

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Kristýna Táborská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stabilita amorfních léčiv
Bakalářská práce

2024

Kristýna Táborská

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna Táborská**
Osobní číslo: **C21235**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Stabilita amorfních léčiv**
Téma práce anglicky: **Stability of Amorphous Drugs**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte rešerši týkající se zadaného tématu.
2. Využijte termickou analýzu pro studium stability vybraného amorfního léčiva.
3. Proveďte analýzu naměřených termooanalytických dat.
4. Diskutujte získané výsledky.
5. Výsledky zpracujte ve formě bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jana Shánělová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

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

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Stabilita amorfních léčiv jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne 01.07.2024

Kristýna Táborská v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Největší poděkování bych chtěla věnovat vedoucí mé bakalářské práce paní Ing. Janě Shánělové, PhD. Velice jí děkuji za poskytnutí odborných rad při vypracování bakalářské práce, dále za poskytnuté materiály a pomoc při experimentálním měření.

Další poděkování patří mé rodině, blízkým kamarádům, a hlavně mým spolužačkám, kteří mi velmi pomáhali a podporovali mě po celou dobu mého bakalářského studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá studiem stability amorfních léčiv, se zaměřením v experimentální části na léčivo nifedipin. Amorfní formy léčiv jsou důležité z hlediska jejich biologické dostupnosti, avšak jejich nestabilita může omezit jejich praktické využití. Práce zkoumá různé aspekty fyzikální a tepelné stability amorfních látek pomocí metod termické analýzy. Hlavním cílem práce je analyzovat vliv různých faktorů, jako je příměs polymeru polyvinylpyrrolidonu (PVP10), velikost částí či doba skladování na stabilitu amorfního nifedipinu. Výsledky experimentální části ukazují, jak příměsi a podmínky zpracování ovlivňují krystalizaci a tepelnou stabilitu amorfních léčiv.

KLÍČOVÁ SLOVA

Nifedipin, diferenční skenovací kalorimetrie, stabilita, amorfní léčivo, polyvinylpyrrolidon

TITLE

Stability of Amorphous Drugs

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the study of the stability of amorphous drugs, focusing in the experimental part on the drug nifedipine. Amorphous forms of drugs are important in terms of their bioavailability, but their instability may limit their practical use. This thesis investigates various aspects of the physical and thermal stability of amorphous compounds using thermal analysis methods. The main objective of this work is to analyze the effect of various factors such as polyvinylpyrrolidone (PVP10) polymer admixture, particle size or storage time on the stability of amorphous nifedipine. The results of the experimental part show how admixture and processing conditions affect the crystallization and thermal stability of amorphous drugs.

KEYWORDS

Nifedipine, differential scanning calorimetry, stability, amorphous drug, polyvinylpyrrolidone

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM TABULEK.....	12
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1 Amorfnní stav látek	14
1.2 Amorfnní pevné disperze.....	15
1.2.1 Rozdělení pevných disperzí	15
1.2.1.1 První generace.....	16
1.2.1.2 Druhá generace	16
1.2.1.3 Třetí generace	16
1.3 Stabilita amorfnních léčiv	17
1.3.1 Fyzikální stabilita.....	17
1.3.2 Stabilitní testy ve farmacii	19
1.3.2.1 Typy stabilitních testů.....	19
1.3.3 Metody studia tepelné stability léčiv	20
1.3.3.1 Diferenční skenovací kalorimetrie.....	20
1.3.3.2 Diferenční termická analýza	21
1.3.3.3 Termogravimetrie	22
1.3.3.4 Simultánní termická analýza.....	22
1.4 Léčivo nifedipin.....	23
1.4.1 Mechanismus účinku	23
1.4.2 Dávkování.....	24
1.4.3 Nežádoucí účinky	24
1.4.4 Farmakokinetické vlastnosti	24

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
2.1	Příprava vzorku	25
2.2	Měření pomocí DSC	27
2.2.1	Vyhodnocení DSC křivek	29
2.3	Měření pomocí STA	31
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
	ZÁVĚR	44
	POUŽITÁ LITERATURA	45

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ASD	amorfní pevné disperze
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DTA	diferenční termická analýza
E_A	aktivační energie
NIF	léčivo nifedipin
PVP10	polymer polyvinylpyrrolidon
STA	simultánní termická analýza
t	čas
T	teplota
T_{cr}	teplota krystalizace
T_g	teplota skelného přechodu
TG	termogravimetrie
T_p	teplota maxima píku krystalizace
T_{t-min}	minimum teploty tání
$T_{t-onset}$	teplota tání onset – extrapolovaný počátek tání
w	hmotnostní zlomek
WHO	Světová zdravotnická organizace
XRD	rentgenová difrakční analýza
$\alpha_{amorfní}$	stupeň amorfности léčiva
β	rychlost ohřevu
ΔH_{cr}	entalpie krystalizace (změna entalpie krystalizace)
ΔH_t	entalpie tání (změna entalpie tání)
Φ	tepelný tok

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura amorfni látky v porovnání s krystalickou látkou a plynem.....	14
Obrázek 2: Rozdělení pevných disperzí do generací.....	15
Obrázek 3: Znázornění teplotní závislosti teplot nukleace a růstu krystalů pro sloučeniny první a druhé třídy	18
Obrázek 4: Strukturni vzorec léčiva NIF ve 2D	23
Obrázek 5: Vzorky léčiva Nifedipin s příměsí PVP10	25
Obrázek 6: Síta pro rozdělení vzorku dle velikosti částic	26
Obrázek 7: Lis k hermetickému uzavření vzorků.....	26
Obrázek 8: Diferenční skenovací kalorimetr DSC 2500 (výrobce TA Instruments)	27
Obrázek 9: Teplotní kalibrační křivka za využití čistých kovů (indium, cín, olovo a zinek)....	28
Obrázek 10: Kalibrační křivka tepelného toku za využití india	29
Obrázek 11: Vyhodnocení DSC křivky při rychlosti ohřevu 10 K/min s 10 hm. % PVP10....	30
Obrázek 12: Porovnání STA křivek vzorků čistého NIF a polymeru PVP10 s rychlostí ohřevu 5 K/min	32
Obrázek 13: DSC křivky při ohřevu 10 K/min pro frakce 300–400 μm vzorků NIF s různou příměsí hm. % PVP10.....	33
Obrázek 14: DSC křivky při ohřevu 10 K/min pro vzorek NIF s 2 hm. % PVP10 s různou zrnitostí	34
Obrázek 15: Porovnání DSC křivek vzorku léčiva s 5 hm. % PVP10 s různými rychlostmi ohřevu	35
Obrázek 16: Stanovení aktivační energie pro NIF s 5 hm. % PVP10 a zrnitosti	36
Obrázek 17: Závislost E_A krystalizace na příměsí hm. % PVP10 v NIF pro dvě frakce.....	37
Obrázek 18: Závislost T_g a T_{cr} na hm. % příměsí PVP10 v NIF pro rychlosti ohřevu 10 K/min	38
Obrázek 19: Závislost T_{t-min} a $T_{t-onset}$ na hm. % příměsí PVP10 v NIF pro ohřev 10 K/min....	38
Obrázek 20: Porovnání DSC křivek čistého NIF s různou dobou skladování vzorku	40
Obrázek 21: Vliv doby skladování při pokojové teplotě na amorfnost léčiva NIF s různým obsahem příměsí PVP10.....	41
Obrázek 22: Závislost ΔH_f (rychlost ohřevu 2 a 10 K/min) a $-\Delta H_{cr}$ (rychlost ohřevu 10 K/min) na příměsí hm. % PVP10 ve vzorku NIF.....	43

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Porovnání experimentálních hodnot s tabelovanými pro tání india	28
--	----

ÚVOD

Amorfní formy léčiv představují významný směr ve farmaceutickém výzkumu díky svým výjimečným vlastnostem, zejména zlepšené biologické dostupnosti oproti jejich krystalickým protějškům. Tato vlastnost je zásadní pro efektivní podávání léků, zejména těch, které se špatně rozpouštějí ve vodě. Avšak amorfní formy léčiv jsou známé svou nestabilitou, což může vést k jejich krystalizaci během skladování a tím k poklesu účinnosti a biologické dostupnosti léčiva.

Stabilita amorfních léčiv je komplexní problém, který zahrnuje studium různých faktorů ovlivňujících krystalizaci a degradaci těchto látek. Proces krystalizace zahrnuje nukleaci a růst krystalů, což jsou dva nezávislé jevy, které mohou být ovlivněny vnějšími podmínkami, jako jsou teplota, vlhkost, přítomnost nečistot a mechanické namáhání. Pro pochopení těchto procesů se využívají charakterizační techniky, jako jsou optická a elektronová mikroskopie, Ramanova spektroskopie, rentgenová difrakční analýza, termogravimetrie a diferenční skenovací kalorimetrie.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium stability amorfního léčiva nifedipin, které je známé svou vysokou biologickou dostupností v amorfní formě. Experimentální část práce využívá metod termické analýzy a soustředí se na stanovení vlivu různých faktorů, jako jsou příměs polymeru polyvinylpyrrolidonu (PVP10), velikost částic či doba skladování vzorku na stabilitu amorfního nifedipinu. Cílem je zjistit, jak tyto faktory ovlivňují krystalizaci a tepelnou stabilitu léčiva. Získané poznatky lze využít pro vývoj stabilnějších farmaceutických formulací.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Amorfní stav látek

Amorfní látky se řadí do kategorie pevných látek. Pevné látky jsou takové, které si zachovávají svůj tvar, pokud na ně nezačnou působit vnější síly. Podle vnitřního uspořádání částic lze pevné látky rozdělit na krystalické, které se vyznačují pravidelným uspořádáním částic na dlouhé vzdálenosti, a na amorfní, které mají periodické uspořádání částic omezené na mnohem kratší vzdálenosti. Lze tedy říci, že amorfní látky nemají uspořádání částic do pevné krystalické mřížky a jejich struktura se blíží struktuře kapalin. Mezi takové látky patří například skla nebo vosky. [1]



Obrázek 1: Struktura amorfní látky v porovnání s krystalickou látkou a plynem [1]

Amorfní látky jsou v nerovnovážném stavu a vykazují tendenci přeměnit se na rovnovážný stav krystalické látky. Pro stanovení stupně krystalinity lze například využít rentgenovou difrakční analýzu (XRD), diferenční termickou analýzu (DTA) či diferenční skenovací kalorimetrii (DSC). [2]

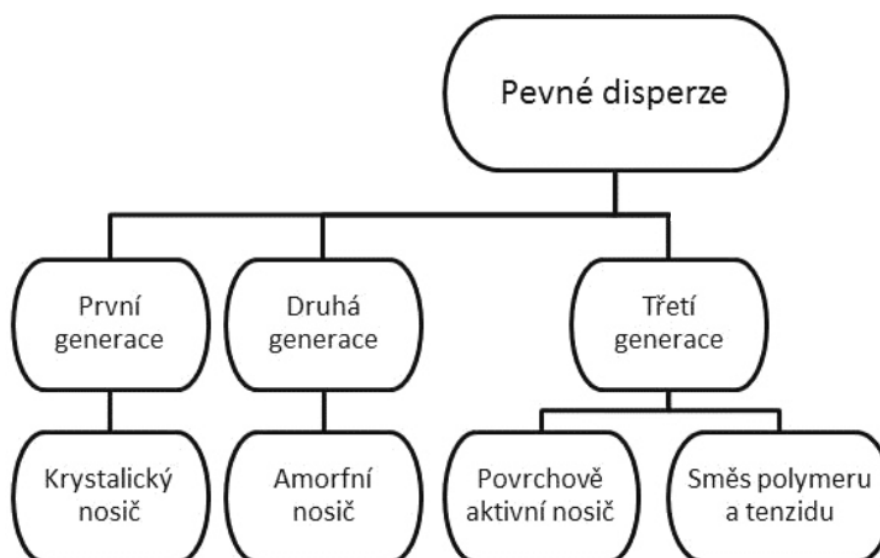
Proces přeměny látky na amorfní či sklovitou se nazývá vitrifikace. Nejčastěji se využívá procesu, kdy se látka roztaví a následně se tavenina rychle ochladí. Během tohoto procesu dochází s klesající teplotou k postupnému zpomalování molekulárních pohybů, částice nemají dostatek času a energie k vytvoření krystalu, až neuspořádaná struktura taveniny zamrzne a stane se pevnou. Takto připravené amorfní látky se nazývají skla. Dalšími způsoby, jak připravit amorfní látky, jsou mletí, kondenzace par, lyofilizace nebo sprejové sušení. [3]

