

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

Matricové tablety na bázi alginátu sodného s prodlouženým uvolňováním
tramadol hydrochloridu

Bc. Jan Jirmásek

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jan Jirmásek**
Osobní číslo: **C16541**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Matricové tablety na bázi alginátu sodného s prodlouženým uvolňováním tramadol hydrochloridu**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši na téma "Použití alginátu sodného a dalších přírodních polymerů v matricových tabletách s prodlouženým uvolňováním léčiva".
2. Metodou přímého lisování připravte matricové tablety s různým obsahem alginátu sodného a ověřte homogenitu připravených tablet metodou SEM.
3. Proveďte disoluční test připravených matricových tablet v kyselém disolučním médiu.
4. Získané disoluční profily zpracujte pomocí vhodných matematických modelů a vyhodnoťte vliv retardantu na uvolňování účinné látky ze studovaných tablet.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martin Bartoš, CSc.**

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**

Katedra fyzikální chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2019**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Všechny literární prameny a informace, které jsem v práci použil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem obeznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o použití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že když dojde k použití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o použití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněná ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním svojí práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2019

Bc. Jan Jirmásek

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat doc. Ing. Aleně Komersové, Ph.D., za její odborný a vstřícný přístup během psaní této diplomové práce. Vážím si užitečných poznatků a znalostí, které mi ochotně předávala. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Martinovi Bartošovi, CsC., za pomoc při osvojení práce se skenovacím elektronovým mikroskopem. Chci také poděkovat své rodině za významnou podporu během mého studia.

ANOTACE:

Tato diplomová práce je zaměřena na studium disoluční kinetiky hydrofilních matricových tablet s tramadol hydrochloridem jako účinnou látkou. Dále se zabývá ověřením homogenity připravených tablet pomocí metody SEM (skenovací elektronová mikroskopie). Matricové tablety byly připraveny metodou přímého lisování, jako retardující složka byl zvolen alginát sodný a jako pojivo byla použita mikrokrystalická celulóza (Prosolv[®] SMCC 90). Po provedení disolučních testů byly získány disoluční profily, které byly kvantitativně vyhodnoceny pomocí nelineární regresní analýzy. Byl zjišťován vliv obsahu retardující složky na rychlost a mechanismus uvolňování účinné látky z tablety a vliv metody přímého lisování na homogenitu připravených tablet.

KLÍČOVÁ SLOVA:

tramadol hydrochlorid, disoluční testy, alginát sodný, matricové tablety, skenovací elektronová mikroskopie

ANNOTATION:

This master thesis is focused on the study of dissolution kinetics of hydrophilic matrix tablets with tramadol hydrochloride as active substance. Further, it deals with verification of homogeneity of prepared tablets by SEM (scanning electron microscopy). Matrix tablets were prepared by direct compression, sodium alginate was chosen as retardant component and microcrystalline cellulose (Prosolv[®] SMCC 90) was used as the main binder. Dissolution profiles were obtained after dissolution tests and were quantitatively evaluated by nonlinear regression analysis. The influence of the amount of the retarding component on the rate and mechanism of drug release from the tablet was investigated, and the influence of direct compression method on the homogeneity of prepared tablets was also discussed.

KEYWORDS:

tramadol hydrochloride, dissolution tests, sodium alginate, matrix tablets, scanning electron microscopy

Obsah

Úvod.....	14
1. Teoretická část.....	16
1.1 Řízené uvolňování.....	16
1.2 Matricové tablety.....	17
1.2.1 Hydrofilní gelové matrice	17
1.3 Přírodní polymery používané v hydrofilních matricových tabletách.....	19
1.3.1 Alginát sodný	19
1.3.2 Chitosan.....	20
1.3.3 Xantanová guma.....	22
1.3.4 Arabská guma (klovatina)	23
1.3.5 Pektiny.....	23
1.4 Pomocné látky pro přípravu matricových tablet	24
1.5 Tramadol hydrochlorid.....	25
1.5.1 Farmakodynamické vlastnosti	25
1.5.2 Farmakokinetické vlastnosti.....	26
1.5.3 Léčivé přípravky s TH.....	26
1.6 Disoluční testy.....	27
1.6.1 Metoda pádelková (míchadlová)	29
1.6.2 Metoda košíčková	29
1.7 Matematické modely popisující řízené uvolňování léčiva	30
1.7.1 Kinetický model I. řádu.....	30
1.7.2 Model Weibull.....	31
1.7.3 Model Korsmeyer-Peppas	31
1.8 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	32
1.8.1 Princip SEM	33
1.8.2 Vakuový systém	34
1.8.3 Elektronová tryska (dělo) – zdroj elektronů.....	35
1.8.4 Elektromagnetické čočky	36
1.8.5 Interakce elektronů se vzorkem.....	36
1.8.6 Detektory	37
1.8.7 Příprava vzorků pro SEM.....	40
1.8.8 Příprava matricových tablet pro SEM.....	42
2. Experimentální část.....	44
2.1 Disoluční testy.....	44

2.1.1	Laboratorní přístroje a pomůcky	44
2.1.2	Chemikálie	44
2.1.3	Použité programy	45
2.1.4	Příprava matricových tablet	45
2.1.5	Disoluční zkouška	46
2.1.6	UV/VIS spektroskopie	47
2.1.7	Kalibrační závislost	47
2.2	Skenovací elektronová mikroskopie – SEM	48
2.2.1	Laboratorní přístroje a pomůcky	48
2.2.2	Příprava vzorků tablet pro SEM.....	48
2.2.3	Optimalizace nastavení SEM	49
3.	Výsledky a diskuze.....	53
3.1	Disoluční testy.....	53
3.1.1	Nelineární regresní analýza disolučních profilů.....	53
3.1.2	Tabelární přehled výsledků nelineární regresní analýzy.....	57
3.1.3	Disoluční profily formulací F1 – F7	60
3.1.4	Disoluční profily formulací F1-F4 obsahující alginát sodný	61
3.2	SEM.....	63
3.2.1	Ověření homogenity připravených formulací	63
	Formulace 1	63
	Formulace 2.....	64
	Formulace 3.....	65
	Formulace 4.....	66
4.	Závěr.....	68
5.	Literatura	70

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Možnosti uvolnění účinné látky z matricové tablety: difuze (vlevo) a eroze (vpravo), převzato z [4].....	18
Obrázek 2: Struktura alginátu sodného, převzato z [29].....	20
Obrázek 3: Strukturní vzorec chitosanu, převzato z [34]	21
Obrázek 4: Deacetylace chitinu, převzato z [27].....	22
Obrázek 5: Strukturní vzorec tramadol hydrochloridu, převzato z [37].....	25
Obrázek 6: Schéma pádelkového uspořádání disolučního testu, převzato z [55].....	29
Obrázek 7: Schéma košíčkového uspořádání disolučního testu, převzato z [56].....	29
Obrázek 8: Schéma SEM, převzato z [59].....	34
Obrázek 9: Detailní schéma zdroje elektronů pro SEM, převzato z [59].....	35
Obrázek 10: Možné interakce elektronů se vzorkem, převzato z [59]	37
Obrázek 11: Detekční systém podle Everharta-Thornleyho, převzato z [62].....	38
Obrázek 12: Schéma detektoru pro BSE, převzato z [62]	39
Obrázek 13: Uhlíkové lepící disky a hliníkové podložky pro vzorky SEM, převzato z [64].	42
Obrázek 14: Řezy tablety pomocí skalpelu (A), děliče table (B), mikrotomu (C), převzato z [63]	43
Obrázek 15: Řez tablety vložené do parafínového vosku, převzato z [63]	43
Obrázek 16: Tableta F2 před počátkem disoluce.....	46
Obrázek 17: Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart	47
Obrázek 18: Závislost absorbance (A) na koncentraci TH.....	48
Obrázek 19: Vzorek tablety před vložením do komory.....	49
Obrázek 20: Mikroskop VEGA 3 SBU	49
Obrázek 21: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa (BI = 10, U = 10, 15, 20 kV).	49
Obrázek 22: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa (BI = 10, U = 25, 30 kV).	50
Obrázek 23: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa (BI = 17, U = 10, 15, 20 kV).	50
Obrázek 24: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa (BI = 17, U = 25, 30 kV).	51
Obrázek 25: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 50 Pa (BI = 17, U = 10, 15, 20 kV).	51
Obrázek 26: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa (BI = 17, U = 25, 30 kV).	52
Obrázek 27: Zobrazení povrchu tablety F1 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)	63
Obrázek 28: Zobrazení řezu tablety F1 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)	63
Obrázek 29: Zobrazení povrchu tablety F2 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX.....	64
Obrázek 30: Zobrazení řezu tablety F2 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo).....	64
Obrázek 31: Zobrazení povrchu tablety F3 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)	65

Obrázek 32: Zobrazení řezu tablety F3 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)	65
Obrázek 33: Zobrazení povrchu tablety F4 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)	66
Obrázek 34: Zobrazení řezu tablety F4 pomocí BSE	66

