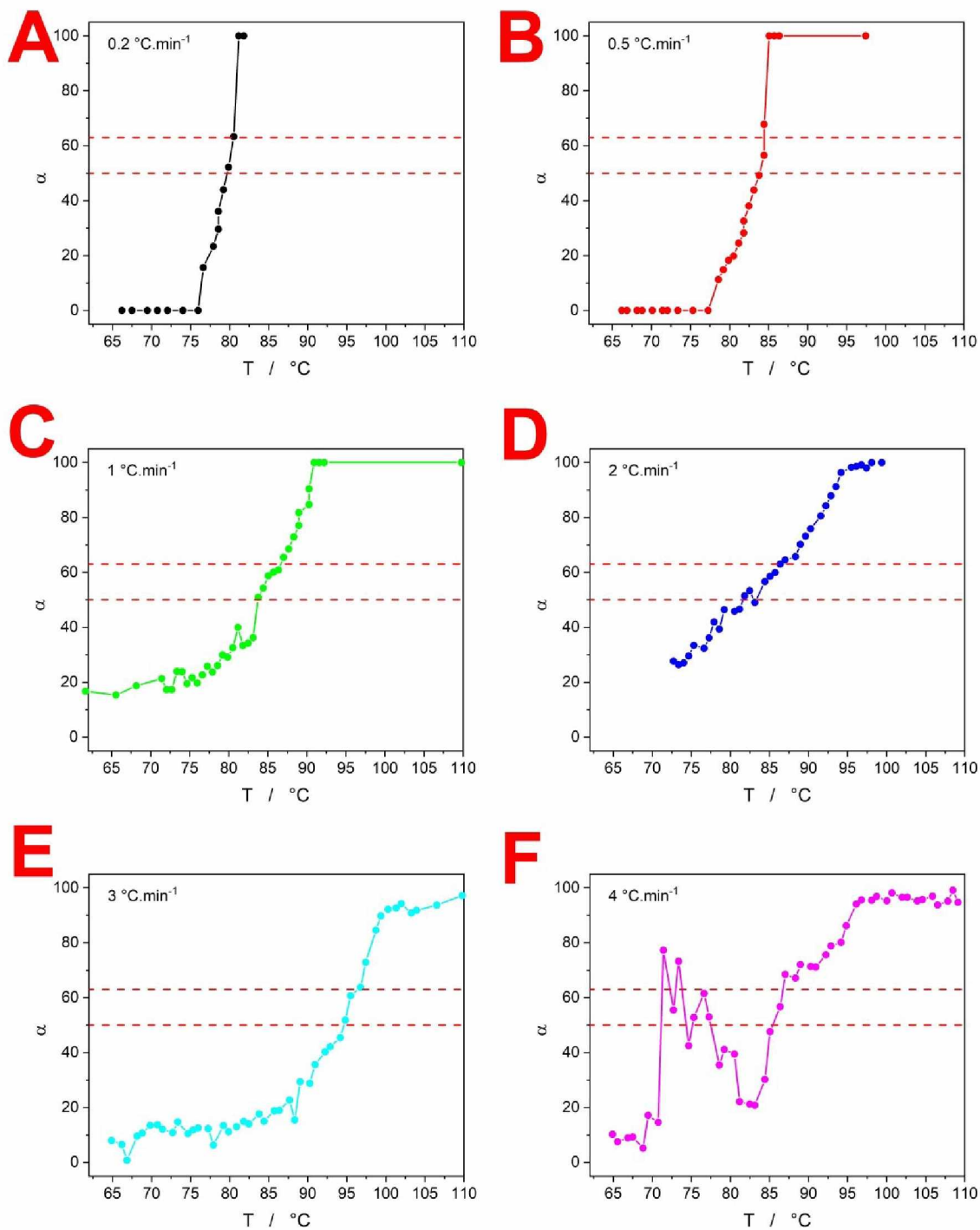
morfologicky nebo prostorově lišících se krystalů. Ostatní získané DSC křivky při různých rychlostech ohřevu, které byly také fitovány modelem JMA se nacházejí v Příloze I. Ohledně výše popsaného vyhodnocení kinetiky krystalizace z DSC dat lze tedy říci, že reflektuje nejmodernější trendy kinetické analýzy. Aplikovatelnost těchto metod byla možná i přes neideality experimentálních dat a získané výsledky jsou konzistentní a smysluplné i v porovnání s dostupnou literaturou. (Duong, 2018; Surwase, 2013; Lee, 2011)