1.2 Amorfnní pevné disperze

Amorfnní pevné disperze (ASD) jsou velmi populární pro zvyšování rozpustnosti a biologické dostupnosti špatně rozpustných léčivých látek ve vodném prostředí. Amorfnní léčiva jsou obecně lépe a rychleji rozpustná než jejich krystalické protějšky, ale zároveň se vyznačují nižší termodynamickou stabilitou, která může vést k rekrystalizaci během skladování nebo při rozpouštění ve vodě. K potlačení rekrystalizace je zapotřebí přídavku pomocné látky. V případě amorfnních pevných disperzí je jedna z možností, jak zabránit rekrystalizaci amorfnního léčiva, jeho dispergace do vysoce viskózní polymerní matrice. [3; 4] Fyzikální stabilita amorfnních pevných disperzí je kritickým ukazatelem kvality, proto je důležité vzít v úvahu, jaký vliv na stabilitu bude mít složení a následné zpracování léčiva. [5]

1.2.1 Rozdělení pevných disperzí

Na základě složení přípravku se pevné disperze dělí do první, druhé a třetí generace. První generací jsou pevné disperze připravené s použitím krystalických nosičů. Do druhé generace lze zařadit pevné disperze, které jsou vyrobeny za použití amorfnního léčiva spolu s amorfnním polymerem. Pevné disperze mohou také obsahovat další pomocné látky, jako jsou další polymery či povrchově aktivní látky usnadňující uvolňování léčiva a zlepšující jeho stabilitu. Takové disperze se řadí do třetí generace. [6]



Obrázek 2: Rozdělení pevných disperzí do generací [6]

1.2.1.1 První generace

V první generaci pevných disperzí se ve funkci nosiče využívá krystalická látka. Tím vznikají krystalické pevné disperze. Cukry, zejména mannitol a sorbitol, jsou společně s močovinou jedny z nejčastěji používaných krystalických nosičů. Krystalickou pevnou disperzi lze snadněji získat za použití močoviny, protože oproti cukrům má nižší teplotu tání, je dobře rozpustná ve vodě i v běžně využívaných rozpouštědlech. [6] Krystalické pevné disperze jsou termodynamicky stabilnější a jejich rychlost rozpouštění bývá nižší ve srovnání s amorfními disperzemi. [7]

1.2.1.2 Druhá generace

Pevné disperze druhé generace obsahují jako amorfni nosiče především polymery. Polymery mohou být jak syntetické, polosyntetické, tak přírodní. Mezi syntetické polymery lze zařadit polyvinylpyrrolidon (PVP). Polosyntetické polymery zahrnují skupinu derivátů celulosy. [8] Přírodním polymerem, který zastává roli jako amorfni nosič, mohou být škroby. Zásadním faktorem pro výběr typu nosiče je délka polymerního řetězce, respektive jeho molekulová hmotnost. S delšími řetězci roste viskozita polymeru. Použitím polymerů s vysokou viskozitou lze zabránit rekrytalizaci léčiv při výrobě a skladování. Zároveň však s rostoucím řetězcem klesá rozpustnost polymeru ve vodě. [6] Naopak amorfni léčivo v těchto disperzích vykazuje rozpustnost vyšší. Polymerní nosiče se aktivně podílejí na procesu přeměny krystalického léčiva na jeho amorfni formu a zároveň stabilizují ASD tím, že snižují molekulární pohyblivost a zvyšují teplotu skelného přechodu (T_g). [9] Podle fyzikálního stavu léčiva lze pevné disperze druhé generace rozdělit na amorfni pevné suspenze a na amorfni pevné roztoky (neboli skla). Amorfni pevné suspenze se skládají ze dvou oddělených fází, zatímco amorfni pevné roztoky obsahují homogenní směs léčiva a amorfniho nosiče. [7]

1.2.1.3 Třetí generace

Povrchově aktivní látky (surfaktanty) nebo látky s emulgačními vlastnostmi vykonávají funkci nosičů pevných disperzí třetí generace. Příklady těchto nosičů mohou být inulin či poloxamery. Použití povrchově aktivních látek nebo emulgátorů nejen zlepšuje disoluční profil léčiva, ale také zlepšuje fyzikální i chemickou stabilitu léčiva v pevné disperzi. Stabilita je zlepšena tím, že se zabrání nukleaci a aglomeraci. [8]

1.3 Stabilita amorfních léčiv

Testy stability se týkají, jak prvotního testování potenciálních léčiv ve výzkumu, tak již připravených léčiv ve finální podobě. Testování amorfních léčiv ve výzkumu je zaměřeno na tepelnou stabilitu samotného léčiva a přídatných látek při procesu přípravy amorfních léčiv nebo amorfních pevných disperzí. Sem patří využití technik termogravimetrie, diferenční skenovací kalorimetrie (nebo diferenční termické analýzy) a optické mikroskopie. Termogravimetrie se používá ke stanovení tepelné stability léčiv při vyšších teplotách vzhledem k možným způsobům přípravy amorfních léčiv a pevných disperzí pomocí tavení a rychlého chlazení, případně pomocí tavení a vytlačování taveniny tryskou („hot melt extruze“). Diferenční skenovací kalorimetrie se využívá pro testování stability léčiva v průběhu ohřevných a chladících cyklů, kde může docházet ke krystalizaci nebo rekrystalizaci léčiva. Studium krystalizačního chování amorfního léčiva nebo amorfní pevné disperze může predikovat také odolnost vůči krystalizaci během skladování při nižších teplotách. Tato technika byla také využita ke studiu stability amorfní disperze vůči odmíšení, které vede ke změně chování amorfní pevné disperze. [10] Případně je možné stanovit maximální rozpustnost amorfního léčiva v použitém přídatném polymeru. Procesy krystalizace i odmíšení mohou být sledovány také pomocí optické mikroskopie. Všechny tyto testy vedou při výzkumu k výběru vhodné formy amorfního léčiva a selekci přídatných látek, které vlastnosti amorfního léčiva vylepšují směrem k vyšší stabilitě vůči krystalizaci a odmíšení. Finální navržené amorfní pevné disperze jsou pak podrobeny klasickým farmaceutickým stabilitním testům.

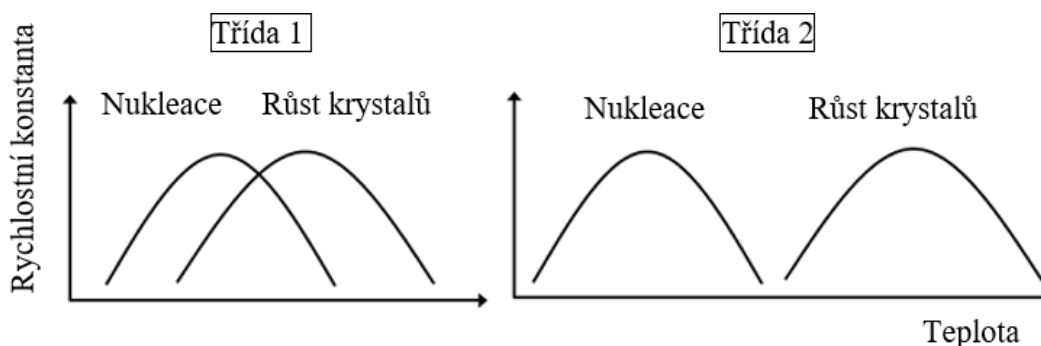
1.3.1 Fyzikální stabilita

Jedním z nejdůležitějších fyzikálních procesů, kterým je nutno se zabývat s ohledem na stabilitu amorfních léčiv, je proces krystalizace. Během krystalizace se mění amorfní látka na krystalickou, která je uspořádána do pravidelné a periodické struktury, která se nazývá krystalická mřížka. Z hlediska dlouhodobé stability a využitelnosti amorfních léčiv v amorfních pevných disperzích je třeba zachovat léčiva v amorfním stavu, aby v průběhu rozpouštění působily příznivě. Stopové množství krystalů by po rozpouštění mohlo vyvolat rychlou krystalizaci a významně snížit dostupnost léčiva. [11] Pomocné látky v amorfních pevných disperzích ve formě polymerů zlepšují saturační vlastnosti, ale také inhibují proces krystalizace léčiva. [12]

Pro výběr léčiv vhodných k aplikaci ve formě amorfního léčiva nebo amorfni pevné disperze je třeba posoudit sklotvornost dané látky. Obecně je možné říci, že vyšší sklotvornost bývá spojena s vysokou molekulární hmotností a velkým rozdílem mezi teplotou tání a teplotou skelného přechodu. Krystalizační tendence daných sloučenin se určují pozorováním krystalizace při rychlém ochlazování nebo při cyklech ochlazování/ohřívání taveniny pomocí diferenční skenovací kalorimetrie. Dle krystalizační tendence, můžeme sloučeniny klasifikovat do následujících tříd: [11]

- 1. třída: Léčiva, která krystalizují při ochlazování taveniny rychlostí 20 K/min.
- 2. třída: Léčiva, která nekrystalizují během ochlazování taveniny, ale krystalizují při následném ohřevu rychlostí 10 K/min.
- 3. třída: Léčiva, která vůbec nekrystalizují během procesu ochlazení/ohřívání rychlostí 10 K/min.

Dle práce autora Kohsaku Kawakamiho [11] lze sloučeniny tříd rozdělit následovně: mezi sloučeniny z první třídy lze zařadit například benzamid, kofein, griseofulvin nebo kyselinu salicylovou, do druhé třídy mohou patřit sloučeniny jako je paracetamol, cinnarizin, droperidol či nifedipin a mezi sloučeniny třetí třídy lze řadit ibuprofen, indomethacin či ritonavir. Rozdílné chování sloučenin 1. a 2. třídy je dáno rozdílnými teplotami nukleace a růstu krystalů (viz obrázek 3). [11] V případě léčiv 1. třídy dochází snadno ke krystalizaci léčiva během chlazení z důvodu překryvu oblasti nukleace a růstu krystalů. V oblasti překryvu obou křivek tak dochází ke snadné tvorbě zárodků krystalů a k jejich následnému růstu. U léčiv druhé třídy dochází k nukleaci při teplotách výrazně nižších, než jsou teploty pro růst krystalů. Je tedy nutné taveninu ochladit a následně ohřát, aby krystalizace proběhla. Čím větší je rozdíl teplot mezi křivkou nukleace a růstu krystalů, tím větší má léčivo tendenci vytvářet amorfni fázi s vysokou odolností vůči krystalizaci. [11]



Obrázek 3: Znárodnění teplotní závislosti teplot nukleace a růstu krystalů pro sloučeniny první a druhé třídy [11]

Skla, která se připravují mletím, vykazují nižší stabilitu než skla v neporušeném stavu. To může být zapříčiněné nedokonalostí amorfizace, kdy ve fázi jsou stále přítomny zárodky či malé krystaly. Roli zde také může hrát velký povrch zrn, na kterém může snadněji docházet k heterogenní nukleaci. Kinetika krystalizace také může být ovlivněna působením kompresních tlaků. U některých látek bylo zjištěno, že růst krystalů se s rostoucím tlakem zvyšuje. U některých léčiv vlivem komprese během ohřevu dochází ke snížení teplot krystalizace. [11]