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled vybraných léčiv s TH, převzato z [47]	27
Tabulka 2: Používaná disoluční média, převzato z [49].....	28
Tabulka 3: Procentuální složení jednotlivých formulací	45
Tabulka 4: Časové intervaly odběrů vzorků pro formulaci F2.....	46
Tabulka 5: Časové intervaly odběrů vzorků pro formulace F1, F3, F4, F7.....	46
Tabulka 6: Časové intervaly odběrů vzorků pro formulace F5, F6	47
Tabulka 7: Regresní analýza disolučních profilů po proložení modelem I. řádu	57
Tabulka 8: Regresní analýza disolučních profilů po proložení modelem Weibull	57
Tabulka 9: Regresní analýza disolučních profilů po proložení modelem Kormeyer-Peppas	58

Seznam grafů

Graf 1: Disoluční profil formulace F1 a vzhled tablety po 60 minutách, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	53
Graf 2: Disoluční profil formulace F2 a vzhled tablety po skončení disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	54
Graf 3: Disoluční profil formulace F3 a vzhled tablety po 45 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	54
Graf 4: Disoluční profil formulace F4 a stav tablety po 45 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	55
Graf 5: Disoluční profil formulace F5 a vzhled tablety po 30 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	55
Graf 6: Disoluční profil formulace F6 a vzhled tablety po 15 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	56
Graf 7: Disoluční profil formulace F7 a vzhled tablety po 30 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull	56
Graf 8: Disoluční profily formulací F1-F7	60
Graf 9: Disoluční profily formulací obsahující alginát sodný	61
Graf 10: Porovnání rychlostních konstant I. řádu formulací F1-F4 v závislosti na obsahu alginátu sodného	62
Graf 11: Disoluční profily formulací F1-F7, proloženy modelem Korsmeier-Peppas	62

Seznam zkratek a značek

TH – tramadol hydrochlorid

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

EDX – energiově disperzní spektroskopie

MCC – mikrokrytalická celulóza

ÚL – účinná látka

UV/VIS – ultrafialová a viditelná oblast

RSS – suma čtverců reziduí

SE – detektor sekundárních elektronů

BSE – detektor zpětně odražených elektronů

LVSTD – detektor sekundárních elektronů při nízkém vakuu

CL – katodoluminiscenční detektor

Úvod

Historicky je orální podání dominantním způsobem podávání léčivých látek. Nejrozšířenějším způsobem podání je také proto, že gastrointestinální trakt a jeho fyziologie nabízí velkou flexibilitu pro široké spektrum různých formulací perorálních forem. Systémy s řízeným uvolňováním dodávají léčivo lokálně nebo systémově po určitou dobu a jejich cílem je dosažení požadované plazmatické hladiny léčiva a její udržení po dostatečně dlouhou dobu. Perorální lékové formulace jsou usilovně zkoumány také kvůli mnohým výhodám oproti běžným dávkovým formám.

Rozvoj moderních farmaceutických technologií v 60. a 70. letech 20. století přinesl značné pokroky ve formulaci a výrobě pevných lékových forem. Během tohoto období se postupně objevovaly průlomové výzkumy týkající se nových aktivních substancí a výrazně se rozšířily znalosti o fyzikálně-chemických vlastnostech molekul léčiv, což umožnilo zavedení řady nových účinných terapeutických strategií [1].

Vývoj a výzkum perorálních forem v období let 1950-1980 (lékové formy I. generace) je všeobecně považován za velice produktivní, jelikož došlo k vývoji velkého množství orálních a transdermálních formulací, které bývají označovány jako lékové formy I. generace. U těchto léčiv je plazmatický profil ovlivňován výhradně farmakokinetickými ději, jako je absorpce, distribuce a eliminace léčiva, vlastní léková forma však není schopna prodloužit nebo jinak modifikovat uvolňování léčiva [1].

Druhá generace klinických výrobků (1980-2010) měla překvapivě menší úspěch co do počtu nových klinických výrobků. Vývoj byl zaměřen na široké spektrum formulací s prodlouženým uvolňováním a na využití tzv. smart polymerů a hydrogelů. Ty byly schopné regulovat uvolňování účinné látky v závislosti na podmínkách gastrointestinálního traktu [1]. Zkoumány byly také systémy s řízeným uvolňováním za účelem dosažení uvolňování účinné látky pomocí kinetiky nultého řádu. Intenzivně byly také vyvíjeny nanočásticové formulace vhodné pro cílené podávání léčiva [2]. Hlavní překážkou systémů s řízeným uvolňováním byla *in-vitro/in-vivo* korelace a s ní související problémy s překonáním biologických bariér [1].

Úkolem třetí generace lékových přípravků (od 2010) je překonat jak fyzikálně-chemické, tak i biologické bariéry. Fyzikálně-chemické problémy plynou ze špatné rozpustnosti léčiv ve vodě a složité kinetiky uvolňování léčiv z lékových formulací v podmínkách *in vivo*. Biologickou překážkou je hlavně distribuce léčiva v organismu, a s tím

související transport molekuly léčiva na specifické místo v těle. Budoucnost systémů s řízeným uvolňováním závisí na hlubším pochopení zmíněné problematiky biologických bariér, které musí účinná látka překonat, na intenzivním studiu fyzikálně-chemických vlastností aktivních substancí i pomocných látek, a zejména na rozvoji farmaceutických technologií [1].

Jak již bylo zmíněno, celý farmaceutický výzkum se nadále vyvíjí a vznikají léky nové nebo dochází k neustálému zlepšování léků stávajících. Je potřeba stále více informací a ukázalo se, že využití pokročilých nástrojů, jakými jsou například skenovací elektronové mikroskopy (SEM) je více než přínosné. Ve farmaceutickém výzkumu se SEM využívají k zobrazení a analýze lékových formulací, práškovitých komponent tablety a buněčných interakcí s novými léky [3].

1. Teoretická část

1.1 Řízené uvolňování

Formulace, které jsou schopné regulovat uvolňování léčiva, se staly velice důležitou součástí farmaceutického průmyslu. Vývoj lékových forem pro perorální použití je v popředí farmaceutického průmyslu již řadu let. Hlavní předností těchto lékových formulací jsou mnohé výhody oproti běžným dávkovým formám. Velký význam mají matricové tablety kvůli svému širokému použití a relativně jednoduchému složení jednotlivých formulací [4].

Řízené uvolňování léčiva může probíhat kontinuálně (prodloužené uvolňování) nebo diskontinuálně (zpožděné, pulzní uvolňování) podle potřeb organismu a léčby daného onemocnění. Během prodlouženého uvolňování se část účinné látky uvolní okamžitě a tím se dosáhne hodnoty terapeutické koncentrace. Zbylé množství účinné látky se uvolňuje pomaleji, a to má za následek udržení hladiny léčiva v terapeutické hladině po dobu nejčastěji 12-18 hodin [5; 6]. Zpožděné (opozděné) uvolňování léčiva z lékové formy je charakteristické pro tablety, které jsou nerozpustné v kyselém prostředí žaludku. Znamená to tedy, že se účinná látka začíná uvolňovat až při dosažení trávícího traktu nebo v jeho určitém místě (např. dvanáctníku). Pulzní uvolňování zahrnuje takový proces, kde je účinná látka uvolňována v pravidelných časových intervalech. Disoluční profily uvedených druhů řízeného uvolňování je možno nalézt v [6].

Perorální formulace s řízeným uvolňováním mají řadu výhod oproti běžným dávkovým formám: [4]

- frekvence dávkování je snížena díky uvolňování léčivé látky po delší časový interval
- redukce nežádoucích účinků díky konstantní hladině léčiva v plazmě
- zlepšení komfortu pacientů v důsledku snížené frekvence dávkování
- lepší kontrola terapeutické koncentrace léčiva
- cenově efektivní výroba.

Perorální formulace s řízeným uvolňováním mají také několik nevýhod:

- výroba některých přípravků vyžaduje finančně nákladné specializované vybavení [4]
- míra uvolňování léku může být ovlivněna jídlem a následně změnou doby průchodu léčiva gastrointestinálním traktem (GIT) – vznikají rozdíly v rychlosti uvolňování mezi jednotlivými dávkami
- přípravky s řízeným uvolňováním účinné látky by neměly být rozdrceny ani žvýkány, jelikož hrozí riziko narušení (ztráty) mechanismu prodlouženého uvolňování

1.2 Matricové tablety

Matricové tablety reprezentují typ tablet s prodlouženým uvolňováním. Tableta je tvořena tzv. matricí (nosný polymer), do které je homogenně včleněna účinná látka, a látkami pomocnými (excipienty). Nosný polymer funguje jako retardující komponenta. Na základě typu retardující komponenty můžeme matricové tablety rozdělit na hydrofilní gelové, lipofilní, polymerní nerozpustné a směsné [6, 7, 13].

Matricové tablety patří k jednotkovým lékovým formám (na rozdíl od násobných forem neobsahují částice), což znamená, že tableta funguje jako jeden celek a její vlastnosti závisí především na vlastnostech nosné pomocné látky a vlastnostech léčivé látky, které mohou být do jisté míry upraveny dalšími vhodnými pomocnými látkami tak, aby přípravek splňoval požadované farmakologické vlastnosti a stabilitu [8].

