

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra farmaceutické technologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava sprejově sušeného prášku s různým množstvím chitosanu

Preparation of spray-dried powder containing different amount of chitosan

Hradec Králové, 2022

Michaela Pětioká

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

V Hradci Králové, Michaela Pětioká

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Petře Svačinové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při psaní této práce. Poděkování patří také konzultantce PharmDr. Tereze Vařilové, Lence Svobodové a Mgr. Janě Brokešové za pomoc se získáváním údajů pro experimentální část práce.

OBSAH

1	ABSTRAKT	6
2	ABSTRACT.....	7
3	ZADÁNÍ A CÍLE PRÁCE	8
4	SEZNAM ZKRATEK	9
5	ÚVOD.....	10
6	TEORETICKÁ ČÁST	11
6.1	Sprejové sušení	11
6.1.1	Průběh a parametry procesu.....	12
6.1.2	Využití sprejového sušení.....	13
6.2	Chitosan	14
6.2.1	Využití chitosanu při sprejovém sušení	15
6.2.1.1	Příprava mikročástic na bázi zesítěného chitosanu.....	15
6.2.1.2	Enkapsulace flurbiprofenu bez použití síťovacích činidel.....	18
6.2.1.3	Enkapsulace probiotických bakterií.....	19
6.2.1.4	Příprava mukoadhezivních mikrosfér pro nasální podání léčiva... 20	
6.3	Meloxicam	22
6.3.1	Sprejové sušení meloxicamu	22
6.3.1.1	Příprava porézních a neporézních mikročástic pro inhalační podání 22	
6.3.1.2	Příprava mikročástic s přídavkem stearanu sodného	24
6.4	Micelární solubilizace.....	26
6.4.1	Povrchově aktivní látky	26
6.4.2	Kritická micelární koncentrace	27
6.4.3	Micely	28
6.4.4	Micelární solubilizace špatně rozpustných léčiv	30
6.4.4.1	Micelární solubilizace ibuprofenu	30
6.4.4.2	Micelární solubilizace xanthohumolu.....	31

7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
7.1	Použité přístroje	32
7.2	Použité suroviny	33
7.3	Metody přípravy	33
7.3.1	Sprejové sušení	33
7.3.2	Příprava fyzikálních směsí.....	35
7.3.3	Optická mikroskopie.....	37
7.3.4	Skenovací elektronová mikroskopie.....	37
7.3.5	Diferenciální skenovací kalorimetrie.....	38
7.3.6	Disoluce a spektrofotometrie.....	39
8	DISKUZE A VÝSLEDKY	42
8.1	Hodnocení vzhledu částic	43
8.1.1	Optická mikroskopie.....	43
8.1.2	Skenovací elektronová mikroskopie.....	48
8.2	Hodnocení tepelných vlastností pomocí DSC	54
8.3	Hodnocení rychlosti a množství uvolněného léčiva	63
9	ZÁVĚR	71
10	BIBLIOGRAFIE.....	73

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technologie

Školitel: PharmDr. Petra Svačinová, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Tereza Vařilová

Posluchač: Michaela Pětioká

Název diplomové práce: Příprava sprejově sušeného prášku s různým množstvím chitosanu

Tato diplomová práce se zabývá přípravou sprejově sušených částic, hodnocením jejich vlastností a posouzením vlivu různého množství chitosanu na hodnocené vlastnosti. Částice byly připraveny ze suspenze chitosanu v roztoku meloxicamu s přídavkem tenzidu laurylsíranu sodného. Suspenze obsahovaly různá množství chitosanu (12,5; 10; 7,5 nebo 5 g) a meloxicamu (62,5; 50 nebo 37,5 mg), množství laurylsíranu sodného bylo u všech suspenzí shodné (7,5 g). Sušení všech suspenzí probíhalo při teplotě 190 °C.

Pro hodnocení vlastností usušených vzorků a jejich částic byla použita optická mikroskopie, skenovací elektronová mikroskopie (SEM), diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a disoluční zkoušky se spektrofotometrickým vyhodnocením.

Připravené částice měly nepravidelný sférický tvar a vyskytovaly se samostatně i ve shlucích. Některé z částic byly duté a uvnitř jejich dutin se nacházely menší částice. Tvar ani struktura usušených částic nebyla ovlivněna množstvím chitosanu ve vzorku. Na DSC termogramech byly pozorovány píky dehydratace, teploty tání, dekompozice a degradace. Vlivem sprejového sušení došlo k poklesu teploty tání meloxicamu až o 63,3 °C oproti teplotě tání nesusušeného meloxicamu. Disoluční zkoušky prokázaly u usušených vzorků vyšší uvolňování léčiva než u nesusušeného meloxicamu. U vzorků s menším množstvím chitosanu bylo uvolňování léčiva rychlé a nerovnoměrné. Naopak u vzorků s větším množstvím chitosanu bylo uvolňování pomalejší a více rovnoměrné.

2 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Supervisor: PharmDr. Petra Svačinová, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Tereza Vařilová

Student: Michaela Pětioká

Title of Thesis: Preparation of spray-dried powder containing different amount of chitosan

The aim of the thesis is the preparation of spray-dried particles, evaluation of their properties and assessment of the influence of different amounts of chitosan on the evaluated properties. The particles were prepared from a suspension of chitosan in meloxicam solution with the addition of sodium lauryl sulfate as a surfactant. The suspensions contained different amounts of chitosan (12.5; 10; 7.5 or 5 g) and meloxicam (62.5; 50 or 37.5 mg), the amount of sodium lauryl sulfate was uniform for all suspensions (7.5 g). All suspensions were dried at 190 °C.

Optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) and dissolution tests with spectrophotometric evaluation were used to evaluate the properties of the dried samples and their particles.

The prepared particles had an irregular spherical shape and occurred independently and in clusters. Some of the particles were hollow and there were smaller particles inside their cavities. The shape and structure of the dried particles were not affected by the amount of chitosan in the sample. Dehydration, melting points, decomposition and degradation peaks were observed on DSC thermograms. Due to spray drying, the melting point of meloxicam decreased by up to 63.3 °C compared to the melting point of undried meloxicam. Dissolution tests showed higher drug release in dried samples than in undried meloxicam. For samples with less chitosan, drug release was rapid and uneven. In contrast, for samples with larger amounts of chitosan, the release was slower and more uniform.

3 ZADÁNÍ A CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je posoudit vliv množství chitosanu na vlastnosti sprejově sušeného prášku s obsahem chitosanu, léčiva a tenzidu. Experimentální část bude zaměřena převážně na přípravu sprejově sušených materiálů a jejich následné hodnocení.

Sprejově sušené materiály budou připraveny ze suspenze s různým obsahem chitosanu a léčiva a jednotným obsahem tenzidu. Hodnocen bude vzhled připravených částic, jejich termální charakteristiky a uvolňování léčiva z připravených vzorků. Na základě získaných výsledků bude hodnocen vliv různého množství chitosanu na sledované vlastnosti.

Výsledky budou sloužit především jako základ pro další experimentální práce, kde mohou pomoci při výběru pomocných látek a jejich množství pro proces sprejového sušení.

4 SEZNAM ZKRATEK

ACV	acyklovir
BCS	Biofarmaceutický klasifikační systém
CMC	kritická micelární koncentrace
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
FS	fyzikální směs
FS+SLS	fyzikální směs s laurylsíranem sodným
CHIT	chitosan
MPC	chitosan-5-methylpyrrolidinon
MX	meloxicam
MXP	draselná sůl meloxicamu
NaSt	stearan sodný
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SLS	laurylsíran sodný
TPP	tripolyfosfát

5 ÚVOD

Sprejové sušení je proces, v jehož průběhu dochází k přeměně látky ze stavu kapalného do stavu pevného. Výchozí pevná látka je rozpuštěna nebo suspendována ve vhodné kapalině a následně pomocí trysky rozprašována do sušící komory. V důsledku proudění zahřátého sušícího média dochází k odpařování rozpouštědla a tvorbě suchých částic, zpravidla sférického a pórovitého charakteru. Suché prášky připravené sprejovým sušením mohou sloužit jako samostatná léčivá forma nebo mohou být dále využity k přípravě jiných léčivých forem. Chitosan je přírodní, netoxický, biokompatibilní polymer připravovaný alkalickou hydrolyzou chitinu získávaného ze schránek korýšů. Díky svým vlastnostem je chitosan vhodným nosičem léčiv při přípravě částic sprejovým sušením. Vhodným nastavením parametrů sušení nebo modifikací chitosanu lze připravit částice s řízeným uvolňováním a cílenou distribucí. [1] [2] [3] [4] [5]

V této diplomové práci bude sprejově sušena suspenze chitosanu v roztoku meloxicamu s přídavkem anionického surfaktantu laurylsíranu sodného. Přídavek povrchově aktivní látky v podobě laurylsíranu v koncentraci vyšší, než je kritická micelární koncentrace, by měl zapříčinit micelární solubilizaci a s ní související zvýšení rozpustnosti špatně rozpustného meloxicamu.

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Sprejové sušení

Sprejové sušení je metoda přípravy pevných disperzí, při které je léčivo spolu se svým nosičem rozpuštěno nebo suspendováno ve vhodné kapalině nebo směsi kapalin. Takto připravený roztok nebo suspenze je poté za zvýšené teploty vstříkovan do prostoru sušící komory sprejové sušárny, kde vlivem proudění zahřátého vzduchu nebo inertního plynu (nejčastěji dusíku) dochází k odpařování rozpouštědla a tvorbě suchého prášku. Sprejovým sušením lze získat disperze s dobrými tokovými vlastnostmi, které mohou být dále využity k přípravě lékových forem (tablet, zrněných prášků) nebo mohou samy sloužit jako léková forma (pelety). [1] [2] [5]

Sprejové sušení a další způsoby přípravy pevných disperzí jsou jedny z mnoha metod, kterými lze zvýšit rozpustnost špatně rozpustných léčiv, především těch, které patří do třídy II Biofarmaceutického klasifikačního systému. BCS je systém rozřazující léčiva do 4 tříd na základě jejich rozpustnosti a permeability. Více než 70 % léčiv se řadí do tříd II a IV BCS, což znamená, že jsou špatně rozpustná. Rozpustnost léčiva ve vodných roztocích je však klíčovým parametrem ovlivňujícím dosažení požadované koncentrace léčiva v krevním oběhu a vyvolání farmakologického účinku. Aby špatně rozpustná léčiva dosáhla terapeutických hladin v krevní plazmě po perorálním podání, musí být zpravidla podávána ve vysokých dávkách. Zvýšení jejich rozpustnosti tedy vede i k výraznému zvýšení jejich biodostupnosti po perorálním podání. Kromě přípravy pevných disperzí lze rozpustnost těchto léčiv zvýšit např. mikronizací, nanokrystalizací, přidáním kosolventů, tvorbou solí, přípravou proléčiv, tvorbou komplexů s cyklodextriny, micelární solubilizací, kryogenními metodami, přípravou mikroemulzí a samoemulgujících systémů a enkapsulací do nanočástic. [2] [5] [6] [7]

6.1.1 Průběh a parametry procesu

Proces sprejového sušení lze rozdělit na čtyři fáze odehrávající se v různých částech zařízení označovaného jako sprejová sušárna (Obrázek 1). V první fázi procesu dochází k rozprašování přiváděného roztoku nebo suspenze pomocí trysky a k formování kapiček. Druhá fáze zahrnuje kontakt rozprašovaných kapiček se zahřátým sušícím médiem a odpařování rozpouštědla. Ve třetí fázi dochází k formování částic a poslední fází je oddělení suchých částic od proudícího sušícího média. V průběhu sprejového sušení tedy dochází k přeměně látky z kapalného stavu do stavu pevného. Vzniklé částice jsou zpravidla sférické, porézní a ve styku s kapalinou se dobře smáčí a rychle rozpouští. [1] [5] [8] [9] [10]



Obrázek 1: Sprejová sušárna Büchi Mini Spray Dryer B-290

Sprejové sušení má v porovnání s dalšími metodami přípravy pevných disperzí řadu výhod. Při sprejovém sušení lze za relativně krátký časový úsek usušit velké množství produktu a zároveň se sprejové sušení řadí mezi ekonomicky méně náročné procesy. Velmi významnou výhodou je i skutečnost, že sprejové sušení je metoda vhodná pro látky ve vodě rozpustné i nerozpustné, termolabilní i termostabilní. Další výhodou je jednoduchost nastavení parametrů sušení. [1] [11] Mezi parametry ovlivňující průběh sušení a fyzikální vlastnosti vznikajících částic patří koncentrace rozpuštěné nebo suspendované látky, výběr rozpouštědla, vstupní a výstupní teplota sušicího média, materiál a průměr otvoru trysky a rychlost nástřiku. [5] [8] [12] [13]

6.1.2 Využití sprejového sušení

Sprejové sušení je často využíváno k přípravě částic určených pro inhalační podání prostřednictvím inhalátorů suchého prášku. Výhodou přípravy těchto částic metodou sprejového sušení je možnost přidání široké škály pomocných látek, které následně ovlivní stabilitu a aerodynamické vlastnosti vznikajících částic. Cílem mnoha studií je nalezení vhodných nosičů léčiv pro inhalační podání. Jako nosiče léčiva jsou ve studiích většinou testovány aminokyseliny (leucin, glycin), laktóza, mannitol [14] a chitosan. [15] Řada studií se také zabývá využitím sprejového sušení pro přípravu lékových forem k nasálnímu podání. Tímto způsobem by mohla být podávána např. některá antibiotika (gentamicin) [16], triptany [17], metoklopramid [18] a protilátky IgG [19]. [10] [20]

Kromě oblasti farmacie nachází sprejové sušení uplatnění i v oblasti potravinářství. Typickým příkladem je sprejově sušené mléko. V případě sprejového sušení mléka lze hovořit o enkapsulaci, neboť mléčný tuk lze nalézt ve středu usušených částic, kde je vrstvou laktózy a mléčných proteinů chráněn před oxidací. Sprejové sušení může být dále využito například k enkapsulaci rybího a makadamiového oleje a také k enkapsulaci rostlinných barviv, šťáv a extraktů. Sušit ale lze například i tomatovou dužinu a pivovarské kvasnice. [9] [20]

6.2 Chitosan

Chitosan je přírodní biokompatibilní a biodegradabilní polymer připravovaný částečnou nebo úplnou deacetylací chitinu získávaného ze schránek korýšů. Termín chitosan se zpravidla využívá v případech, kdy je stupeň deacetylace chitinu větší než 70 %. Chitosan se zároveň řadí do skupiny lineárních polyaminosacharidů, je totiž složen z N-acetyl-D-glukosaminových a D-glukosaminových jednotek spojených β -1,4 glykosidickými vazbami. Glukosamin je látka tvořená z glukózy v těle některých živočichů a v lidském těle, kde se účastní tvorby glykosaminoglykanu, který je nezbytným stavebním prvkem vazů, šlach a chrupavek. [3] [4] [21]

Vlastnosti chitosanu jsou ovlivněny řadou faktorů, především ale jeho molekulární hmotností a stupněm deacetylace, jež je definován jako poměr mezi jednotkami N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukosaminu. Chitosan je nerozpustný ve vodě (v ní pouze bobtná) a ve většině organických rozpouštědel, avšak vzhledem k přítomnosti primárních aminoskupin ve své struktuře je chitosan rozpustný ve vodných roztocích kyselého charakteru, jejichž hodnota pH je nižší než pK_a chitosanu (6,1–6,5). Pokud nesou aminoskupiny chitosanu kladný náboj, disponuje chitosan i výbornými antibakteriálními, antifungálními, antioxidačními a protizánětlivými účinky. Mezi další neméně významné vlastnosti chitosanu patří schopnost formulovat mikročástice a nanočástice a také jeho výborná mukoadhezivita. [3] [4] [22] [23]

Podobné a mnohdy ještě mnohem lepší vlastnosti jako chitosan mají i jeho deriváty. K přípravě derivátů se často používá zesílení chitosanu pomocí síťovacích činidel. Síťovacím činidlem mohou být např. dialdehydy (glutaraldehyd), ty ale mohou mít na svědomí nežádoucí účinky, a proto jsou pro biomedicínské použití upřednostňována činidla typu tripolyfosfátů. Struktura chitosanu může být kromě zesílení modifikována i dalšími způsoby, např. alkylací, acylací, esterifikací, sulfonylací, karboxymethylací nebo tvorbou Shiffových bazí. Místem těchto modifikací jsou primární a sekundární hydroxylové skupiny a aminoskupiny. Chemické modifikace mohou vést nejen ke zlepšení fyzikálně-chemických vlastností, ale také ke zvýšení bioaktivity, biodegradability a biokompatibility. [3] [4] [22]

Chitosan i jeho deriváty jsou vhodnými látkami pro sprejové sušení. Během sprejového sušení jsou z chitosanu a derivátů formovány mikročástice a nanočástice, které díky svým vlastnostem mohou být následně využity jako nosiče léčiv zajišťující jejich řízené uvolňování nebo cílenou distribuci. Sprejovým sušením neztrácí chitosan ani své mukoadhezivní vlastnosti. Mukoadhezivita mikrosfér chitosanu prodlužuje dobu setrvání léčiva v místě absorpce, čímž dochází k vytvoření koncentračního gradientu a tím i zvýšení absorpce léčiva. Kromě toho chitosan zvyšuje absorpci i díky své schopnosti otevírat těsné spoje mezi buňkami. Dále mohou být chitosan i jeho deriváty využity pro přípravu nanočástic pro genovou terapii [24], jako pomocné látky při formulaci vakcín [25] nebo v podobě hydrogelů také jako antibakteriální krytí [26] vhodné pro hojení ran. [3] [4] [22]

V řadě studií je chitosan testován také jako zdravotnický prostředek k zástavě krvácení, pro tyto účely by se chitosan mohl používat ve formě složených filmů, hydrogelů, hemostatických hub, složených xerogelů, mikrosfér a netkaných vláknitých polštářků [27]. Hemostatické mechanismy, kterými chitosan působí, zatím nejsou plně objasněny, avšak zatím se zdá, že jsou nezávislé na koagulační kaskádě. Nejpravděpodobnější příčinou hemostatického účinku jsou totiž interakce mezi chitosanem a membránami erytrocytů, které vedou k tvorbě sraženiny. Kromě oblasti farmacie a medicíny nachází chitosan a jeho deriváty uplatnění například v potravinářském, textilním a papírnickém průmyslu a také v zemědělství. Nespornou výhodou chitosanu i jeho derivátů je jejich ekonomická dostupnost. [4] [21] [23]

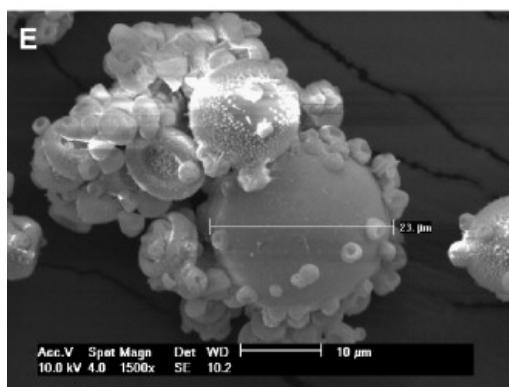
6.2.1 Využití chitosanu při sprejovém sušení

6.2.1.1 Příprava mikročástic na bázi zesítěného chitosanu

Cílem studie Stulzer a kol. [11] byla příprava mikročástic s obsahem antivirotika acykloviru (ACV) a chitosanu zesítěného pomocí tripolyfosfátu (TPP) sprejovým sušením a následné hodnocení vlivu poměru mezi množstvím chitosanu a ACV na vlastnosti připravených mikročástic. Nejprve bylo požadované množství ACV (100, 150 nebo 200 mg) rozpuštěno v 0,1M roztoku HCl, následně byl přidán chitosan (1 nebo 2 g) a TPP (1 nebo 2 ml). Takto připravený roztok byl homogenizován a poté sprejově sušen při teplotě 180 °C. U vzniklých mikročástic byla hodnocena

jejich stabilita, dále jejich termické vlastnosti metodou diferenciální skenovací kalorimetrie a termogravimetrie, jejich struktura pomocí skenovací elektronové mikroskopie a rentgenové difrakce, a v neposlední řadě byla disolučními zkouškami hodnocena také rychlost uvolňování ACV.

Ze získaných dat vyplývá, že poměr mezi množstvím chitosanu a ACV ovlivnil řadu parametrů, jako např. stabilitu, disoluční profily a účinnost enkapsulace neboli zapouzdření, jež je definována jako podíl množství ACV zabudovaného do mikročástic ku celkovému množství ACV. Stulzer a kol. dále zjistili, že během sprejového sušení dochází ke konverzi krystalické formy ACV na formu amorfní, což má za následek zvýšení rozpustnosti a zvýšení rychlosti uvolňování ACV. Nejlepší vlastnosti byly prokázány u mikročástic připravených z roztoku s chitosanu a ACV v poměru 1000:50 (Obrázek 2).

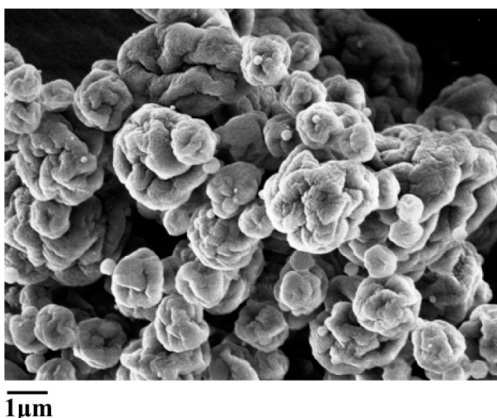


Obrázek 2: SEM snímek mikročástic ACV/TPP/ chitosan při zvětšení 1500×. Upraveno podle [11]

Zesítnění chitosanu pomocí činidla TPP využili ve své práci i Aranaz a kol. [3]. Cílem této práce bylo zabudování antidepresiva venlafaxinu do mikrotobolek vhodných pro řízené uvolňování, neboť právě řízené uvolňování podstatně snižuje nežádoucí účinky venlafaxinu při léčbě deprese a úzkosti a zároveň umožní podání venlafaxinu pouze v jedné denní dávce. Pro přípravu roztoků před samotným sprejovým sušením byly použity dva vzorky chitosanu s rozdílným stupněm deacetylace a s rozdílnou molekulovou hmotností, díky čemuž byly připraveny roztoky s různou viskozitou. Rozpuštění chitosanu bylo zajištěno přidáním kyseliny octové, pro zesítnění chitosanu byly užity vodné roztoky TPP o koncentraci 0,1–0,5 %.

Poměry mezi množstvím chitosanu a TPP byly zvoleny tři, konkrétně 100:30, 100:80 a 100:100.

U usušených mikrotobolek (Obrázek 3) byl následně hodnocen jejich vzhled a struktura (sférický tvar s hlubokými prohlubněmi, bez krystalků venlafaxinu na povrchu), jejich povrchové napětí, účinnost enkapsulace a také distribuce velikosti částic. Dále byly provedeny zkoušky hodnotící uvolňování léčiva *in vitro* v simulované žaludeční a intestinální šťávě. Bylo zjištěno, že největší vliv na uvolňování léčiva měl poměr mezi množstvím chitosanu a TPP. V případě mikrotobolek připravených z roztoku chitosanu o nízké viskozitě a s poměrem mezi množstvím chitosanu a TPP 100:100 došlo ke snížení uvolňování léčiva během 8 hodin v intestinální tekutině na 60 %. Zároveň byly u těchto mikrotobolek odlišitelné dvě fáze uvolňování léčiva, neboť během prvních 90 minut bylo uvolňování léčiva velmi rychlé, následně se však ustálilo a bylo pozvolné.