1.3.2 Stabilitní testy ve farmacii

Stabilitní testy jsou využívány ke stanovení podmínek skladování a uchovávání léčiv, k určování vhodných obalových materiálů a doby použitelnosti léčiv. Sledování stability vede k zajištění kvalitního, bezpečného a účinného léčiva po celou dobu použitelnosti. Léčivo se považuje za stabilní v případě, že během testování stability nedojde ke ztrátě účinnosti větší jak 5 % a zároveň nedojde k překročení limitu jednotlivých hodnot (pH, rozkladné produkty). Pro testování stability léčiv se využívají organoleptické hodnocení, fyzikální, chemické, biologické a mikrobiologické zkoušky. [13]

Při organoleptickém neboli sensorickém hodnocení se sleduje vzhled, zápach, barva či chuť léčiv. Mezi fyzikální zkoušky lze u roztoků léčiv zařadit zkoušku čirosti. Je možné sledovat případnou sraženinu či zákal v důsledku reakce s obalem. Dále je možné stanovit rychlost sedimentace a objem sedimentu nebo disoluční profil léčiva. Pomocí zkoušek chemických je možné odhalit vznik rozkladných produktů. Mezi rozkladné procesy se řadí oxidace, hydrolyza nebo rozklad pomocí světla. Testování fotostability slouží k demonstraci, že vystavení léčiva světlu, nezpůsobí žádné změny v jeho vlastnostech. Během biologických a mikrobiologických zkoušek se testuje mikrobiologická nezávadnost, zkouška sterility, zkouška ke stanovení bakteriálních endotoxinů a další. [14]

1.3.2.1 Typy stabilitních testů

Podle podmínek zátěže se stabilitní testy dělí na stresové, zrychlené a dlouhodobé.

Stresové testy

Stresové testy jsou prováděny před registrací léčiva jako předběžná studie. Během těchto testů je léčivo podrobena extrémní fyzikální a chemické zátěži za účelem urychlení fyzikální změny či rozpadu léčiva. Výsledkem tohoto testu by mělo být stanovení základních vlastností léčiva během zátěžových situací, které simulují podmínky výroby,

transportu a působení vnějších vlivů. Při stresových testech se zkoumá vliv teploty, vlhkosti, působení světla a pH na stabilitu léčiva. Trvání testu by mělo být maximálně 3 měsíce. [13]

Zrychlené testy

Tyto testy se provádí za extrémních skladovacích podmínek, kdy je sledováno urychlení chemického rozkladu či fyzikální změny léčiva. Zrychlené testy by se měly provádět každé 3 měsíce během 1. roku skladování, každý 6. měsíc během 2. roku skladování a následně jednou ročně. [14]

Dlouhodobé testy

Dlouhodobé testy se provádějí z důvodu určení doby použitelnosti léčiva. Léčivé přípravky se testují v originálním obalu. Podmínky, pro skladování léčiv, závisí na klimatickém pásu, ve kterém se daný stát nachází. Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) se řadí jednotlivé země do pásem podle průměrných hodnot teplot a vlhkosti vzduchu. Česká republika se řadí mezi země, kde se léčiva testují při 25 °C a 60% vlhkosti vzduchu po dobu 5 let. [13]

1.3.3 Metody studia tepelné stability léčiv

Termickou analýzou se rozumí soubor technik, při nichž je měřena změna fyzikálních vlastností látek v závislosti na teplotě. Ve farmaceutickém průmyslu je znalost těchto vlastností klíčová pro výrobu stabilního a vyhovujícího léčivého přípravku. V porovnání s jinými metodami (prášková rentgenová difrakce nebo spektrální metody), je termická analýza relativně rychlá, vyžaduje jen malé množství vzorku, ale je metodou destruktivní. Ve výzkumu a vývoji léčiv se nejčastěji používají diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), dále diferenční termická analýza (DTA) a termogravimetrie (TG). [15]

1.3.3.1 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie je nejrozšířenější technikou termické analýzy z důvodu rychlého a snadného získávání velkého množství informací o analyzované látce. Tato metoda se používá ke sledování tepelně zabarvených dějů, ke kterým dochází během procesů ohřívání a ochlazování nebo udržování vzorku v izotermickém prostředí. Sleduje se, při jakých teplotách dochází k těmto změnám a jak velké tyto změny jsou. Zaznamenané tepelné změny umožňují identifikovat děje, ke kterým ve vzorku dochází, a charakterizovat

materiál ve vztahu k fázovým přechodům (skelný přechod, krystalizace, rekrystalizace, tání), dehydratačním a desorpčním dějům, tepelným rozkladům a dalším chemickým přeměnám. [16]

Na základě typu experimentu se volí rychlost ohřevu, nejčastěji v rozsahu 5 – 20 K/min. DSC přístroje se používají pro měření v rozsahu teplot od -195 °C do 750 °C. [15] Tepelný tok je hlavní veličinou, která je pomocí DSC měřena. Zaznamenává se jako funkce teploty a času. Pokud dochází k dodávání tepelného toku do vzorku, jedná se o endotermický děj. Pokud se naopak jedná o uvolňování tepelného toku ze vzorku, jedná se o děj exotermický. Mezi endotermní děje probíhající při ohřevu léčiv se řadí dehydratace, desorpce rozpouštědel, tepelný rozklad a z fázových transformací pak skelný přechod a tání. Nejčastější exotermní děje jsou oxidace a krystalizace. Uvedené procesy jsou zaznamenávány ve formě píků na DSC křivce. [16] Výjimkou je skelný přechod, který se projevuje endotermní skokovou změnou, která může obsahovat i takzvaný „upper peak“ [17]. Tento efekt je neoddelitelný od skelného přechodu a objevuje se u silně relaxovaných amorfních materiálů. V literatuře je tento efekt někdy chybně interpretován jako DSC pík. Technikou DSC bylo prováděno experimentální měření v experimentální části této práce.

Speciální technikou je rychloskenovací DSC („fast scan DSC“), která se často využívá ve farmacii. Tato metoda je podobná klasické DSC technice, využívá však velmi malého množství vzorku (0,2–1 µg) a rychlostí ohřevu až 10⁶ K/min. Tyto experimentální podmínky umožňují identifikovat léčiva v metastabilním stavu, která by během ohřevu standardní rychlostí procházela transformací na stabilní fázi. [18]

1.3.3.2 Diferenční termická analýza

Jednou z nejstarších technik termické analýzy je právě diferenční termická analýza (DTA). Tato metoda zaznamenává teplotní rozdíl mezi referenčním a měřicím kelímkem. Referenční kelímkem může být prázdný nebo obsahovat látku, která během zvoleného teplotního programu nemění své vlastnosti a má podobnou teplotní vodivost jako studovaný vzorek. Měření se zpravidla uskutečňuje za konstantní rychlosti ohřevu (5 – 20 K/min). Výhodou této techniky je možnost měření od pokojové teploty až do vysokých teplot kolem 2 400 °C. Nevýhodou je nižší citlivost k probíhajícím tepelným změnám. Ve farmacii je tato metoda méně využívána právě z důvodu časté potřeby měřit při nízkých teplotách a požadované vyšší citlivosti. [19]

1.3.3.3 Termogravimetrie

K základním metodám termické analýzy lze jednoznačně zařadit i metodu termogravimetrie. Pomocí této metody je možné zaznamenat změny v hmotnosti studovaného vzorku v závislosti na teplotě. Vzorky lze měřit dvěma způsoby – dynamickým a statickým. Během dynamického měření teplota nepřetržitě roste konstantní rychlostí, kdežto během měření statického jsou podmínky izotermní. [15] Po provedení experimentálního měření je získána termogravimetrická křivka, ze které lze poznat, kolik rozkladných reakcí ve vzorku proběhlo, v jakých rozmezích teplot k rozkladným reakcím dochází a jak velká část hmotnosti během měření ubyla. [20]

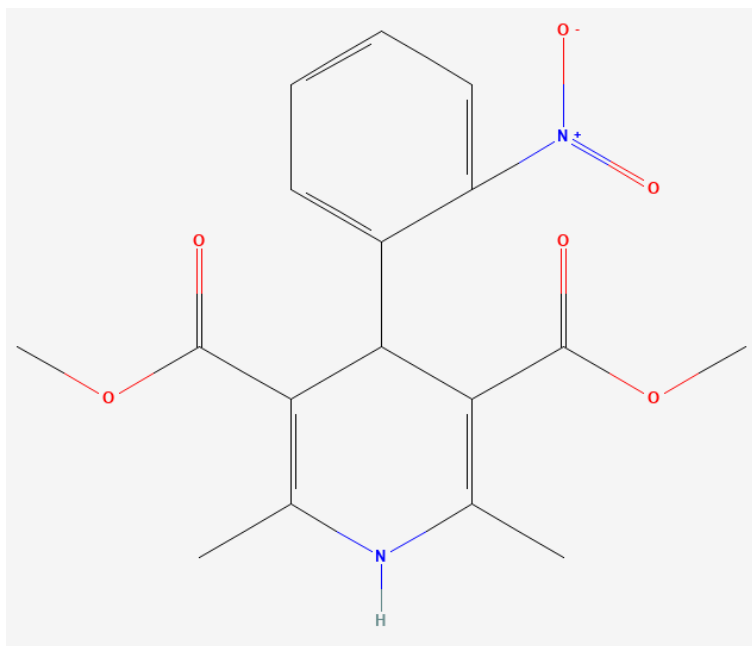
1.3.3.4 Simultánní termická analýza

Simultánní termická analýza je typ termické analýzy, který umožňuje provést dvě termické analýzy současně. Do této analýzy lze zařadit termogravimetrii simultánně prováděnou s diferenční termickou analýzou (TG/DTA) nebo s diferenční skenovací kalorimetrií (TG/DSC). Hlavní výhodou takto prováděných termických analýz je možnost měřit více vlastností vzorku současně za stejných experimentálních podmínek a získat tak komplexnější pohled na děje probíhající ve vzorku během ohřevu. Další výhodou je také úspora času a nízká spotřeba vzorku. [19; 21]

1.4 Léčivo nifedipin

Experimentální část této práce je zaměřena na studium teplotní stability léčiva nifedipin (NIF).

Toto léčivo, chemicky dimethyl-(1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitrofenyl)-3,5-pyridindikarboxylát), se může vyskytovat ve formě zlatavě žlutých krystalů či ve formě stejně barevného prášku. [22]



Obrázek 4: Strukturální vzorec léčiva NIF ve 2D [22]

Nifedipin patří do skupiny blokátorů kalciových kanálů, přesněji ho lze zařadit do podskupiny dihydropyridinů. Primárně se NIF využívá k léčbě hypertenze (vysoký krevní tlak) a k léčbě stabilní angíny pectoris. [22] Dle Státního ústavu pro kontrolu léčiv, léčivý přípravek s názvem Cordipin XL obsahuje jako léčivou látku právě nifedipin.