Většina komerčních matricových tablet se vyrábí metodou přímého lisování, kterému může předcházet proces granulace. Nenáročná technologie přípravy matricových tablet patří k hlavním výhodám (spolu s dalšími výhodami uvedenými v kapitole 2.1). Naopak nežádoucím efektem může být vliv prvního průchodu játry tzv. first pass efekt. Tento efekt způsobuje, že část léčivé látky může být metabolizována ještě před vstupem do systémové cirkulace [9]. V dalším textu budou popsány hlavně hydrofilní matricové systémy, jelikož hlavním zaměřením této práce je provedení disolučních zkoušek a následné zkoumání těchto systémů pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

1.2.1 Hydrofilní gelové matrice

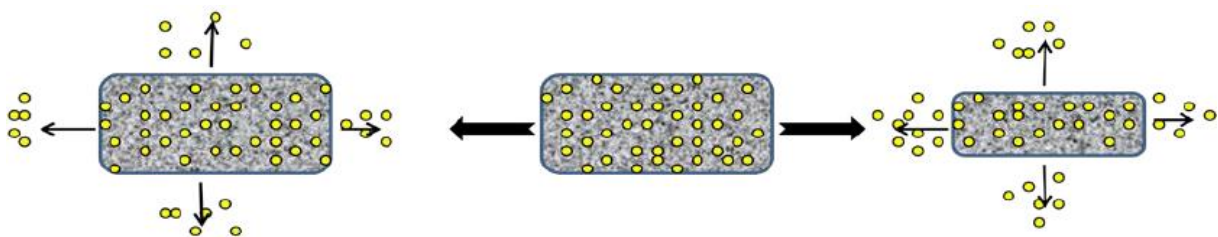
Hydrofilní matricové tablety mohou být definovány jako homogenní disperze molekul účinné látky v rámci skeletu hydrofilního polymeru. Polymery používané při přípravě hydrofilních matric můžeme rozdělit do 3 skupin: [9]

1. *Deriváty celulosy*: methylcelulosa, hydroxyethylcelulosa, hydroxypropylmethylcelulosa, sodná sůl karboxymethylcelulosy
2. *Necelulosové přírodní, nebo semisyntetické polymery*: agar, kyselina alginová a algináty, arabská guma, pektiny, xantanová guma, chitosan a modifikované škroby
3. *Polymery kyseliny akrylové a syntetické polymery*: karbomery, polyvinylalkohol

Právě tyto zmíněné polymery tvoří základ hydrofilních matricových tablet. Bobtnání polymeru, eroze, difuze a rozpouštění účinné látky jsou hlavní děje, které řídí mechanismus uvolňování léčiva z matrice. To platí jak v makroskopickém měřítku, tak i na molekulární úrovni [10].

Obecným mechanismem uvolňování účinné látky je přechod polymeru ze sklovitého do viskoelastického stavu po kontaktu polymeru s vodným roztokem (disoluční médium nebo žaludeční šťáva) [11].

Hlavním prvkem mechanismu uvolňování léčiva je gelová vrstva tvořící se kolem matrice po již zmíněném kontaktu s vodným roztokem a má zásadní vliv na uvolňování léčiva z hydrofilních matricových tablet. V této rané fázi dojde k uvolnění počáteční dávky léčiva a tím se navodí jeho terapeutická koncentrace. Vrstva je poté schopna zabránit rozpadu matrice a dalšímu rychlému pronikání vody [11]. V dalším kroku rozpouštědlo zvýší pohyblivost polymerních řetězců a jejich rozvolnění umožní vznik nabobtnalého gelu. Původně gelová vrstva se postupně rozpouští a je nahrazena vrstvou novou, která musí být dostatečně pevná, aby zpomalovala difuzi a dále prodlužovala uvolňování léčiva [11]. Vlastnosti gelové vrstvy a rychlost uvolňování léčiva může ovlivnit celá řada faktorů. Mezi faktory ovlivňující rychlost uvolňování léčiva patří např. typ polymeru, jeho viskozitní stupeň, stupeň substituce, velikost částic polymeru, chemická struktura léčiva, rozpustnost a lisovací síla. Uvolňování léčivé látky z těchto systémů se děje v závislosti na rozpustnosti léčiva ve vodném prostředí difuzí (převažuje u léčiv dobře rozpustných), erozí (převažuje u léčiv špatně rozpustných) nebo kombinací obou dějů podle rozpustnosti léčiva a relaxace polymerových řetězců [11, 6].



Obrázek 1: Možnosti uvolnění účinné látky z matricové tablety: difuze (vlevo) a eroze (vpravo), převzato z [4]

Proces vzniku gelové vrstvy má za následek rozdělení matricové tablety na tři odlišné oblasti. Silně nabobtnalá vnější oblast (erozní vrstva) obsahuje nejvyšší množství vody, mechanicky je velmi slabá. Ovšem její role je významná z důvodu bránění vstupu vody do dalších vrstev tablety. Střední část tablety je nazývána disoluční vrstva, která je mechanicky pevnější, avšak bobtná méně. Jádro celé tablety tvoří bobtnající vrstva, která je po většinu času suchá, a proto se nachází ve skelném stavu [12].

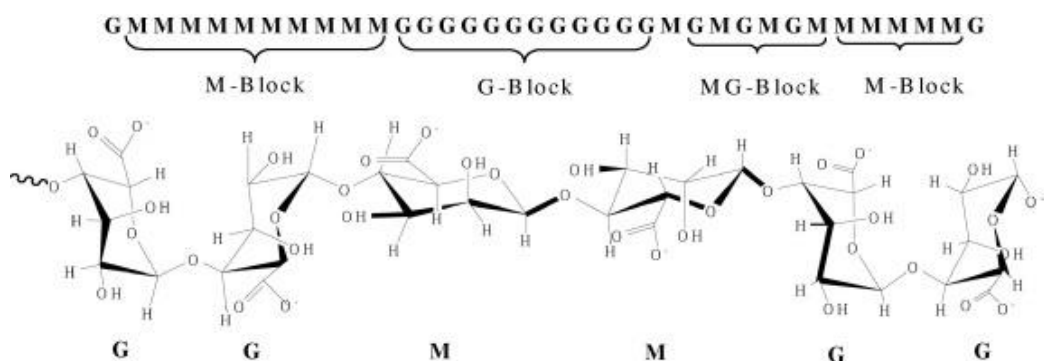
Hydrofilní matricové systémy jsou v současné době jedním z nejzajímavějších systémů pro perorální podávání léků. Výhodou těchto systémů je malá finanční náročnost technologie, jednoduchost výroby a přijatelná cena pomocných látek [9].

1.3 Přírodní polymery používané v hydrofilních matricových tabletách

V dnešní době jsou přírodní polymery využívány stále častěji. Jsou vhodné jako biodegradabilní nosiče léčiv. Používají se k řízenému uvolňování účinné látky, ke zvyšování rozpustnosti a lepší možnosti cíleného podání [14]. Mezi největší přednosti přírodních polymerů patří jejich bezpečnost, snadná dostupnost a relativně nízká cena [15]. Přírodní polymery je možné získat z rostlinných exudátů (arabská guma) či extraktů (pektiny), z mořských řas (algináty, karageny). Při procesu mikrobiální fermentace pro výrobu matric je produktem xantanová guma [15].

1.3.1 Alginát sodný

Alginát je přírodní lineární polymer, který se přirozeně vyskytuje ve stěnách buněk hnědých mořských řas a je složen ze dvou monosacharidů kyseliny uronové: kyselina D-mannurová a L-guluronová. Spojení těchto monosacharidů je uskutečněno β (1-4) a α (1-4) glykosidickými vazbami. Tyto dva monopolymery poté tvoří M-, G- a MG blokové struktury, které jsou zobrazeny na obrázku č. 2. [16, 17]. Při nízkém pH ($\text{pH} < 3$) se alginát sodný mění na kyselinu alginovou, sráží se a depolarizuje [15].



Obrázek 2: Struktura alginátu sodného, převzato z [29]

Příprava alginátu

V buněčných stěnách hnědých řas je alginát přítomen jako vápenatá, hořečnatá a sodná sůl kyseliny alginové. Cílem extrakčního procesu je získat suchý, práškový alginát sodný. Vápenaté a hořečnaté soli jsou ve vodě nerozpustné, kdežto sodná sůl je rozpustná. To znamená, že prvním krokem je převedení všech alginátových solí na sodnou sůl, rozpuštění ve vodě a následné odstranění zbytků mořských řas filtrací. Alginát se pak získává z vodného roztoku. Po přidání zředěné kyseliny chlorovodíkové, která způsobí tvorbu kyseliny alginové se vzniklá alginová kyselina odděluje jako měkký gel. Následně je přidán alkohol a poté uhličitan sodný, který vzniklou kyselinu alginovou převede na alginát sodný. Ten však není rozpustný ve směsi alkohol/voda, a tak musí být oddělen, vysušen a poté rozemlet na konkrétní a vhodnou velikost částic [16, 19].

Využití alginátu

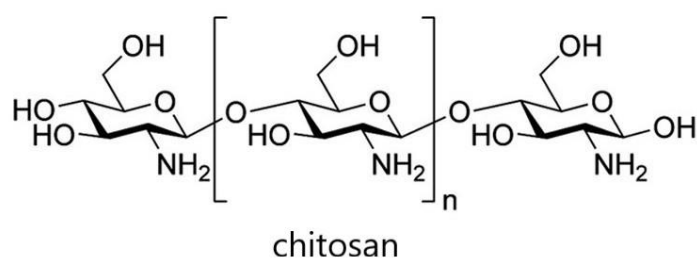
Ve farmaceutickém průmyslu se alginát využívá pro výrobu hydrofilních matricových tablet pro řízené uvolňování léčiva nebo také jako dezintegrační činidlo pro různé tablety se speciálními aplikacemi. Využívá se také k udržení obsahu žaludku a snižuje pravděpodobnost refluxu. V lékařství se uplatňují obvazy, které se vyrábějí ze směsi sodné a vápenaté soli alginátu a výrazně přispívají k rychlosti hojení ran. Jeho výhodou je nízká toxicita, biokompatibilita a nízké výrobní náklady [19, 20].