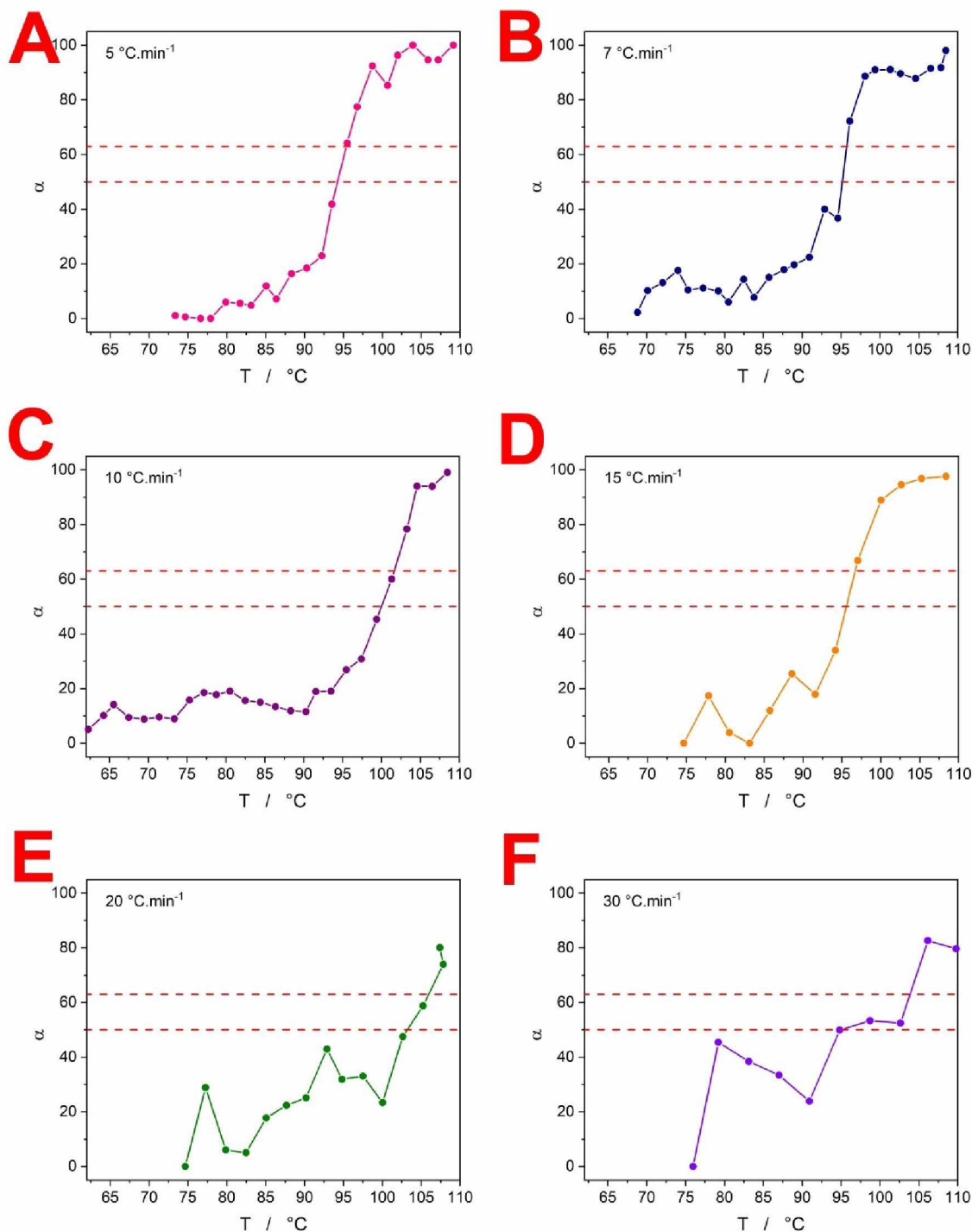
Obrázek 39: Rychlost ohřevu $0,2 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$: A) JMA model s jedním procesem; B) JMA model s dvěma procesy

3.2 Kinetika krystalizace z Ramanovy spektroskopie

V případě dat z in-situ Ramanovy spektroskopie byla provedena, jak již bylo uvedeno v experimentální části diplomové práce, multikomponentní analýza, která poskytla grafy závislosti stupně přeměny α na teplotě pro všechny naměřené rychlosti ohřevu (Obr. 40 a 41).