1.4.1 Mechanismus účinku

Nifedipin blokuje kalciové kanály typu L, čímž dochází k zamezení průniku vápníku do buněk srdečního svalu a hladkého svalstva koronárních arterií a periferních cév. Snížením intracelulárního obsahu vápníku dojde ke snížení rezistence cév a dilatace tepen. Takto se docílí snížení krevního tlaku a zvýšení transportu kyslíku do srdce. [23]

1.4.2 Dávkování

Nifedipin se užívá ve formě tabletek, které mohou být s okamžitým nebo prodlouženým účinkem uvolňování léčiva. Denní dávka léčiva by měla být při léčbě hypertenze či angíny pectoris 40 miligramů. Tabletky s okamžitým účinkem vyžadují několikanásobné denní dávkování. To může způsobovat více nežádoucích účinků z důvodu rychlé vazodilatace a aktivace sympatiku. Nifedipin by neměly užívat ženy během těhotenství, pokud si to nevyžaduje jejich klinický stav. O přesném dávkování by se každý, kdo léčivo užívá, měl informovat u svého ošetřujícího lékaře. [23]

1.4.3 Nežádoucí účinky

Užívání léčiva nifedipin je spjato také s řadou vyskytujících se nežádoucích účinků. Nežádoucí účinky se objeví zhruba u 30 % pacientů užívajících toto léčivo. Mezi časté nežádoucí účinky lze zařadit nadýmání, otok obličeje, otok horních i dolních končetin, kašel, bolest hlavy nebo svalové křeče. Méně časté nežádoucí účinky jsou bolest na hrudi, horečka, zmodrání rtů a konečků prstů nebo zvracení. [24]

1.4.4 Farmakokinetické vlastnosti

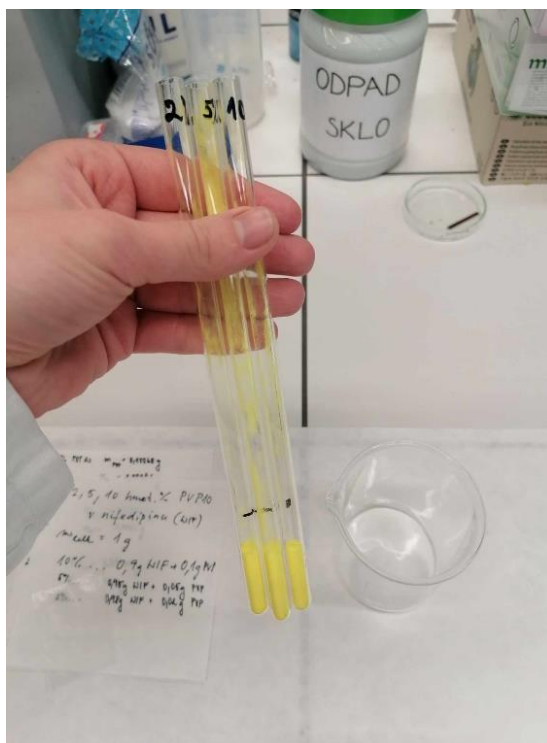
Pomocí farmakokinetických vlastností je možné popsat chování léčiva v lidském organismu. Při perorálním podání se nifedipin velmi rychle a téměř všechen vstřebává. Maximální koncentrace v lidském organismu dosahuje po 5–7 hodinách po užití přípravku. Souběžná konzumace potravin s dávkováním léčiva napomáhá k rychlejšímu dosažení maximální plazmatické koncentrace než při podání léčiva nalačno. Nifedipin se v organismu váže na plazmatické bílkoviny a je schopen prostupovat hematoencefalickou bariérou a placentou. Většina dávky léčiva se vylučuje močí ve formě metabolitů, zbytek dávky je vylučován stolicí. [24]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Tato kapitola bude věnována především podrobnému popisu způsobu přípravy vzorku k analýze. Nejprve budou popsány jednotlivé kroky, které byly nezbytné k přípravě reprezentativních vzorků. Dále budou uvedeny metody a techniky, které byly využity pro jejich charakterizaci. Budou popsány podmínky, za kterých byla experimentální měření prováděna.

2.1 Příprava vzorku

Pro testování stability amorfních léčiv bylo vybráno léčivo nifedipin (NIF), jehož vlastnosti byly modifikovány přidávkem polymeru polyvinylpyrrolidon (PVP10) o molekulové hmotnosti 10 kg/mol. Celkem bylo připraveno 5 vzorků léčiva nifedipin s příměsí 0, 2, 5, 10 a 20 hm. % polymeru PVP10. Pro přípravu vzorků byl použit nifedipin čistoty $\leq 98\%$ (Sigma Aldrich) a polyvinylpyrrolidin ($M = 10$ kg/mol, Sigma Aldrich). Látky byly naváženy v odpovídajícím hmotnostním poměru na analytických vahách tak, aby celková navážka vzorku činila přibližně 1 g. Navážené vzorky byly přesypány do úzkých skleněných zkumavek (obrázek 5), které byly vloženy do pícky, ve které došlo k tavení vzorku léčiva s odpovídajícím množstvím polymeru při teplotě $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut.



Obrázek 5: Vzorky léčiva nifedipin s příměsí PVP10

Po úplném roztavení léčiva s polymerem byly zkumavky se vzorky prudce ochlazeny v ledové lázni. Tímto procesem vznikla amorfni forma léčiva. Zkumavky byly následně kladivem rozbity a jednotlivé vzorky byly přemístěny do lékovek. Před měřením byly vzorky nadrceny v achátové misce na jemnější prášek. Nadrcené vzorky ve formě jemného prášku byly pomocí sít (obrázek 6) rozděleny do frakcí podle velikosti částic (<125, 125–180, 180–250, 250–300, 300–400 μm).



Obrázek 6: Síta pro rozdělení vzorku dle velikosti částic



Obrázek 7: Lis k hermetickému uzavření vzorků

2.2 Měření pomocí DSC

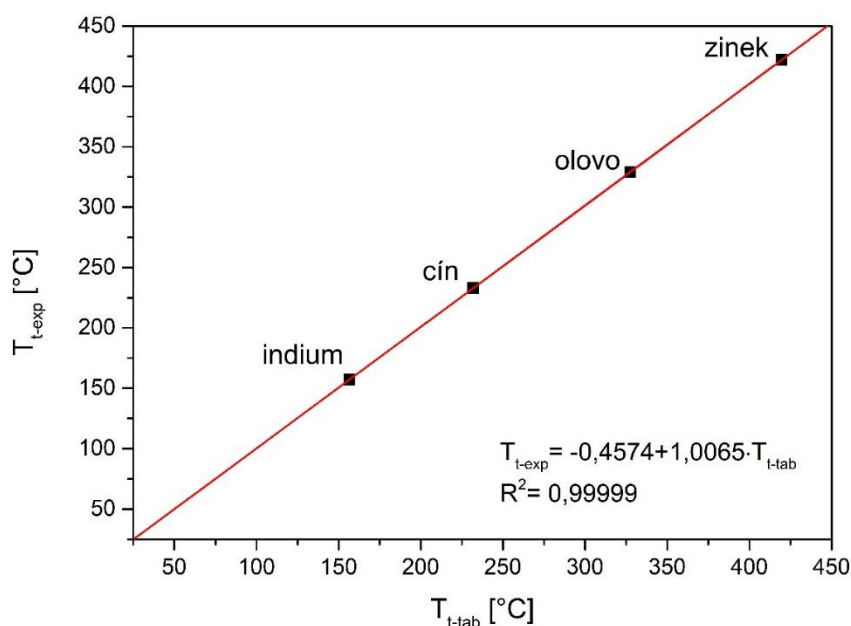
Pro měření stability vzorků léčiva NIF byl použit diferenční skenovací kalorimetr DSC 2500 od výrobce TA Instruments se softwarem TRIOS (obrázek 8). Součástí přístroje je autosampler pro 54 vzorků a chladičí zařízení RSC 90 umožňující měření od teplot $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přístroj DSC 2500 využívá patentovanou technologii Tzero, která umožňuje snímat tepelný tok s vyšší přesností a citlivostí. [25]



Obrázek 8: Diferenční skenovací kalorimetr DSC 2500 (výrobce TA Instruments) [25]

Do hliníkových DSC kelímků bylo naváženo 3–4 mg práškového vzorku dané frakce s různou příměsí polymeru PVP10. Kelímky byly přiklopeny víčkem, hermeticky uzavřeny na lisu (obrázek 7) a připraveny k měření. Měření probíhalo za neizotermních podmínek od teploty $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ při rychlostech ohřevu 2, 5 a 10 K/min . Dále bylo několik vzorků ponecháno při pokojové teplotě (kolem $22\text{ }^{\circ}\text{C}$) několik desítek hodin a následně změřeno stejným postupem. Naměřené DSC křivky byly vyhodnoceny pomocí softwaru TRIOS.

Přístroj byl předem nakalibrován. Pro teplotní kalibraci byly použity čisté kovy s přesně známými teplotami a entalpiemi tání. Jako standardy byly použity indium, cín, olovo a zinek. Standardy byly před měřením kalibrace roztaveny, aby byl maximalizován styk kovu s dnem kelímku. Během následného ohřevu, byl pak zaznamenán DSC pík tání, z něhož byla vyhodnocena teplota tání kovu jako extrapolovaný počátek píku tání ($T_{\text{t-onset}}$). Hodnoty získané z kalibračního experimentu byly porovnány s hodnotami tabelovanými a na základě odchylek byla stanovena teplotní korekce přístroje. Získaná kalibrační křivka je zakreslena na obrázku 9.

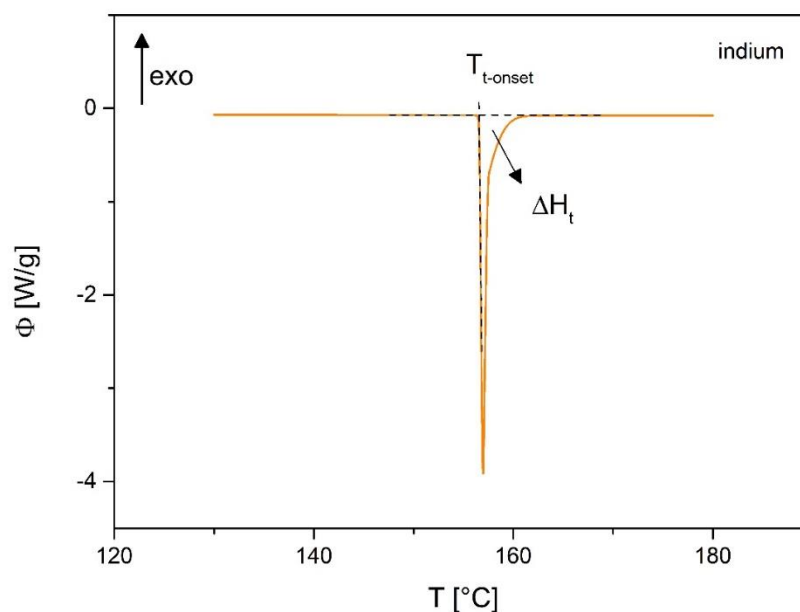


Obrázek 9: Teplotní kalibrační křivka za využití čistých kovů (indium, cín, olovo a zinek)

Kalibrace tepelného toku zajišťuje správné měření tepelných toků. Ke kalibraci se opět využívají látky s dobře definovanou teplotou tání a známou entalpií tání. Nejčastěji využívaným materiálem je indium, které bylo použito i v tomto případě. Byla vyhodnocena plocha píku tání odpovídající tabelované entalpii tání (ΔH_t). Z těchto hodnot byla stanovena konstanta měřicí cely. Obě kalibrace byly následně ověřeny opakováním experimentu s indiem a vyhodnocení $T_{t-onset}$ a ΔH_t , jak je ukázáno na obrázku 10. Stanovené hodnoty teploty a entalpie tání india jsou uvedeny v Tabulka 1 spolu s tabelovanými hodnotami a odchylkami. Zjištěné odchylky jsou výrazně nižší než doporučené pro ověření kalibrace (výrobce přístroje udává akceptovatelnou chybu 0,01 °C pro teplotu tání a 2 % pro entalpii tání).