1.3.2 Chitosan

Chitosan neboli (1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glukan je kationtový biopolymer patřící mezi přírodní polymery polysacharidového typu. Je odvozený od chitinu, druhého nejrozšířenějšího přírodního polysacharidu po celulóze [14]. Chitosan se získává částečnou deacetylací chitinu [21]. Ve srovnání s chitinem má chitosan větší chemickou a biochemickou

aktivitu [14]. Strukturu chitosanu tvoří glukosaminové a N-acetylglukosaminové jednotky, které jsou spojeny β (1-4) glykosidickou vazbou [22].

Aminoskupiny vzniklé po deacetylaci jsou zodpovědné za specifické chemické vlastnosti chitosanu (obr. 3). Chitosan je ceněn pro dobrou biokompatibilitu, biologickou rozložitelnost, netoxicitu a antibakteriální vlastnosti. Díky těmto vlastnostem je velice žádaným polymerem pro biomedicínské aplikace. Nevýhodou chitosanových biomateriálů je nízká mechanická stabilita. Zvýšení mechanické odolnosti lze dosáhnout vhodným začleněním sacharidů (hemicelulosa, celulóza, škrob), syntetických polymerů a některých bílkovin [23].

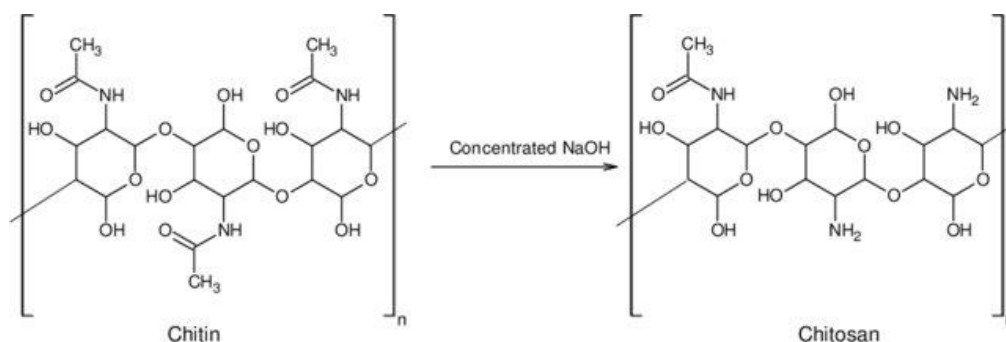


Obrázek 3: Strukturní vzorec chitosanu, převzato z [34]

Příprava chitosanu

Jak již bylo zmíněno, nejznámějším způsobem výroby chitosanu je alkalická deacetylace, další možností je několikahodinový var s 50 % hydroxidem sodným nebo enzymatická reakce (N-deacetylasa). Stupeň deacetylace se udává v procentech. Nejčastěji se hodnoty pohybují v rozmezí 60 – 100 %. V přírodě se chitosan vyskytuje například u několika typů hub rodu *Aspergillus* a *Mucor* [14].

Samotná výroba spočívá v nadrcení schránek koryšů (rak, krab, kalmar) a následné odvápnování ve zředěném roztoku HCl. V dalším kroku následuje deproteinizace ve zředěném roztoku NaOH. K odstranění karotenoidů a pigmentů (tzv. odbarvování) se využívá ethanol, aceton nebo 0,5 % KMnO_4 s zředěnou kyselinou šťavelovou. Z chitinu vzniká pomocí deacetylace v horkém roztoku NaOH polysacharid chitosan (obr. 4). V tomto procesu jsou odstraněny postranní acetylové skupiny u opakujících se N-acetylglukosaminových jednotek [22].



Obrázek 4: Deacetylace chitinu, převzato z [27]

Využití chitosanu

Pro své vlastnosti je chitosan v dnešní době velice žádanou látkou ve farmaceutických a biomedicínálních odvětvích. Využívá se pro transport léčiva a jeho cílení k aktivnímu místu a také ve formulacích pro řízené uvolňování [14]. Chitosan také vykazuje antibakteriální účinnost vůči některým grampozitivním (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) i gramnegativním (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*) bakteriím. V této souvislosti byly připraveny komplexy se stříbrnými ionty, které samy o sobě zvyšují antibakteriální vlastnosti [14, 24]. Komplexy poté vykazovaly vyšší antibakteriální a antifungální účinnost [14, 25]. Chitosan byl také použit k pokrytí monomerního alginátu sodného, který byl pospojován chloridem vápenatým. Tento materiál se používá k léčbě ran a popálenin [14]. Chitosan je také využíván ke snížení hladiny cholesterolu, ke snížení krevního tlaku a také zpomaluje ukládání tuků [22].

1.3.3 Xantanová guma

Xantanová guma je extracelulární vysokomolekulární aniontový polysacharid, který je produkován gram-negativní bakterií *Xanthomonas campestris* [26]. Makromolekulární řetězce xantanové gumy jsou tvořeny přibližně 2000 pravidelně se opakujících jednotek. Každou jednotku tvoří dva β -D-glukosové, dva D-mannosové a jeden zbytek kyseliny D-glukuronové. Primární řetězec ovšem tvoří pouze β -D-glukosy a na něj je vázán trisacharidový postranní řetězec, který tvoří již zmíněné dvě D-mannosy a kyselina D-glukuronová [15]. Terminální zbytek D-mannosy může nést v poloze 4 a 6 pyruvát. Distribuce je ovšem nepravidelná a závisí na druhu bakteriálního kmene a podmínkách fermentace. Proximální zbytek D-mannosy může v poloze 6 acetylovaný [26, 15].

Xantanová guma je bílý až krémově zabarvený prášek, který se ochotně rozpouští ve studené i teplé vodě. Rozpouští se také v 5 % kyselině sírové i dusičné, avšak nerozpustná je v mnoha organických rozpouštědlech. Díky postranním řetězcům, které chrání hlavní lineární řetězec je velice odolná proti enzymatickému rozkladu působením některých enzymů (α -amylasy, celulasy, pektinas a proteas) [15]. Uplatnění xantanová guma nachází jako pomocná látka v perorálních i topických přípravcích. Využívá se jako stabilizátor, látka zvyšující viskozitu a také jako nosný polymer pro výrobu matricových tablet [28, 15].

1.3.4 Arabská guma (klovatina)

Arabská guma je vysušený exudát, který samovolně vytéká nebo je získáván cíleným nařezáváním kůry dřevin rodu *Acacia* (*senegal*, *seyal*). Samovolné vylučování exudátu nastává při poranění dřeviny, při nedostatku živin a vody (hlavně v období sucha) Hlavním producentem arabské gumy jsou západoafrické země [15].

Z chemického hlediska je arabská guma tvořena kyselinou arabinovou. Tento polysacharid se skládá z D-galaktosy, L-arabinosy, L-rhamnosy a kyseliny D-glukuronové. V arabské gumě je kyselina arabinová přítomna ve formě solí, převážně vápenatých, draselných a hořečnatých [30].

Arabská guma je velice dobře rozpustná ve vodě. Lze připravit roztoky s více než 50% obsahem polymeru. Využívá se jako pojivo při výrobě tablet a jako nosný polymer v matricových tabletách pro prodloužené uvolňování. Lze použít jako stabilizátor emulzí a suspenzí pro perorální přípravky [31, 15].

1.3.5 Pektiny

Pektiny patří do skupiny polysacharidů aniontového charakteru. Společně s celulosou se nachází v buněčných stěnách rostlin. Ovlivňují zde mechanické vlastnosti rostlin, konkrétně celuloza ovlivňuje pevnost a pektiny flexibilitu [32]. Hlavní stavební jednotkou pektinů je kyselina α -D-galakturonová. Tvoří lineární řetězec spojený (1-4) glykosidickými vazbami. Přítomen je i postranní řetězec, který může obsahovat další cukry (D-xylosa, L-fukosa a jiné). Kyselina α -D-galakturonová bývá často esterifikována methanolem a proto se pektiny mohou rozdělit do dvou skupin. Pektiny s vysokým obsahem methoxylovaných skupin (více než 50% esterifikovaných skupin) a pektiny s nízkým obsahem methoxylovaných skupin (méně než 50% esterifikovaných skupin) [14]. Se zvyšující se

methylovanými získávají molekuly hydrofobnější charakter a klesá jejich interakce s kationty [33, 34, 15].

Pro výrobu se používají citrusové a jablečné výlisky. Následně je materiál podroben kyselé hydrolyze (teplota 70 – 90 °C) a dochází k deesterifikaci vysoce methoxylovaných pektinů, které jsou málo rozpustné. Tím se získávají pektiny s nižším obsahem methoxylovaných skupin, které už jsou ve vodě rozpustné. Výsledný extrakt je nutné zakonzentrovat a vysrážet ethanolem. Získané pektiny se oddělí a vysuší [35].