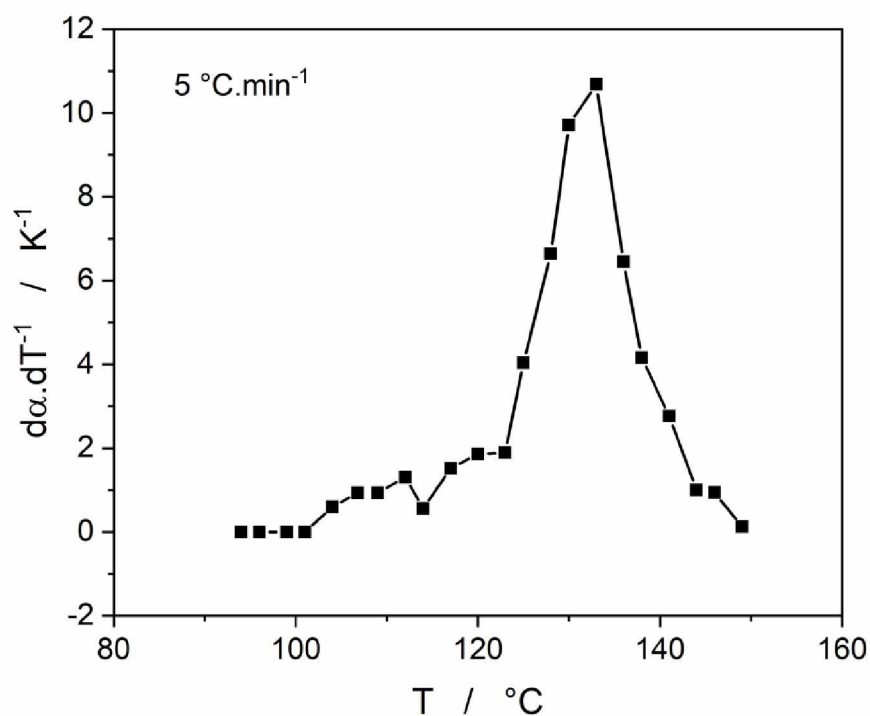
Obrázek 40: α -T závislosti získané pomocí in-situ Ramanovy spektroskopie při nízkých rychlostech ohřevu



Obrázek 41: α - T závislosti získané pomocí in-situ Ramanovy spektroskopie při vysokých rychlostech ohřevu

Hlavním cílem této analýzy bylo určení charakteristických teplot, které jsou nezbytné pro výpočet aktivační energie pomocí Kissingerovy metody. Tyto charakteristické teploty byly určeny pomocí tří metod. První metodou je stanovení teploty při dosažení 50% stupně přeměny. Tato hodnota je zvolena z toho důvodu, že tomuto stupni přeměny odpovídá charakteristická

teplota pro symetrický pík. Druhá z metod je podobná té první, avšak místo 50 % se zde používá 63 % stupně přeměny k určení charakteristické teploty. Tato hodnota je zvolena vzhledem k asymetrické povaze píků při popisu JMA procesu. Třetí metodou pro získání charakteristické teploty je určení maxima první derivace α -T dat. Derivace byla počítána z pěti po sobě jdoucích bodů a na následujícím obrázku (Obr. 42) je příklad takové derivace pro rychlost ohřevu $5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$. Získání charakteristických teplot pomocí derivace stupně přeměny podle teploty se ukázalo jako nevhodná metoda, protože v grafu bylo pozorováno více píků, kdy nepomohlo ani menší počet bodů derivace ani vyhlazení křivky.