Obrázek 3: SEM snímek sprejově sušených tobolek na bázi zesítěného chitosanu. [3]

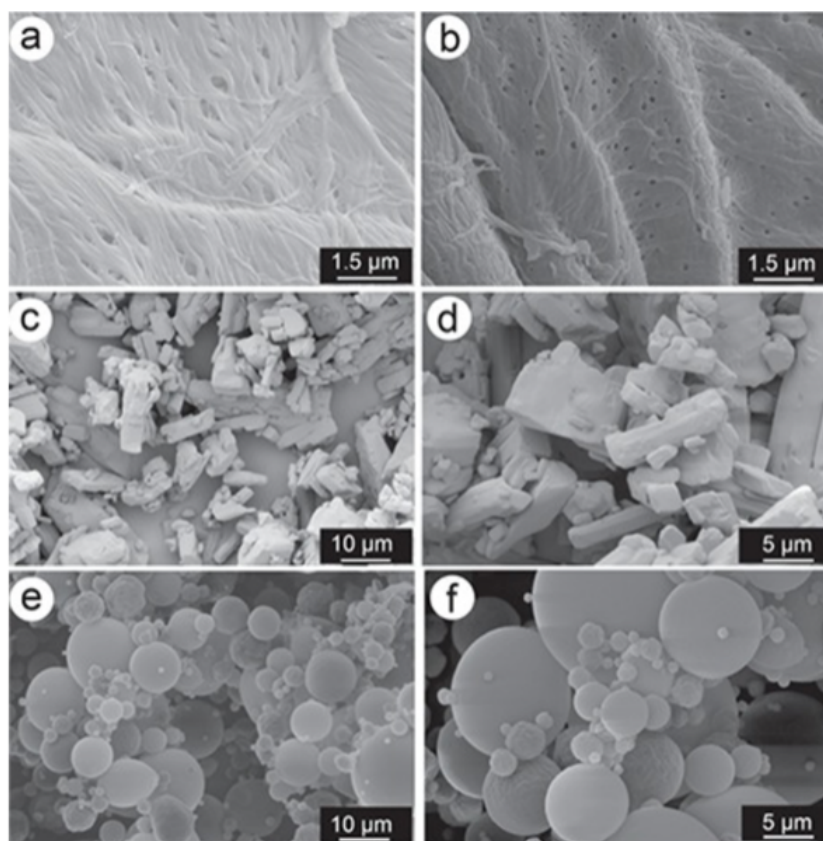
Chitosan zesítěný působením tripolyfosfátu byl využit také ve studii Pourshahab a kol. [15], jejímž cílem byla příprava sprejově sušeného prášku s obsahem antibiotika isoniazidu, který by následně mohl být podáván inhalačně při léčbě tuberkulózy. Jako pomocné látky byly použity maltodextrin, mannitol nebo laktóza, samotné nebo v kombinaci s leucinem. Bylo prokázáno, že zabudováním isoniazidu do mikročástic na bázi chitosanu se zvýšila jeho antimikrobiální aktivita. Ze studie dále vyplývá, že pro inhalační podání jsou nejvhodnější mikročástice na bázi zesítěného chitosanu s přídavkem laktózy a leucinu jako pomocných látek, neboť při

použití této kombinace dosahuje hodnota frakce jemných částic neboli respirabilní frakce nejvyšší hodnoty.

6.2.1.2 Enkapsulace flurbiprofenu bez použití síťovacích činidel

Ve studii Akyüz a kol. [28] byly metodou sprejového sušení připraveny mikrosféry a nanosféry chitosanu, které sloužily k enkapsulaci nesteroidního antiflogistika flurbiprofenu. Nejprve byl připraven roztok flurbiprofenu ve směsi ethanolu a destilované vody v poměru 10:15, poté byl k tomuto roztoku přidán roztok chitosanu v acetátovém pufru (pH 5,5 až 6,0). Vzniklý roztok byl sprejově sušen při teplotě 100 °C. Použitý chitosan, flurbiprofen i usušené sféry byly následně charakterizovány pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), dále pomocí skenovací elektronové mikroskopie, rentgenové difrakce a metodami termogravimetrické analýzy. Provedeny byly i testy uvolňování léčiva *in vitro* v simulované biologické tekutině o hodnotě pH 7,4.

Metoda FTIR prokázala, že během sprejového sušení dochází k utvoření systému vodíkových vazeb mezi chitosanem a flurbiprofenem. Pomocí SEM byly pozorovány usušené částice sférického tvaru, pro porovnání byly pořízeny i snímky samotného chitosanu a flurbiprofenu (Obrázek 4). Účinnost enkapsulace byla stanovena na 73,28 %. Díky *in vitro* testům bylo zjištěno, že veškerý flurbiprofen se uvolní ze sfér během 48 hodin. Uvolňování léčiva je dvoufázové, přičemž v první fázi trvající 4 hodiny je uvolňování velmi rychlé, následně ve druhé fázi se uvolňuje mnohem pomaleji. Po zhodnocení všech výsledků došli Akyüz a kol. k závěru, že příprava sférických částic chitosanu sprejovým sušením a s ní související enkapsulace léčiv je možná a účinná i bez použití činidel sloužících k zesílení chitosanu.



Obrázek 4: SEM snímky chitosanu (a, b), flurbiprofenu (c, d), usušených sférických částic (e,f). [28]

6.2.1.3 Enkapsulace probiotických bakterií

Chitosan byl spolu s alginátem sodným a hydroxypropylmethylcelulózou (HPMC) použit i ve studii Yonekura a kol. [29], jejímž cílem bylo enkapsulovat probiotické bakterie, konkrétně druh *Lactobacillus acidophilus*, pomocí sprejového sušení. Před samotným sprejovým sušením byly probiotické bakterie ve formě pelet suspendovány v suspenzi obsahující maltodextrin, glukózu a syrovátkový proteinový koncentrát. Následně bylo ke vzniklé suspenzi přidáno žádané množství roztoku alginátu, HPMC nebo chitosanu (s přídavkem kyseliny mléčné).

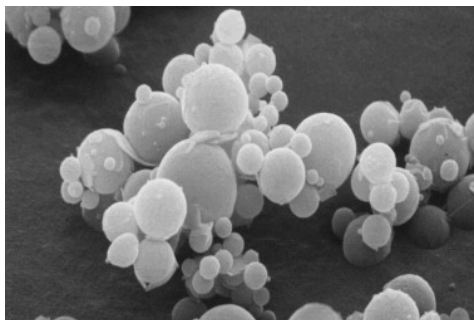
Po zhodnocení počtů životaschopných bakterií obsažených v usušeném prášku ihned po skončení sušení a po 35 dnech skladování a také po zhodnocení schopnosti bakterií přežít simulované trávení došli Yonekura a kol. k závěru, že z hodnocených látek se jako nejvhodnější pro enkapsulaci bakterií jeví chitosan. Chitosan sice jako jediný způsobil poměrně velký pokles v počtu životaschopných bakterií během

sprejového sušení, ale zároveň jako jediný zvýšil životaschopnost bakterií během simulovaného trávení. Usušený prášek s obsahem chitosanu také jako jediný vykazoval excelentní stabilitu i po 35 dnech skladování.

6.2.1.4 Příprava mukoadhezivních mikrosfér pro nasální podání léčiva

Přípravě mikrosfér určených pro nasální podání prokinetika metoklopramidu se věnovala studie Gavini a kol. [18]. Pro přípravu mikrosfér byl využit chitosan-5-methylpyrrolidinon (MPC), což je derivát chitosanu, ve kterém jsou aminoskupiny glukosaminových jednotek částečně substituovány methylpyrrolidinonem v poloze 5. Pro účely srovnání byly připraveny i mikročástice na bázi nesubstituovaného chitosanu, příprava probíhala vždy prostřednictvím sprejového sušení. Sprejově sušeny byly roztoky obsahující kombinace různých koncentrací chitosanu (s přidavkem kyseliny octové) s metoklopramidem a MPC s metoklopramidem. Dále byly připraveny roztoky chitosanu i MPC bez přidavku metoklopramidu.

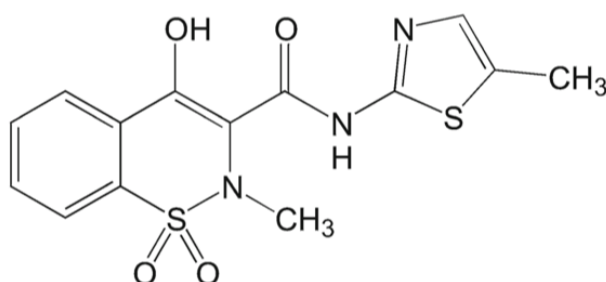
Po skončení sušení hodnotili Gavini a kol. vzhled (Obrázek 5), strukturu a velikost mikročástic, rychlost uvolňování léčiva a také účinnost enkapsulace. Provedeny byly i *in vitro* mukoadhezivní testy, testy bobtnání a *ex vivo* studie permeace využívající ovčí nosní sliznici. Při porovnání mikročástic bylo zjištěno, že *in vitro* uvolňování léčiva je prakticky shodné v případě použití chitosanu i MPC. Avšak mikrosféry na bázi MPC vykazují mnohem lepší mukoadhezivní vlastnosti, méně bobtnají a v *ex vivo* studiích byl u nich potvrzen lepší permeační profil. Po kontaktu s vodnými roztoky (např. na povrchu nosní sliznice) totiž dochází k tvorbě hydrogelu, což má za následek prodloužení doby setrvání formulace na sliznici a zároveň hydrogelová vrstva působí jako ochrana sliznice před potenciálním poškozením. Z vyhodnocených dat tedy vyplývá, že sprejově sušené mikrosféry, jejichž základem je MPC, mohou být považovány za slibnou formulaci vhodnou pro nasální podání metoklopramidu.



Obrázek 5: SEM snímek sprejově sušených mikrosfér na bázi MPC s obsahem metoklopramidu. [18]

6.3 Meloxikam

Meloxikam, jehož strukturní vzorec je uveden na Obrázku 6, je léčivo patřící do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAIDs), které se používá k léčbě revmatoidní artritidy, osteoartrózy, ankylozující spondylitidy a také ke tlumení pooperačních bolestí. Protizánětlivé účinky meloxikamu jsou důsledkem inhibice enzymu cyklooxygenázy (COX), přesněji inhibice isoformy COX-2. Meloxikam je tzv. COX-2 preferenční inhibitor, což znamená, že isoformu COX-2 inhibuje v mnohem větší míře než isoformu COX-1. [30] [31] [32]



Obrázek 6: Strukturní vzorec meloxikamu. [30]

Výhodou meloxikamu vyplývající z preferenční inhibice COX-2 je jeho vyšší analgetická a protizánětlivá účinnost a současně menší dráždivost. Nevýhodou meloxikamu je skutečnost, že se svými fyzikálními vlastnostmi řadí mezi léčiva třídy II BCS. Má tedy dobrou schopnost permeability, ale je velmi špatně rozpustný ve vodě. Zvýšením jeho rozpustnosti se zabývá řada studií, mezi nejčastěji používanými metodami zvyšování rozpustnosti meloxikamu patří tvorba solí a příprava mikročástic metodou sprejového sušení. [30] [31] [32] [33]

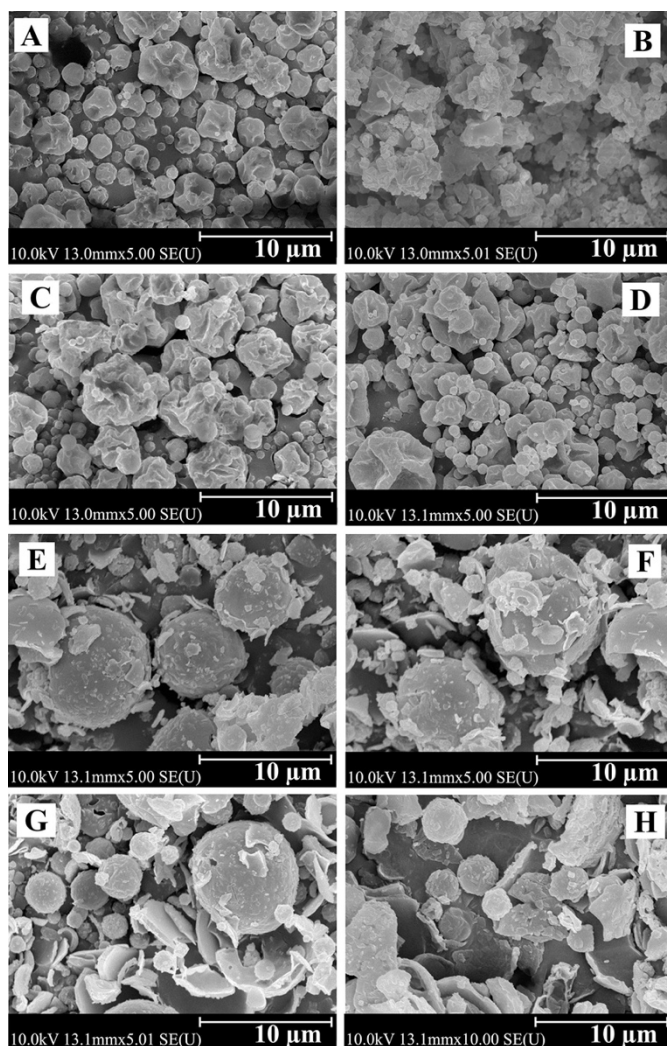
6.3.1 Sprejové sušení meloxikamu

6.3.1.1 Příprava porézních a neporézních mikročástic pro inhalační podání

Ve studii Chvatal a kol. [34] byly připraveny a následně porovnávány dva typy sprejově sušených mikročástic s obsahem meloxikamu určené pro inhalační podání prostřednictvím inhalátorů suchého prášku. Prvním typem byly neporézní mikročástice, druhým typem byly velké porézní mikročástice. V obou případech se

jednalo o přípravu mikročástic bez obsahu nosiče léčiva. Nejprve bylo pomocí 1M roztoku hydroxidu sodného upraveno pH destilované vody na hodnotu $8,0 \pm 0,1$. Zvýšením pH bylo umožněno rozpuštění meloxicamu za vzniku roztoku, ve kterém byly následně rozpouštěny pomocné látky. Pro formulaci neporézních mikročástic byly použity roztoky samotného meloxicamu, meloxicamu s leucinem, nebo meloxicamu s leucinem a hyaluronátem sodným. Hyaluronát sodný zvyšuje viskozitu roztoku, což zapříčiní vznik větších částic při sprejovém sušení, zároveň slouží i ke zvýšení stability a zlepšení mukoadhezivních vlastností vzniklých částic. Pro formulaci porézních mikročástic byl použit roztok meloxicamu s leucinem a hyaluronátem sodným s přídavkem porogenního činidla. Jako porogenní činidlo byl zvolen bikarbonát amonný o koncentraci 0,5, 1,5 a 2,0 mg/ml.

Po sprejovém sušení byly vlastnosti vzniklých mikročástic hodnoceny řadou metod, např. skenovací elektronovou mikroskopií (Obrázek 7), Ramanovou spektroskopií a metodou laserové difrakce. Dále byla stanovena sypná a setřesná hustota a také aerodynamické vlastnosti, jako např. respirabilní a emitovaná frakce. Po celkovém zhodnocení došli Chvatal a kol. k závěru, že větší porézní mikročástice vykazují podstatně lepší vlastnosti důležité pro inhalační podání než neporézní mikročástice. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití porogenního činidla o koncentraci 2,0 mg/ml. Aerodynamické vlastnosti zůstaly nezměněny i po 10 měsících skladování. Z této studie tedy vyplývá, že porézní mikročástice s obsahem meloxicamu mohou být vhodnou alternativou pro lokální terapii zánětlivých onemocnění dýchacích cest.

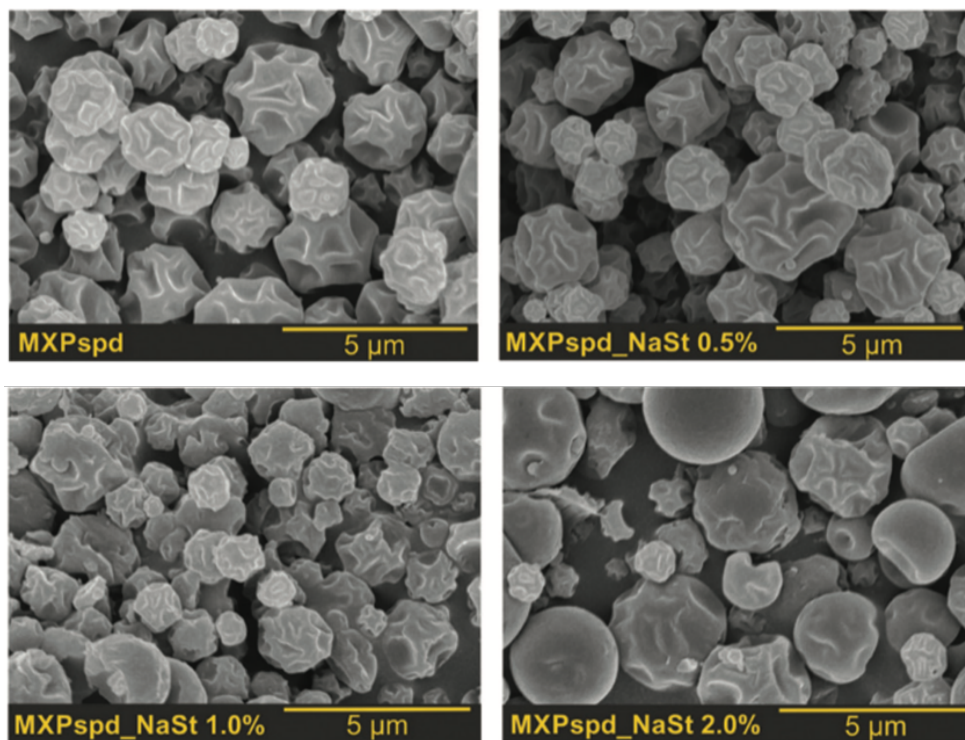


Obrázek 7: SEM snímky neporézních mikročastic (A, B, C, D) a velkých porézních mikročastic (E, F, G, H). [34]

6.3.1.2 Příprava mikročastic s přidavkem stearanu sodného

Přípravou sprejově sušených mikročastic určených pro inhalační podání meloxicamu se ve své studii zabývali i Benke a kol. [33]. V této studii byla použita draselná sůl meloxicamu (MXP), což je vlastně meziprodukt při výrobě meloxicamu, který má ale mnohem větší rozpustnost ve vodě. V průduškách (pH 7,4) je rozpustnost MXP dokonce stonásobně větší než rozpustnost meloxicamu. Vzorky pro sprejové sušení byly připraveny smísením vodného roztoku MXP a roztoku stearanu sodného (NaSt) v ethanolu, sušení probíhalo při teplotě 130 °C. Usušené vzorky obsahovaly 98 až 100 % MXP a 0 až 2 % NaSt. Po skončení sušení byl u všech vzorků hodnocen reziduální obsah ethanolu a vody, poté byla u částic posuzována distribuce velikosti

částic a hodnocena byla i jejich struktura a vzhled metodou SEM (Obrázek 8) a rentgenové difrakce. Neméně důležité bylo i hodnocení aerodynamických vlastností a interakcí mezi částicemi.



Obrázek 8: SEM snímky sprejově sušených částic s obsahem MXP. Vlevo nahoře bez obsahu NaSt, vpravo nahoře s obsahem 0,5 % NaSt. Vlevo dole s obsahem 1,0 % NaSt, vpravo dole s obsahem 2,0 % NaSt. Upraveno podle [33]

Při porovnání s literaturou a doporučeními pro složení prášků k inhalaci Benke a kol. zjistili, že všechny usušené vzorky splňují požadavky kladené na tuto lékovou formu, neboť obsah zbytkového ethanolu nepřesáhl 0,5 % a zbytkový obsah vody se pohyboval mezi 3,24 a 3,73 % (v literatuře se hovoří o obsahu zbytkové vody do 9,02 %). Nejlepší aerodynamické vlastnosti vykazovaly částice s obsahem 2 % NaSt, jejich respirabilní frakce totiž dosáhla hodnoty 84.03 ± 1.65 %. Na závěr studie Benke a kol. své výsledky porovnávali i s dalšími studiemi, ve kterých byl pro přípravu sprejově sušených částic s obsahem léčiva také použit NaSt. Během porovnání zjistili, že optimální koncentrace NaSt se pro každé léčivo může lišit, neboť např. pro antibiotikum ciprofloxacin hydrochlorid (studie Ambrus a kol. [35]) je nejvýhodnější koncentrace NaSt 0,5 %.

6.4 Micelární solubilizace

Stejně jako sprejové sušení patří i micelární solubilizace mezi účinné metody, kterými lze zvýšit rozpustnost špatně rozpustných léčiv ve vodném prostředí a tím zvýšit i jejich biologickou dostupnost. Solubilizace neboli zprostředkované rozpouštění je proces, během kterého se ke špatně rozpustnému léčivu přidá vhodná pomocná látka tzv. solubilizátor, který následně napomáhá převedení tohoto léčiva do roztoku. V případě micelární solubilizace jsou solubilizátorem povrchově aktivní látky. [6] [36] [37]

V průběhu micelární solubilizace dochází ke vzniku reverzibilních interakcí mezi léčivem a micelami, což jsou shluky molekul povrchově aktivní látky koloidní velikosti s heterogenní mikrostrukturou. Micely jsou tvořeny oblastmi s různou polaritou, což umožňuje začlenění molekul léčiva do jejich struktury. Důsledkem těchto reverzibilních interakcí mezi léčivem a micelami je vznik termodynamicky stabilního izotropního roztoku a rozpuštění léčiva. [36] [38]

6.4.1 Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky neboli surfaktanty jsou amfifilní molekuly, jejichž hydrofobní část, často nazývaná jako ocas, je zpravidla tvořena dlouhým uhlovodíkovým segmentem. Méně často bývá ocas tvořen halogenovaným nebo oxygenovaným uhlovodíkovým nebo siloxanovým řetězcem. Hydrofilní část nazývaná jako hlava může být nabitá (aniontová nebo kationtová), dipolární (zwitteriontová) nebo nenabitá (neiontová). Surfaktanty tvoří velkou skupinu farmaceutických pomocných látek, uplatnění nachází nejčastěji jako solubilizátory, emulgátory, pěnidla a smáčedla. [7] [36] [38] [39]

K nejběžněji používaným surfaktantům se řadí laurylsíran sodný, dodecylsulfát sodný (SDS), dodecyltrimethylamonium bromid (DTAB), cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) a polysorbáty neboli Tweeny. [38] [39] Synergistických účinků může být dosaženo při použití kombinace surfaktantů, což dokazuje studie Seedher a Kanojia [6], ve které byly pro micelární solubilizaci špatně rozpustných léčiv ze

skupiny antidiabetik využity kombinace SDS + Tween-80 a CTAB + Tween-80. Kromě kombinace surfaktantů došlo k významnému zvýšení rozpustnosti i v případě přidání 0,1M fosfátového pufru (pH 7,4), synergistický účinek navodilo ve většině případů i přidání 0,15M NaCl.