Ve farmacii se pektiny uplatňují hlavně při výrobě hydrofilních matricových tablet. Uvolňování účinné látky je často ovlivněno typem použitého pektinu. Používají se jako stabilizátory emulzí a suspenzí. Pektinové gely se využívají k výrobě masťových základů. Uvádí se, že kombinací pektinů a chitosanu se vyrábějí formulace, které se používají například pro cílený transport léčiv do tlustého střeva [36, 15].

1.4 Pomocné látky pro přípravu matricových tablet

Prosolv® SMCC 90

Prosolv® SMCC 90 je vedeno jako směsné suché pojivo skládající se z 98 % mikrokrystalické celulosy a z 2 % koloidního oxidu křemičitého. Jedná se o bílý inertní krystalický prášek s velice dobrou sypností. Ve srovnání se standardní mikrokrystalickou celulosou má až pětinasobně větší specifický povrch a také o 30 % – 50 % větší schopnost zhutnění. Tyto vlastnosti vedou k dobré homogenitě, jemnější distribuci velikosti částic, stabilitě přípravku a zlepšení obsahové rovnoměrnosti. Využívá se hlavně při přípravě tablet metodou přímého lisování [37 – 39].

LubriTose™ MCC

Toto suché směsné pojivo obsahuje 98 % mikrokrystalické celulosy a 2 % glycerylmonostearátu. Glycerylmonostearát nahrazuje běžně užívaný stearát hořečnatý a plní funkci lubrikantu. LubriTose™ je nejvíce využíván pro metodu přímého lisování společně s přímo stlačitelným pojivem. Mezi další výhody patří snížení počtu kroků při výrobě, zlepšení sypnosti, hmotnosti tablet a eliminace externího mazadla [40].

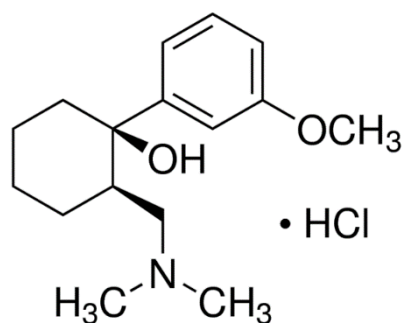
Kollidon® SR

Kollidon® SR je fyzikální směs polyvinylacetátu a povidonu a v matricových tabletách se využívá jako retardující komponenta. Jedná se o bílý nebo slabě nažloutlý prášek s velmi dobrou sypností. Jeho využití je hlavně pro výrobu tablet s prodlouženým uvolňováním, a to

nezávisle na hodnotě pH. Je vhodný pro tablety připravované metodou přímého lisování nebo metodou horké extruze. Po zavedení tablet do žaludeční nebo střevní dutiny se ve vodě rozpustný povidon vyloučí za vzniku pórů, kterými účinná látka pomalu difunduje ven. Kollidon[®] SR je ceněný pro nízkou hygroskopicitu a dobrou lisovatelnost [41].

1.5 Tramadol hydrochlorid

Tramadol hydrochlorid (TH) je bílý krystalický prášek. Je velice dobře rozpustný ve vodě a v metanolu.



Obrázek 5: Strukturní vzorec tramadol hydrochloridu, převzato z [37]

1.5.1 Farmakodynamické vlastnosti

Tramadol hydrochlorid (TH) je centrálně působící opioidní analgetikum syntetického původu. Jeho strukturním analogem je kodein, avšak tramadol hydrochlorid má nižší afinitu k opioidním receptorům, což je ceněnou výhodou této účinné látky. Další mechanismy, které přispívají k analgetickému účinku, jsou inhibice zpětného vychytávání noradrenalinu v neuronech a zlepšení uvolňování serotoninu [42, 43]

Na rozdíl od morfinu nepůsobí analgetické dávky TH útlum dechového centra a gastrointestinální motilita je rovněž ovlivněna méně. Analgetická účinnost TH je uváděna jako desetina nebo šestina účinnosti morfinu [43].

Jeho využití je především při pooperačních, popřípadě chronických bolestí, ale také bývá podáván pacientům s nádorovým onemocněním [42].

1.5.2 Farmakokinetické vlastnosti

Po perorálním podání se absorbuje více než 90 % TH. Průměrná absolutní biologická dostupnost je přibližně 70 %, bez ohledu na současný příjem potravy. Rozdíl mezi absorbovaným a nemetabolizovaným biologicky dostupným TH je dán nízkým first-pass efektem. First-pass efekt je po perorálním podání nejvýše 30 % [44].

Metabolizace TH se uskutečňuje hlavně v játrech, a to především procesem N- a O-demetylace a následnou konjugací O-demetyltramadolu (jediný je farmakologicky aktivní) s kyselinou glukuronovou za pomoci komplexu enzymů cytochromu P450 (hlavně izoenzym CYP2D6). CYP2D6 může být inhibován řadou léků, včetně různých antidepresiv. Souběžná léčba takovými inhibitory může ovlivnit analgetický účinek TH a jeho plazmatickou koncentraci [45].

Eliminační poločas je přibližně 6 hodin a není závislý na způsobu podání. TH a jeho metabolity jsou výhradně vylučovány ledvinami. Močová exkrece dosahuje 90 % celkového množství podané dávky. Při poruše jaterních a renálních funkcí může být poločas mírně prodloužen. [45, 44].

Maximální plazmatické koncentrace ($C_{max} = 310 \pm 80$ ng/l), po perorálním podání 100 mg léčiva, je dosaženo po 1-2 hodinách. U přípravků s prodlouženým uvolňováním tomu je po 4-6 hodinách. Na plazmatické proteiny je vázáno 20 % léčiva. TH má terapeutické rozmezí 100-300 ng/l. Distribuční objem dosahuje 2,6-2,9 litrů na kilogram tělesné hmotnosti. Z toho je patrné, že TH disponuje vysokou afinitou ke tkáním. [45, 44].

1.5.3 Léčivé přípravky s TH

TH byl vyvinut počátkem 60. let 20. století německou farmaceutickou společností Grunenthal. Poprvé TH vstoupil na trh koncem 70. let 20. století pod obchodním názvem Tramal®. Přibližně o 20 let později byl TH představen na americkém trhu. V současné době je TH dostupný ve 100 zemích pod různými obchodními názvy. Často se tablety vyskytují v kombinaci s paracetamolem pro zvýšení terapeutického účinku. Nejčastěji se jedná o tablety s prodlouženým uvolňováním, potahované tablety, tvrdé tobolky nebo také injekční roztoky a perorální kapky. Vybraná léčiva (především s prodlouženým uvolňováním) dostupná na českém trhu jsou uvedena v tabulce 1 [46, 47].

Tabulka 1: Přehled vybraných léčiv s TH, převzato z [47]

Název	Forma	Držitel registrace
DORETA PROLONG	tableta s prodlouženým uvolňováním	Krka, d.d., Novo mesto, Novo město (Slovinsko)
MABRON RETARD	tableta s prodlouženým uvolňováním	Medochemie Ltd., Limassol (Kypr)
TRALGIT SR	tableta s prodlouženým uvolňováním	Zentiva a.s., Bratislava (Slovensko)
TRAMADOL MYLAN	tableta s prodlouženým uvolňováním	Generics [UK] Limited, Potters Bar (Velká Británie)
TRAMADOL RETARD ACTAVIS	tableta s prodlouženým uvolňováním	Actavis Group PTC ehf., Hafnarfjörður (Island)
TRAMADOL SANDOZ RETARD	tableta s prodlouženým uvolňováním	Sandoz s.r.o., Praha doz GmbH, Kundl (Rakousko)
TRAMAL RETARD TABLETY	tableta s prodlouženým uvolňováním	STADA Arzneimittel AG, Bad Vilbel (Německo)
TRAMUNDIN RETARD	tableta s prodlouženým uvolňováním	Mundipharma Gesellschaft m.b.H., Vídeň (Rakousko)
TRAMYLPA	potahovaná tableta	Generics [UK] Limited, Potters Bar (Velká Británie)
TRAMADOL VITABALANS	tableta	Vitabalans OY, Hämeenlinna (Finsko)

1.6 Disoluční testy

Při vývoji nových perorálních forem je klíčovým aspektem zajištění dostatečné biodostupnosti léčivé látky. Biodostupnost u pevných lékových forem je určena rychlostí uvolňování léčivé látky z lékové formy, která se zkouší *in vitro* tzv. zkouškou disoluce.

Disoluční studie je požadována u všech pevných lékových forem s perorálním užitím a je využívána ve všech fázích vývoje nového produktu. Provedení disolučního testu je definováno lékopisem [50]. Jedná se o klíčový analytický test používaný k detekci fyzikálních a chemických změn celé nové formulace. V současné době jsou disoluční testy nejen testy pro kontrolu řízeného uvolňování, ale během posledních několika desetiletí se také používají pro

kontrolu kvality ve výzkumu a vývoji pro zjištění vlivu výrobních postupů a následných *in vitro/in vivo* korelacích [48].