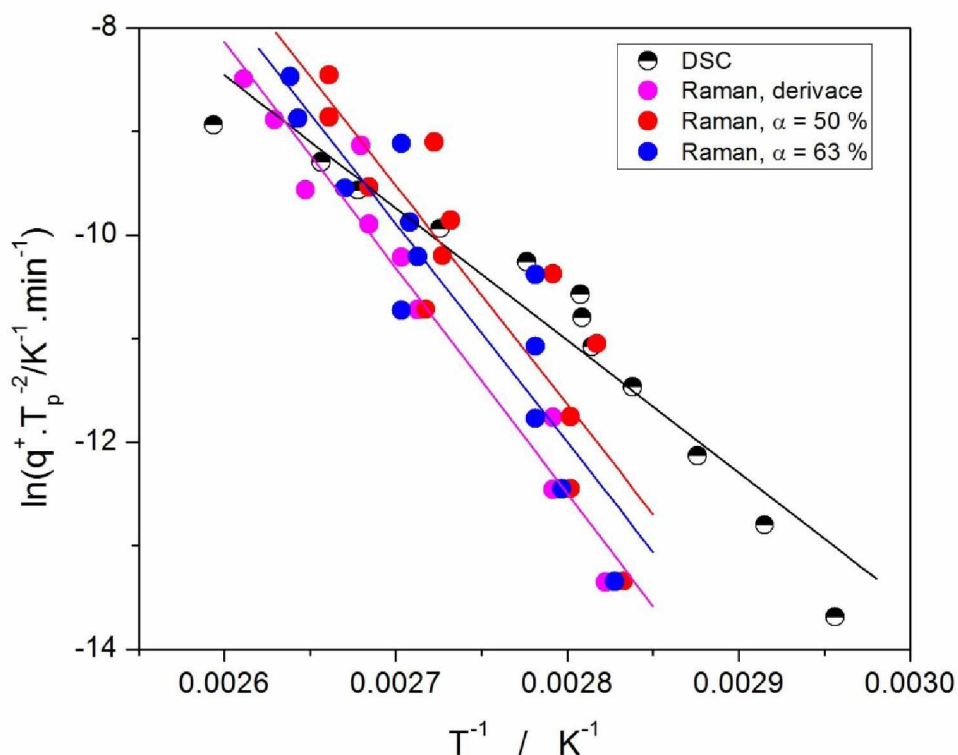
Obrázek 42: Derivace stupně přeměny podle teploty pro $5\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$

V následující Tabulce 6 jsou vypsány charakteristické teploty získané již zmíněnými třemi metodami.

Tabulka 6: Charakteristické teploty

q^+ , $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$	T (derivace), $^{\circ}\text{C}$	T (50 %), $^{\circ}\text{C}$	T (63 %), $^{\circ}\text{C}$
0,13	81,17	79,87	80,52
0,325	85,07	83,77	84,42
0,65	85,07	83,77	86,37
1,3	77,92	81,82	86,37
1,95	95,47	94,82	96,78
2,6	71,41	85,07	86,37
3,25	96,78	93,52	95,47
4,55	99,38	92,87	96,13
6,5	104,58	99,38	101,33
9,75	100,03	94,17	96,78
13	107,18	102,63	105,23
19,5	109,78	102,63	105,88

Pomocí Kissingerovy metody a získaných charakteristických teplot byl sestaven graf (Obr. 43) závislosti $\ln\left(\frac{q^+}{T_p^2}\right)$ na T^{-1} . Na Obrázku 43 jsou porovnávána data z Ramanovy spektroskopie a DSC.



Obrázek 43: Kissingerovy závislosti pro data z DSC a in-situ Ramanovy spektroskopie

Můžeme si všimnout, že data z Ramanových měření ukazují vysokou podobnost, což naznačuje, že výběr metody pro získání charakteristických teplot nemá vliv na konečné výsledky. Z grafu na Obrázku 43 lze usoudit, že aktivační energie získaná pomocí Ramanovy spektroskopie je vyšší než ta získaná z DSC měření. Aktivační energie získaná z DSC měření činila 107,7 kJ/mol, zatímco z Ramanovy spektroskopie byly získány následující hodnoty aktivační energie: 173,8 kJ/mol při $\alpha = 50 \%$, 174,1 kJ/mol při $\alpha = 63 \%$ a 179,3 kJ/mol pomocí derivace. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že Ramanova spektroskopie je povrchová metoda, která měří krystalizaci pouze na povrchu vzorku. Na začátku procesu krystalizace mohou být vyšší energetické bariéry (například v souvislosti s probíhající nukleací), které je potřeba překonat, což může vést k vyšší aktivační energii na povrchu vzorku ve srovnání s kompletní objemovou krystalizací, kterou měří DSC.