Tabulka 1: Porovnání experimentálních hodnot s tabelovanými pro tání india

	ΔH_t [J/g]	$T_{t-onset}$ [°C]
Experimentální hodnota	28,798	156,596
Tabelovaná hodnota	28,576	156,598
Odchylka	0,222	0,002
Chyba [%]	0,8	



Obrázek 10: Kalibrační křivka tepelného toku za využití india

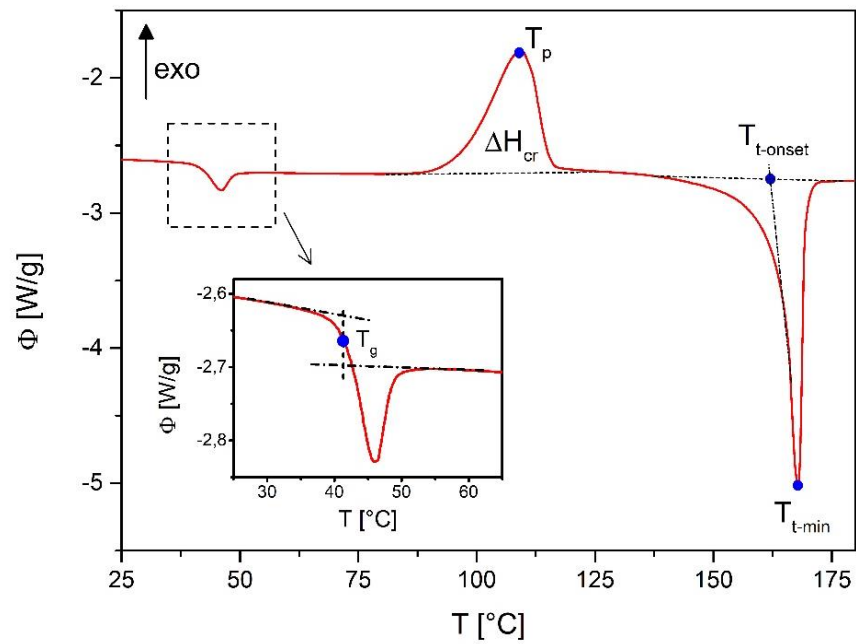
2.2.1 Vyhodnocení DSC křivek

Typická DSC křivka je ukázána na obrázku 11. První efekt, který se na DSC křivce objevuje, je endotermní skelný přechod. Projevuje se jako skoková změna základní linie tepelného toku, v tomto případě i s výrazným „upper“ píkem daným přípravou. Teplota skelného přechodu (T_g) se vyhodnotila jako teplota v polovině výšky skoku sestrojením dvou tečen, tečna k základní linii před skelným přechodem a tečna k základní linii po skelném přechodu. Zmiňovaná hodnota T_g se nachází na DSC křivce v polovině výšky skoku mezi oběma tečnami, jak je patrné na vloženém zvětšeném grafu uvnitř obrázku 11.

Druhým tepelným efektem, který se na křivce nachází, je krystalizace. Krystalizace se projevuje jako exotermní pík. Teplota maxima píku krystalizace (T_p) odpovídá nejvyššímu bodu krystalizačního píku a při dosažení této teploty je rychlost krystalizace nejvyšší. Plocha krystalizačního píku odpovídá hodnotě entalpie krystalizace (ΔH_{cr}).

Posledním efektem je proces tání. Tání je opačný děj než krystalizace, a tudíž se na křivce zobrazuje jako endotermní pík. Teplota tání onset ($T_{t-onset}$) je extrapolovaný počátek tání. Vyhodnocení $T_{t-onset}$ se provádí sestrojením tečny základní linie píku tání a sestrojením tečny v inflexním bodě náběhové hrany píku. V místě, kde tato tečna protne základní linii, se nachází extrapolovaná teplota počátku tání $T_{t-onset}$. V nejnižší bodě píku tání se nachází

minimum teploty tání (T_{t-min}). Přesnější informaci o procesu tání udává hodnota $T_{t-onset}$, protože minimum teploty tání se může měnit s množstvím zkoumaného vzorku.



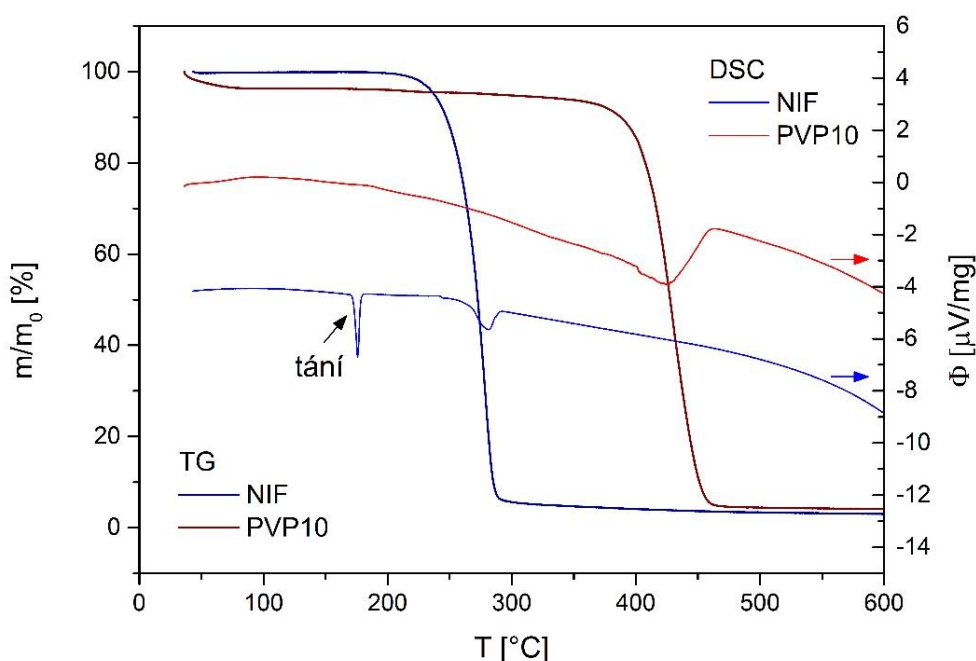
Obrázek 11: Vyhodnocení DSC křivky při rychlosti ohřevu 10 K/min s 10 hm. % PVP10

2.3 Měření pomocí STA

Metoda simultánní termické analýzy (STA) kombinuje několik termo-analytických technik do jednoho experimentu, což umožňuje komplexní charakterizaci měřeného vzorku. V experimentálním měření byla použita kombinace technik diferenční skenovací kalorimetrie a termogravimetrie. Pro měření byl využit přístroj NETZSCH STA 449F5 s přítokem dusíku o rychlostech 50 ml/min do pece a 20 ml/min do vah. Měření bylo provedeno do teplot 600 °C rychlostí ohřevu 5 K/min. Pro analýzu byl vzorek léčiva nifedipin a PVP10 navážen do otevřených hliníkových kelímků o objemu 85 μ l. Navážka léčiva činila 7–8 mg. Před samotným měřením byl proveden sken základní linie pouze s prázdnými kelímky. Kalibrace přístroje byla provedena obdobně jako u DSC pomocí tání čistých kovů (indium, cín, bismut, olovo a zinek).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

K popsání chování léčiva nifedipin v amorfní formě byla využita technika diferenční skenovací kalorimetrie a technika simultánní termické analýzy, která kombinuje techniku diferenční skenovací kalorimetrie a termogravimetrie. Bylo sledováno chování čistého amorfního NIF a změny způsobené přidávkem různého množství polymeru PVP10. Měření byla prováděna na práškových vzorcích různých frakcí za neizotermních podmínek při rychlostech ohřevu 2, 5 a 10 K/min. Na následujících grafech je ukázáno chování léčiva s příměsí a bez příměsi polymeru v oblasti skelného přechodu, dále v průběhu krystalizace a tání.

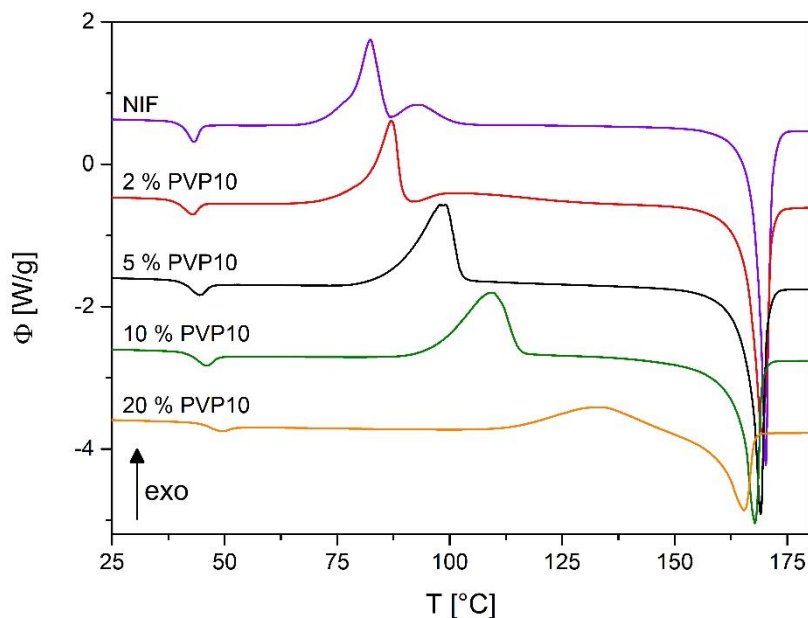


Obrázek 12: Porovnání STA křivek vzorků čistého NIF a polymeru PVP10 s rychlostí ohřevu 5 K/min

Před samotnou přípravou vzorků byla ověřena tepelná stabilita NIF a PVP10 pomocí měření STA. Na obrázku 12 je graficky znázorněno porovnání STA křivek vzorků čistého NIF (modré) a polymeru PVP10 (červené). Termogravimetrické křivky jsou zabarveny tmavě modře a vínově, DSC křivky jsou zakresleny modře a červeně. U čistého nifedipinu pozorujeme, že rozkladné procesy, a tím i úbytek hmotnosti vzorku, nastávají až po samotném procesu tání při teplotách nad 200 °C. V rozmezí teplot (0 – 180 °C), ve kterém byly amorfní vzorky připravovány a studovány, byl vzorek léčiva stabilní a nedocházelo k jeho rozkladu.

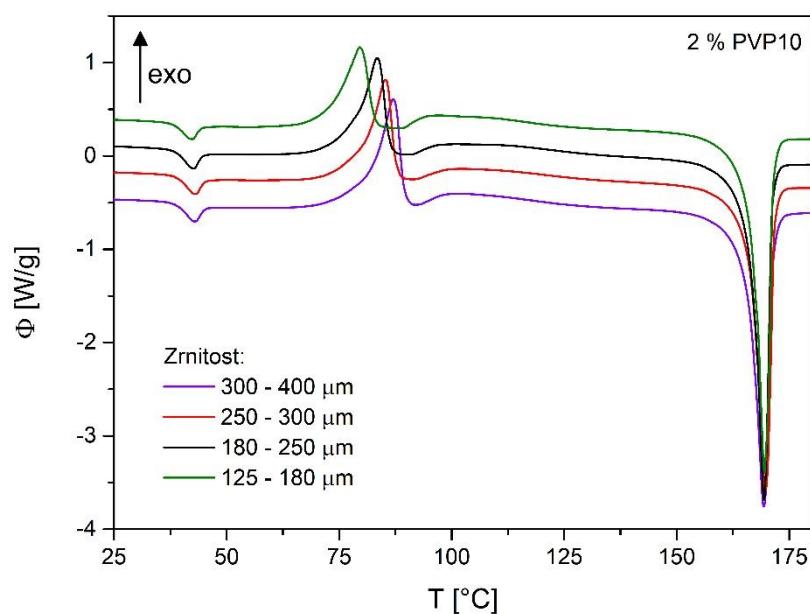
Polymer PVP10 na počátku měření vykazoval mírný pokles hmotnosti v řádech jednotek procent. Tento úbytek je dán vlhkostí, kterou polymer disponoval před samotným měřením. Výrazné rozkladné procesy polymeru nastávají nad teplotou 350 °C. Při teplotách do 180 °C je polymer stabilní a tedy využitelný jako přídatná látka pro přípravu amorfního léčiva.