Solubilizační schopnost surfaktantu zpravidla narůstá s délkou jeho uhlovodíkového řetězce [37]. Najdou se ale i výjimky. Alkhamis a kol. [40] ve své studii hodnotili vliv různých surfaktantů na zvyšování rozpustnosti gliklazidu. Výsledkem této studie bylo zjištění, že u kationtových surfaktantů se solubilizační schopnost zvyšuje s narůstající délkou řetězce, avšak u aniontových surfaktantů se s narůstající délkou snižuje. Solubilizační schopnost může být kromě délky uhlovodíkového řetězce surfaktantu ovlivněna i teplotou roztoku, hodnotou pH roztoku [6], molekulovou hmotností, polaritou a hodnotou disociační konstanty solubilizovaného léčiva a také hodnotou HLB (hydrofilně-lipofilní rovnováha) surfaktantu. [37] [38]

6.4.2 Kritická micelární koncentrace

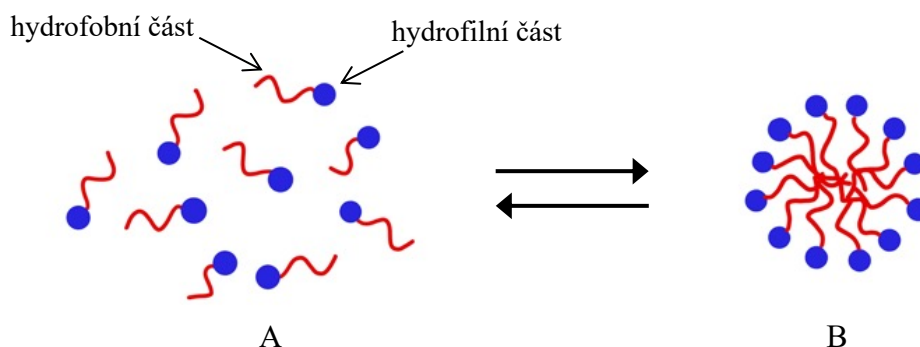
Jedním ze základních parametrů charakterizujících roztoky surfaktantů je hodnota kritické micelární koncentrace. CMC je taková koncentrace, při jejímž dosažení se začnou molekuly surfaktantu shlukovat a tvořit micely. Pro přípravu micelárních roztoků postačuje koncentrace surfaktantu nepříliš přesahující CMC, neboť při vysokém překročení CMC může dojít k nežádoucí agregaci a změně reologických vlastností roztoku. [37] [38]

U většiny surfaktantů se hodnota CMC pohybuje v rozmezí 0,05 až 0,10 %. Čím nižší je hodnota CMC, tím stabilnější jsou vytvořené micely. Nižší hodnoty CMC mají zpravidla neiontové surfaktanty. Hodnota kritické micelární koncentrace surfaktantu se stanovuje experimentálně, pro stanovení lze využít v podstatě jakoukoliv vlastnost roztoku surfaktantu, která je ovlivněna tvorbou micel. Pro stanovení CMC lze tedy využít např. změny povrchového napětí, změny v absorpci UV/VIS záření a změny v elektrické vodivosti. Dále je možné stanovit CMC metodou

fluorescenční spektroskopie, nukleární magnetické rezonance, izotermické titrační kalorimetrie a mnoha dalšími metodami. [7] [37] [38] [41]

6.4.3 Micely

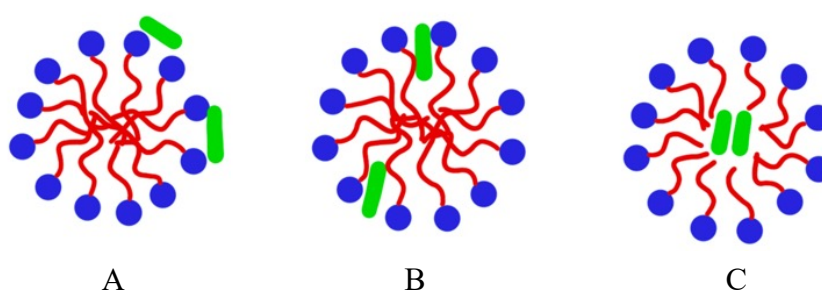
Micely jsou shluky molekul surfaktantu nejčastěji o velikosti 5 až 50 nm formované ve vodném prostředí. Ve struktuře micel dochází k anizotropní distribuci vody, vodná fáze je schopná prostoupit do micely pouze do oblasti několika prvních methylenových skupin sousedících s hydrofilními skupinami tvořícími povrch micely. Koncentrace vody tedy klesá od povrchu micely směrem k jejímu jádru, které je kompletně hydrofobní. Proces formování micel (Obrázek 9) je výsledkem jemné rovnováhy mezi přitažlivými a odpuzivými mezimolekulovými silami. Na formování se podílí hydrofobní, sterické, elektrostatické a van der Waalsovy interakce a také tvorba vodíkových vazeb. [36] [38] [42]



Obrázek 9: Formování micel. Monomery surfaktantu (A), micela (B). Vytvořeno podle [38]

Tvar a velikost micel může být ovlivněn mnoha způsoby. Kromě změny struktury použitého surfaktantu lze využít např. změny teploty a pH roztoku a změny celkové koncentrace surfaktantu v roztoku. Tvar micel může být kulový, válcový nebo rovinný (dvouvrstvé a diskoidální micely). Ke vzniku válcových micel dochází jednorozměrným růstem sférických micel, vznik rovinných micel je důsledkem dvourozměrného růstu micel. Jednorozměrný i dvourozměrný růst micel je závislý primárně na vzájemném přiblížení hlav surfaktantu, čímž dojde ke změně v zakřivení povrchu micel. [38]

Existuje několik způsobů, kterými se léčivo v průběhu micelární solubilizace může začlenit do struktury micely. Tyto způsoby jsou vyobrazeny na Obrázku 10. Poloha solubilizovaného léčiva závisí především na jeho polaritě. Nepolární léčiva se zpravidla ukládají ke středu micely mezi hydrofobní ocase molekul surfaktantu, naopak polární léčiva se adsorbují na povrchovou vrstvu micely. Léčiva amfifilního charakteru se orientují v micelle stejným způsobem jako molekuly surfaktantu, ukládají se do tzv. palisádové vrstvy mezi hydrofilní hlavy a několik prvních uhlíků hydrofobního ocasu surfaktantu. [6] [37] [38]



Obrázek 10: Umístění léčiva ve struktuře micely. Léčivo (zeleně) adsorbované na povrchu micely (A), uložené v palisádové vrstvě (B), uložené blízko středu micely (C). Vytvořeno podle [38]

Kromě zvýšení rozpustnosti a tím i biologické dostupnosti má použití micel jako nosičů léčiv i řadu dalších výhod. Mezi ně patří redukce toxicity a dalších nežádoucích účinků léčiva, zlepšení průchodu léčiva přes fyziologické bariéry a s ním související příznivé změny v biodistribuci a také prodloužení času, po který micely setrvávají v krevním oběhu. Léčivo inkorporované do micel je lépe chráněno před možnou inaktivací v biologickém prostředí a může tak být schopné účinkovat pouze v cílových orgánech a tkáních, čímž chrání ostatní necílové orgány a tkáně. [42]

6.4.4 Micelární solubilizace špatně rozpustných léčiv

6.4.4.1 Micelární solubilizace ibuprofenu

Micelární solubilizací nesteroidního antiflogistika ibuprofenu se ve své studii zabývali Rangel-Yagui a kol. [36]. Přesněji řečeno, zkoumali vliv hydrofilní části surfaktantu na zvýšení rozpustnosti ibuprofenu, neboť všechny tři použité surfaktanty měly svou hydrofobní část tvořenou stejným uhlíkatým řetězcem, ale lišily se právě svou hydrofilní částí. Surfaktanty byly pro tuto studii zvoleny tři, a to aniontový sodium dodecylsulfát (SDS), kationtový dodecyltrimethylamonium bromid (DTAB) a neiontový n-dodecyllokta(ethylenoxid) ($C_{12}EO_8$). Pro stanovení rozpustnosti ibuprofenu byly použity roztoky surfaktantů o koncentracích 0 až 85 mM, pro přípravu těchto roztoků byl použit 5 mM fosfátový pufr (pH 7,4). Součástí studie bylo také stanovení kritické micelární koncentrace pro jednotlivé surfaktanty v ibuprofenem nasyceném (4 mM) fosfátovém pufru. Pro SDS byla stanovena CMC 4,7 mM, pro DTAB 11,0 mM a pro $C_{12}EO_8$ 47 μ M.

Výsledky studie prokázaly, že po překročení CMC rostla rozpustnost ibuprofenu lineárně se zvyšující se koncentrací surfaktantu. Nejmenší vliv na zvýšení rozpustnosti byl prokázán u roztoku SDS, neboť při koncentraci 80 mM došlo pouze k 5,5násobnému zvýšení rozpustnosti. Příčinou byly pravděpodobně elektrostatické repulzní síly mezi aniontovým SDS a ibuprofenem, což je léčivo kyselé povahy a je tedy při pH 7,4 z 99,7 % disociováno. Naopak díky elektrostatickým interakcím mezi negativně nabitým ibuprofenem a pozitivně nabitým DTAB byla rozpustnost ibuprofenu v 80 mM roztoku DTAB zvýšena 16krát. Stejného výsledku, tedy 16násobného zvýšení rozpustnosti, bylo dosaženo i u 80mM roztoku $C_{12}EO_8$, a to díky skutečnosti, že neiontový $C_{12}EO_8$ tvoří micely mnohem ochotněji než iontové surfaktanty, což dokazuje i jeho podstatně nižší CMC. Jako další pozitivum neiontového $C_{12}EO_8$ vnímali Rangel-Yagui a kol. jeho nízkou toxicitu v porovnání s iontovými surfaktanty, a tudíž vyhodnotili $C_{12}EO_8$ jako nejvhodnější surfaktant pro micelární solubilizaci ibuprofenu a dalších léčiv kyselého charakteru.

6.4.4.2 Micelární solubilizace xanthohumolu

Vliv micelární solubilizace na protizánětlivé účinky xanthohumolu hodnotili ve své studii Khayyal a kol. [43]. Xanthohumol je flavonoid s protizánětlivými, imunomodulačními a antioxidačními účinky získávaný z chmele otáčivého, jehož nevýhodou je jeho velmi nízká biologická dostupnost po perorálním podání.

Na počátku studie byla u laboratorních potkanů navozena artritida pravé zadní končetiny a následně byli potkani rozděleni do čtyř skupin. První skupině byl podáván micelární xanthohumol v dávce 5mg/kg připravený za použití polysorbátu 80 jako surfaktantu. Druhá skupina dostávala nativní extrakt xanthohumolu, a to také v dávce 5 mg/mg. U předposlední skupiny byla artritida léčena pomocí referenčního léčiva diklofenaku v dávce 3 mg/kg a poslední skupina byla ponechána bez medikace. Micelární xanthohumol, nativní extrakt xanthohumolu i diklofenak byly podávány perorálně jednou denně, každý den ve stejnou dobu.

V den navození artritidy a dále každý čtvrtý den byl u všech čtyř skupin měřen objem postižené končetiny a 24 hodin po podání poslední dávky léčiva bylo potkanům odebráno krevní sérum, které následně sloužilo ke stanovení indikátorů zánětu, což jsou například tumor nekrotizující faktor- α , interleukin-6, myeloperoxidáza a c-reaktivní protein.

Po provedení analýzy získaných dat došli Khayyal a kol. k závěru, že micelárně solubilizovaný xanthohumol má oproti nativnímu xanthohumolu výrazně zvýšenou protizánětlivou aktivitu. Podávání micelárního xanthohumolu redukovalo otok na stejnou úroveň jako podávání referenčního léčiva diklofenaku, což korespondovalo i s naměřenými hodnotami indikátorů zánětu v séru. Naopak při podání nativního xanthohumolu byla redukce otoku velmi nízká, prakticky shodná s redukcí otoku u kontrolní skupiny potkanů bez medikace.

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité přístroje

Analytické váhy A&D HR-120 EC, A&D Company, Limited, Japonsko

Analytické váhy OHAUS Discovery DV314C, OHAUS Corporation, USA

Disoluční systém Sotax AT7 Smart, Autosampler Sotax CH-4123, Sotax AG, Švýcarsko

DSC 200 F3 NETZSCH Maia, Netzsch-Geratebau GmhH, Selb, Německo

Lis T1-FRO 50 Zwick/Roell, Zwick GmbH & Co., Německo

Magnetická míchačka Lavat MM4, LAVAT a.s., Česká republika

Magnetická míchačka CIMAREC i Multipoint, Thermo Fisher Scientific, USA

Mikroskop Olympus BX 51, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Německo

Mísicí zařízení Turbula T2F, WAB-GROUP, Německo

Ruční lis pro víčkování hliníkových kelímků, Netzsch-Geratebau GmhH, Selb, Německo

Skenovací elektronový mikroskop Phenom Pro, Phenom-World B.V., Nizozemsko

Sprejová sušárna Büchi Mini Spray Dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko

Ultrazvuková čisticí lázeň Witeg WUC-A01H, Witeg Labortechnik GmbH, Německo

UV/VIS Spektrofotometr Analytik Jena Specord 205, Analytik Jena, Německo

7.2 Použité suroviny

Čištěná voda

Fosforečnanový pufr o pH 6,8 připravený rozpuštěním 6,8 g KH_2PO_4 (Dr. Kulich Pharma, s.r.o.) v 250 ml vody a následným doplněním vodou do 1000 ml; pH pufru bylo upravováno pomocí roztoku NaOH o koncentraci 0,2 mol/l

Chitosan č. šarže JB-CH190301, JBiChem, Čína

Isopropylmyristát č. šarže 107K0693, Sigma-Aldrich s.r.o., Praha

Laurylsíran sodný č. šarže 0013370720, dodavatel Dr. Kulich Pharma s.r.o., Hradec Králové

Meloxikam poskytnutý společností Zentiva, č. šarže není k dispozici, Zentiva, Česká republika

Methanol č. šarže SZBD127SV, Sigma-Aldrich s.r.o., Praha

7.3 Metody přípravy

7.3.1 Sprejové sušení

Před samotným sprejovým sušením bylo potřeba připravit vzorky, tedy suspenze chitosanu v roztoku meloxikamu a laurylsíranu sodného. Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v Tabulce 1. Prvním krokem přípravy každého vzorku bylo navážení meloxikamu a laurylsíranu sodného. Veškerá navažování probíhala na analytických vahách, maximální povolená odchylka při navažování byla 0,1 mg. Meloxikam byl následně rozetřen v porcelánové třence spolu s laurylsíranem sodným, ten byl přidáván postupně v poměru 1:1 do vzniku homogenní směsi. Tato směs byla převedena do baňky, doplněna čištěnou vodou do 250 ml a pomocí magnetické míchačky míchána přes noc, aby bylo zajištěno úplné rozpuštění meloxikamu.

Následující den byl roztok převeden do kádinky a poté k němu bylo za stálého míchání na magnetické míchače po částech přidáváno požadované množství

chitosanu do vzniku suspenze. Mezitím byla zapnuta sprejová sušárna a byly na ní nastaveny žádané parametry sušení. Tyto parametry jsou uvedeny v Tabulce 2. Po zahřátí sušárny na určenou teplotu byla zapnuta pumpa, suspenze se začala postupně nasávat a pomocí trysky byla rozptylována do sušící komory. Během celého procesu sušení byla suspenze míchána pomocí magnetické míchačky, aby nedocházelo k usazování chitosanu a ucpání trysky. Po přečerpání celého objemu suspenze byl systém pročištěn malým množstvím čišťené vody a sušárna se vypnula. Po vychladnutí a rozebrání sušárny byl produkt sebrán ze sběrné nádoby, kam byl po celou dobu sušení zachytáván.

Tabulka 1: Složení vzorků pro sušení

Vzorek	Chitosan (g)	Meloxicam (mg)	Laurylsíran sodný (g)
1.vzorek	12,5	37,5	7,5
2.vzorek	12,5	50	7,5
3.vzorek	12,5	62,5	7,5
4.vzorek	10	37,5	7,5
5.vzorek	10	50	7,5
6.vzorek	10	62,5	7,5
7.vzorek	7,5	37,5	7,5
8.vzorek	7,5	50	7,5
9.vzorek	7,5	62,5	7,5
10.vzorek	5	37,5	7,5
11.vzorek	5	50	7,5
12.vzorek	5	62,5	7,5

Tabulka 2: Parametry sprejového sušení

Parametry procesu	Experimentální podmínky
Průměr trysky	1,4 mm
Průtok vzduchu	30 mm ~ 439,11 L/h
Účinnost aspirátoru	100 %
Vstupní teplota	190 °C
Výkon pumpy	5 %
Frekvence čištění trysek	5

7.3.2 Příprava fyzikálních směsí

Po sprejovém sušení následovala příprava fyzikálních směsí. Kromě dvanácti fyzikálních směsí se shodným složením jako vzorky pro sprejové sušení bylo za účelem porovnání připraveno ještě dalších dvanáct fyzikálních směsí, které neobsahovaly povrchově aktivní laurylsíran sodný. Celkem tedy bylo připraveno 24 fyzikálních směsí, jejich názvy a složení jsou uvedeny v Tabulce 3. Mísení fyzikálních směsí probíhalo v mísicím zařízení Turbula, rychlost mísení byla nastavena na 34 otáček za minutu, celková doba mísení byla 5 minut.

Tabulka 3: Složení fyzikálních směsí

Název fyzikální směsi	Chitosan (g)	Meloxicam (mg)	Laurylsíran sodný (g)
FS+SLS 12,5/37,5	12,5	37,5	7,5
FS+SLS 12,5/50	12,5	50	7,5
FS+SLS 12,5/62,5	12,5	62,5	7,5
FS+SLS 10/37,5	10	37,5	7,5
FS+SLS 10/50	10	50	7,5
FS+SLS 10/62,5	10	62,5	7,5
FS+SLS 7,5/37,5	7,5	37,5	7,5
FS+SLS 7,5/50	7,5	50	7,5
FS+SLS 7,5/62,5	7,5	62,5	7,5
FS+SLS 5/37,5	5	37,5	7,5
FS+SLS 5/50	5	50	7,5
FS+SLS 5/62,5	5	62,5	7,5
FS 12,5/37,5	12,5	37,5	0
FS 12,5/50	12,5	50	0
FS 12,5/62,5	12,5	62,5	0
FS 10/37,5	10	37,5	0
FS 10/50	10	50	0
FS 10/62,5	10	62,5	0
FS 7,5/37,5	7,5	37,5	0
FS 7,5/50	7,5	50	0
FS 7,5/62,5	7,5	62,5	0
FS 5/37,5	5	37,5	0
FS 5/50	5	50	0
FS 5/62,5	5	62,5	0

7.3.3 Optická mikroskopie

Pro účely optické mikroskopie bylo z každého usušeného vzorku i z každé fyzikální směsi kopistkou odebráno malé množství produktu, které bylo následně převedeno do lékovek a smíseno s isopropylmyristátem za vzniku suspenze. Lékovky byly poté umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně, aby bylo působením ultrazvukových vln zajištěno rovnoměrné rozptýlení částic. Po vyjmutí z ultrazvukové lázně bylo z každé lékovky pomocí skleněné tyčinky odebráno několik kapek suspenze, ty byly přeneseny na podložní sklíčko a překryty krycím sklíčkem. Takto připravené preparáty byly položeny na posuvný stolek optického mikroskopu Olympus BX 51, jehož parametry nastavení jsou uvedeny v Tabulce 4. Mikroskop byl propojen s počítačem s programem AnalySIS auto 5,1, který byl použit pro pozorování částic a pořízení snímků.

Tabulka 4: Parametry nastavení optického mikroskopu

Zvětšení	20×
Rozlišení kamery	1360×1024 px
Rozlišení fotoaparátu	1360×1024 px
Velikost jednoho pixelu	0,2164 μm

7.3.4 Skenovací elektronová mikroskopie

Vzhled částic usušených vzorků i samotných výchozích surovin byl kromě optické mikroskopie hodnocen i pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Snímky částic byly pořízeny Mgr. Janou Brokešovou na Povodí Labe v Hradci Králové, vzhledem k protiepidemickým opatřením bylo pořízení snímků provedeno bez její přítomnosti. Pro pořízení snímků byl použit elektronový mikroskop Phenom Pro s detektorem zpětně odražených elektronů, parametry měření jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Parametry elektronového mikroskopu

Zvětšení	500× a 2000×
Urychlovací napětí	5 kV

Nejprve byly vzorky za použití uhlíkové lepicí pásky přichyceny na hliníkový terčík, poté byla na vzorky nanesena vrstva zlata o tloušťce přibližně 10 nm. Pokovením došlo ke zvýšení povrchového napětí vzorků, čímž byl odveden přebytečný náboj a zabránilo se tak deformaci preparátu.

7.3.5 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Metodou diferenciální skenovací kalorimetrie byly hodnoceny termické vlastnosti usušených vzorků i fyzikálních směsí. Pro účely DSC bylo nutné převést malé množství z každého usušeného vzorku do hliníkových kelímků s víčkem. Veškerá manipulace s hliníkovými kelímky probíhala pomocí pinzety. Nejprve byla na analytických vahách stanovena hmotnost prázdného kelímku i s víčkem, poté byl do víčka udělán malý otvor. Následně se do kelímku pomocí kopistky přeneslo 5 až 10 mg vzorku, kelímek byl překryt víčkem a zvážen. Rozdíl mezi hodnotou hmotnosti kelímku se vzorkem a prázdného kelímku udával množství přeneseného vzorku. Pokud byl splněn požadavek na hmotnost vzorku uvnitř kelímku, byl kelímek vložen do ručního lisu a řádně uzavřen. Posledními kroky před spuštěním měření bylo vložení uzavřeného kelímku do DSC přístroje a nastavení požadovaných parametrů (Tabulka 6). Jako referenční vzorek byl použit prázdný kelímek. Stejným způsobem byly připraveny vzorky i ze všech fyzikálních směsí a pro účely vyhodnocení i vzorky samotného meloxikamu, chitosanu a laurylsíranu sodného.

Tabulka 6: Parametry teplotního programu DSC

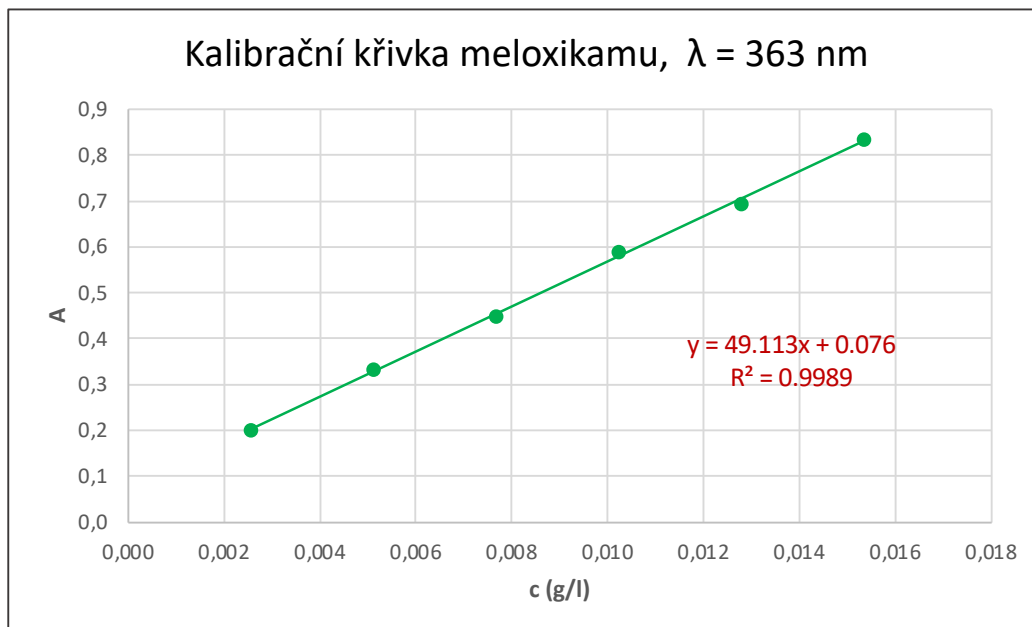
	Fáze programu	Teplota	Rychlost teplotních změn
Použitý teplotní program	Start	20 °C	-
	Chlazení	-20 °C	10 °C/min
	Izoterma	-20 °C	5 min
	Ohřev	280 °C	4 °C/min
	Chlazení	-20 °C	10 °C/min
	Izoterma	-20 °C	2 min
	Ohřev	280 °C	4 °C/min

Do počítačového programu DSC 200 byly zadány veškeré potřebné údaje, konkrétně název a hmotnost vzorku, hmotnost prázdného kelímku, hmotnost referenčního vzorku, použitý teplotní program a měření s korekcí anebo bez korekce. Dle zvolených parametrů teplotního programu docházelo v komoře k teplotním změnám, které následně vyvolaly změny ve vzorku. Každý vzorek podstoupil celkem dva ohřevy. Změny vzorků byly v podobě píků zaznamenávány v termogramech, každý pík byl charakterizován plochou pod píkem a teplotami. Termogramy usušených vzorků a fyzikálních směsí byly následně vyhodnoceny v počítačovém programu Netzsch Proteus Thermalanalysis a porovnány s termogramy meloxikamu, chitosanu a laurylsíranu sodného.

7.3.6 Disoluce a spektrofotometrie

Pro účely disolučních zkoušek s následným spektrofotometrickým vyhodnocením bylo nejprve třeba vylisovat tablety. Z každého vzorku, z každé fyzikální směsi a také z nesušeného meloxikamu byly za použití lisovací síly 4 kN lisovány celkem 3 tablety o hmotnosti 500 mg a průměru 9 mm. K provedení disolučních zkoušek sloužil přístroj s pádly a uzavřeným disolučním systémem. Před zahájením zkoušek byly nádoby disolučního systému naplněny fosforečnanovým pufrům o hodnotě pH 6,8. Systém byl se zapnutými míchadly následně zahříván na 37 °C a po dosažení požadované teploty byly tablety umístěny do sinkerů a vloženy do disolučního média. Ve stejný čas byl spuštěn automatický odběr vzorků.

Vzorky o objemu 5 ml byly pomocí autosampleru odebírány každých 5 minut po dobu jedné hodiny, objem disolučního média byl po každém odběru doplněn pufrům z kádinky umístěné vedle disolučního systému. Odebrané vzorky (celkem 12 vzorků z každé disoluční nádoby) byly převedeny do kyvet a vloženy do spektrofotometru. Jako slepý vzorek byl použit fosforečnanový pufr o hodnotě pH 6,8. Vlnová délka byla nastavena na 363 nm a pomocí počítačového programu byly zjištěny hodnoty absorbance. Ty po dosažení do vzorce získaného z kalibrační křivky (Obrázek 11) sloužily k výpočtu koncentrace léčiva.