Přestože jsou α -T data (Obrázky 40 a 41) pro nízké a střední rychlosti ohřevu poměrně konzistentně a uniformě vykreslena, pokusy o jejich proložení ukázaly na nekonzistentnost jejich popisu jak v rámci hodnot kinetických exponentů AC modelu, tak co se týká proložitelnosti dat buď jedním nebo dvěma JMA procesy. Kvalita α -T dat je ale přesto dostačující alespoň pro kvalitativní zjištění základního typu pevnofázové kinetiky, kdy jde (stejně jako u DSC dat) o akcelerující neboli negativně asymetrickou kinetiku krystalizace. Jako největší překážky pro získání kvalitnějších in-situ Ramanovských dat byly identifikovány následující čtyři aspekty. Za prvé, použitá teplotní cela CCR1000 má nedostatečně přesnou regulaci a snímání teploty, což vede k odchylkám a posunům na teplotní ose. Tento problém by vyřešilo pořízení specializovaného nízkoteplotního stolku. Druhý aspekt úzce souvisí s prvním a týká se nepřesnosti kalibrace teplotního pole v této cele, která je primárně určena pro vysokoteplotní aplikace. I tento problém by byl vyřešen pořízením specializovaného nízkoteplotního stolku a velmi čistých kalibračních standardů. Třetí aspekt se týká nejednotnosti Ramanovských spekter charakterizujících základní fyzikálně-chemické stavy (amorfní a krystalický) studovaného materiálu. K potlačení tohoto jevu by mohlo dojít přesnější volbou těchto spekter s ohledem na odhadovaný počátek a konec procesu krystalizace, bylo by ovšem zároveň potřeba vyvinout pokročilejší způsob vyhodnocení obsahu krystalické fáze – například přes použití naprogramovaných maker. Jako čtvrtý kritický aspekt byl pak identifikován problém příliš fokusovaného sběru dat z povrchu vzorku, který probíhá pouze z plochy několika μm^2 a nemusí být tedy vždy reprezentativní vůči celému vzorku. Řešením by bylo zapojení mapovací funkce Ramanova mikroskopu – alespoň při velmi nízkých rychlostech ohřevu.

4. ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se věnovala studiu kinetiky krystalizace amorfního léčiva indomethacin pomocí dvou experimentálních technik – diferenční skenovací kalorimetrie a in-situ Ramanovy mikroskopie. Kalorimetrická data se ukázala velmi spolehlivá a konzistentní, vhodná pro vyhodnocení kompletním spektrem nejmodernějších metod kinetické analýzy. Ve své práci jsem se zvláště soustředila na identifikaci a popis teplotně závislých veličin standardní pevno-fázové kinetické rovnice – aktivační energie, frekvenčního faktoru a v menší míře i kinetických exponentů Šesták-Berggrenova modelu. Jedním z nejdůležitějších důsledků těchto výpočtů bylo vysvětlení změny asymetrie krystalizačních píků měřených při vysokých rychlostech ohřevu.

Data z in-situ Ramanovy mikroskopie se ukázala být získávána v podstatně horší kvalitě, pravděpodobně nedostatečné pro obdobně komplexní kinetickou analýzu, jako tomu bylo v případě kalorimetrických dat. Na základě extenzivní zkušenosti s měřeními a následnými vyhodnoceními jsem se pokusila identifikovat problémy související s použitím této metody a zároveň navrhnout jejich řešení. Vedle hardwarových změn lze významného zlepšení dosáhnout i změnou metodiky měření. I přes nižší kvalitu kinetických dat z in-situ Ramanovských měření bylo možné spolehlivě srovnat alespoň hodnoty aktivační energie krystalizace získané kalorimetricky a spektroskopicky. Aktivační energie získaná metodou in-situ Ramanovy mikroskopie měla výrazně vyšší hodnotu ve srovnání s průměrnou hodnotou získanou kalorimetricky. Velmi pravděpodobně je důvodem striktně povrchový charakter in-situ Ramanovy mikroskopie, kdy prvotní stádium krystalizačního procesu může být charakterizováno zvýšenou energetickou náročností například v důsledku přidruženého procesu nukleace nebo kvůli nutnosti překonání prostorových defektů bránících uniformnímu růstu krystalků.