Na obrázku 13 je celkové porovnání DSC křivek všech vzorků s ohledem na přidání množství polymeru PVP10. Prvním endotermním efektem při teplotách 40–50 °C je skelný přechod. S přibývajícím hm. % PVP10 ve vzorku je efekt skelného přechodu méně zřetelný. Dále je možno pozorovat, že se skelný přechod posouvá směrem k vyšším teplotám. Exotermní efekty v oblasti teplot 70–150 °C jsou spojeny s krystalizací nifedipinu ve vzorku. Teploty maxim píků krystalizace se s přibývajícím hm. % PVP10 ve vzorcích posouvají opět směrem k vyšším hodnotám. U vzorku čistého NIF jsou zřetelné dva krystalizační píky. Druhý z krystalizačních píků se s přidáním PVP10 stává méně výrazný. Krystalizační pík u vzorku NIF s 20 hm. % PVP10 přechází v pík tání, což znamená, že proces krystalizace není před počátkem tání dokončen. Posledním endotermním efektem je tání zkrystalizovaného nifedipinu. Teplota tání se s příměsí PVP10 dle očekávání posouvá k nižším teplotám a pík tání se vlivem příměsí rozšiřuje.



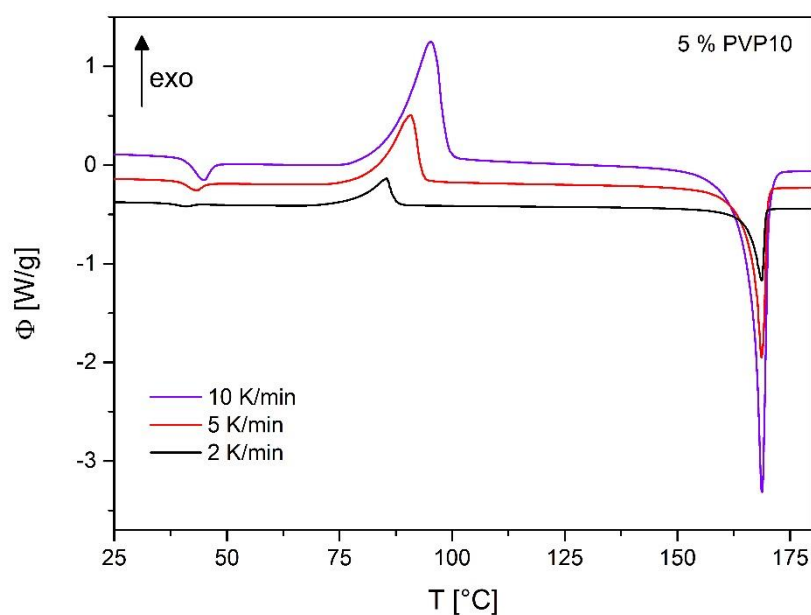
Obrázek 13: DSC křivky při ohřevu 10 K/min pro frakce 300–400 μm vzorků NIF s různou příměsí hm. % PVP10

U vzorků stejného složení byl sledován vliv zrnitosti na jednotlivé procesy – jak je vidět na obrázku 14. Zatímco skelný přechod a tání nejsou zrnitostí prášku ovlivněny, na teplotní maxima píků krystalizace výběr frakce vliv má. Na grafu je možno vidět, jak se teplota krystalizace jednotlivých frakcí vzorku NIF s 2 hm. % PVP10 posouvá směrem k vyšším teplotám. Při nižší teplotě jako první krystalizuje vzorek o velikosti frakce 125–180 μm . Teplota maxima píku T_p se se zvyšující velikostí frakce posouvá k vyšším hodnotám, tudíž nejvyšší hodnoty teplotního maxima píku krystalizace vykazuje vzorek o velikosti frakce 300–400 μm . Toto chování naznačuje, že na krystalizaci nifedipinu má velký vliv růst krystalů z nukleí na povrchu zrn materiálu.



Obrázek 14: DSC křivky při ohřevu 10 K/min pro vzorek NIF s 2 hm. % PVP10 s různou zrnitostí

Chování vzorků léčiva během měření ovlivňuje i rychlost ohřevu, jak je zřejmé z obrázku 15. Zde je možné pozorovat průběh DSC křivek s rychlostí ohřevu 2, 5 a 10 K/min pro vzorek NIF s 5 hm. % PVP10. Všechny měřené procesy jsou výraznější pro křivky s vyšší rychlostí ohřevu, protože je měřený tepelný tok přímo úměrný rychlosti ohřevu. Dále je možné pozorovat posun teploty skelného přechodu směrem k nižším hodnotám se snižováním rychlosti ohřevu, což je dáno vyšším časem, který je materiálu dán pro přiblížení se k rovnovážnému stavu neboli strukturní relaxaci.

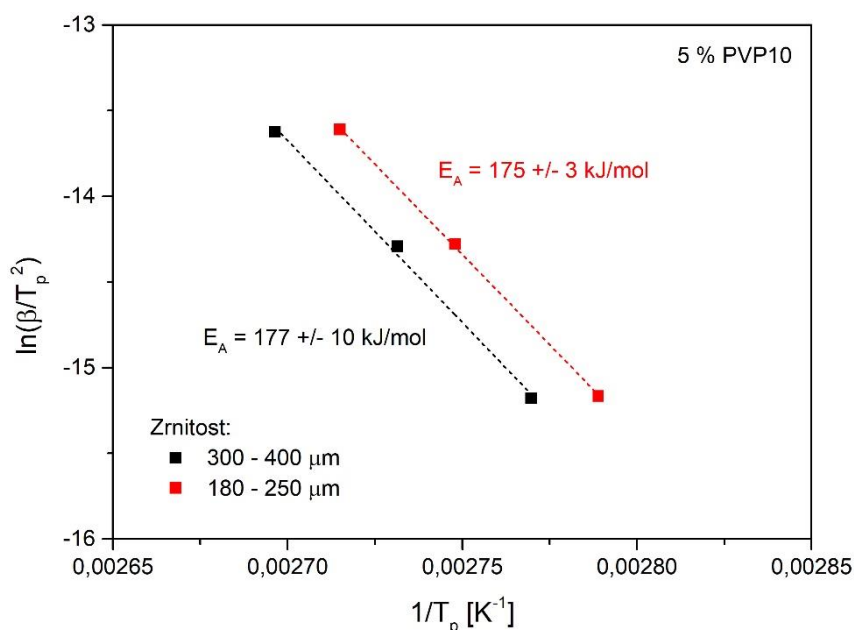


Obrázek 15: Porovnání DSC křivek vzorku léčiva s 5 hm. % PVP10 s různými rychlostmi ohřevu

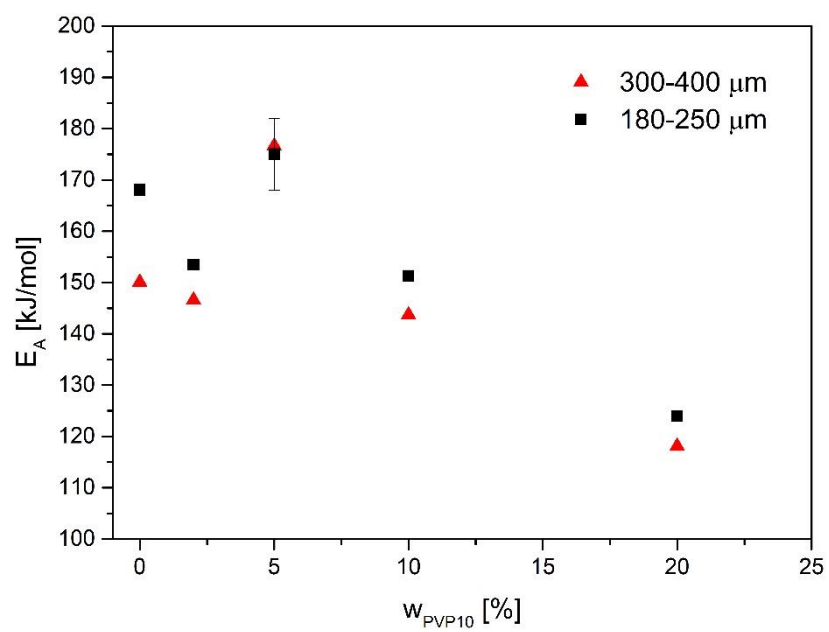
Z obrázku 15 je také patrný výrazný posun maxim krystalizačních píků T_p k vyšším teplotám s rostoucí rychlostí ohřevu. Tohoto jevu se využívá při stanovení hodnoty aktivační energie krystalizace pomocí Kissingerovy metody. [26] Aktivační energie je minimální hodnota energie, kterou musí mít reagující částice, aby mohla proběhnout chemická reakce. Je to jednoduchý a často používaný způsob vyhodnocení kinetiky krystalizace. Metoda poskytuje jedinou hodnotu E_A bez ohledu na složitost procesu. Aktivační energii krystalizace je možné stanovit z posunu hodnot teplotních maxim krystalizačních píků T_p při různých rychlostech ohřevu pomocí rovnice (1).

$$\ln\left(\frac{\beta}{T_p^2}\right) = konst. - \frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_p}\right) \quad (1)$$

Na obrázku 16 je příklad výpočtu E_A pro vzorek léčiva s 5 hm. % polymeru pro zrnitosti vzorků 300–400 a 180–250 μm . Hodnoty aktivačních energií příslušných frakcí pro stejné složení vzorku se shodují v rámci experimentální chyby. Porovnání aktivačních energií krystalizace vzorků léčiva NIF dvou velikostních frakcí s příměsí polymeru PVP10 je zobrazeno v obrázku 17. Hodnota E_A má tendenci se snižovat s přibývajícím množstvím polymeru ve vzorku (kromě hodnoty E_A pro vzorek NIF s 5 hm. % PVP10). Pokud porovnáme vzorky léčiva se shodujícím se obsahem polymeru, ale s odlišnou velikostí frakce, zjistíme, že vzorek o větší frakci vykazuje nižší hodnotu aktivační energie. Dále je v grafu znázorněna průměrná chyba měření u vzorku NIF 5 hm. % PVP10.