Disoluce perorálních léčivých přípravků se stanovuje v jednom ze čtyř přístrojů uvedených v lékopise. Přístroje mohou být s košíčkem, pádlem (míchadlem), vratným válcem a průtokovou celou. Při stanovení disoluce léčivé látky je třeba specifikovat použitý přístroj, složení, objem a teplotu disolučního roztoku, rychlost otáčení nebo průtok disoluční kapaliny, dobu, metodu a množství zkoušeného roztoku pro vzorkování nebo podmínky průběžného sledování. Složení disolučního média se vybírá na základě fyzikálně-chemických vlastností léčivé látky, látek pomocných a specifikace léčivého přípravku. Zkouška je prováděna při teplotě $37 \pm 0,5$ °C. Voda je doporučena jako disoluční medium pouze tehdy, když je prokázáno, že různé hodnoty pH nemají vliv na disoluční charakteristiku. Častěji se však používají tlumivé roztoky [49, 50]. V další části práce budou popsány dvě nejběžnější disoluční metody a to pádelková, která byla využita jako hlavní disoluční metoda v této diplomové práci, a metoda košíčková.

Tabulka 2: Používaná disoluční média, převzato z [49]

pH	Disoluční médium
1,0	HCl
1,2	NaCl; HCl
1,5	NaCl; HCl
4,5	tlumivý roztok fosforečnanový nebo acetátový
6,8	tlumivý roztok forforečnanový

1.6.1 Metoda pádelková (míchadlová)

Všechny části přístroje, které přicházejí do styku s disoluční kapalinou nebo léčivým přípravkem musí být chemicky inertní, a tedy neadsorbují, neinterferují a nereagují se zkoušeným vzorkem. Přístroj u této metody se skládá z válcovité skleněné nádoby (např. borosilikátové sklo) nebo jiného inertního průhledného materiálu (obr. 6). Nádoba má objem 1000 ml a je opatřena víkem k zamezení odpařování. Ve středovém otvoru víka je umístěna hnací hřídel, otvor pro teploměr a otvor pro odebírání vzorku. Lopatky sestupující z hřídele jsou umístěny v přesně definované vzdálenosti ode dna nádoby. Horní konec hřídele je připojen k motorové jednotce regulující rychlost otáčení. Během disoluční zkoušky musí být míchání plynulé a bez zjevného chvění [50].



Obrázek 6: Schéma pádelkového uspořádání disolučního testu, převzato z [55]

1.6.2 Metoda košíčková

Složení přístroje je stejné jako při pádelkové metodě. Hlavním rozdílem je, že se zde nevyužívá k míchání lopatek, ale konec hnací řídele je zakončen košíčkem z inertního materiálu (obr. 7). Testovaná tableta se vkládá do stabilně upevněného košíčku, přesněji do části zvané tubus, která je připevněna k horní přírubě. Košíček je umístěn v přesně definované výšce ode dna disoluční nádoby a podmínky pro správné provedení jsou totožné s metodou pádelkovou [50]. Použití této metody je vhodné pro pevné lékové formy, které při pádelkové metodě nezůstávají pod lopatkami, ale plavou na hladině disolučního média, což by způsobovalo nerovnoměrné omývání tablety disolučním médiem.



Obrázek 7: Schéma košíčkového uspořádání disolučního testu, převzato z [56]

1.7 Matematické modely popisující řízené uvolňování léčiva

Nejpoužívanější matematické modely pro vyhodnocování disolučních profilů jsou kinetický model I. a 0. řádu, Higuchi model, Korsmeyer-Peppas model, Weibull model a Hixson-Crowell. Regresní analýza disolučního profilu je základem nejen pro kvantitativní popis uvolňování léčiva z dané formulace v podmínkách *in vitro*, ale také pro predikci uvolňování léčiva v podmínkách *in vivo*. Důležitou roli hraje matematický popis disolučního profilu také při vývoji nových lékových formulací [51, 52].

1.7.1 Kinetický model I. řádu

Model byl pro popis disoluce poprvé použit v roce 1967 Gibaldim a Fedmanem a později Wágnerem v roce 1969. Využívá se pro popis eliminace léčiva po jednorázové intravenózní dávce [52].

Kinetický model I. řádu vychází z řešení diferenciální kinetické rovnice (1) [51]:

$$-\frac{d[C]_{(s)}}{dt} = k_1[C_0]_{(s)} \quad (1)$$

K vyřešení této rovnice (1) je nutná separace proměnných a následná integrace, po níž se získá exponenciální tvar rovnice (2) popisující závislost koncentrace účinné látky na čase ve tvaru:

$$[C]_{(s)} = [C_0] e^{-k_1 t} \quad (2)$$

kde $[C]_{(s)}$ je aktuální koncentrace léčiva nacházející se v matrici v čase t , k_1 je rychlostní konstanta prvního řádu čas^{-1} a $[C_0]$ je počáteční množství léčiva v matrici

Pro využití nelineární regresní analýzy při vyhodnocování disolučních profilů je výhodnější upravit rovnici (2) na tvar:

$$C_{(t)} = C_0 (1 - e^{-kt}) \quad (3)$$

kde $C_{(t)}$ je množství léčiva uvolněného v disolučním médiu v čase t , C_0 určuje maximálně uvolnitelné množství léčiva (ideálně rovno počátečnímu množství léčiva v matrici) a k označuje rychlostní konstantu s rozměrem čas^{-1} .

1.7.2 Model Weibull

Obecná empirická rovnice popsána Weibullem v roce 1951 byla převzata a upravena pro popis disolučních profilů Langenbucherem v roce 1972. Tento model lze vhodně aplikovat téměř na všechny druhy disolučních křivek. Weibullův model ve tvaru vhodném pro popis disolučních dat lze vyjádřit jako závislost množství uvolněné látky z lékové formy na čase ve tvaru [51, 52]:

$$C_{t(l)} = C_0 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right] \quad (4)$$

kde $C_{t(l)}$ je množství účinné látky uvolněného v čase t , C_0 je počáteční (maximální uvolnitelné) množství léčiva, parametr T představuje dobu prodlevy (tzv. *lag time*) před samotným započítáním disoluce (ve většině případů bývá nulový), parametr b je zodpovědný za tvar disoluční křivky a parametr a popisuje časovou závislost procesu [52]:

Parametr b může nabývat různých hodnot a ovlivňovat tvar výsledné křivky. Pro hodnotu $b > 1$ má křivka sinusoidový charakter. Pokud je $b < 1$, křivka roste strměji než pro případ $b = 1$, kde tvar odpovídá exponenciální křivce s konstantou $k = 1/a$, a tudíž můžeme psát Weibullův model ve tvaru [53]:

$$C_{t(l)} = C_0 \cdot (1 - e^{-k(t-T)}) \quad (5)$$

Model Weibull nebyl odvozen na základě žádné kinetické teorie (jedná se o model statistický) a díky tomu má také omezené využití pro popis mechanismu a rychlosti uvolňování léčiva z lékové formy a pro stanovení korelací *in vivo/in vitro* [52].

1.7.3 Model Korsmeyer-Peppas

Tento model byl odvozen v 80. letech 20. století. Korsmeyer a Peppas odvodili vztah popisující uvolňování léčiva z polymerního systému pomocí mocninné funkce v následujícím tvaru [51, 52]:

$$f_t = \frac{C_t}{C_\infty} = Kt^n \quad (6)$$

kde C_t/C_∞ je frakce uvolněného léčiva (množství uvolněné látky v čase t /maximální uvolnitelné množství léčiva) do disolučního média v čase t , K charakterizuje konstantu procesu a n je exponent uvolňování charakterizující mechanismus uvolňování léčiva [51, 52].

Pro zjištění mechanismu uvolňování léčiva je nutné tento model aplikovat na prvních 60 % uvolněného množství [51]. V roce 1985 Peppas použil parametr n pro charakteristiku mechanismu uvolňování pro cylindrické tablety [52].

Pro případ cylindrických tablet s hodnotou parametru $n \leq 0,45$ se uvolňování tablety řídí Fickovým difuzním zákonem. To znamená, že primárním mechanismem uvolňování léčiva je difúze [52, 53]. Pro n v rozsahu $0,45 < n < 0,89$ se jedná o anomální transport a uvolňování léčiva je řízeno složitějším mechanismem - kombinací více transportních mechanismů [52, 54]. Pro $n = 0,89$ se jedná o relaxační (Case II) transport, který se řídí kinetikou nultého řádu. Zde je charakteristická vysoká afinita disolučního média k matici [52, 54]. Poslední případ je tzv. Super case II transport pro $n > 0,89$. V tomto případě dochází velmi často k rozpadu celého jádra [52–54].

1.8 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Tuto techniku je také možno nazývat řádkovací nebo skenovací. Elektronové mikroskopy, jak je z názvu patrné, využívají k zobrazení proud elektronů. Elektron byl objeven v roce 1897 J. J. Thompsonem, ale klíčový objev nastal v roce 1925. Luis de Broglie přišel s tvrzením, že rychle letící částice (elektrony) mají korpuskulární, ale i vlnový charakter využívaný pro zobrazení ve světelném mikroskopu [57]. Pro fokusaci rychle letícího svazku elektronů byly vyvinuty dlouhé elektromagnetické cívky (solenoidy), které dokáží ovlivnit dráhu letícího elektronu magnetickým polem. [57].

Elektrony mají nepatrnou hmotnost a lze je urychlit pomocí urychlovacího napětí, díky kterému elektron získá kinetickou energii danou rovnicí (7) [57]:

$$eU = \frac{1}{2}mv^2 \quad (7)$$

kde e je náboj elektronu ($1,602 \cdot 10^{-19}$ C), U urychlovací napětí [V], m je hmotnost elektronu ($9,109 \cdot 10^{-31}$ kg) a v rychlost elektronu.