Závěrem mohu tedy říct, že in-situ Ramanova mikroskopie nemůže být považována za metodu alternativní k diferenční skenovací kalorimetrii, ale jde o metodu velmi vhodně doplňující a významně rozšiřující kinetickou informaci získanou pomocí kalorimetrie.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KRATOCHVÍL, Bohumil, KOUPILOVÁ, Iva. Farmaceutické amorfní hydráty. *Chemické listy*. 2011, 105, 3-7.
- [2] Dostupné z: https://mineralogie.sci.muni.cz/kap_1_2_krystal/obrazek12_4.htm
[cit. 8.2.2024]
- [3] BOURNE, Neil. Materials in Mechanical Extremes – Fundamentals and Applications. Cambridge University Press, 2013. s. 8. [cit. 8.2.2024]. ISBN 978-1-107-02375-8.
- [4] VRANIC, Edina. Amorphous Pharmaceutical Solids. *Journal of the Association of Basic Medical Sciences*. 2004, 4 (3) 35-39.
- [5] KOPP, S., BEYER, C., GRAF, E., KUBEL, E., DOELKER, E. Methodology for a better evaluation of the relation between mechanical strength of solids and polymorphic form. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1989, 41, 79-82.
- [6] BACH, Hans, NEUROTH, Norbert. The Properties of Optical Glass. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1995. s. 1-11. [cit. 12.2.2024]. ISBN 3-540-58357-2.
- [7] WHITE, Mary Anne. Properties of Materials. New York: Oxford University Press, 1999. s. 70. [cit. 12.2.2024]. ISBN 0-19-511331-4.
- [8] BATCHELOR, Andrew W., LOH, Nee Lam, CHANDRASEKARAN, Margam. Degradace materiálů a její řízení povrchovým inženýrstvím. World Scientific, 2011. [cit. 12.2.2024]. ISBN 978-1-908978-14-1.
- [9] DEBENEDETTI, P. G., STILLINGER, F. H. Supercooled liquids and the glass transition. *Nature*. 2001. 410, 259-267.
- [10] ANGELL, C. A., NGAI, K. L., MCKENNA, G. B., MCMILLAN, P. F., MARTIN, S. W. Relaxation in glassforming liquids and amorphous solids. *Journal of Applied Physics*. 2000, 88 (6), 3113-3157.
- [11] LUO, M., HENG, W., DAI, J., WEI, Y., GAO, Y., ZHANG, J. Crystallization of Amorphous Drugs and Inhibiting Strategies. *Progress in Chemistry*. 2021, 33 (11), 2116-2127.

- [12] LUCAS, Sylvia. The Pharmacology of Indomethacin. *Journal of Head and Face Pain*. **2016**, 56 (2), 436-446.
- [13] CAMMACK, R., ATTWOOD, T. K., CAMPBELL, P. N., PARISH, J. H., SMITH, A. D., STIRLING, J. L., VELLA, F. Oxford dictionary of Biochemistry and molecular biology. Revised edition. Oxford University, **2006**. s. 341. [cit. 13.2.2024]. ISBN 978-0-19-852917-0.
- [14] GANGOLLI, Sharat, ed. The Dictionary of Substances and their Effects [online]. 3rd electronic ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, ©2005. Last Update Jan. 1999 [13.2.2024]. ISBN 978-0-85404-803-8.
- [15] COMER, John, JUDGE, Sam, MATTHEWS, Darren, TOWERS, Louise, FALCONE, Bruno, GOODMAN, Jonathan, DEARDEN, John. The intrinsic aqueous solubility of indomethacin. *Original scientific paper*. **2014**, 2 (1), 18-32.
- [16] BRANDENBERGER, H., MAES, R. A. A. Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists. De Gruyter, **1997**. s. 527. [cit. 13.2.2024]. ISBN 978-3-11-010731-9.
- [17] HAMPL, František, RÁDL, Stanislav, PALEČEK, Jaroslav. Farmakochemie. 3. upravené a rozšířené vydání. Praha, **2015**. s. 127, 132. [cit. 13.2.2024]. ISBN 978-80-7080-875-7.
- [18] EL-RAHMAN, A. E., EL-MAHDY, H., AMROUSY, D. E., ELGENDY, M. Comparative study of the efficacy and safety of paracetamol, ibuprofen, and indomethacin in closure of patent ductus arteriosus in preterm neonates. *European Journal of Pediatrics*. **2017**, 176 (2), 233-240.
- [19] RICCE, M. L., LÓPEZ-SALAZAR, T. R., JIMÉNEZ-RIDRUEJO, J. M., MONTEAGUDO, J. A. M., VAQUERO, C. S. Effectiveness of rectal indomethacin in the prevention of acute pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography in unselected patients. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas*. **2020**, 112 (3), 183-188.
- [20] Příbalové letáky léčivých přípravků obsahujících Indomethacin. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. **2010** © SÚKL [cit. 14.2.2024]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/>