Obrázek 11: Kalibrační křivka meloxikamu. Absorbance (A), koncentrace (c), vlnová délka (λ).

Vypočtená koncentrace léčiva byla poté použita pro výpočet dalších veličin (Tabulka 7) charakterizujících uvolňování léčiva. Před výpočtem některých veličin bylo potřeba stanovit množství meloxikamu v usušených vzorcích, neboť během sprejového sušení může docházet k jeho ztrátám. Pro stanovení množství meloxikamu bylo ze všech usušených vzorků odebráno 100 mg, následně bylo toto odebrané množství převedeno do odměrné baňky a doplněno methanolem do 10 ml. Takto připravená suspenze byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně, aby byla zajištěna rovnoměrná distribuce částic, a po vyjmutí z lázně se nechala přes noc stát, aby došlo k rozpuštění meloxikamu.

Další den byla suspenze přefiltrována do kádinky, z ní bylo poté pipetou odebráno 200 μl roztoku, převedeno do kyvety a smíseno s 1,80 ml fosfátového pufru. U takto připravených roztoků byla následně změřena absorbance. Z ní byla dosazením do kalibrační křivky (a se zohledněním naředění) vypočítána koncentrace, ta sloužila k samotnému výpočtu množství meloxikamu v usušených vzorcích.

Tabulka 7: Vzorce pro výpočet veličin z disoluce

Symbol	Jednotka	Název	Vzorec
c	mg/ml	Koncentrace	$c = \frac{(A - 0,076)}{49,113}$
m_{vessel}	mg	Množství vzorku uvolněného léčiva v nádobě	$m_{vessel} = c * V$
m_{sample}	mg	Množství léčiva ve vzorku	$m_{sample} = c * V_{sample}$
$m_{c.sam.}$	mg	Kumulované množství léčiva odebrané ve vzorcích	$m_{c.sam.} = \sum m_{sample}$
m_{corr}	mg	Korigované množství uvolněného léčiva	$m_{corr} = m_{vessel} + \sum m_{sample}$
m_{rel}	%	Množství uvolněného léčiva vzhledem k deklarované dávce	$m_{rel} = \frac{m_{corr}}{deklar.dávka} * 100$

8 DISKUZE A VÝSLEDKY

V této diplomové práci byla sprejově sušena suspenze chitosanu v roztoku meloxicamu s přídavkem povrchově aktivního laurylsíranu sodného. Sušeny byly suspenze obsahující 12,5; 10; 7,5 nebo 5 g chitosanu. Sušení všech vzorků probíhalo při teplotě 190 °C ve sprejové sušárně Büchi Mini Spray Dryer B-290, vzhled a vlastnosti usušených částic byly dále hodnoceny několika metodami.

Vzhled částic usušených vzorků byl hodnocen metodami optické mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie. Sledovalo se, k jakým změnám tvaru a struktury částic došlo během sprejového sušení a zda jsou tyto změny ovlivněny i použitou koncentrací chitosanu. Metodou optické mikroskopie byly pozorovány také částice fyzikálních směsí. Získané snímky byly následně porovnávány se snímky samotných výchozích surovin, tj. meloxicamu, chitosanu a laurylsíranu sodného.

Metodou diferenciální skenovací kalorimetrie byly hodnoceny tepelné vlastnosti částic u usušených vzorků i fyzikálních směsí. Porovnáním termogramů usušených vzorků a termogramů nesušených výchozích surovin bylo zjištěno, jaký vliv má sprejové sušení na teploty tání, dehydratace, dekompozice a degradace jednotlivých složek vzorku. Posuzován byl i vliv přídavku SLS na tyto teploty.

Z usušených vzorků i fyzikálních směsí byly vylisovány tablety o hmotnosti 500 mg, které byly podrobeny disolučním zkouškám. Během zkoušek disoluce byly z disolučních nádob v pravidelných časových intervalech odebírány vzorky, u nichž byla spektrofotometricky měřena absorbance. Data získaná metodami disoluce a spektrofotometrie sloužila k hodnocení uvolňování léčiva meloxicamu z tablet.

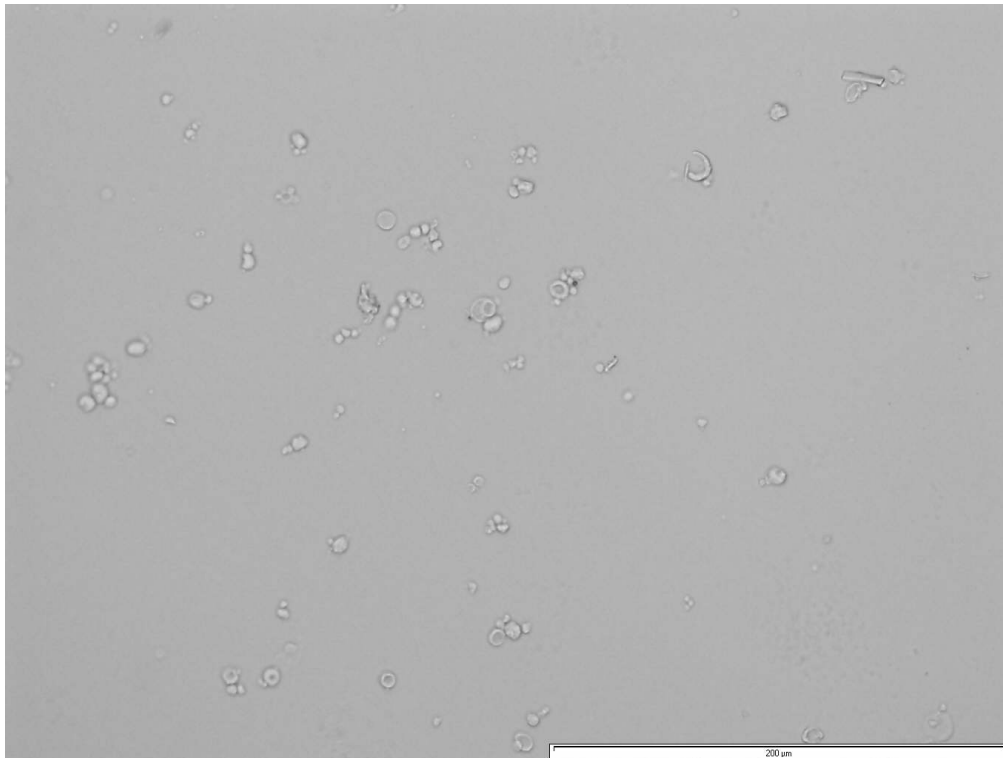
8.1 Hodnocení vzhledu částic

8.1.1 Optická mikroskopie

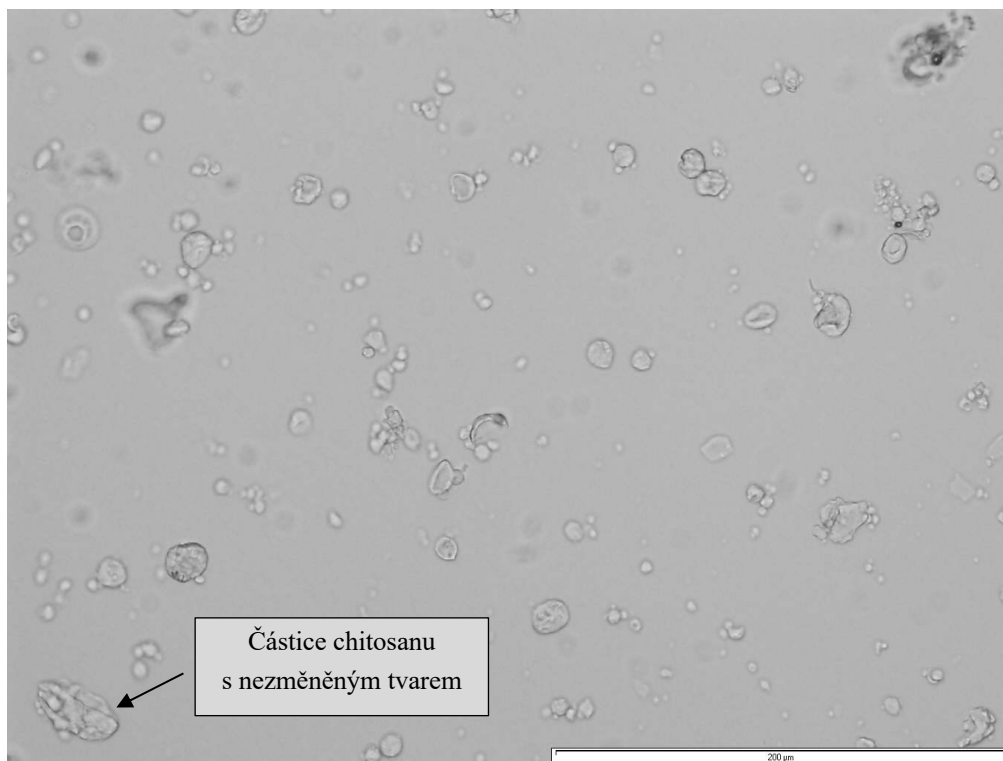
Na Obrázcích 12 a 13 můžeme pozorovat částice sprejově sušených vzorků. Pro ukázkou byl vybrán 3. vzorek a 12. vzorek, tj. jeden ze vzorků s nejvyšším obsahem chitosanu (12,5 g před sušením) a jeden ze vzorků s nejnižším obsahem chitosanu (5 g před sušením). Při porovnání snímků usušených částic se snímky zachycujícími částice výchozích surovin (Obrázky 14 až 16) a částice fyzikálních směsí (Obrázky 17 až 20) je zřejmé, že během sprejového sušení dochází k výrazné změně tvaru částic. Zatímco částice samotných výchozích surovin mají převážně nepravidelný tvar, částice usušených vzorků jsou většinou téměř sférického nebo nepravidelného sférického tvaru a tvoří shluky. Zpravidla se uprostřed shluku nachází větší částice chitosanu obklopená několika malými částicemi meloxikamu v kombinaci s SLS nebo chitosanu. Kromě sférických částic jsou v usušených vzorcích viditelné i částice chitosanu s nezměněným destičkovitým tvarem (Obrázek 13).

Vzhled částic jednotlivých vzorků se mezi sebou výrazně neliší, z čehož vyplývá, že množství chitosanu použitého pro přípravu vzorků pravděpodobně nemá vliv na vzhled částic vzniklých při sprejovém sušení. Se zvyšujícím se množstvím chitosanu lze u usušených vzorků pozorovat pouze nepatrně větší množství částic chitosanu s nezměněným tvarem. Velikost usušených částic měřena nebyla, avšak i bez tohoto měření je při porovnání snímků jasně viditelné, že během sprejového sušení došlo k výraznému zmenšení částic chitosanu. Největší vliv na zmenšení velikosti mají nejspíše vzájemné srážky částic, ke kterým dochází v důsledku proudění v suspenzi a proudění horkého vzduchu v sušící komoře během sprejového sušení.

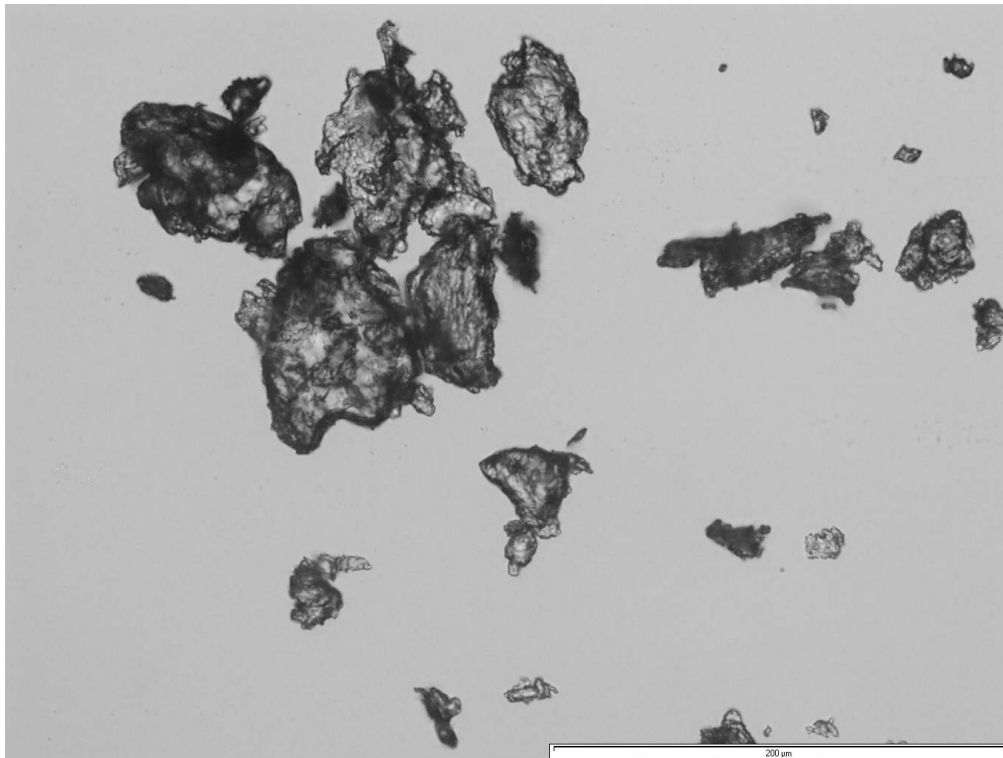
Odlišná je situace u fyzikálních směsí, v jejich případě totiž nedochází ke změně tvaru ani velikosti částic. Nelze ani spolehlivě odlišit, které ze zachycených částic patří chitosanu a které SLS, neboť částice obou jsou poměrně velké a na snímcích z optického mikroskopu vypadají obdobně. Lze předpokládat, že během mísení fyzikálních směsí došlo k přilnutí malých částic meloxikamu na nepravidelný povrch chitosanu nebo SLS, avšak na snímcích není tato skutečnost dobře pozorovatelná.



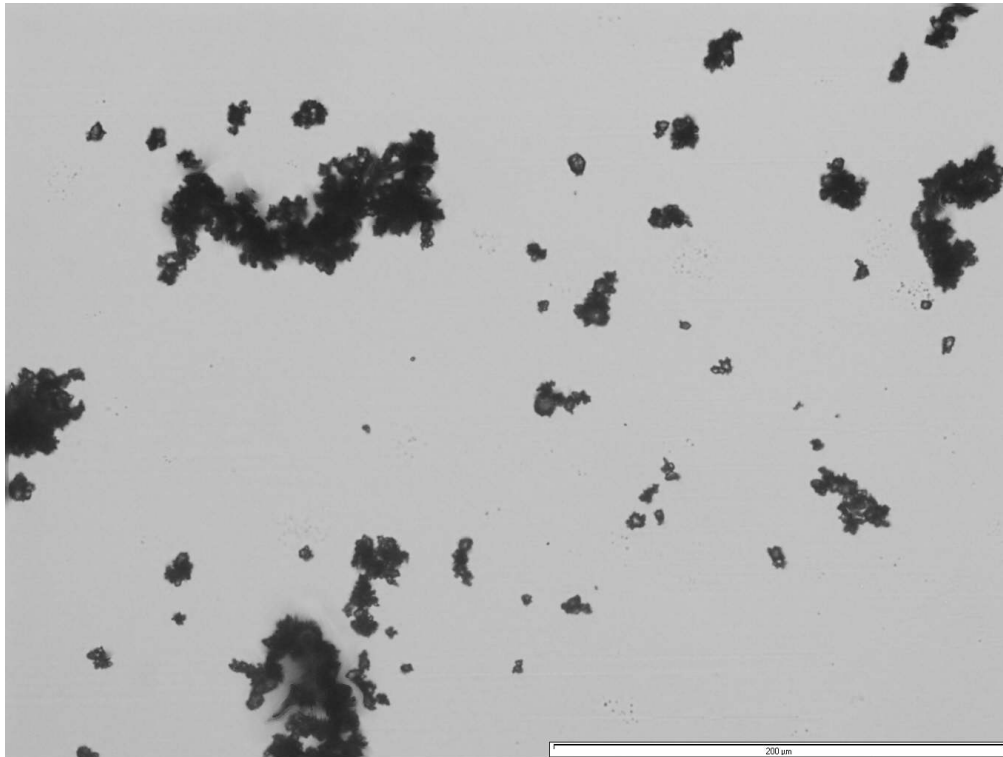
Obrázek 12: Sprejově sušené částice 3. vzorku, zvětšení 20×



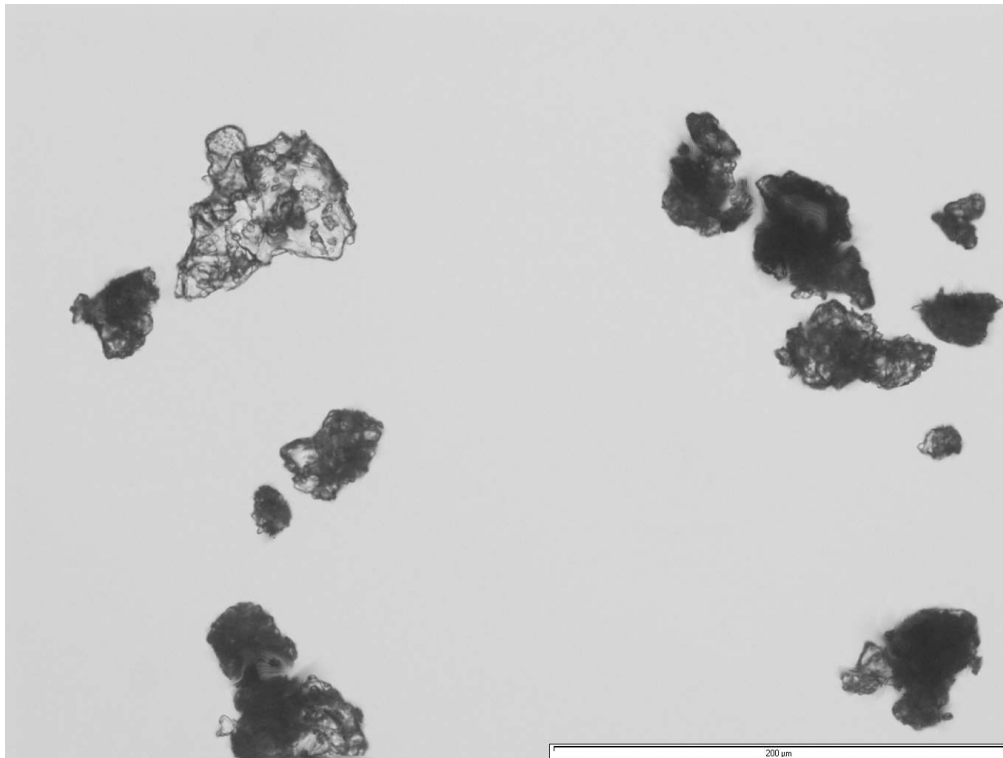
Obrázek 13: Sprejově sušené částice 12. vzorku, zvětšení 20×



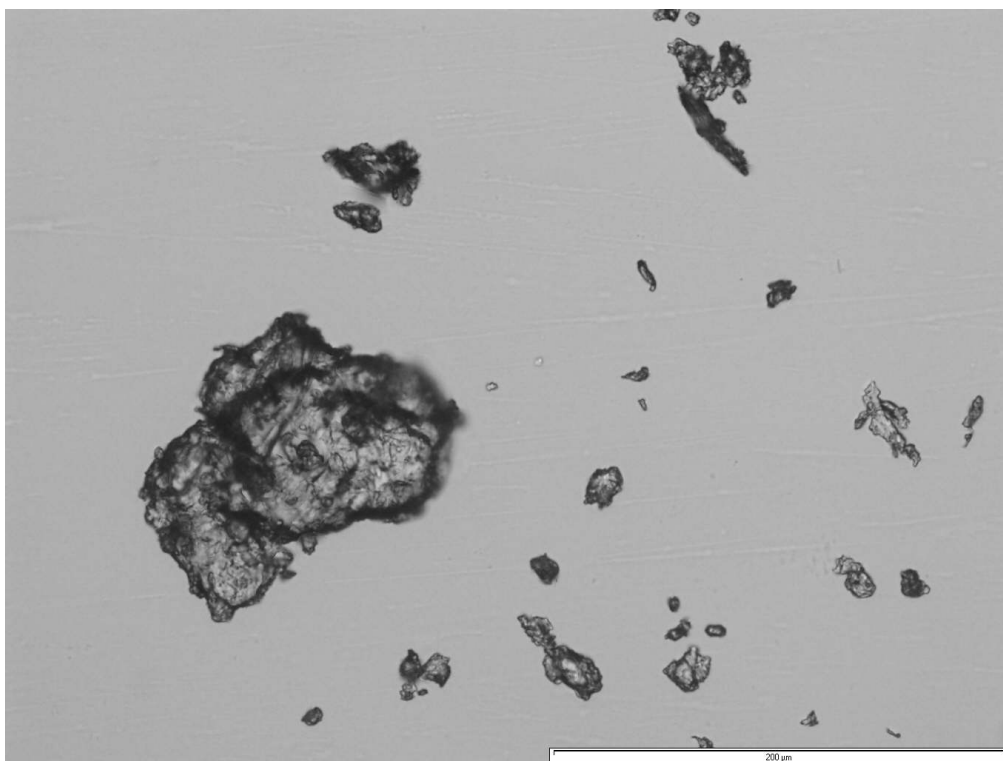
Obrázek 14: Částice nesušeného chitosanu, zvětšení 20×



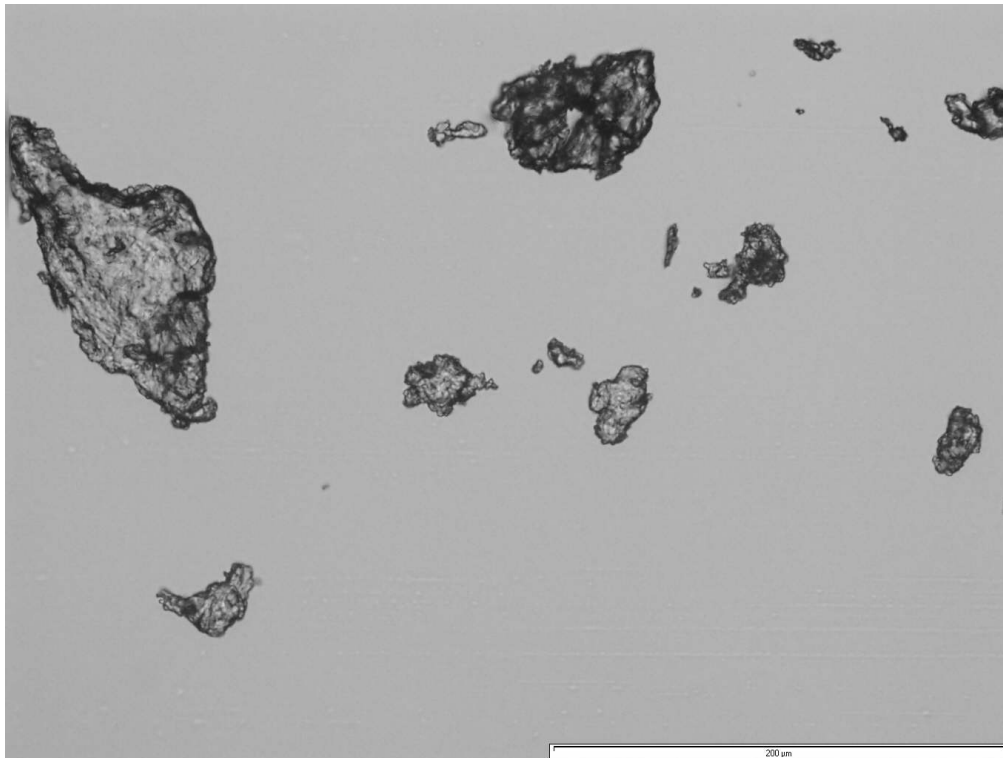
Obrázek 15: Částice nesušeného meloxicamu, zvětšení 20×