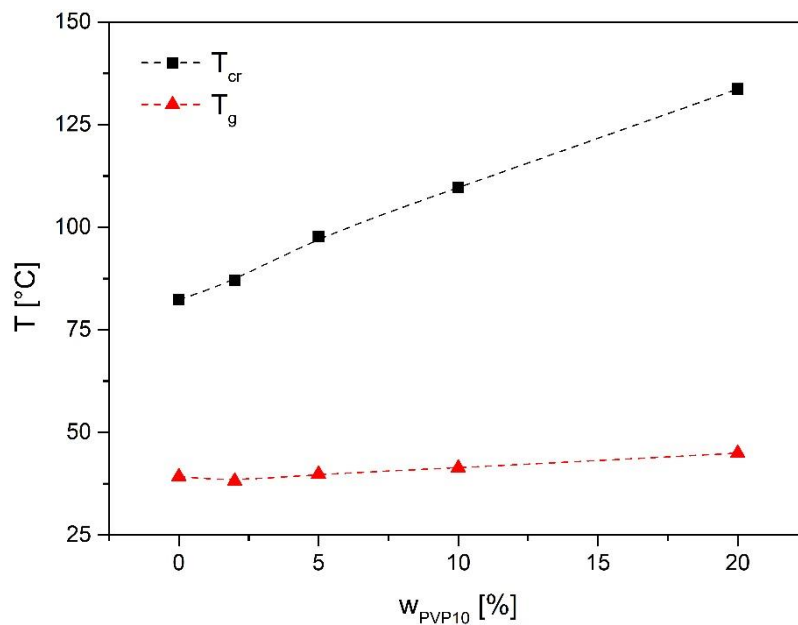


Obrázek 16: Stanovení aktivační energie pro NIF s 5 hm. % PVP10 a zrnitosti

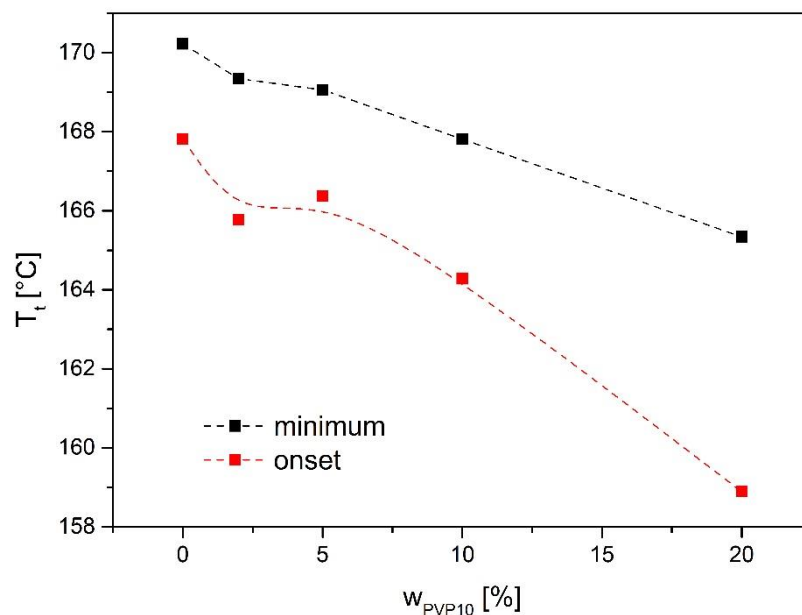


Obrázek 17: Závislost E_A krystalizace na příměsi hm. % PVP10 v NIF pro dvě frakce

Na následujících dvou grafech (obrázek 18 a obrázek 19) bude popsáno, jak množství polymeru obsaženého ve vzorcích ovlivňuje efekty viditelné na DSC křivkách. Těmito efekty jsou skelný přechod, krystalizace a tání.



Obrázek 18: Závislost T_{g} a T_{cr} na hm. % příměsi PVP10 v NIF pro rychlosti ohřevu 10 K/min

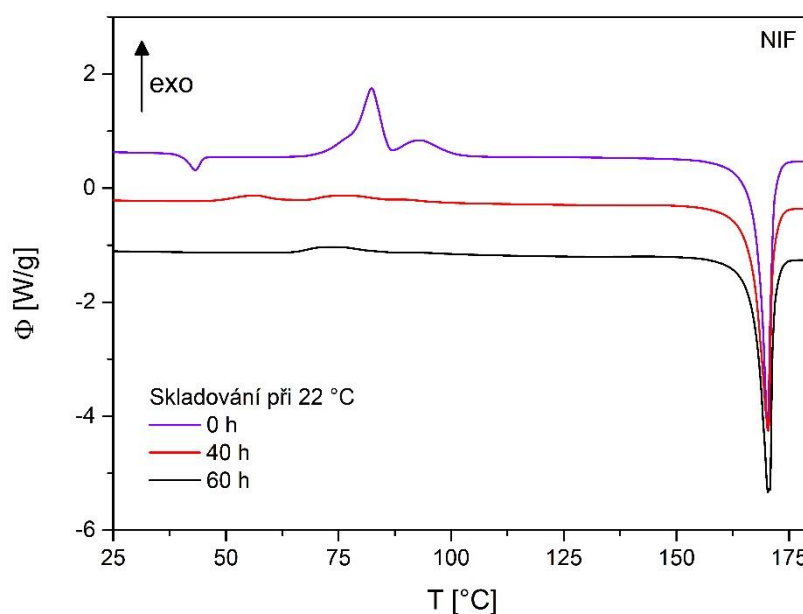


Obrázek 19: Závislost $T_{t-\text{min}}$ a $T_{t-\text{onset}}$ na hm. % příměsi PVP10 v NIF pro ohřev 10 K/min

Teplota skelného přechodu se s přibývajícím obsahem polymeru ve vzorku jen velice nepatrně zvyšuje. Oproti tomu lze pozorovat, že teplota krystalizace téměř dokonale lineárně vzrůstá s obsahem PVP10 ve vzorku. Čistý nifedipin krystalizuje při teplotě 83 °C a vzorek s obsahem NIF 20 hm. % PVP10 krystalizuje až při teplotě 135 °C. Přídavek polymeru tedy stabilizuje amorfni formu léčiva a zvyšuje odolnost vůči krystalizaci.

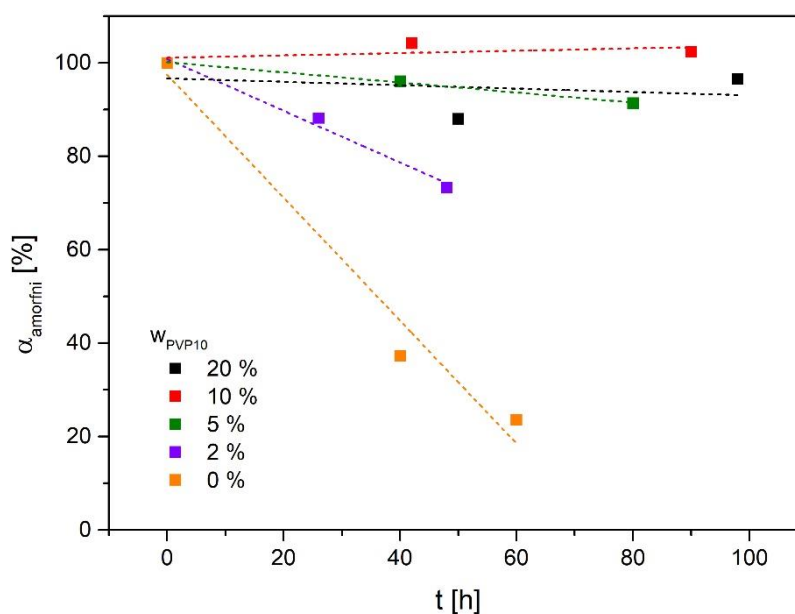
U procesu tání je možné vyhodnocovat dvě teploty. A to teplotu extrapolovaného počátku píku tání $T_{t-onset}$ a teplotu minima píku tání T_{t-min} . Z obrázku 19 je patrné, že se teplota tání jednotlivých vzorků snižuje s přibývajícím obsahem polymeru. Vzorek, který obsahoval pouze čisté léčivo, vykazuje nejvyšší teplotu tání. Oproti tomu vzorek, který obsahoval léčivo s příměsí 20 hm. % polymeru, vykazuje nejnižší teplotu tání. Proces tání také s přídavkem příměsi polymeru probíhá v širším rozsahu teplot tak, jak je předpokládáno dle fázových diagramů.

Dalším zajímavým jevem, který lze porovnat, je vliv doby skladování vzorku při pokojové teplotě (20–25 °C) na průběh DSC křivky. Vzorek čistého NIF byl skladován při pokojové teplotě po dobu 40 a 60 hodin. Na obrázku 20 lze vidět porovnání se vzorkem, který byl skladován v chladničce při teplotě 5 °C a v přístroji měřen ihned po navážení (fialová křivka). Čerstvý amorfní nifedipin na DSC křivkách vykazuje viditelný skelný přechod, komplikovaný krystalizační proces sestávající z nejméně dvou krystalizačních píků a ostrý pík tání. Naopak u vzorků skladovaných delší dobu při pokojové teplotě (červená a černá křivka) je jediným výrazně viditelným efektem tání. Skelný přechod u těchto vzorků není viditelný a také proces krystalizace je velmi málo zřetelný. Výsledky tak ukazují, že během skladování amorfních vzorků při pokojové teplotě dochází k postupné krystalizaci nifedipinu.



Obrázek 20: Porovnání DSC křivek čistého NIF s různou dobou skladování vzorku

Pomocí testování amorfních vzorků, skladovaných při pokojové teplotě, je možné stanovit množství amorfního léčiva, které zakrystalizovalo v průběhu samotného skladování, respektive množství léčiva, které zůstalo v amorfní formě. Tento jev je možné sledovat na obrázku 21. Doba skladování byla pro jednotlivé vzorky odlišná a pohybovala se v řádech desítek hodin (od 26 do 96 hodin). Výrazně nestabilní je vzorek čistého amorfního nifedipinu, který po 60 hodinách při pokojové teplotě téměř z 80 % přešel do krystalické formy. Vzorek, který obsahoval 2 hm. % polymeru, po 48 hodinách zakrystalizoval zhruba z jedné třetiny. Další vzorky léčiva s vyšším obsahem polymeru i po 4 dnech skladování při pokojové teplotě stále disponují z více jak 90 % amorfní formou. U těchto vzorků jsou odchylky již dány chybou měření a není možné stanovit procento amorfní formy přesně. Přesto na základě všech výsledků je možné konstatovat, že přidavek polymeru k nifedipinu významným způsobem stabilizuje amorfní formu léčiva a zvyšuje jeho odolnost vůči krystalizaci. Efekt je dostatečný pro vzorky s více jak 10 hm. % PVP10, kde případné rozdíly v naměřených hodnotách entalpie krystalizace jsou v rámci experimentální chyby.



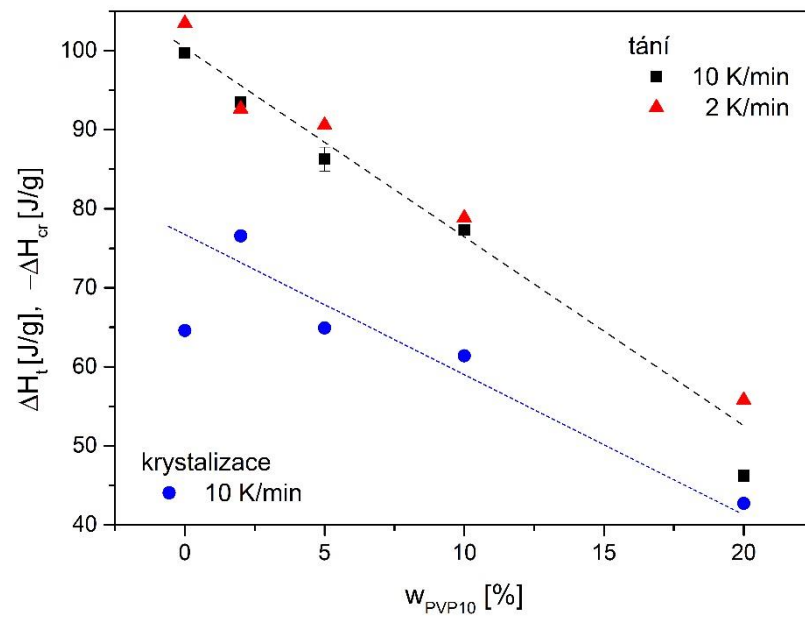
Obrázek 21: Vliv doby skladování při pokojové teplotě na amorfnost léčiva NIF s různým obsahem příměsi PVP10

Obrázek 22 zobrazuje závislost entalpie krystalizace a entalpie tání s ohledem na množství polymeru obsaženého ve vzorku. Krystalizace je exotermní děj, což znamená, že děj je doprovázen uvolňováním tepla do okolí. Množství uvolněného tepla se s přibývajícím množstvím polymeru ve vzorku snižuje, což odpovídá skutečnosti, že se snižuje množství nifedipinu ve vzorku a polymer sám nekrystalizuje. Hodnota $-\Delta H_{cr}$ vzorku s obsahem čistého nifedipinu je mnohem nižší, než by bylo předpokládáno. To může být z důvodu krystalizace vzorku ještě před samotným měřením vzhledem k nižší stabilitě amorfního čistého NIF při skladování a pravděpodobně i během drcení a manipulace. Hodnota tedy odpovídá krystalizaci jen zbylé amorfní části vzorku. Vzorek NIF, který obsahuje 2 hm. % polymeru, během krystalizace uvolňuje téměř dvojnásobné množství tepla než vzorek s 20 hm. % polymeru. V případě vzorku s 20 hm. % PVP10 může být entalpie krystalizace nižší také díky tání NIF, které začíná ještě, než stihne veškerý nifedipin zakrystalizovat (viz Obrázek 13).