- [21] DRAPER, M. P., MARTELL, R. L., LEVY, S. B. Indomethacin-mediated reversal of multidrug resistance and drug efflux in human and murine cell lines overexpressing MRP, but not P-glycoprotein. *British Journal of Cancer*. **1997**, 75 (6), 810-815.
- [22] AMICI, C., DI CARO, A., CIUCCI, A., CHIAPPA, L., CASTILLETTI, C., MARTELLA, V., DECARO, N., BUONAVOGLIA, C., CAPOBIANCHI M. R., SANTORO, M. G. Indomethacin has a potent antiviral activity against SARS coronavirus. *Antiviral Therapy*. **2006**, 11 (8), 1021-1030.
- [23] Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00328> [cit. 5.2.2024]
- [24] VILLAR-MARTÍNEZ, M. D., MORENO-AJONA, D., CHAN, C., GOADSBY, P. J. Indomethacin-responsive headaches-A narrative review. *Headache*. **2021**, 61 (5), 700-714.
- [25] SHEEHAN, T. M., BOLDY, D. A., VALE, J. A. Indomethacin poisoning. *Journal of Clinical Toxicology*. **1986**, 24 (2), 151-158.
- [26] *INDOMETHACIN, USP*, 53-86-1; IN126; G2; Spectrum: California, 7.3.2018. Dostupné z: https://www.spectrumchemical.com/media/sds/IN126_AGHS.pdf [14.2.2024]
- [27] BERNSTEIN, Joel. Polymorphism in Molecular Crystals. New York: Oxford University Press, **2002**. s. 1-27. [15.2.2024]. ISBN 0-19-850605-8.
- [28] CRUZ-CABEZA, A. J., REUTZEL-EDENS, S. M., BERNSTEIN, J. Facts and fictions about polymorphism. *Chemical Society Reviews*. **2015**, 44, 8619-8635.
- [29] Dostupné z:
https://www.mt.com/sk/sk/home/applications/L1_AutoChem_Applications/L2_Crystallization/polymorphism.html?fbclid=IwAR3sPtI2q8q2nmNtBHsbmQ0crVV8WiizlK90gMHmliBnq3SRrDMh0b8dDSc [cit. 15.2.2024]
- [30] ANDRUSENKO, I., HAMILTON, V., LANZA, A. E., HALL, C. L., MUGNAIOLI, E., POTTICARY, J., BUANZ, A., GAISFORD, S., PIRAS, A. M., ZAMBITO, Y., HALL, S. R., GEMMI, M. Structure determination, thermal stability and dissolution rate of δ -indomethacin. *International Journal of Pharmaceutics*. **2021**, 608, 121067.

- [31] SURWASE, S. A., BOETKER, J. P., SAVILLE, D., BOYD, B. J., GORDON, K. C., PELTONEN, L., STRACHAN, C. J. Indomethacin: new polymorphs of an old drug. *Molecular Pharmaceutics*. **2013**, *10* (12), 4472-4480.
- [32] LIGHTOWLER, M., LI, S., OU, X., ZOU, X., LU, M., XU., H. Indomethacin Polymorph δ Revealed To Be Two Plastically Bendable Crystal Forms by 3D Electron Diffraction: Correcting a 47-Year-Old Misunderstanding. *A Journal of the German Chemical Society*. **2021**, *61* (7).
- [33] WAGNER, Matthias. Thermal Analysis in Practise. Switzerland: Hanser Publications, **2017**. [15.2.2024]. ISBN 978-1-56990-643-9.
- [34] WARRINGTON, S. B., HÖHNE, G. W. H. Thermal Analysis and Calorimetry. In: ELVERS, B., ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2011**, s. 415-421. Vol. 36. [15.2.2024]. ISBN: 978-3-527-32943-4.
- [35] SEILEROVÁ, L., BRUSOVÁ, H., KRATOCHVÍL, B., KREJČÍK, L. Využití metod termické analýzy ve výzkumu a vývoji léčiv. *Chemické listy*. **2012**, *106*, 890–895.
- [36] MEHLING, H., CABEZA, L. F. Heat and cold storage with PCM. Germany: Springer. **2010**. s. 70-80. [cit. 16.2.2024]. ISBN 978-3-540-68556.
- [37] SVOBODA, Roman, MÁLEK, Jiří. Interpretation of crystallization kinetics results provided by DSC. *Thermochimica Acta*. **2011**, *526* (1-2), 237-251.
- [38] CLAS, Sophie-Dorothee, DALTON, Chad R., HANCOCK, Bruno C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*. **1999**, *2* (8), 311-320.
- [39] McKEEN, Laurence W. The effect of long term thermal exposure on plastics and elastomers. Second edition. Elsevier, **2021**. s. 14. [cit. 16.2.2024]. ISBN 978-0-323- 85436-8.
- [40] Society of Plastics Engineers. Proceedings of the Technical Conference & Exhibition. Society of Plastics Engineers, **2015**. s. 1. [cit. 16.2.2024]. ISBN 978-0-9850112-7-7.