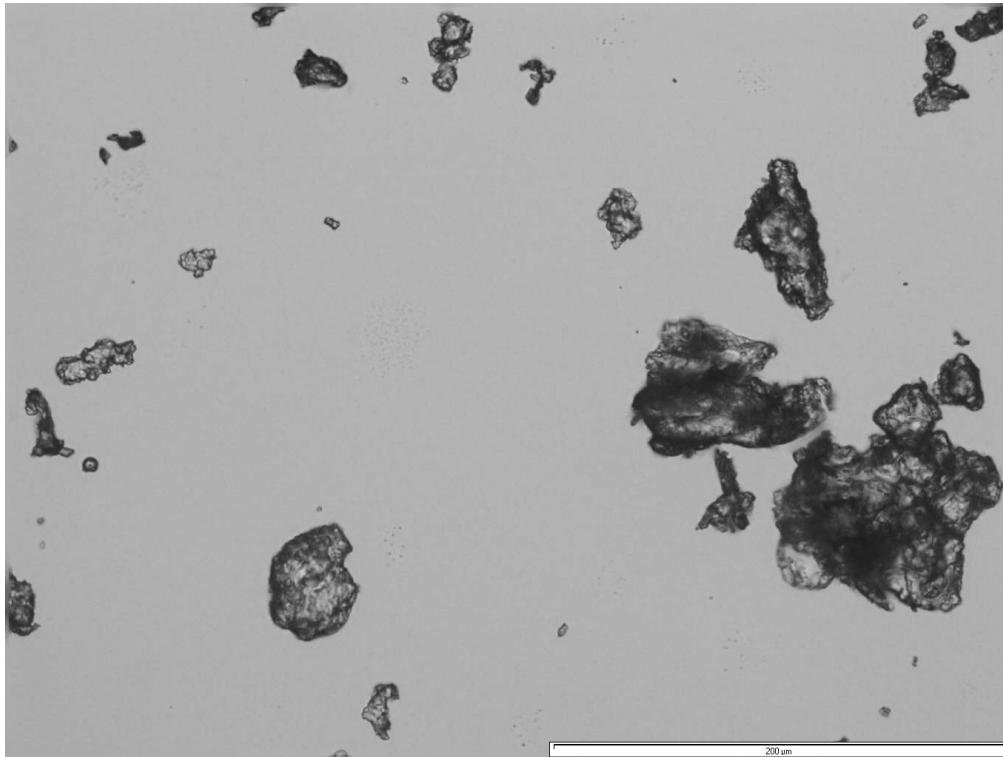
Obrázek 16: Částice nesušeného laurylsíranu sodného, zvětšení 20×



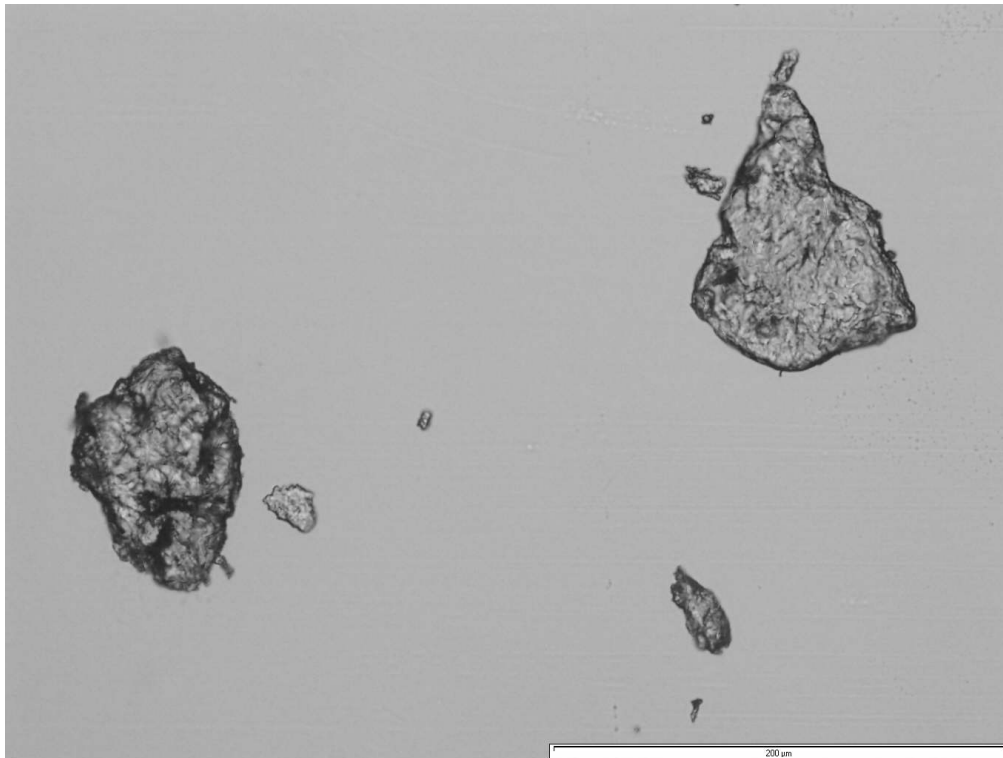
Obrázek 17: Částice fyzikální směsi FS+SLS 12,5/62,5, zvětšení 20×



Obrázek 18: Částice fyzikální směsi FS 12,5/62,5, zvětšení 20×



Obrázek 19: Částice fyzikální směsi FS+SLS 5/62,5, zvětšení 20×



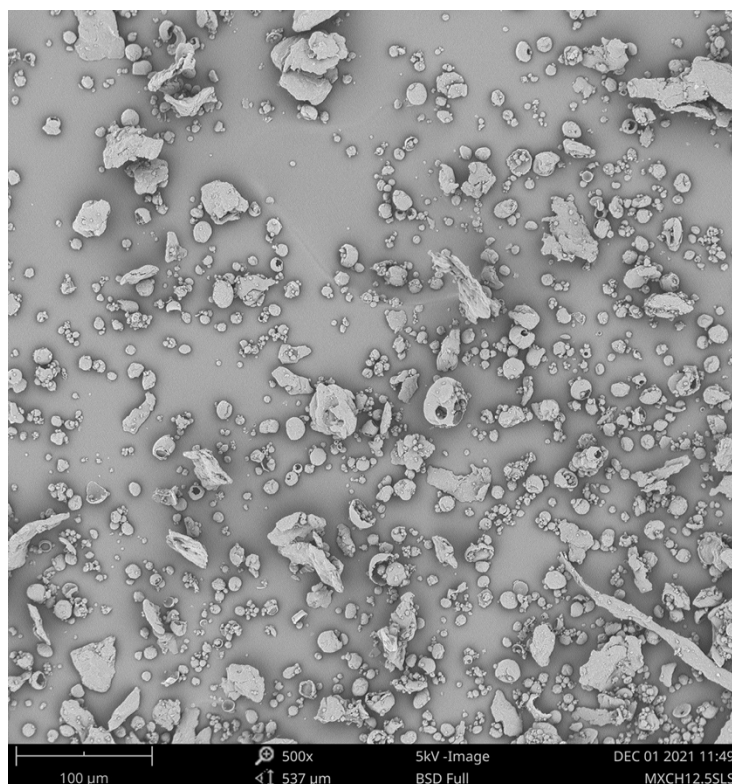
Obrázek 20: Částice fyzikální směsi FS 5/62,5, zvětšení 20×

8.1.2 Skenovací elektronová mikroskopie

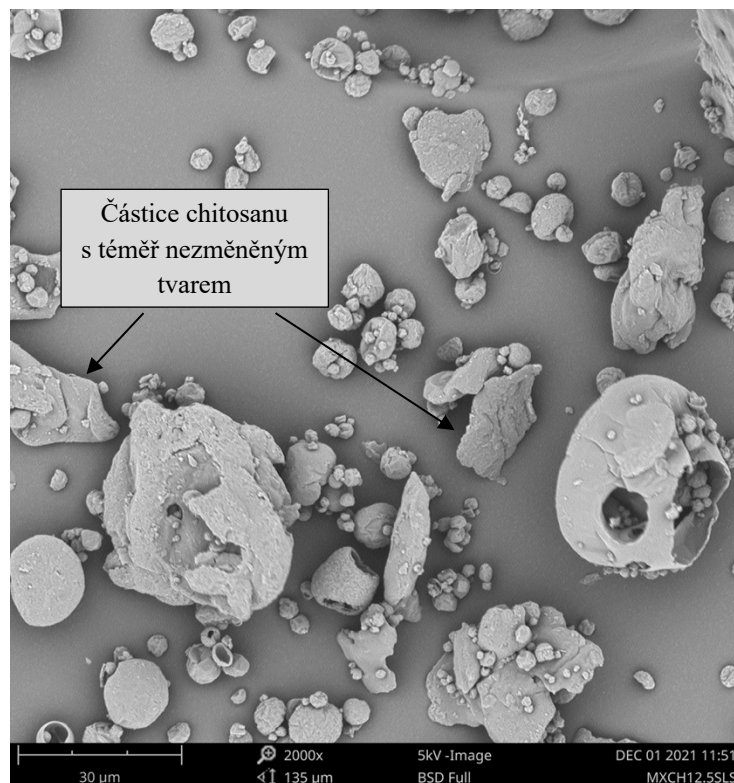
Pro hodnocení vzhledu částic metodou skenovací elektronové mikroskopie byl stejně jako u optické mikroskopie vybrán 3. a 12. vzorek. Snímky sprejově sušených částic těchto vzorků pořízené při různých zvětšeních jsou zobrazeny na Obrázcích 21 až 24. Při porovnání těchto snímků se snímky částic nesusušených výchozích surovin (Obrázky 25 až 27) se opět potvrzuje skutečnost, že během sprejového sušení dochází k významné změně tvaru, struktury i velikosti částic. Většina sprejově sušených částic má nepravidelný kulovitý tvar a na jejich povrchu jsou viditelné četné nerovnosti a vrásnění. Zpravidla se tyto částice vyskytují ve shlucích, avšak pozorovány mohou být i samostatné částice nepravidelného kulovitého tvaru a částice chitosanu, jejichž tvar byl během sprejového sušení nezměněn nebo změněn minimálně (Obrázky 22 a 24).

Dále je možné si na snímcích sprejově sušených vzorků povšimnout, že některé částice jsou duté, přičemž uvnitř těchto dutin se obvykle nachází menší částice (Obrázek 23). Duté částice pravděpodobně vznikají kombinací chitosanu a SLS, jejich

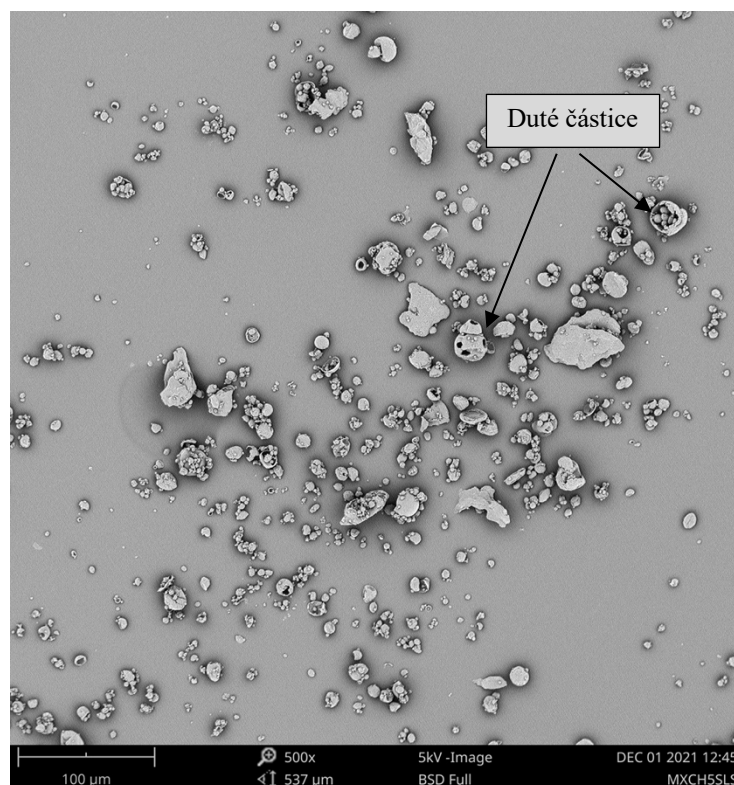
tvorby by se patrně mohl účastnit i meloxikam. Malé sférické částice nacházející se uvnitř dutin jsou zřejmě tvořeny meloxikamem a SLS, neboť jejich původní nepravidelné částice se při přípravě vzorků před sušením rozpustí a následně během sprejového sušení vznikají částice s konečným sférickým tvarem, který je výsledkem rozprašování pomocí trysky a s tím souvisejícím formováním kapiček. Shodně jako u optické mikroskopie nejsou při porovnání snímků obou usušených vzorků patrné rozdíly ve vzhledu částic.



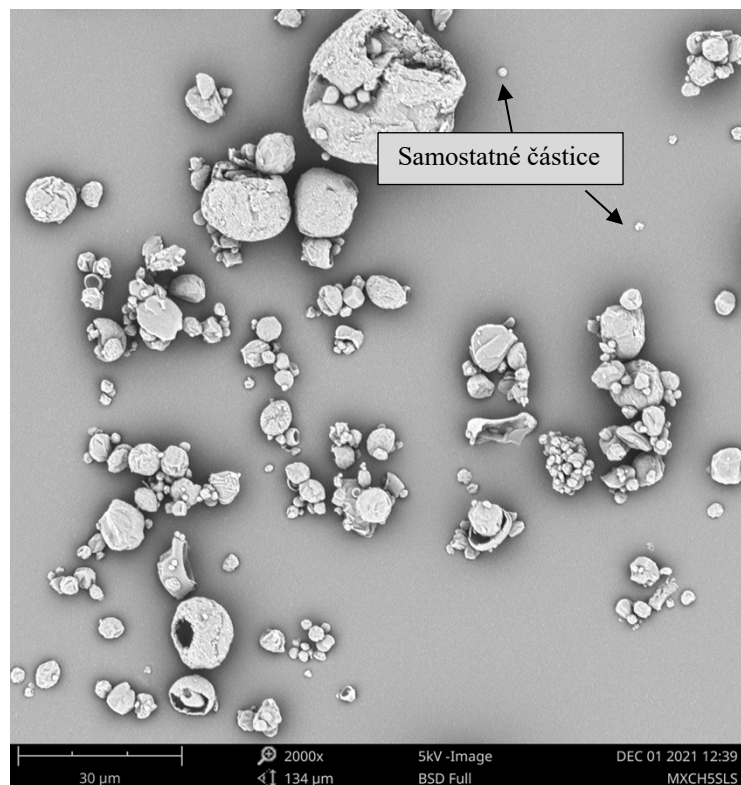
Obrázek 21: SEM snímek usušeného 3. vzorku, zvětšení 500×



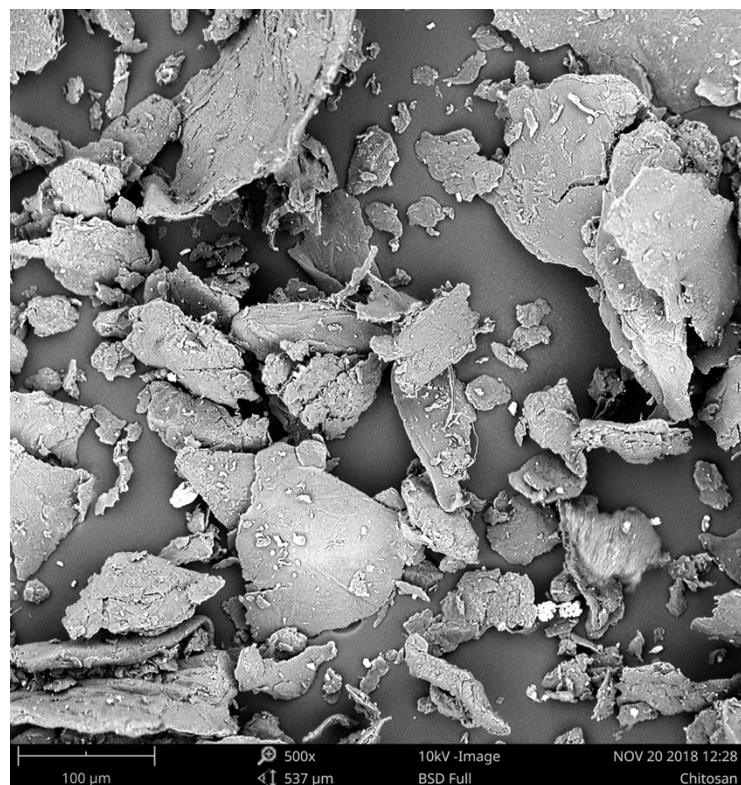
Obrázek 22: SEM snímek usušeného 3. vzorku, zvětšení 2000×



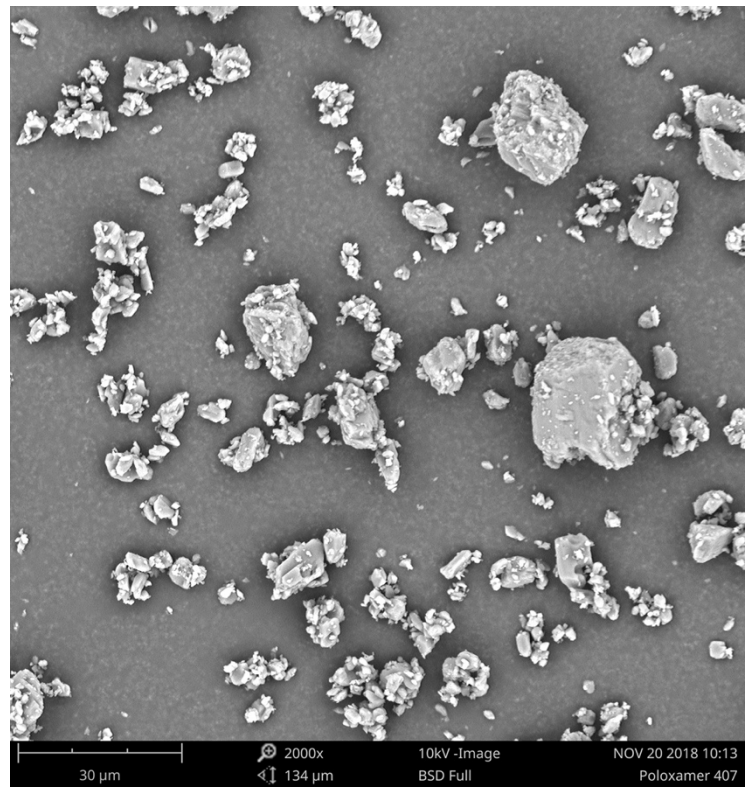
Obrázek 23: SEM snímek usušeného 12. vzorku, zvětšení 500×



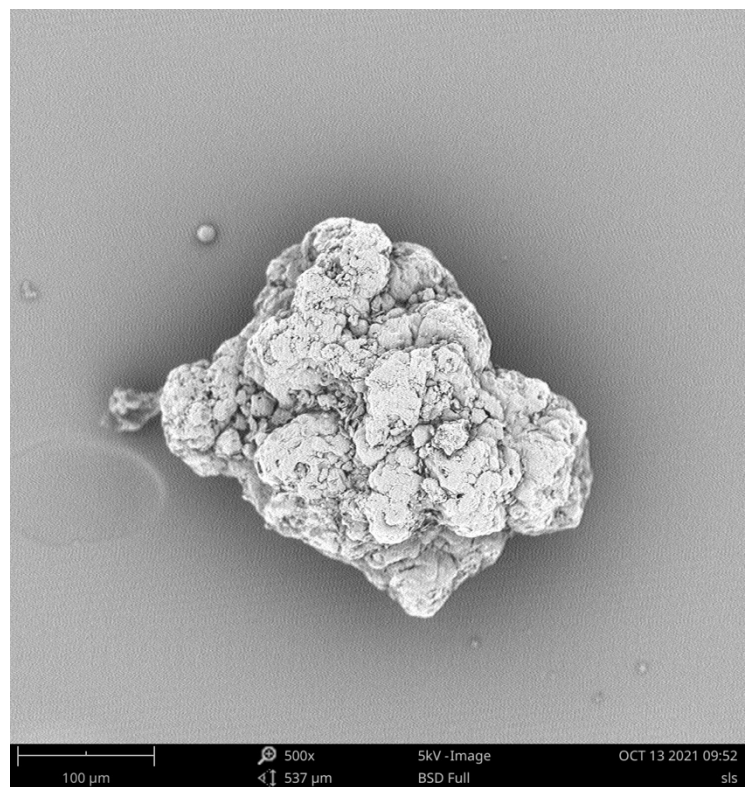
Obrázek 24: SEM snímek usušeného 12. vzorku, zvětšení 2000×



Obrázek 25: SEM snímek chitosanu, zvětšení 500×



Obrázek 26: SEM snímek meloxicamu, zvětšení 2000×



Obrázek 27: SEM snímek laurylsíranu sodného, zvětšení 500×

Na Obrázcích 21 až 24 si lze povšimnout, že malé částice tvořené kombinací meloxicamu a SLS se vyskytují nejen uvnitř již zmíněných větších dutých částic, ale i na jejich povrchu. Podíl množství léčiva zabudovaného do mikrosfér chitosanu ku celkovému množství léčiva ve vzorku hodnotili ve své práci např. Stulzer a kol. [11] a Aranaz a kol. [3]

Sprejově sušené částice chitosanu a léčiva, které měly stejně jako částice připravené v této diplomové práci zvrásněný povrch, byly připraveny a hodnoceny ve studii Alhalaweh a kol. [17], Cervera a kol. [44] a Corrigan a kol. [45]. Většina částic v těchto studiích měla v porovnání s částicemi připravenými v této diplomové práci pravidelnější sférický tvar a v žádném z usušených vzorků se nevyskytovaly částice chitosanu s nezměněným, a tedy nepravidelným tvarem. Sférický tvar usušených částic vzniká během rozprašování kapiček sušeného roztoku nebo suspenze do horkého sušicího média [17], podle Cervera a kol. sféricita částic souvisí i s teplotou, při které jsou částice sušeny.

Corrigan a kol. [45] ve své práci zjistili, že tvar a povrch usušených částic je závislý na charakteru rozpouštědla, ve kterém byl chitosan před sušením rozpuštěn nebo suspendován. Dalším faktorem ovlivňujícím vzhled usušených částic může dle Corrigan a kol. být i koncentrace léčiva, neboť čím větší koncentrace léčiva byla pro přípravu vzorků použita, tím hladší měly částice povrch a jejich tvar byl častěji zborcený. V této diplomové práci byly při přípravě vzorků také použity různé koncentrace léčiva, avšak v porovnání se studií Corrigan a kol. byly tyto koncentrace výrazně menší a jejich vliv na vzhled usušených částic tedy nebyl pozorován.

Podstatně větší vliv na vzhled a vlastnosti částic hodnocených v této diplomové práci by oproti koncentraci léčiva mohla mít koncentrace chitosanu v suspenzi, ze které byly částice sprejově sušeny. Jak již ale bylo zmíněno výše, při porovnání snímků usušených částic připravených ze suspenzí s různým obsahem chitosanu nebyly viditelné rozdíly ani ve struktuře ani ve tvaru částic. Rozdíly by pravděpodobně mohly být patrné ve velikosti usušených částic, avšak měření velikosti nebylo součástí této práce. Posouzením vlivu koncentrace chitosanu na vzhled a vlastnosti sprejově sušených částic se ve svých studiích zabývali i Liu a kol. [46] a He a kol. [47]. Ve studii Liu a kol. je potvrzena skutečnost, že koncentrace chitosanu vzhled usušených

částic neovlivňuje nebo ovlivňuje jen zanedbatelně. Jejich velikost tímto naopak ovlivněna je, přičemž se vzrůstající koncentrací chitosanu roste i velikost usušených částic. Závislost velikosti usušených částic na koncentraci chitosanu byla prokázána i ve studii He a kol.

8.2 Hodnocení tepelných vlastností pomocí DSC

Metodou diferenciální skenovací kalorimetrie byly hodnoceny tepelné vlastnosti částic usušených vzorků, fyzikálních směsí a samotných výchozích surovin. Změny, ke kterým dochází v průběhu zahřívání částic, jsou znázorněny na termogramech. Na Obrázcích 28 až 30 jsou zobrazeny termogramy samotných výchozích surovin, tj. samotného chitosanu, meloxikamu a SLS. Tyto termogramy byly porovnávány s termogramy usušených vzorků (Obrázky 31 a 32) a fyzikálních směsí (Obrázky 33 až 36). Pro ukázkou byly stejně jako při hodnocení vzhledu částic zvoleny termogramy usušených vzorků a fyzikálních směsí obsahující nejvyšší a nejnižší množství chitosanu, pro větší přehlednost byly do termogramů zahrnuty pouze první ohřevy. Díky porovnání těchto termogramů s termogramy výchozích surovin je možné určit, jaké změny jednotlivé píky na termogramech znázorňují a při jakých teplotách k těmto změnám dochází. Mezi hodnocené změny patří dehydratace chitosanu a SLS, teploty tání meloxikamu a SLS, dekompozice meloxikamu a degradace SLS (Tabulky 8 až 10).