Do vztahu pro kinetickou energii elektronu (7) lze za rychlost dosadit podle rovnice de Broglieho, která popisuje vztah mezi vlnovou a korpuskulární povahou hmotných částic (8) [57]:

$$\lambda = \frac{h}{mv} \quad (8)$$

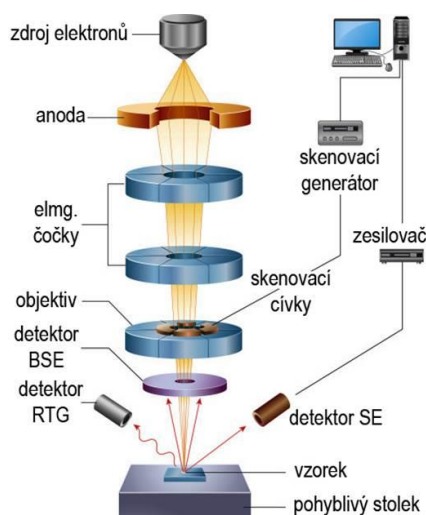
Po dosazení příslušných konstant a následné úpravě dostaneme vztah, který se využívá v praxi pro výpočet λ [57]:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2meU}} = \frac{1,226}{\sqrt{U}} [nm] \quad (9)$$

Pokud dosadíme do vztahu (9) hodnotu urychlovacího napětí 10 kV, dostaneme hodnotu $\lambda = 0,012$ nm. Běžně používané hodnoty urychlovacího napětí jsou 10 až 30 kV. Pro TEM (transmisní elektronovou mikroskopii) se hodnoty urychlovacího napětí pohybují okolo 100 kV, tudíž pro vlnovou délku dostaneme hodnotu $\lambda = 0,0037$ nm. Ve srovnání s vlnovou délkou viditelného světla (390 – 760 nm), lze očekávat, že elektronový svazek poskytne podrobnější informace o struktuře pozorovaných vzorků [57].

1.8.1 Princip SEM

Skenovací elektronová mikroskopie se v průběhu let stala výkonným a univerzálním nástrojem pro charakterizaci materiálu. Její využití roste také díky tomu, že dochází k neustálému vývoji a nutné analýze nových materiálů. V tomto typu mikroskopu jsou elektrony generovány zdrojem elektronů na vrcholu jeho kolony (tubusu) [58]. Ty jsou emitovány katodou, která je zahřívána a překročí-li jistou teplotní mez, dochází k uvolňování elektronů z jejího povrchu [57]. Emitované elektrony jsou poté urychlovány a přitahovány kladně nabitou anodou. Celý vnitřní prostor mikroskopu musí být vakuovaný. To platí i pro další složky uvnitř mikroskopu, aby se předešlo kontaminaci (především srážkám elektronů s molekulami vzduchu). Možná kontaminace má za následek vychýlení elektronového paprsku a snížení kvality obrazu. Vysoké vakuum navíc zvyšuje účinnost sběru elektronů detektory [58]. Všechny části mikroskopu zobrazuje následující schéma (obr. 8). Hlavní části mikroskopu (vakuový systém, elektronová tryska, elektromagnetické čočky a detektory) budou popsány v dalších kapitolách.



Obrázek 8: Schéma SEM, převzato z [59]

1.8.2 Vakuový systém

Vnitřní prostor, ve kterém se elektrony pohybují, je nutné udržovat vakuovaný, a to hned z několika důvodů [57, 60]:

1. Hrozí nebezpečí ionizace vzduchu, jelikož vzduch není dostatečně dobrým izolantem a může dojít k elektrickému výboji mezi katodou a anodou elektronové trysky z důvodu srážek elektronů s molekulami vzduchu.
2. Ve vzduchu jsou obsaženy molekuly O_2 , CO_2 , N_2 a také uhlovodíků, které mohou způsobit kontaminaci vzorku a celého tubusu.
3. Střední volná dráha elektronu při atmosférickém tlaku je pouze 1 cm. Při hodnotě tlaku 10^{-5} Pa se elektrony mohou pohybovat až několik metrů a také eliminují svůj rozptyl [60].
4. Prostor okolo elektronové trysky musí být zbaven molekul vzduchu, hlavně tedy kyslíku, který snižuje živostnost žhavicího vlákna [60].

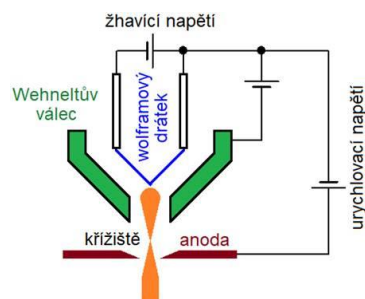
K dosažení pracovního vakua (minimálně 10^{-3} až 10^{-5} Pa) se používají výkonné vývěvy. Mezi nejvíce používané vývěvy patří rotační, iontové, difuzní a turbomolekulární. Pro odvzdušnění komůrky se vzorkem se používá rotační olejová vývěva, která je schopna snížit tlak přibližně na 10^{-1} Pa. Následně se zapíná difuzní vývěva snižující tlak na 10^{-3} Pa. Nejvyšší stupeň vakua vyžaduje elektronová tryska a to až 10^{-7} Pa. K dosažení tak vysokého vakua slouží iontové vývěvy. Nicméně, stále může docházet ke kontaminaci tubusu kvůli odparům z olejové vývěvy. Proto je v mikroskopu speciální antikontaminační komora. Ta je chlazená dusíkem v tubusu a snižuje tenzi uhlovodíkových par [57].

1.8.3 Elektronová tryska (dělo) – zdroj elektronů

Pro elektron platí, že je v atomu vázán jistou výstupní energií E_v . Na uvolnění elektronu je potřeba dodání energie, která musí být větší než E_v . V současné době se nejvíce používá termoemise a autoemise [57].

Princip termoemise spočívá v zahřívání katody, kdy se zvyšuje její vnitřní energie. Katoda má svoji tzv. mezní teplotu a pokud je tato teplota překročena, dochází k uvolnění elektronů z jejího povrchu. U autoemise je katoda vytvarována do tvaru hrotu a proti umístíme elektrodu s vysokým napětím. Silné elektrické pole vznikající okolo hrotu katody odtrhává elektrony z povrchu. Pro tento postup je ale vyžadováno vysoké vakuum [57].

Nejčastějším zdrojem elektronů je wolframový drátek. Po zahřátí na teplotu přibližně 2800 K začne emitovat elektrony. Mezi katodou (wolframový drátek) a anodou, která urychluje svazek elektronů je vložen Wehneltův válec formující svazek elektronů (obr. 9) [59]. Wehneltův válec vytváří v okolí vlákna katody elektrické pole způsobující zúžení svazku elektronů emitovaných z katody. Zúžení elektronů těsně před otvorem v anodě vytváří křížičště. Křížičště je nejužší místo svazku elektronů. Toto místo lze pak považovat za bodový zdroj urychlených elektronů [57].



Obrázek 9: Detailní schéma zdroje elektronů pro SEM, převzato z [59]

Kromě wolframového vlákna se v současné době používá lanthanhexaborid (LaB_6). Výhodou je, že elektrony jsou emitovány při nižší teplotě oproti wolframu. Nicméně, tento druh katody vyžaduje vyšší vakuum [59]. Aktuálně nejpokročilejší dostupný zdroj elektronů je Schottkyho zdroj. Schottkyho katoda je složena z monokrystalického wolframového drátu, který je vytvarován do tvaru hrotu. Konec drátu je tvořen svárem monokrystalického wolframového drátu přibližně stejného průměru. Tato monokrystalická smyčka je vložena do válcovitého keramického základu a je upevněna ke dvěma pólům. Asi v polovině monokrystalického drátu je nanesený rezervoár ze ZrO_x . Ten zajišťuje nižší výstupní práci elektronů [57].

1.8.4 Elektromagnetické čočky

Hlavní funkcí elektromagnetických čoček je ovlivnění trajektorie prolétávajících elektronů pomocí téměř homogenního magnetického pole [59]. Funkce elektromagnetické čočky je podobná jako u skleněné čočky v případě světla. Za nejjednodušší případ elektromagnetické čočky se považuje solenoid. Solenoid je tvořen velkým počtem závitů vyrobených z mědi a jejich průměr je menší než délka cívky [57].

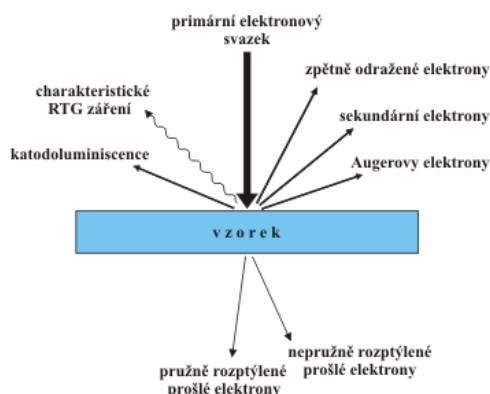
Průchodem vysokého proudu závity elektromagnetické čočky vzniká teplo, které zvyšuje teplotu čočky. Proto je nutné elektromagnetické čočky chladit. Magnetické pole uvnitř reálné elektromagnetické čočky není zcela homogenní. Z tohoto důvodu vznikají vady, které jsou podobné s vadami optických čoček. Vady výrazně ovlivňují obraz vytvořený čočkou, především jeho kontrast, hloubku ostroty a rozlišovací mez [57]. Další příčinou vad u elektromagnetických čoček může být různá rychlost elektronů ve svazku, vzájemná interakce elektronů ve svazku a také kolísání napětí a budícího elektrického proudu [59].