- [41] WELLEN, Renate M. R., CANEDO, Eduardo Luis, RABELLO, Marcelo. Nonisothermal cold crystallization of poly(ethylene terephthalate). *Journal of Materials Research*. **2011**, 26 (9), 1107-1115.
- [42] Dostupné z: <https://polymerscience.physik.hu-berlin.de/docs/manuals/DSC.pdf> [cit. 16.2.2024]
- [43] BROWN, M. E. Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications. 2ns ed. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers. **2001**. s 54-55. [cit. 17.2.2024]. ISBN 978-1-4020-0472-8.
- [44] ROMANOVÁ, Jana, SVOBODA, Roman, OBADALOVÁ, Iva, BENEŠ, Ludvík, PEKÁREK, Tomáš, KREJČÍK, Lukáš, KOMERSOVÁ, Alena. Amorphous Enzalutamide – Non-isothermal recrystallization kinetics and thermal stability. *Thermochimica Acta*. **2018**, 665, 134-141.
- [45] BRANDOVÁ, Daniela. Crystallization Behavior of Far-Infrared Chalcogenide Glasses. Pardubice, 2019. Dizertační práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Fyzikální chemie. Vedoucí práce prof. Ing. Jiří Málek, DrSc.
- [46] MÁLEK, Jiří. Kinetic analysis of crystallization processes in amorphous materials. *Thermochimica Acta*. **2000**, 355, 239-253.
- [47] DUBINSKY, Barry, PRESS, Jeffery B. Skeletal Muscle Relaxants. In: ELVERS, Barbara, ed. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 7th completely rev. ed. Weinheim: Wiley-VCH, **2011**, s. 161. Vol. 17. ISBN: 978-3-527-32943-4.
- [48] BOLDT, Klaus. Raman spectroscopy of colloidal semiconductor nanocrystals. *Nano Futures*, **2022**, 6 (1).
- [49] ORLAND, A., FRANCESCHINI, F., MISCAS, C., PIDKOVA, S., BARTOLI, M., ROVERE, M., TAGLIAFERRO, A. A Comprehensive Review on Raman Spectroscopy Applications. *Chemosensors*. **2021**, 9 (9), 262.

- [50] NOVOTNÁ, Radka, ŠILHA, Tomáš, TRÁVNÍČEK, Zdeněk. Spektrální metody studia chemických látek [online]. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, **2011**. s. 48-53. [cit. 28.2.2024]. Dostupné z:
https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni_materialy/Spektralni_metody.pdf
- [51] NĚMCOVÁ, I., ČERMÁKOVÁ L., RYCHLOVSKÝ P. Spektrometrické analytické metody I. 2. vydání. Praha: Karolinum, **2004**. s. 166. [cit. 27.2.2024]. ISBN 80-7184-365-2.
- [52] GARDINER, D. J., GRAVES, P. J., BOWLEY, H. J. Practical Raman Spectroscopy. 3rd ed. Berlin: Springer-Verlag, **1989**. s. 157. [cit. 28.2.2024] ISBN 978-3875-254.
- [53] MILATA, V. Aplikovaná molekulová spektroskopie. 1. vydání. Bratislava: Slovenská technická univerzita v Bratislavě. **2008**. s. 602. [cit. 27.2.2024]. ISBN 978-80-227-2960-4.
- [54] BUMBRAH, G. S., SHARMA, R. M. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. **2016**, 6 (3), 209-215.
- [55] ŠTUKELJ, Jernej, SVANBÄCK, Sami, KRISTL, Julijana, STRACHAN, Clare J., YLIRUUSI, Jouko. Image-Based Investigation: Biorelevant Solubility of α and γ Indomethacin. *Analytical Chemistry*. **2019**, 91, 3997-4003.
- [56] SVOBODA, R., CHOVANEC, J., SLANG, S., BENEŠ, L., KONRÁD, P. Singel-curve multivariate kinetic analysis: Application to the crystallization of commercial Fe-Si-Cr-B amorphous alloys. *Journal of Alloys and Compounds*. **2021**, 889, 161672.
- [57] SVOBODA, R. Johnson-Mehl-Avrami kinetics as a universal description of crystallization in glasses? *Journal of the European Ceramic Society*. **2024**, 44,4064-4082.

PŘÍLOHA I

V příloze I se nachází fity DSC dat buď jedním (nalevo) nebo dvěma (napravo) JMA procesy. Postupně jsou zde seřazeny data pro rychlosti ohřevu 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 7; 10; 15; 20 a 30 °C·min⁻¹.