Prvním píkem na termogramu sprejově sušených vzorků je pravděpodobně pík dehydratace SLS. Teplota, při které k dehydrataci SLS u usušených vzorků dochází, se pohybuje v rozmezí 15,5 až 16,3 °C (Tabulka 8), a je tedy pouze nepatrně vyšší než u nesušeného SLS, kde byla stanovena jako 14,3 °C. Další pík na termogramu také znázorňuje dehydrataci, tentokrát se však jedná o dehydrataci chitosanu. Teplota dehydratace chitosanu se během sprejového sušení snížila z původních 98,9 °C na 57,1 až 75,5 °C. Ve studii Ogunjimi a kol. [48] byla teplota dehydratace sprejově sušeného chitosanu stanovena na 75 °C, ve studii Antonirai a kol. [49] byla stanovena na přibližně 80 °C. Pokles teploty dehydratace chitosanu vlivem sprejového sušení zaznamenali ve své práci i Zhao a kol. [50]. Teplota dehydratace sprejově sušeného

chitosanu může být ovlivněna např. molekulovou hmotností chitosanu, jeho stupněm deacetylace a také jeho úpravou před sušením. Za píkem dehydratace chitosanu se nalézá další pík dehydratace SLS. Teplota této dehydratace je u usušených vzorků opět nepatrně zvýšená oproti teplotě u nesusšeného SLS (106,3 °C), pohybuje se v rozmezí 108,1 až 113,8 °C. Podle práce Elsayed a kol. [51] je teplota dehydratace SLS 105,43 °C. Ve studii Dave a kol. [52] byla dehydratace samotného SLS stanovena při 97,88 °C, avšak v případě, kdy byl SLS součástí pevné disperze s indometacinem a polyvinylpyrrolidonem, byla tato teplota zvýšena na 105 °C.

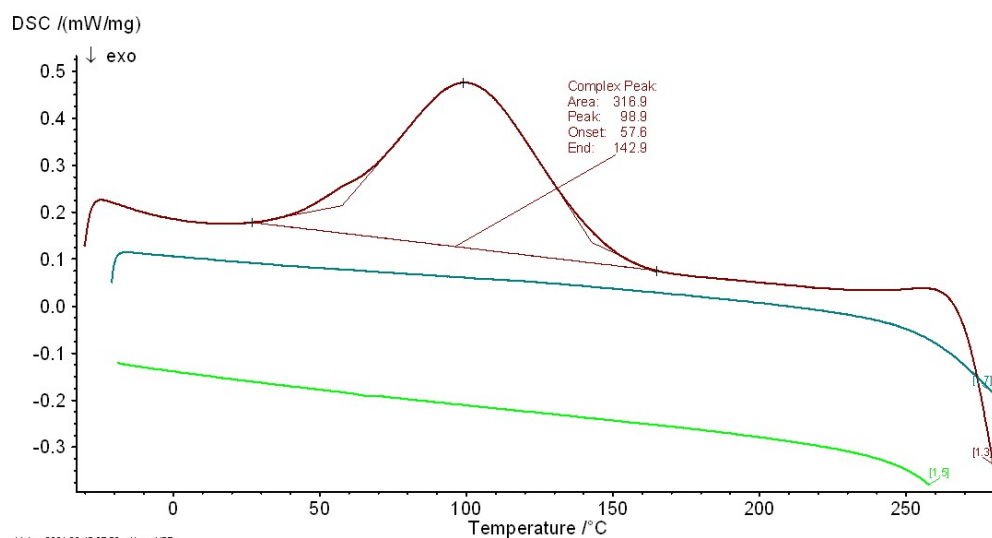
Další pík se na termogramu usušených vzorků vyskytuje při teplotě 196,6 až 197,6 °C. Mohlo by se jednat o pík teploty tání SLS, neboť se tento pík objevuje při přibližně shodné teplotě jako pík teploty tání na termogramu samotného nesusšeného SLS. Dave a kol. [52] ve své práci určili teplotu tání SLS jako 190,28 °C. Jednat by se však mohlo i o pík teploty tání meloxikamu, neboť za tímto píkem následuje pík dekompozice meloxikamu. Pokud se skutečně jedná o pík teploty tání meloxikamu, dochází během sprejového sušení k výrazné změně této teploty tání. Teplota tání nesusšeného meloxikamu byla stanovena při 259,9 °C, rozdíl mezi teplotami tání sušeného a nesusšeného meloxikamu by činil až 63,3 °C. Pokles teploty tání meloxikamu po sprejovém sušení zaznamenali ve své studii i Party a kol. [53] a Pomázi a kol. [54]. Ve studii El-Badry a kol. [55] se po sprejovém sušení pík teplot tání meloxikamu na termogramech vůbec neobjevil, došlo tedy ke změně krystalické struktury meloxikamu na strukturu amorfní. Pravděpodobnou příčinou změny struktury byla interakce s použitým nosičem léčiva. Stejného jevu si ve své studii všimli i Varga a kol. [56]. Na Obrázku 32 zachycujícím termogram usušeného 12. vzorku si lze povšimnout, že pík teploty tání meloxikamu nebo SLS je dvojitý. Dvojitý pík teploty tání se objevil i ve studii Nasr a kol. [57], a to jak na termogramu samotného SLS, tak na termogramu připravených kopolymerů. Existence dvojitého píku je tedy s největší pravděpodobností způsobena právě přítomností SLS.

Jak již bylo uvedeno, po píku teploty tání meloxikamu nebo SLS (v Tabulce 8 a 10 označena jako $T_{T\text{MX}}/T_{T\text{SLS}}$) následuje pík dekompozice meloxikamu. I v případě teploty, při které dochází k dekompozici meloxikamu, došlo k výrazné změně. Na termogramech usušených vzorků se tato teplota pohybuje v rozmezí

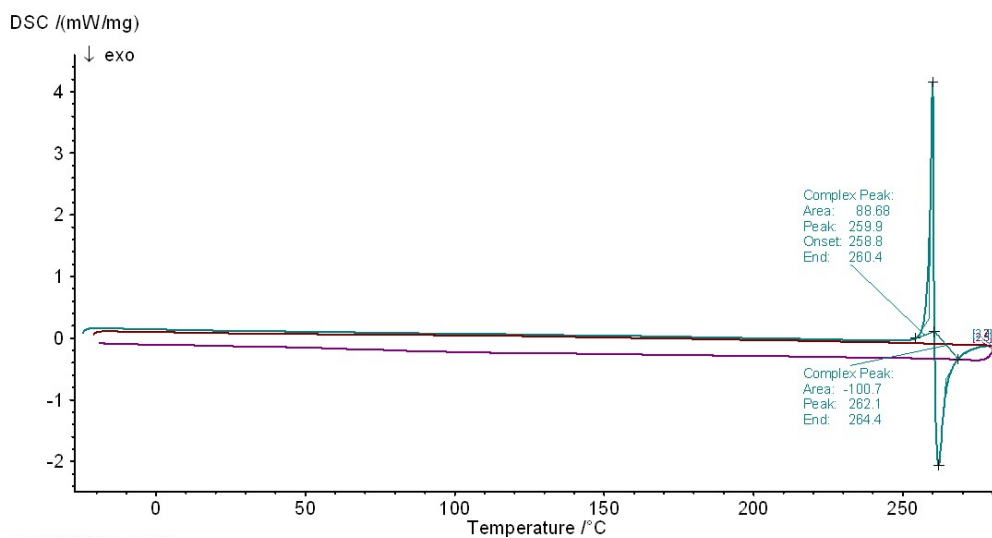
218,1 až 220,8 °C, na termogramu nesusšeného meloxikamu byla stanovena jako 262,1 °C. Pisani a kol. [58] ve své práci určili teplotu tání meloxikamu při 257,6 °C a ihned za tímto píkem také následoval pík dekompozice. Poslední píky na termogramech usušených vzorků patří degradacím SLS. U usušených vzorků dochází k degradaci SLS při teplotách v rozmezí 232,4 až 252,6 °C, tzn. při nižší teplotě než u samotného SLS (265,5 °C). Degradace SLS byla ve studii Elsayed a kol. [51] zjištěna při 277,56 °C a ve studii Nasr a kol. [57] při 264,5 °C. Ve studii Ogunjimi a kol. [48] byla na termogramech sprejově sušených vzorků zaznamenána i teplota skelného přechodu amorfního chitosanu. Stanovení této teploty může být obtížné, neboť může být ovlivněna např. molekulární hmotností chitosanu nebo stupněm jeho deacetylace [48]. Na termogramech hodnocených v této diplomové práci hodnota teploty skelného přechodu chitosanu rozeznat nelze.

U termogramů fyzikálních směsí bez SLS (Obrázky 33 a 34, Tabulka 9) může být hodnocen pouze jeden pík, a to pík dehydratace chitosanu při teplotě 87,2 až 102,2 °C. V případě těchto směsí tedy teplota dehydratace chitosanu není nijak výrazně ovlivněna oproti teplotě dehydratace samotného chitosanu (98,9 °C). Pík teploty tání meloxikamu na termogramech bohužel rozeznatelný není, příčinou by mohlo být např. výrazně menší množství meloxikamu v porovnání s množstvím chitosanu v hodnocených směsích. Pík dekompozice meloxikamu by se objevoval při teplotě vyšší než 280 °C.

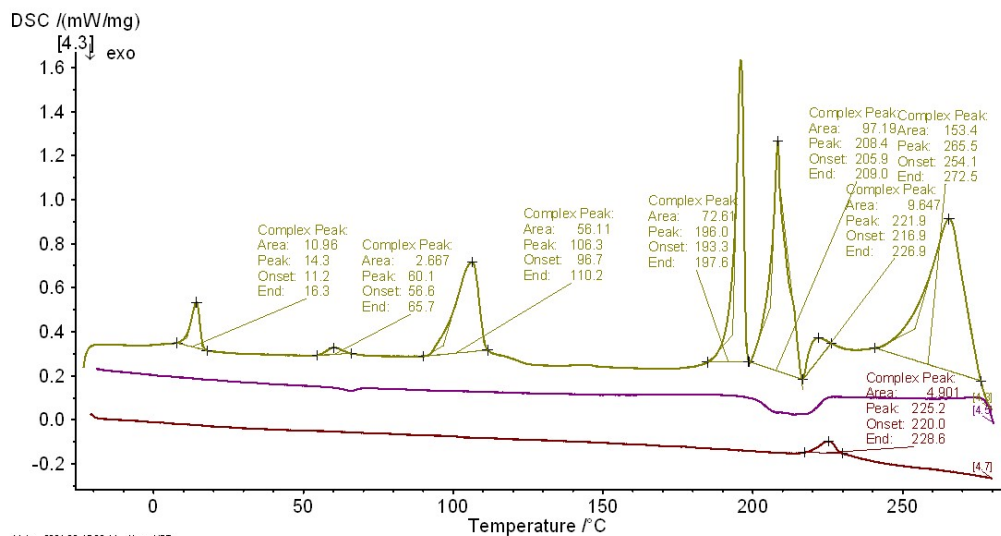
Odlišná je situace v případě fyzikálních směsí s přidavkem SLS (Obrázky 35 a 36, Tabulka 10), termogramy těchto fyzikálních směsí jsou totiž složitější a značně se podobají termogramům usušených vzorků. Teploty, při kterých dochází k jednotlivým změnám jsou u fyzikálních směsí s SLS a usušených vzorků velmi podobné, výraznější rozdíly jsou patrné pouze u dehydratace chitosanu a degradací SLS. Stejně jako u usušeného 12. vzorku se i na termogramech fyzikálních směsí se SLS objevuje již zmíněný dvojitý pík teploty tání meloxikamu nebo SLS. Skutečnost, že termogramy fyzikálních směsí mohou být téměř totožné s termogramy sprejově sušených vzorků, popisují i dvě studie Silva-junior a kol. [59], [60]. Pravděpodobnou příčinou této skutečnosti jsou fyzikální interakce mezi SLS a ostatními složkami směsí.



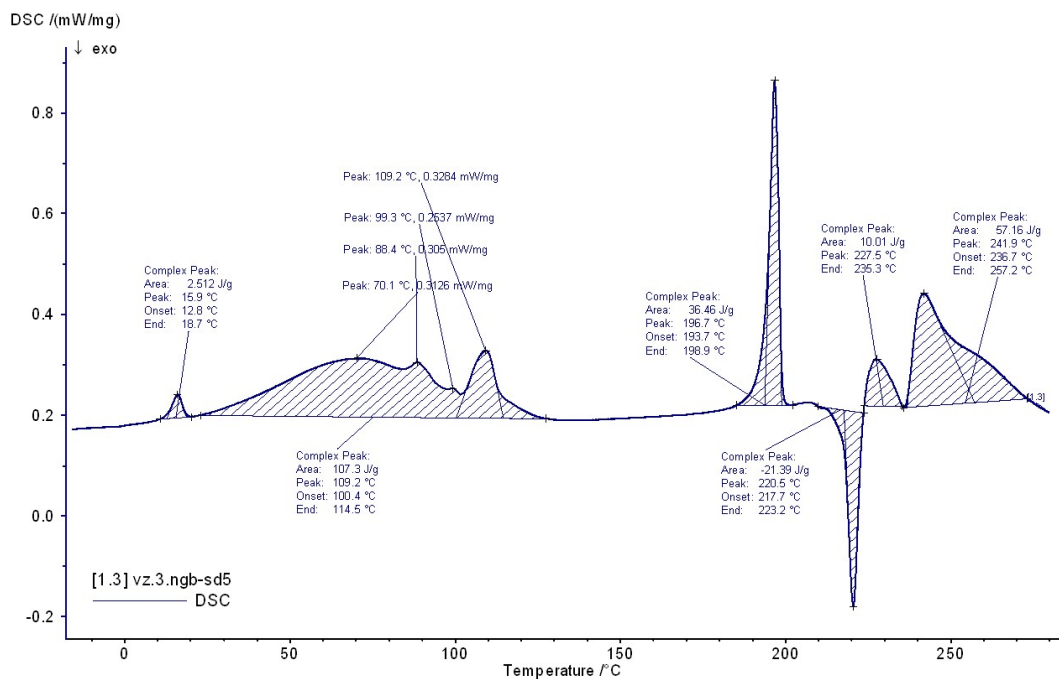
Obrázek 28: Termogram nesusušeného chitosanu. Křivka prvního ohřevu (hnědá), křivka druhého ohřevu (tmavě zelená), křivka chlazení (světle zelená)



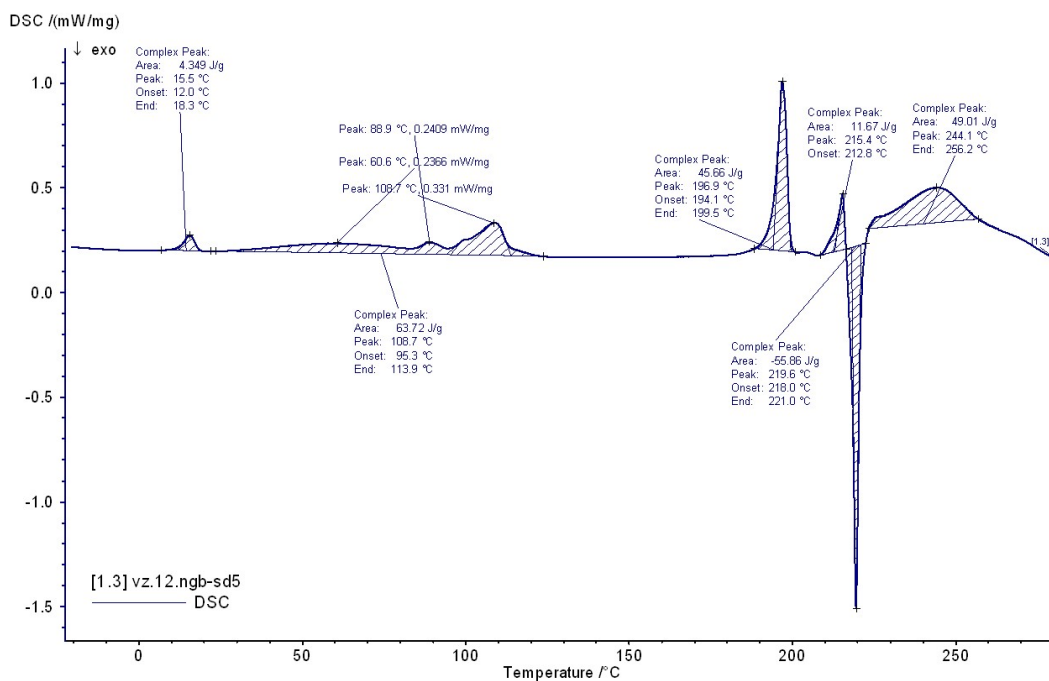
Obrázek 29: Termogram nesusušeného meloxicamu. Křivka prvního ohřevu (zelená), křivka druhého ohřevu (hnědá), křivka chlazení (fialová)



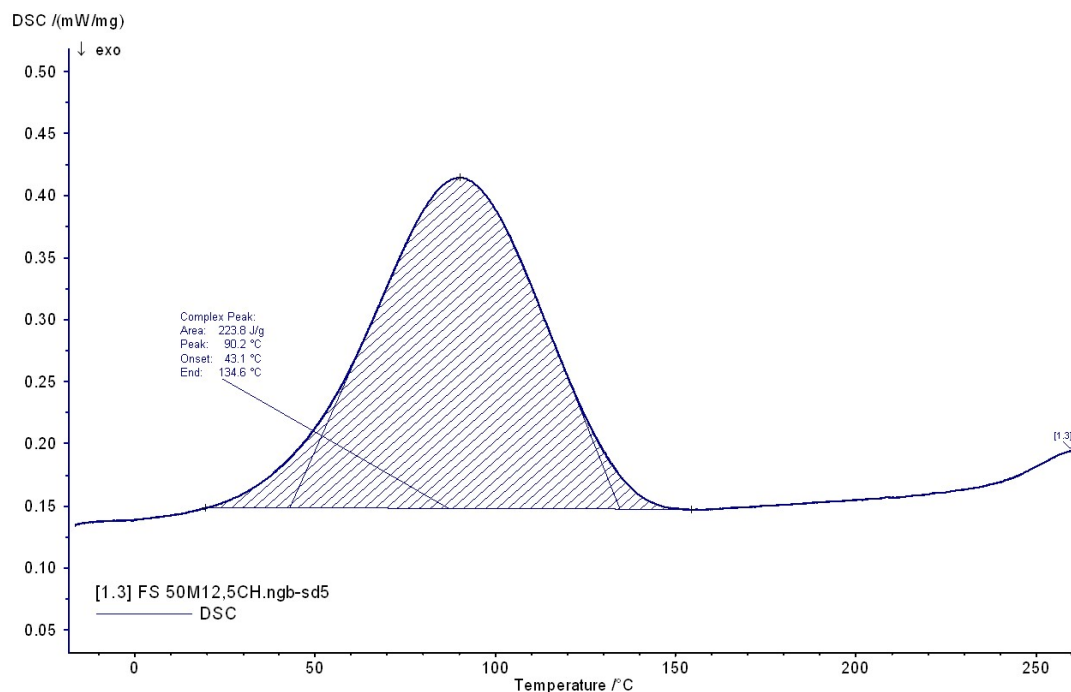
Obrázek 30: Termogram laurylsíranu sodného. Křivka prvního ohřevu (zelená), křivka druhého ohřevu (hnědá), křivka chlazení (fialová)



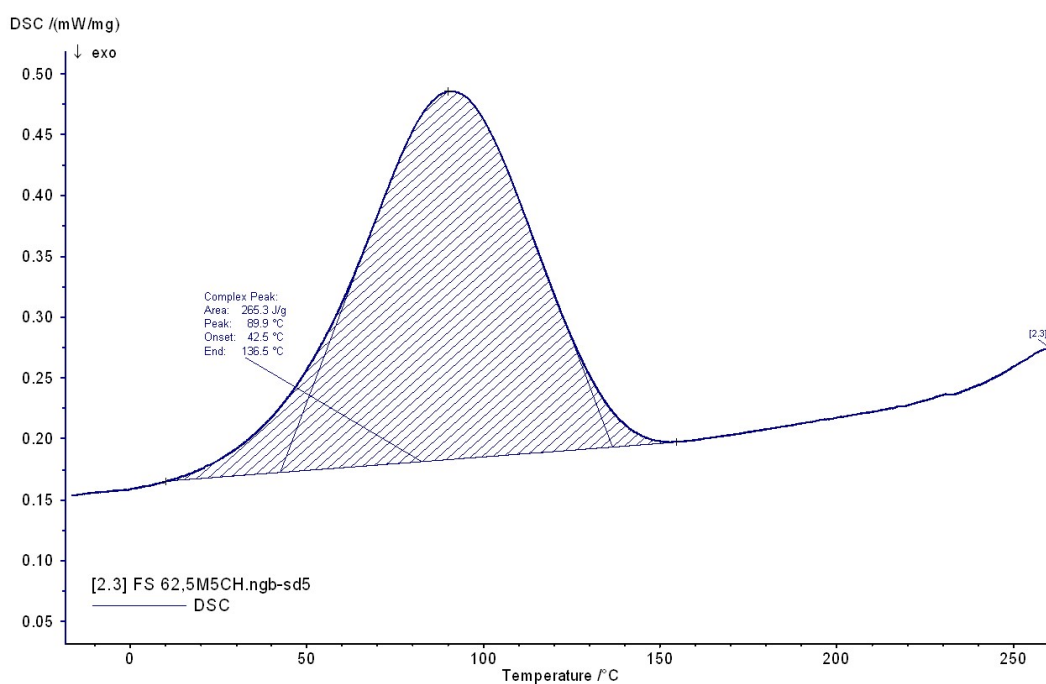
Obrázek 31: Termogram usušeného 3. vzorku



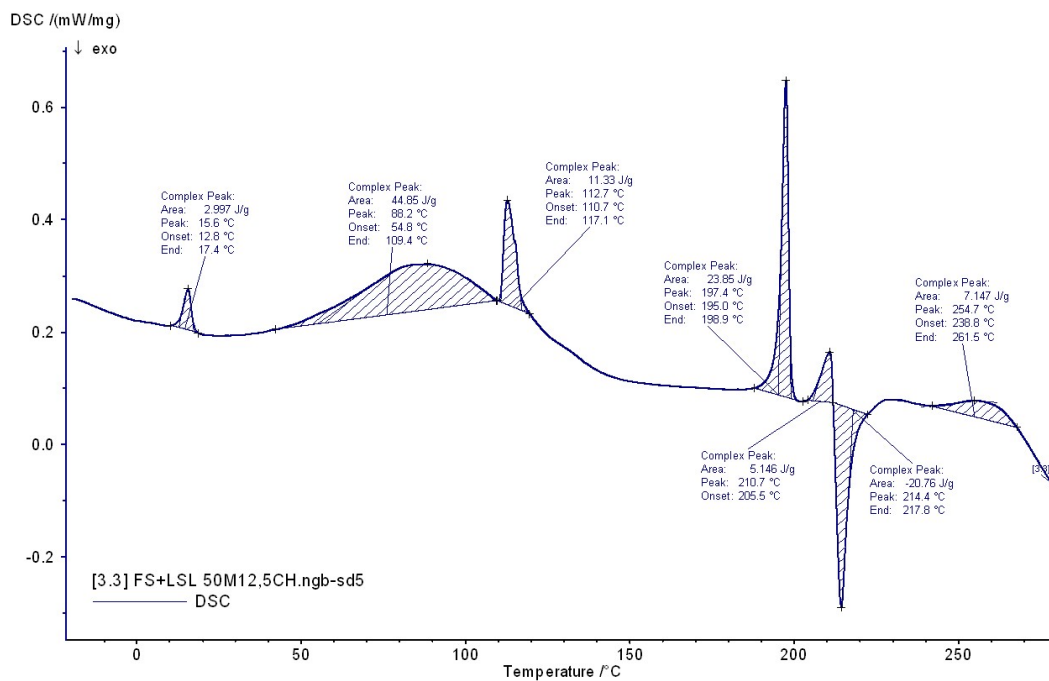
Obrázek 32: Termogram usušeného 12. vzorku