Entalpie tání se mění v závislosti na obsahu hm. % polymeru PVP10 ve vzorku léčiva. Tání je opačný děj než krystalizace. Jedná se tedy o endotermický děj. To znamená, že musíme do systému dodat určité množství tepla, aby proces tání mohl proběhnout. Z grafu je jasné patrné, že s přibývajícím množstvím polymeru ve vzorku, se potřebné teplo k proběhnutí procesu tání lineárně snižuje, což odpovídá snižujícímu se zastoupení nifedipinu ve směsi. Tato závislost je méně ovlivněna podmínkami měření a skladování vzorků než v případě entalpie krystalizace. Přesto i zde entalpie tání vzorku s 20 hm. % polymeru může být ovlivněna překrytím procesu krystalizace a tání na DSC křivce. Pokud byly vzorky ohřívány různou rychlostí ohřevu (v tomto případě 2 a 10 K/min), hodnoty ΔH_t se velice nepatrně odlišují. U vzorku NIF 5 hm. % PVP10 je znázorněna průměrná chyba vzniklá při měření.

Porovnáním hodnot $-\Delta H_{cr}$ a ΔH_t na obrázku 22 bylo zjištěno, že hodnoty krystalizačních entalpií jsou v absolutní hodnotě nižší než entalpie tání. Částečně toto může být způsobeno závislostí hodnot entalpií na teplotě. Rozdíl je však výrazný a může být způsoben také chybou v odečítání základní linie píků krystalizace a tání, jelikož druhý krystalizační efekt je mnohem méně zřetelný a u většiny vzorků přechází přímo v tání. Přesto se zdá, že entalpie tání a krystalizace by mohly odpovídat stejné látce. Navíc z charakteru píku tání, který je velmi ostrý, je možné říci, že se jedná o tání jediné krystalické látky bez ohledu na počet viditelných krystalizačních efektů a obsah příměsi polymeru v nifedipinu. Tento závěr byl potvrzen pomocí práškové rentgenové difrakce. Pro všechny vzorky a teploty krystalizace 25, 80 a 125 °C

byla potvrzena stejná krystalická fáze α – nifedipin. Tato skutečnost není překvapivá vzhledem tomu, že se jedná o termodynamicky nejstabilnější krystalickou formu NIF.



Obrázek 22: Závislost ΔH_t (rychlost ohřevu 2 a 10 K/min) a $-\Delta H_{cr}$ (rychlost ohřevu 10 K/min) na příměsi hm. % PVP10 ve vzorku NIF

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala testováním stability amorfních léčiv a amorfních pevných disperzí, přičemž byl kladen větší důraz na tepelnou stabilitu. Pro testování byly vybrány metody diferenční skenovací kalorimetrie a simultánní termické analýzy. Bylo testováno amorfní léčivo nifedipin s příměsí polymeru polyvinylpyrrolidon (PVP10).

V rámci experimentů bylo zjištěno, že léčivo nifedipin i polymer PVP10 jsou tepelně stabilní do 200 °C a může tak být pro přípravu amorfního léčiva využito metody tavení a následného chlazení. Dále bylo zjištěno, že takto připravený amorfní nifedipin není stabilní při skladování za pokojové teploty a krystalizuje již v řádu hodin. Krystalizační proces v amorfním nifedipinu sestává ze dvou krystalizačních kroků, v obou krystalizuje stejná fáze α -nifedipin. Amorfní nifedipin je možné stabilizovat přidavkem polymeru, v případě této práce přidavkem PVP10 v množství 2 až 20 hm. %. Dostatečnou stabilitu vykazují vzorky obsahující více než 10 hm. % PVP10, které se nemění ani při skladování za pokojové teploty po dobu několika dní. Lepší stabilizace amorfního nifedipinu by mohlo být dosaženo přidavkem polymeru s vyšší molekulovou hmotností, než má PVP10.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] YU, Lian. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2001, 48(1), 27-42 [cit. 2024-06-01]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(01)00098-9
- [2] VRANIĆ, Edina. Amorphous Pharmaceutical Solids. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* [online]. 2018, 4(3), 35-39 [cit. 2024-06-01]. ISSN 1840-4812. Dostupné z: doi:10.17305/bjbms.2004.3383
- [3] SUN, Ye, Lei ZHU, Tian WU, Ting CAI, Erica GUNN a Lian YU. Stability of Amorphous Pharmaceutical Solids: Crystal Growth Mechanisms and Effect of Polymer Additives. *The AAPS Journal* [online]. 2012, 14(3), 380-388 [cit. 2024-05-30]. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-012-9345-6
- [4] BUDIMAN, Arif, Neng Vera NURANI, Eli LAELASARI, Muchtaridi MUCHTARIDI, Sriwidodo SRIWIDODO a Diah Lia AULIFA. Effect of Drug–Polymer Interaction in Amorphous Solid Dispersion on the Physical Stability and Dissolution of Drugs: The Case of Alpha-Mangostin. *Polymers* [online]. 2023, 15(14), 3034 [cit. 2024-06-11]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym15143034
- [5] BHUJBAL, Sonal, Biplob MITRA, Uday JAIN et al. Pharmaceutical amorphous solid dispersion: A review of manufacturing strategies. *Acta Pharmaceutica Sinica B* [online]. 2021, 11(8), 2505- 2536 [cit. 2024-05-31]. ISSN 22113835. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsb.2021.05.014
- [6] GRUBEROVÁ, Lucie a Bohumil KRATOCHVÍL. Pevné disperze málo rozpustných léčiv. *Chemické listy* [online]. 2019, 113, 383-390 [cit. 2024-05-31]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/3382/3340>
- [7] TEKADE, Avinash Ramrao a Jyoti Narayan YADAV. A Review on Solid Dispersion and Carriers Used Therein for Solubility Enhancement of Poorly Water Soluble Drugs. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2020, 10(3), 359-369 [cit. 2024-05-31]. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.34172/apb.2020.044

- [8] VRANÍKOVÁ, Barbora a Jan GAJDZIOK. *Metody používané ve farmaceutické technologii ke zvyšování biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv po perorálním podání*. Česká a slovenská farmacie [online]. 2015, 64 , 159-172 s. [cit. 2024-05-31]. ISSN 1805-4439. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2015-5-6/metody-pouzivane-ve-farmaceuticke-technologie-ke-zvysovani-biologicke-dostupnosti-spatne-rozpustnych-leciv-po-peroralnim-podani-57254>
- [9] PANDI, Palpandi, Raviteja BULUSU, Nagavendra KOMMINENI, Wahid KHAN a Mandip SINGH. Amorphous solid dispersions: An update for preparation, characterization, mechanism on bioavailability, stability, regulatory considerations and marketed products. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, 586, 119560 [cit. 2024-05-31]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119560
- [10] MATHERS, Alex, Fatima HASSOUNA, Martin KLAJMON a Michal FULEM. Comparative Study of DSC-Based Protocols for API–Polymer Solubility Determination. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2021, 18(4), 1742-1757 [cit. 2024-06-27]. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/acs.molpharmaceut.0c01232
- [11] KAWAKAMI, Kohsaku. Crystallization Tendency of Pharmaceutical Glasses: Relevance to Compound Properties, Impact of Formulation Process, and Implications for Design of Amorphous Solid Dispersions. *Pharmaceutics* [online]. 2019, 11(5), 202 [cit. 2024-05-30]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics11050202
- [12] JELIĆ, Dijana. Thermal Stability of Amorphous Solid Dispersions. *Molecules* [online]. 2021, 26(1), 238 [cit. 2024-06-10]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26010238
- [13] VETCHÝ, David. *Stabilitní testy ve farmacii*. Praktické lékařství [online]. 2006, , 2(6), 276- 277 [cit. 2024-06-10]. ISSN 1801-2434. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2006/06/09.pdf>
- [14] VETCHÝ, David, Karolína FRÝBORTOVÁ, Miloslava RABIŠKOVÁ a Adam HARING. *Testování stability léčivých přípravků*. Chemické listy [online]. 2006, 100, 24- 29. [cit. 2024-06-10]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_01_24-29.pdf
- [15] SEILEROVÁ, Lenka, Hana BRUSOVÁ, Bohumil KRATOCHVÍL a Lukáš KREJČÍK. *VYUŽITÍ METOD TERMICKÉ ANALÝZY VE VÝZKUMU A VÝVOJI LÉČIV*. Chemické listy [online]. 2012, 106, 890-895 [cit. 2024-06-11]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/828/828>

- [16] MATĚJKA, Pavel. *Charakterizace farmaceutických látek a jejich systémů se zaměřením na spektrální metody* [online]. VŠCHT Praha, s. 220 [cit. 2024-06-11]. Dostupné z: http://fchioppa.vscht.cz/uploads/AKskripta/Charakterizace%20farmaceutickych%20latek%20a%20jejich%20systemuupr_B.pdf
- [17] SICHINA, W. J. *Measurement of Tg by DSC* [online]. 5 [cit. 2024-06-27]. Dostupné z: <https://thermalsupport.com/wp-content/uploads/2018/05/PETech-09.pdf>
- [18] FORD, James L. a Timothy E. MANN. Fast-Scan DSC and its role in pharmaceutical physical form characterisation and selection. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, 64(5), 422- 430 [cit. 2024-06-27]. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2011.12.001
- [19] ŠTARHA, Pavel a Zdeněk TRÁVNÍČEK. *Termická analýza* [online]. UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI. Olomouc, 2011, 64 s. [cit. 2024-06-11]. Dostupné z: https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni_materialy/Termicka_analyza.pdf
- [20] POLANSKÝ, Radek. Teorie a praxe termogravimetrické analýzy. *Electroscope* [online]. 2008(1), 1-6 [cit. 2024-06-11]. Dostupné z: <https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/449/1/r1c1c5.pdf>
- [21] LEJSEK, Jaroslav. Optimalizace měřicích podmínek simultánní termické analýzy a jejich vliv na rozklad XLPE. In: FIŘT, Jaroslav. ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI. *FIŘT, Jaroslav ed. Elektrotechnika a informatika: XVIII. ročník konference doktorských prací Zámek Nečtiny*. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2017, s. 170-174. ISBN 978-80-261-0712-5. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/11025/26475>
- [22] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *PubChem: Nifedipine* [online]. 2024 [cit. 2024-06-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nifedipine>
- [23] KHAN, Kashif M. a Jayesh B. PATEL, Timothy J. SCHAEFER, ed. *Nifedipine* [online]. 2023 [cit. 2024-06-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537052/>
- [24] STÁTNÍ ÚSTAV PRO KONTROLU LÉČIV [SÚKL]. *Přehled léčiv* [online]. Praha, 2010 [cit. 2024-06-05]. Dostupné z: https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/detail-reg/0003033
- [25] Differential Scanning Calorimeters. In: *TA Instruments* [online]. [cit. 2024-05-16]. Dostupné z: <https://www.tainstruments.com/dsc-2500/>

- [26] VYAZOVKIN, Sergey. Kissinger Method in Kinetics of Materials: Things to Beware and Be Aware of. *Molecules* [online]. 2020, 25(12) [cit. 2024-05-30]
Dostupné z: doi:10.3390/molecules25122813