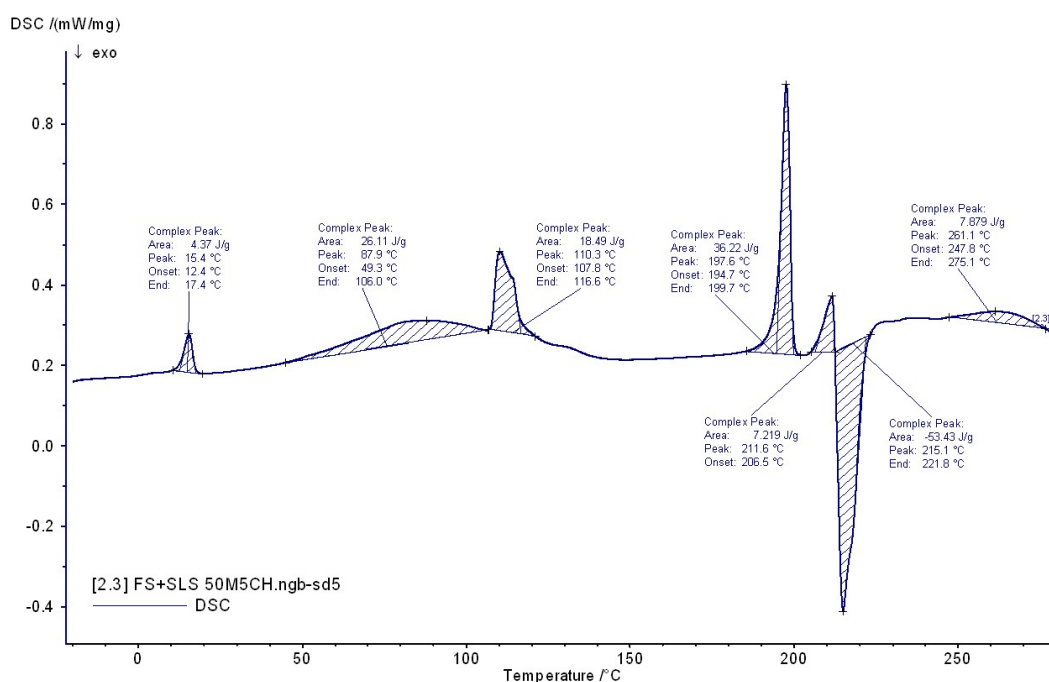
Obrázek 33: Termogram FS 12,5/50



Obrázek 34: Termogram FS 5/62,5



Obrázek 35: Termogram FS+SLS 12,5/50



Obrázek 36: Termogram FS+SLS 5/50

Tabulka 8: Teploty pro jednotlivé píky usušených vzorků

VZORKY	Dehydratace 1 SLS (°C)	Dehydratace CHIT (°C)	Dehydratace 2 SLS (°C)	T _T MX/T _T SLS (°C)	Dekompozice MX (°C)	Degradace SLS (°C)
1.vzorek	16,2	74,6	111,8	197,2	219,7	235,2
2.vzorek	16,3	73,7	111,7	197,6	220,0	244,9
3.vzorek	15,9	70,1	109,2	196,7	220,5	241,9
4.vzorek	15,8	71,9	108,1	197,0	219,5	240,7
5.vzorek	15,7	72,2	109,0	196,8	219,4	234,3
6.vzorek	15,6	73,0	111,3	196,6	219,0	232,4
7.vzorek	15,7	57,1	110,2	197,0	218,5	241,7
8.vzorek	15,7	67,4	110,4	197,0	219,5	241,7
9.vzorek	15,9	75,5	113,0	197,1	220,8	233,7
10.vzorek	15,6	66,9	110,6	197,3	218,2	252,6
11.vzorek	15,8	72,6	113,8	197,0	218,1	247,8
12.vzorek	15,5	60,6	108,7	196,9	219,6	244,1

Tabulka 9: Teploty pro jednotlivé píky fyzikálních směsí

FS	Dehydratace CHIT (°C)
FS 12,5/37,5	92,6
FS 12,5/50	90,2
FS 12,5/62,5	90,7
FS 10/37,5	94,2
FS 10/50	102,2
FS 10/62,5	90,4
FS 7,5/37,5	90,9
FS 7,5/50	91,6
FS 7,5/62,5	87,2
FS 5/37,5	99,7
FS 5/50	94,1
FS 5/62,5	89,9

Tabulka 10: Teploty pro jednotlivé píky fyzikálních směsí se SLS

FS+SLS	Dehydratace SLS (°C)	Dehydratace CHIT (°C)	Dehydratace 2 SLS (°C)	T _T MX/T _T SLS (°C)	Dekompozice MX	Degradace SLS
12,5/37,5	15,6	80,1	109,0	197,6	215,2	255,9
12,5/50	15,6	88,2	112,7	197,4	214,4	254,7
12,5/62,5	15,6	82,6	110,6	197,3	215,1	258,3
10/37,5	15,6	80,9	107,9	197,7	215,4	252,2
10/50	15,5	84,9	109,9	197,7	215,0	255,0
10/62,5	15,5	81,6	108,2	197,4	215,3	256,9
7,5/37,5	15,6	82,3	109,1	197,5	214,9	254,3
7,5/50	15,6	83,0	109,2	197,8	215,4	257,2
7,5/62,5	15,7	83,3	109,6	197,7	215,1	255,5
5/37,5	15,6	79,2	105,2	197,8	215,8	257,9
5/50	15,4	87,9	110,3	197,6	215,1	261,1
5/62,5	15,7	79,4	107,6	197,5	215,5	240,3

8.3 Hodnocení rychlosti a množství uvolněného léčiva

Před samotným hodnocením rychlosti a množství uvolněného léčiva bylo u usušených vzorků nutné stanovit skutečné množství obsaženého meloxikamu. Tabulka 11 uvádí vypočítaná teoretická množství meloxikamu, změřená množství meloxikamu a také procentuální ztráty meloxikamu. Nejmenší ztrátu vykazoval 10. vzorek, kde ztráta byla pouze 0,04 %. Naopak velmi vysoká ztráta byla zjištěna u 4. vzorku, kde tato ztráta činila 54,37 %. Takto výrazná ztráta mohla souviset např. s ulpíváním částic na stěnách sušící komory během sušení nebo s nerovnoměrným odebráním vzorku při měření reálného množství léčiva. Po stanovení skutečného množství léčiva byly z usušených vzorků i fyzikálních směsí vylisovány tablety, které byly následně podrobeny zkouškám disoluce.

Díky zjištěným skutečným množství meloxikamu bylo možné vyhodnotit jeho uvolňování z vylisovaných tablet. Za pomoci dat získaných disolučními zkouškami a následnými výpočty byly vytvořeny grafy, přičemž jednotlivé grafy popisují uvolňování léčiva u vzorků se shodným obsahem meloxikamu a různým obsahem chitosanu. Pro účely porovnání byla do všech grafů zahrnuta také křivka znázorňující uvolňování meloxikamu z tablet tvořených pouze nesusšeným meloxikamem. Při porovnání grafů charakterizujících uvolňování léčiva z tablet u sušených vzorků (Obrázky 37 až 39) a grafů charakterizujících toto uvolňování z tablet u fyzikálních směsí (Obrázky 40 až 43) je na první pohled zřejmé, že sprejové sušení zásadně ovlivnilo rychlost i množství léčiva uvolněného z tablet.

Na Obrázcích 37 až 39 si lze povšimnout, že u dvou nejnižších množství chitosanu (tj. 5 g a 7,5 g) bylo uvolnění meloxikamu z tablet velmi rychlé, v některých případech se 100 % léčiva uvolnilo už během prvních 15–20 minut. Po delší době ale množství uvolněného léčiva často vykazovalo hodnoty vyšší než 100 %. Tyto hodnoty by mohly pravděpodobně být důsledkem nižší homogenity usušených vzorků. To naznačuje i nerovnoměrný průběh disolučního profilu a velké směrodatné odchylky u těchto vzorků. Naopak u vzorků s vyššími obsahy chitosanu (tj. 10 g a 12,5 g) se 100 % léčiva uvolnilo až 5 minut před skončením disoluce nebo se léčiva uvolnilo výrazně méně. To může být dáno tím, že chitosan v kontaktu s disolučním médiem

lehce nabobtná, a protože v tabletě je ho větší množství, uvolnění léčiva vyžaduje delší čas. U vzorků s nejvyšším obsahem chitosanu (12,5 g) došlo k uvolňování meloxicamu např. až po téměř 30 minutách disoluce. U 4. vzorku (s 10 g chitosanu, Obrázek 37) se dokonce uvolnilo pouze méně než 5 % léčiva. Tato skutečnost však může být způsobena již zmíněnou nejvyšší procentuální ztrátou meloxicamu u tohoto usušeného vzorku. V porovnání se samotným meloxicamem, kde se po 60 minutách disoluce uvolnilo přibližně 1 %, došlo u sprejově sušených vzorků k uvolnění většího množství léčiva.

Obrázek 40 znázorňuje graf uvolňování léčiva u fyzikálních směsí s SLS s obsahem 62,5 mg meloxicamu. V případech, kdy bylo množství meloxicamu ve směsi nižší, nebylo možné výpočtem (na základě kalibrační křivky) spolehlivě určit množství uvolněného léčiva. Hodnoty absorbancí byly v těchto případech nízké. Na Obrázku 46 je zachycena jedna z tablet fyzikální směsí s SLS ihned po vyjmutí z disolučního média, která stejně jako všechny ostatní tablety fyzikálních směsí s SLS během disoluční zkoušky pouze nepatrně nabobtnala, nedošlo k jejímu kompletnímu rozpadnutí, a to ovlivnilo uvolňování léčiva. Zaznamenány tedy byly hodnoty pouze pro směsi s nejnižším obsahem chitosanu (5 g), a to nejdříve až po 30. minutě, velmi nízké hodnoty byly zjištěny také v posledních 10 minutách u směsi se 7,5 g chitosanu.

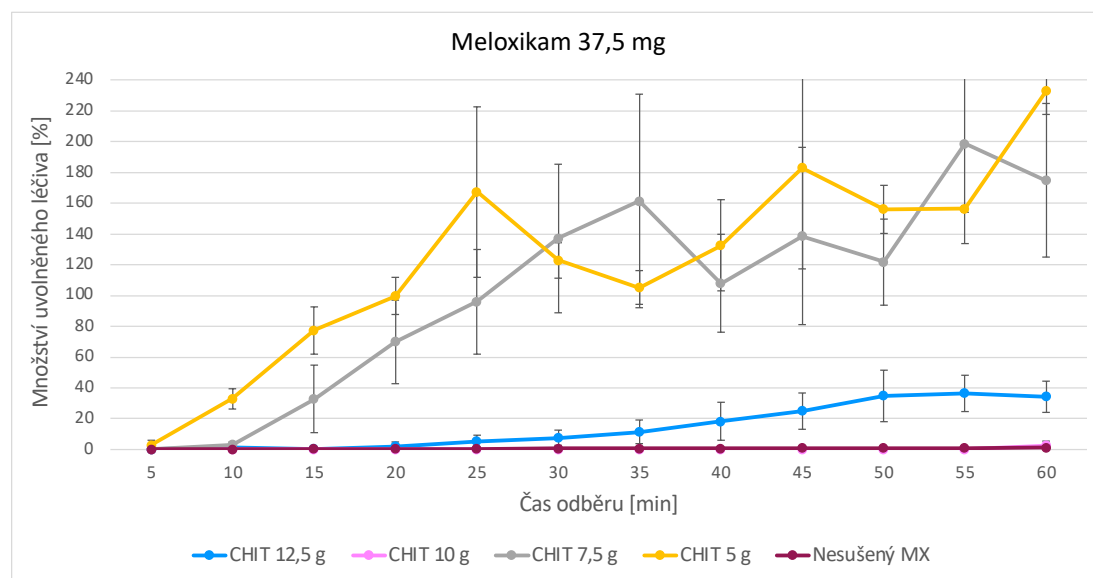
U fyzikálních směsí bez SLS s nejnižším obsahem meloxicamu (Obrázek 41) se větší množství léčiva (přibližně 25 %) uvolnilo pouze u tablet s nejnižším obsahem chitosanu. U fyzikálních směsí s vyššími množstvími meloxicamu (Obrázky 42 a 43) byly disoluční profily plynulé, léčivo se v menší či větší míře uvolnilo ze všech tablet. Při porovnání obrázků 41 až 43 nelze jednoznačně určit závislost uvolňování léčiva na použitém množství chitosanu. Jako nejlepší se však jeví použití nejnižšího množství chitosanu (5 g).

Pro účely porovnání uvolňování léčiva u sušených vzorků, jim odpovídajících fyzikálních směsí a také u nesusšeného meloxicamu byly vytvořeny grafy na Obrázcích 44 a 45. Jako příklad byly zvoleny vzorky s nejvyšším obsahem léčiva a nejvyšším (vzorek 3) a s nejnižším (vzorek 12) obsahem chitosanu. Z těchto grafů vyplývá, že přípravou sprejově sušených částic a přípravou fyzikálních směsí bez SLS lze zvýšit uvolňování meloxicamu z tablet v porovnání se samotným léčivem. Výrazného

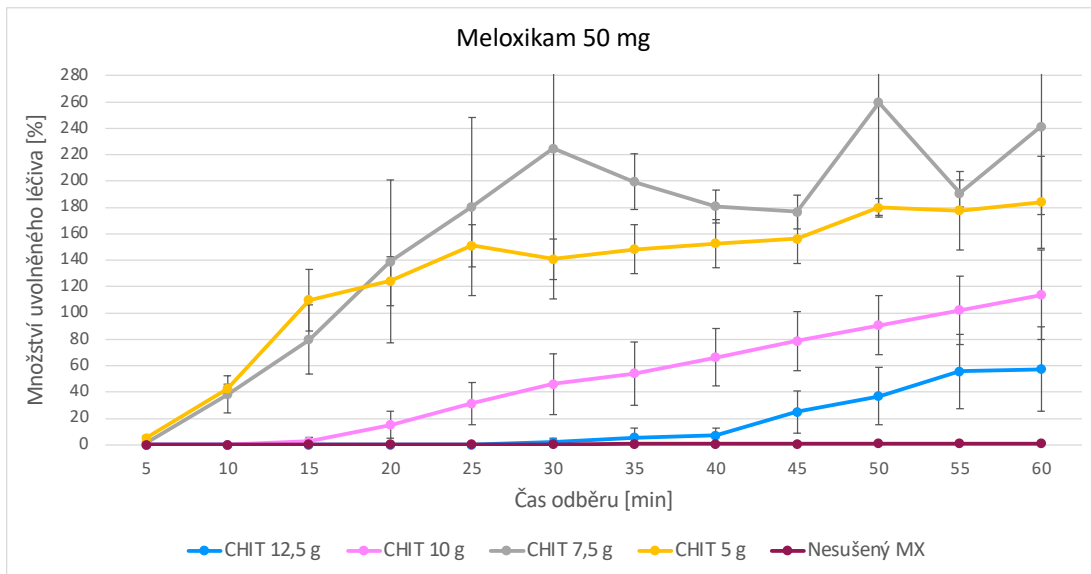
zvýšení uvolňování špatně rozpustného léčiva dosáhli ve své práci přípravou sprejově sušených částic na bázi chitosanu i Kini a kol. [61] a Piccirilli a kol. [62].

Tabulka 11: Porovnání teoretického a změřeného množství léčiva

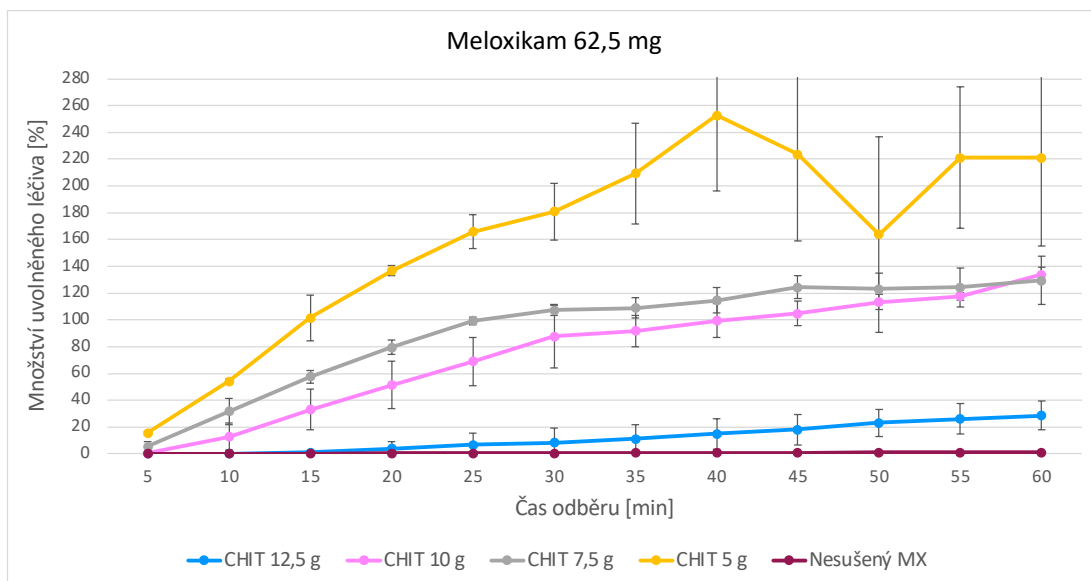
Vzorek	Teoretické množství léčiva (mg)	Změřené množství léčiva (mg)	Změřené množství léčiva %	Ztráta v %
1. vzorek	0,9357	0,9133	97,61	2,39
2. vzorek	1,2469	1,1765	94,36	5,64
3. vzorek	1,5576	1,4566	93,52	6,48
4. vzorek	1,0691	0,4879	45,63	54,37
5. vzorek	1,4245	1,2484	87,64	12,36
6. vzorek	1,7794	1,6727	94,00	6,00
7. vzorek	1,2469	1,0399	83,40	16,60
8. vzorek	1,6611	1,3483	81,17	18,83
9. vzorek	2,0747	2,0483	98,73	1,27
10. vzorek	1,4955	1,4949	99,96	0,04
11. vzorek	1,9920	1,9644	98,61	1,39
12. vzorek	2,4876	2,2080	88,76	11,24



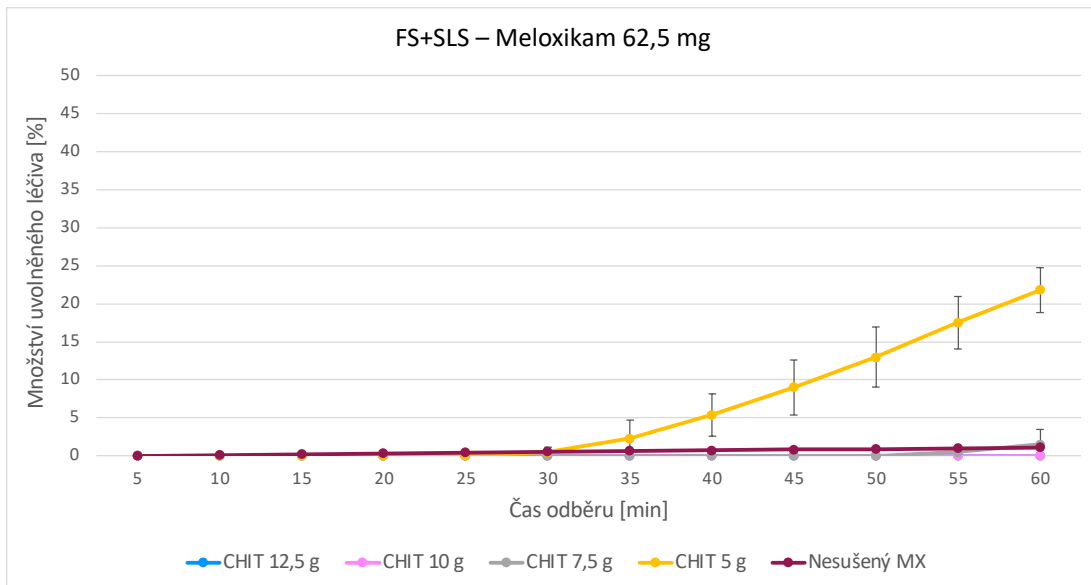
Obrázek 37: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u vzorků s obsahem 37,5 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesušeného meloxicamu



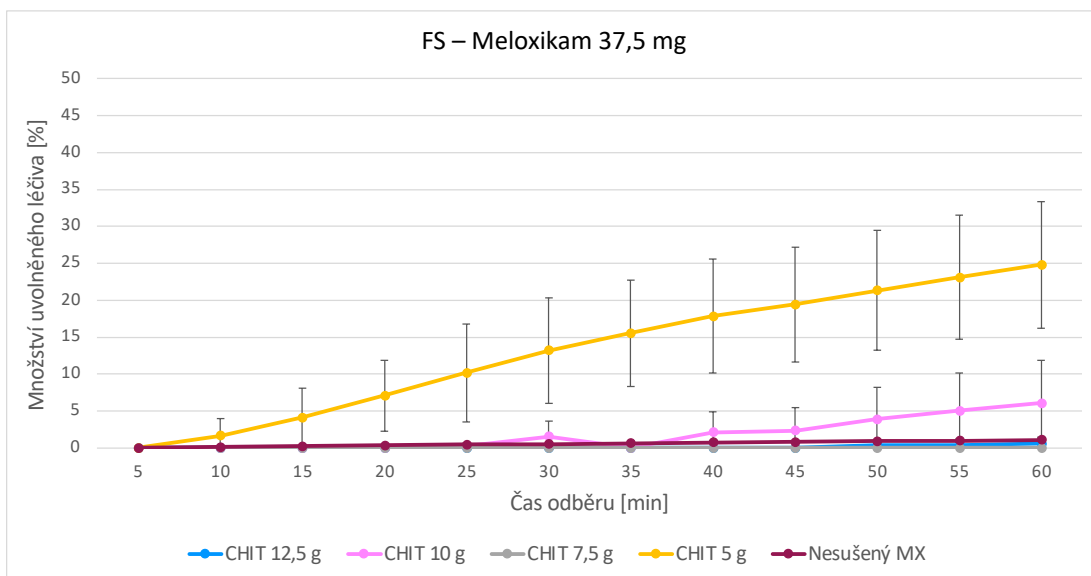
Obrázek 38: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u vzorků s obsahem 50 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesušeného meloxicamu



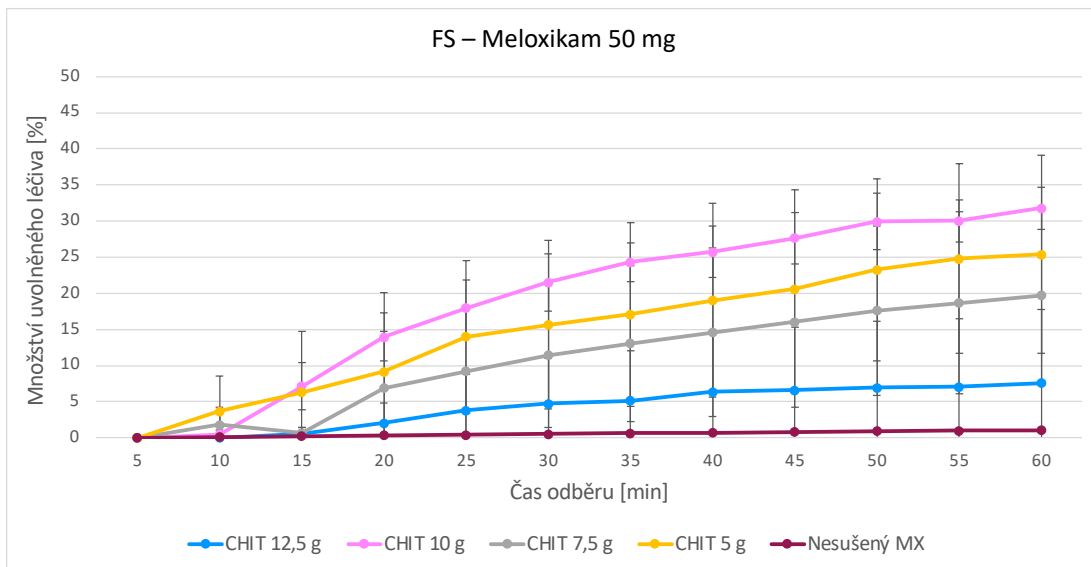
Obrázek 39: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u vzorků s obsahem 62,5 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesušeného meloxicamu



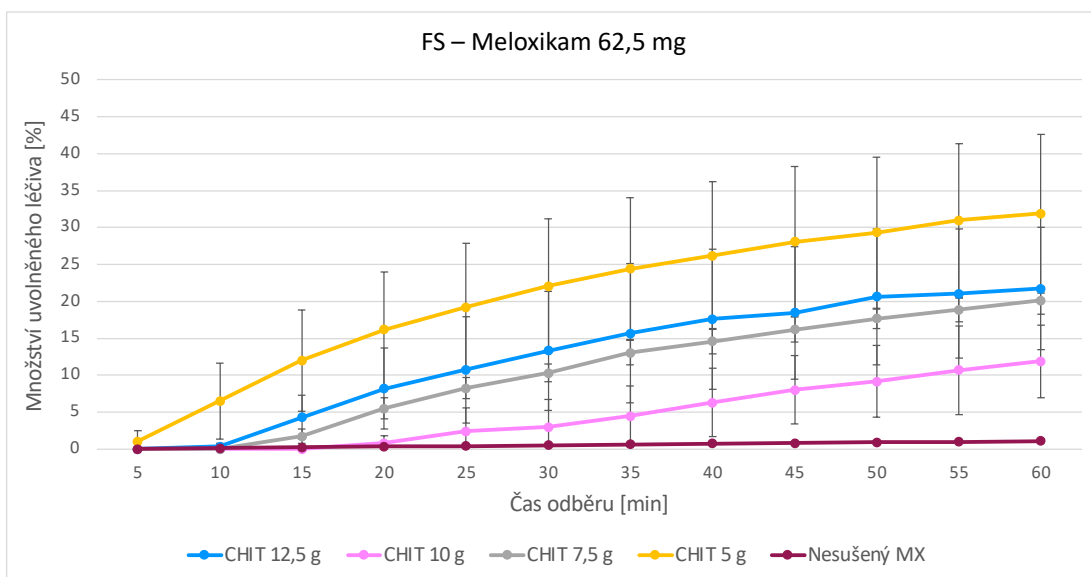
Obrázek 40: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u FS+SLS s obsahem 62,5 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesusušeného meloxicamu



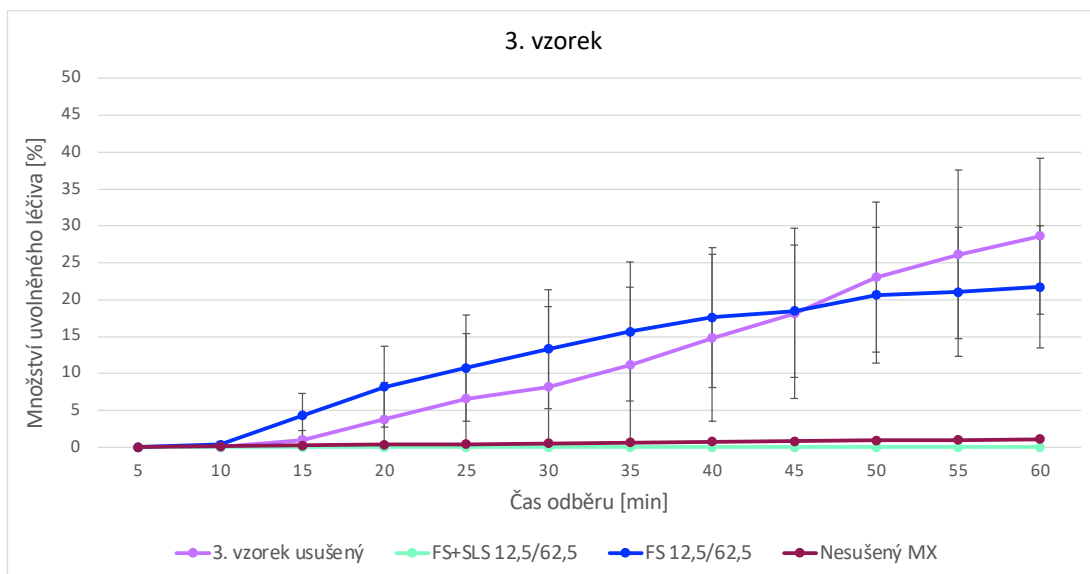
Obrázek 41: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u FS s obsahem 37,5 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesusušeného meloxicamu



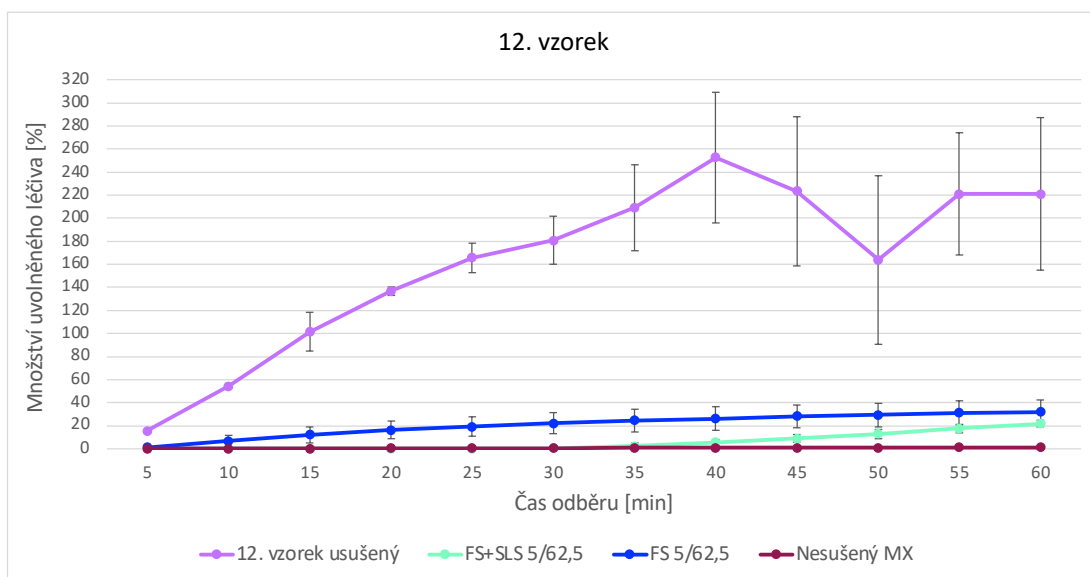
Obrázek 42: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u FS s obsahem 50 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesušeného meloxicamu



Obrázek 43: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u FS s obsahem 62,5 mg MX a různým množstvím chitosanu a u nesušeného meloxicamu



Obrázek 44: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u usušeného 3. vzorku a u jemu odpovídající FS+SLS a FS a u nesusušeného MX



Obrázek 45: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas u usušeného 12. vzorku a u jemu odpovídající FS+SLS a FS a u nesusušeného MX



Obrázek 46: Fotografie tablety FS+SLS 5/50 po disoluční zkoušce

9 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo posoudit vliv množství chitosanu na vlastnosti sprejově sušeného prášku s obsahem chitosanu, léčiva meloxikamu a surfaktantu laurylsíranu sodného. Celkem bylo sprejově sušeno 12 vzorků s různým obsahem chitosanu a meloxikamu, obsah laurylsíranu sodného byl u všech vzorků shodný. Usušené vzorky byly následně hodnoceny a pro účely porovnání byly připraveny také dva typy fyzikálních směsí, a to fyzikální směsi se shodným složením jako sušené vzorky a fyzikální směsi bez obsahu laurylsíranu sodného.

Metodami optické a skenovací elektronové mikroskopie byl hodnocen vzhled připravených částic a fyzikálních směsí, jejich termální charakteristiky byly hodnoceny pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie. Z usušených vzorků i fyzikálních směsí byly vylisovány tablety, které byly následně podrobeny zkouškám disoluce s následným spektrofotometrickým vyhodnocením. Výsledky disolučních zkoušek poté sloužily k hodnocení uvolňování léčiva z připravených tablet.

Na snímcích z optického a elektronového mikroskopu byly u usušených vzorků pozorovány samostatné částice a také shluky částic. Na první pohled bylo zřejmé, že během sprejového sušení došlo k výrazným změnám tvaru, struktury i velikosti částic. Částice měly především nepravidelný sférický tvar a zvrásněný povrch. Dále byly pozorovány velké duté částice, uvnitř kterých se nacházely menší sférické částice. V neposlední řadě bylo možné si na snímcích povšimnout částic chitosanu s nezměněným destičkovitým tvarem. Mezi jednotlivými vzorky nebyly patrné rozdíly ve struktuře a tvaru částic, množství chitosanu ve vzorku tedy tyto vlastnosti neovlivnilo. Množství chitosanu zřejmě ovlivnilo pouze velikost částic, která ale měřena nebyla.

Pomocí metody diferenciální skenovací kalorimetrie byly získány termogramy usušených vzorků i fyzikálních směsí. Na termogramech usušených vzorků byly identifikovány píky dehydratace laurylsíranu sodného a chitosanu, pík teploty tání meloxikamu nebo laurylsíranu sodného a také píky dekompozic a degradací. Nejvýraznější vliv mělo sprejové sušení na teplotu tání meloxikamu, která byla oproti nesušenému meloxikamu snížena až o 63,3 °C. Výrazně byla ovlivněna také teplota

dehydratace chitosanu. U fyzikálních směsí bez SLS byl pozorován pouze pík dehydratace chitosanu, avšak termogramy fyzikálních směsí s SLS byly mnohem složitější a podobaly se termogramům usušených vzorků. Stejně jako při hodnocení vzhledu částic nebyl ani u hodnocení tepelných vlastností sušených prášků pozorován vliv množství chitosanu na tyto vlastnosti.

Díky výsledkům disolučních zkoušek bylo prokázáno, že sprejové sušení mělo významný vliv na uvolňování meloxikamu z tablet. V porovnání se samotným meloxikamem, kde se v průběhu disoluční zkoušky uvolnilo z tablet přibližně 1 % léčiva, bylo u sprejově sušených vzorků uvolněno větší množství léčiva. Pozorován byl i vliv množství chitosanu na toto uvolňování. U vzorků s nižšími množstvími chitosanu (5 g a 7,5 g) bylo uvolňování meloxikamu velmi rychlé. Disoluční profily byly ale v těchto případech nerovnoměrné a množství uvolněného léčiva nejednou vykazovalo hodnoty větší než 100 %. Tyto skutečnosti mohly zřejmě být důsledkem nižší homogenity usušených vzorků. U vzorků s vyššími množstvími chitosanu (10 g a 12,5 g) bylo uvolňování značně pomalejší a často se léčiva uvolnilo méně než 100 %. Zvýšené uvolňování v porovnání se samotným meloxikamem bylo zjištěno i v případě fyzikálních směsí bez SLS. U těchto směsí byly disoluční profily zpravidla plynulé a léčivo se ve větší či menší míře uvolnilo ze všech tablet. Oproti tomu u fyzikálních směsí se SLS se léčiva uvolnilo velmi malé množství. Mnohdy byly naměřené hodnoty absorbance velice nízké a množství uvolněného léčiva tedy nešlo spolehlivě určit. V případě obou typů fyzikálních směsí se jako nejlepší jevílo použití nejmenšího množství chitosanu.

10 BIBLIOGRAFIE

- [1] SOSNIK, Alejandro; SEREMETA, Katia P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in colloid and interface science*, 2015, 223: 40-54. ISSN: 0001-8686
- [2] ZHANG, Xingwang, et al. Pharmaceutical dispersion techniques for dissolution and bioavailability enhancement of poorly water-soluble drugs. *Pharmaceutics*, 2018, 10.3: 74. ISSN: 1999-4923
- [3] ARANAZ, Inmaculada, et al. Chitosan spray-dried microparticles for controlled delivery of venlafaxine hydrochloride. *Molecules*, 2017, 22.11: 1980. ISSN: 1420-3049
- [4] RIZEQ, Balsam R., et al. Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.22: 5776. ISSN: 1422-0067
- [5] OKÁČOVÁ, Ladislava, et al. Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací. *Chem. listy*, 2010, 104.1: 21-26. ISSN: 1213-7103
- [6] SEEDHER, Neelam; KANOJIA, Mamta. Micellar solubilization of some poorly soluble antidiabetic drugs: a technical note. *Aaps Pharmscitech*, 2008, 9.2: 431-436. ISSN: 1530-9932
- [7] DESHMUKH, Amol S.; TIWARI, Kundan J.; MAHAJAN, Vijay R. Solubility enhancement techniques for poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol*, 2017, 10.8. ISSN: 0974-3278
- [8] JAIN, Manu S., et al. Spray drying in pharmaceutical industry: A review. *Research Journal of pharmaceutical dosage forms and technology*, 2012, 4.2: 74-79. ISSN: 0975-4377
- [9] GHARSALLAOUI, Adem, et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, 2007, 40.9: 1107-1121. ISSN: 0963-9969

- [10] SEVILLE, Peter C.; LI, Hao-ying; LEAROYD, Tristan P. Spray-dried powders for pulmonary drug delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2007, 24.4. ISSN: 0743-4863
- [11] STULZER, Hellen Karine, et al. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. *Materials Science and Engineering: C*, 2009, 29.2: 387-392. ISSN: 0928-4931
- [12] PATEL, Bhavesh B., et al. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2015, 23.4: 352-365. ISSN: 1319-0164
- [13] PATEL, R. P.; PATEL, M. P.; SUTHAR, A. M. Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, 2009, 2.10: 44-47. ISSN: 0974-5645
- [14] ZHAO, Min, et al. Formulation, characteristics and aerosolization performance of azithromycin DPI prepared by spray-drying. *Powder Technology*, 2008, 187.3: 214-221. ISSN: 0032-5910
- [15] POURSHAHAB, Pejman Sadegh, et al. Preparation and characterization of spray dried inhalable powders containing chitosan nanoparticles for pulmonary delivery of isoniazid. *Journal of microencapsulation*, 2011, 28.7: 605-613. ISSN: 0265-2048
- [16] HASÇIÇEK, Canan; GÖNÜL, Nurşin; ERK, Nevin. Mucoadhesive microspheres containing gentamicin sulfate for nasal administration: preparation and in vitro characterization. *Il Farmaco*, 2003, 58.1: 11-16. ISSN: 1879-0569
- [17] ALHALAWEH, Amjad; ANDERSSON, Staffan; VELAGA, Sitaram P. Preparation of zolmitriptan–chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 38.3: 206-214. ISSN: 0928-0987
- [18] GAVINI, Elisabetta, et al. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2008, 68.2: 245-252. ISSN: 0939-6411

- [19] KAYE, Richard S.; PUREWAL, Tarlochan S.; ALPAR, Oya H. Development and testing of particulate formulations for the nasal delivery of antibodies. *Journal of controlled release*, 2009, 135.2: 127-135. ISSN: 0168-3659
- [20] B PATEL, Bhavesh; K PATEL, Jayvadan; CHAKRABORTY, Subhashis. Review of patents and application of spray drying in pharmaceutical, food and flavor industry. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 2014, 8.1: 63-78. ISSN: 1872-2113
- [21] RAY, Sarbani Dey. Potential aspects of chitosan as pharmaceutical excipient. *Acta Pol. Pharm*, 2011, 68.5: 619-622. ISSN: 0001-6837
- [22] WANG, Wenqian, et al. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. *International journal of molecular sciences*, 2020, 21.2: 487. ISSN: 1422-0067
- [23] RUIZ, Gustavo Adolfo Muñoz; CORRALES, Hector Fabio Zuluaga. Chitosan, chitosan derivatives and their biomedical applications. *Biological activities and application of marine polysaccharides*, 2017, 87. ISBN: 978-953-51-2860-1
- [24] RAIK, Sergei V., et al. Comparative study of diethylaminoethyl-chitosan and methylglycol-chitosan as potential non-viral vectors for gene therapy. *Polymers*, 2018, 10.4: 442. ISSN: 2073-4360
- [25] LAMPE, Anna T., et al. High-and low-molecular-weight chitosan act as adjuvants during single-dose influenza A virus protein vaccination through distinct mechanisms. *Biotechnology and bioengineering*, 2021, 118.3: 1224-1243. ISSN: 1097-0290
- [26] FAN, Lihong, et al. Preparation and characterization of quaternary ammonium chitosan hydrogel with significant antibacterial activity. *International journal of biological macromolecules*, 2015, 79: 830-836. ISSN: 0141-8130
- [27] HU, Zhang, et al. Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications. *Marine drugs*, 2018, 16.8: 273. ISSN: 1660-3397
- [28] AKYÜZ, Lalehan, et al. Encapsulation of flurbiprofen by chitosan using a spray-drying method with in vitro drug releasing and molecular docking. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 14.1: 34. ISSN: 2148-6247

- [29] YONEKURA, Lina, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of functional foods*, 2014, 6: 205-214. ISSN: 1756-4646
- [30] OCHI, Masanori, et al. Development of meloxicam salts with improved dissolution and pharmacokinetic behaviors in rats with impaired gastric motility. *Pharmaceutical research*, 2013, 30.2: 377-386. ISSN: 0724-8741
- [31] HÎRJĂU, Mircea, et al. Evaluation of experimental multi-particulate polymer-coated drug delivery systems with meloxicam. *Coatings*, 2020, 10.5: 490. ISSN: 2079-6412
- [32] FURST, Daniel E. Meloxicam: selective COX-2 inhibition in clinical practice. In: *Seminars in arthritis and rheumatism*. WB Saunders, 1997. p. 21-27. ISSN: 0049-0172
- [33] BENKE, Edit; SZABÓ-RÉVÉSZ, Piroska; AMBRUS, Rita. Development of meloxicam potassium-containing co-spray-dried inhalation powder with sodium stearate. *Acta Pharmaceutica Hungarica*, 2021, 91.2: 75-82. ISSN: 0001-6659
- [34] CHVATAL, Anita, et al. Formulation and comparison of spray dried non-porous and large porous particles containing meloxicam for pulmonary drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 2019, 559: 68-75. ISSN: 0378-5173
- [35] AMBRUS, Rita, et al. Novel dry powder inhaler formulation containing antibiotic using combined technology to improve aerodynamic properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 123: 20-27. ISSN: 0928-0987
- [36] RANGEL-YAGUI, Carlota O., et al. Micellar solubilization of ibuprofen: influence of surfactant head groups on the extent of solubilization. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2005, 41: 237-246. ISSN: 1516-9332
- [37] OKÁČOVÁ, Ladislava; VETCHÝ, David. Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek technologickými postupy usnadňujícími jejich rozpouštění. *Chem. Listy*, 2011, 105: 34-40. ISSN: 1213-7103

- [38] RANGEL-YAGUI, Carlota Oliveira; PESSOA JR, Adalberto; TAVARES, Leoberto Costa. Micellar solubilization of drugs. *J. Pharm. Pharm. Sci*, 2005, 8.2: 147-163. ISSN: 1482-1826
- [39] VINAROV, Zahari, et al. Micellar solubilization of poorly water-soluble drugs: effect of surfactant and solubilizate molecular structure. *Drug development and industrial pharmacy*, 2018, 44.4: 677-686. ISSN: 0363-9045
- [40] ALKHAMIS, Khoulood A.; ALLABOUN, Hussien; WAF'A, Y. Study of the solubilization of gliclazide by aqueous micellar solutions. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2003, 92.4: 839-846. ISSN: 0022-3549
- [41] AL-SOUFI, Wajih; NOVO, Mercedes. A Surfactant Concentration Model for the Systematic Determination of the Critical Micellar Concentration and the Transition Width. *Molecules*, 2021, 26.17: 5339. ISSN: 1420-3049
- [42] RANA, Suman, et al. Interfacial engineering of nanoparticles for cancer therapeutics. In: *Nanostructures for Cancer Therapy*. Elsevier, 2017. p. 177-209. ISBN: 978-0-323-46144-3
- [43] KHAYYAL, Mohamed T., et al. Micellar solubilization enhances the anti-inflammatory effect of xanthohumol. *Phytomedicine*, 2020, 71: 153233. ISSN: 0944-7113
- [44] CERVERA, Mirna Fernández, et al. Effects of spray drying on physicochemical properties of chitosan acid salts. *Aaps Pharmscitech*, 2011, 12.2: 637-649. ISSN: 1530-9932
- [45] CORRIGAN, Deirdre O.; HEALY, Anne Marie; CORRIGAN, Owen I. Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2006, 62.3: 295-305. ISSN: 0939-6411
- [46] LIU, Wenjie, et al. Uniform chitosan microparticles prepared by a novel spray-drying technique. *International Journal of Chemical Engineering*, 2011, 2011. ISSN: 1687-8078

- [47] HE, Ping; DAVIS, Stanley S.; ILLUM, Lisbeth. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International journal of pharmaceutics*, 1999, 187.1: 53-65. ISSN: 0378-5173
- [48] OGUNJIMI, Abayomi T.; FIEGEL, Jennifer; BROGDEN, Nicole K. Design and characterization of spray-dried chitosan-naltrexone microspheres for microneedle-assisted transdermal delivery. *Pharmaceutics*, 2020, 12.6: 496. ISSN: 1999-4923
- [49] ANTONIRAJ, M. Gover, et al. Cross-linked chitosan microparticles preparation by modified three fluid nozzle spray drying approach. *International journal of biological macromolecules*, 2020, 147: 1268-1277. ISSN: 0141-8130
- [50] ZHAO, Lujie, et al. Effects of Different Drying Methods on the Characterization, Dissolution Rate and Antioxidant Activity of Ursolic Acid-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Foods*, 2021, 10.10: 2470. ISSN: 2304-8158
- [51] ELSAYED, Ibrahim; ABDELBARY, Aly Ahmed; ELSHAFEEY, Ahmed Hassen. Nanosizing of a poorly soluble drug: technique optimization, factorial analysis, and pharmacokinetic study in healthy human volunteers. *International journal of nanomedicine*, 2014, 9: 2943. ISSN: 1176-9114
- [52] DAVE, Rutesh H., et al. To evaluate the effect of addition of an anionic surfactant on solid dispersion using model drug indomethacin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2012, 38.8: 930-939. ISSN: 0363-9045
- [53] PARTY, Petra, et al. Formulation and in vitro and in silico characterization of “nano-in-micro” dry powder inhalers containing meloxicam. *Pharmaceutics*, 2021, 13.2: 211. ISSN: 1999-4923
- [54] POMÁZI, Anita, et al. Analysis of co-spray-dried meloxicam–mannitol systems containing crystalline microcomposites. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2011, 56.2: 183-190. ISSN: 0731-7085
- [55] EL-BADRY, Mahmoud. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam-gelucire 50/13 binary systems. *Scientia Pharmaceutica*, 2011, 79.2: 375-386. ISSN: 2218-0532

- [56] VARGA, Patrícia, et al. Development of Intranasal Chitosan-Based Drug Delivery Containing Meloxicam. In: *Presented at the 1st International Electronic Conference on Pharmaceutics*. 2020. p. 15. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/IECP2020-08751>
- [57] NASR, H. E., et al. Morphological, rheological and ultrasonic characterizations of ECO-friendly microemulsion latices based on acrylate monomers. *Journal of American Science*, 2010, 6.9: 897-910. ISSN: 1545-1003
- [58] PISANI, Silvia, et al. Tableted hydrophilic electrospun nanofibers to promote meloxicam dissolution rate. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2021, 66: 102878. ISSN: 1773-2247
- [59] SILVA-JÚNIOR, Arnóbio A., et al. Thermal analysis of biodegradable microparticles containing ciprofloxacin hydrochloride obtained by spray drying technique. *Thermochimica Acta*, 2008, 467.1-2: 91-98. ISSN: 0040-6031
- [60] DA SILVA-JUNIOR, Arnóbio Antônio, et al. Thermal behavior and stability of biodegradable spray-dried microparticles containing triamcinolone. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, 368.1-2: 45-55. ISSN: 0378-5173
- [61] KINI, ASHWINI G.; DIXIT, MUDIT; KULKARNI, P. K. Enhancement of solubility and dissolution rate of poorly water soluble drug by spray drying using different grade of chitosan. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2011, 3.2: 231-235. ISSN: 0975-1491
- [62] PICCIRILLI, Gisela N., et al. Chitosan microparticles: influence of the gelation process on the release profile and oral bioavailability of albendazole, a class II compound. *Drug development and industrial pharmacy*, 2014, 40.11: 1476-1482. ISSN: 0363-9045