1.8.5 Interakce elektronů se vzorkem

U SEM dopadají urychlené elektrony na vzorek, což je rozdílné oproti TEM, kde elektrony vzorkem prochází. U obou případů dochází v atomech vzorku k pružnému a nepružnému rozptylu primárních elektronů. Detekovány jsou vzniklé sekundární elektrony (SE) a zpětně odražené elektrony (BSE), u TEM prošlé elektrony [57].

U pružného rozptylu nedochází k výrazné ztrátě energie u rozptýlených elektronů oproti energii primárních elektronů, které dopadají na vzorek. Vychýlení elektronu je vyšší, čím blíže elektron mívá jádro atomu preparátu a čím vyšší je elektrický náboj jádra. Pružným rozptylem vznikají zpětně odražené elektrony [57].

Při nepružném (neelastickém) rozptylu se sráží primární elektrony s elektrony atomů vzorku v orbitalech [57]. Dochází k vysoké ztrátě energie primárních elektronů (řádově 10 až 100 eV), ale vychýlení oproti pružnému rozptylu je menší. Díky nepružnému rozptylu a interakcím primárních elektronů, mohou vznikat i jiné druhy signálů než jen sekundární elektrony, jak je uvedeno na následujícím schématu (obr. 10).



Obrázek 10: Možné interakce elektronů se vzorkem, převzato z [59]

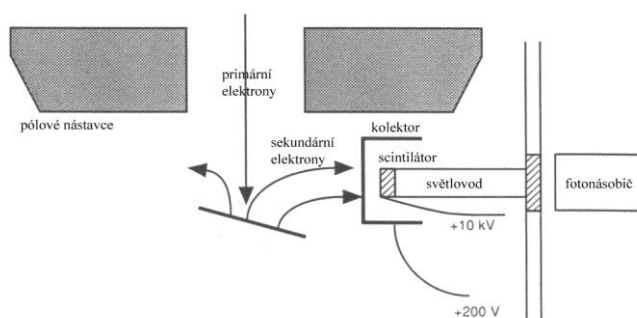
Při používání detektoru BSE se na obrazovce mikroskopu budou zobrazovat tmavší a světlejší oblasti. Je to hlavně proto, že produkce odražených elektronů závisí na středním protonovém čísle. Proto místa tvořená těžšími prvky budou světlejší, než místa tvořená lehčími prvky [57]. Principy detektorů budou diskutovány v kapitole 1.8.6.

1.8.6 Detektory

Podle předešlého schématu (obr. 10) je jasné, že každý druh signálu lze využít při studiu specifických vlastností nebo je možné využít kombinaci těchto signálů [57]. Detekční systém může obsahovat různou sadu detektorů vyplývající z interakcí elektronů a povrchu vzorku. Mezi nejpoužívanější elektrony se řadí SE (detektor sekundárních elektronů), BSE (detektor pro zpětně odražené elektrony), LVSTD (detektor sekundárních elektronů při nízkém vakuu) a CL (katodoluminiscenční detektor) [61].

SE detektor

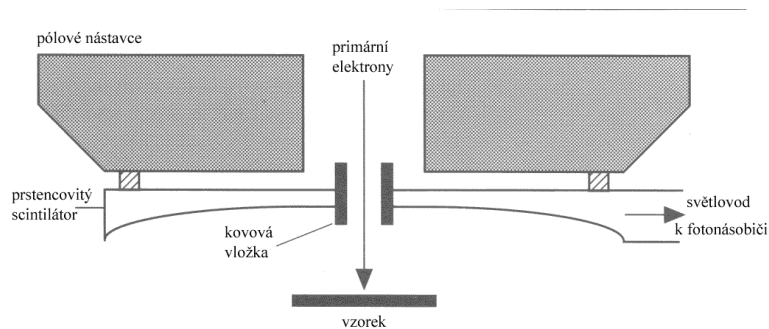
Tento typ detektoru pracuje především v režimu vysokého vakua. Jedná se o základní detektor, který je součástí každého mikroskopu [61]. Sekundární elektrony se vyznačují energií okolo 50 eV. Jejich hlavní přínos je u analýz povrchů, kde přinášejí důležité informace o jeho topografii. V současné době se nejvíce používá detekční systém podle Everharta a Thornleyho (obr. 11) [57]. Je tvořen scintilátorem (např. YAG krystaly) a fotonásobičem. Sekundární elektrony musí být nejprve odvedeny z povrchu pomocí elektrického pole mřížky kolektoru a musejí být urychleny napětím přivedeným na scintilátor, jelikož mají menší energii než odražené elektrony. Poté elektrony dopadají na scintilátor a vyvolají luminiscenci (záblesk světla z viditelné oblasti okolo 550-650 nm) [57, 62]. Následně je signál fotonů převeden na fotonásobič, který světelný signál převede na elektrický. Nevýhodou tohoto detektoru je postupně se snižující citlivost scintilátoru a ten se po čase musí vyměnit [62].



Obrázek 11: Detekční systém podle Everharta-Thornleyho, převzato z [62]

BSE detektor

Existuje několik typů detektorů pro odražené elektrony. Používá se již výše zmíněný detektor podle Everhart-Thornleye ovšem v upraveném uspořádání znázorněném v následujícím schématu (obr. 12) [62]. Zde je prstencový scintilátor připevněn na okraj pólových nástavců poslední elektromagnetické čočky, a to v takové geometrické poloze, aby záchyt odražených elektronů byl co největší [62]. Účinnost v nejvýhodnější poloze dosahuje více než 50 %. Jelikož odražené elektrony mají vysokou energii, dopadají na scintilátor (prstencový YAG monokrystal) bez jakéhokoliv dalšího urychlení a excitují atomy scintilátoru, které postupně emitují fotony. Následné zpracování signálu je totožné s SE detektorem [61]. Dalším typem může být polovodičový detektor nebo Schottkyho dioda [62].



Obrázek 12: Schéma detektoru pro BSE, převzato z [62]

Jiné druhy signálu

Na dříve zmíněném schématu (obr. 10) je vidět, že je možné použít i jiné detektory pro analýzu RTG záření, Augerových elektronů nebo katodoluminiscence.

Při analýze RTG záření vycházíme z teorie, že se elektrony nacházejí na tzv. elektronových hladinách (orbitalech). Každá hladina má své označení. Hladina nejbližší k jádru se označuje písmenem K. Další hladiny, které jsou více vzdáleny od jádra, se označují L, M, N. Vznik RTG záření nastává, když primární elektron vyrazí elektron z atomu vzorku na některé hladině blíže k jádru (např. K). Po vyraženém elektronu vzniká prázdné místo, do kterého se přesune elektron z vyšší energetické hladiny (např. L). Rozdíl energie těchto dvou hladin, ve kterých došlo k přeskoku elektronu, je vyzářen jako charakteristické RTG záření. Tyto energie jsou tabelovány a slouží k identifikaci prvkového složení vzorku a tím se rozšiřují možnosti využití těchto přístrojů [57]. Rozlišujeme dva typy analyzátorů RTG záření – energiově (EDS) a vlnově (WDS) disperzní [57].

Vznik Augerových elektronů je způsoben vyražením elektronu z vnitřní vrstvy atomu. Vzniká zde díra, která je okamžitě zaplněna elektronem z vnější vrstvy atomu. Energie tohoto procesu je buď vyzářené RTG záření, ale může se stát, že energie je předána elektronu z vnější slupky. Tento elektron má dostatečnou energii k opuštění slupky (Augerův elektron). Augerovy elektrony nacházejí využití při zkoumání povrchových jevů pevných látek [57].

U katodoluminiscence dochází k vytvoření vakance ve valenčním pásu. Důvodem je přechod elektronu z valenčního pásu do vodivostního pásu. Následnou rekombinací se vyzáří energie ve formě fotonů [57].

1.8.7 Příprava vzorků pro SEM

Díky svému analytickému potenciálu má v dnešní době SEM využití v mnoha oborech. Hlavní uplatnění nachází v biologii (botanika, zoologie) a v lékařství (histologie, patologie, anatomie). Využívá se ovšem také v průmyslových oborech (geologie, strojírenství, metalografie) [57]. U biologických preparátů se posuzuje, jestli se jedná o měkkou nebo tvrdou tkáň. U tvrdé tkáně (kosti, zuby, vlasy, aj.) je nutné zajistit vodivost povrchu. Měkké tkáně se musí fixovat, odvodnit, vysušit a pokovit [57].

Preparáty vhodné pro pozorování v SEM by měly být stabilní ve vakuu a povrch preparátu by neměl obsahovat cizorodé částice, např. prach [60]. Při ozáření elektronovým paprskem u nevodivých vzorků může docházet ke špatnému odvádění elektronů z povrchu a vznikají místa, které se vyznačují velkou hustotou plošného náboje. V literatuře se hovoří o tzv. nabíjení povrchu. Pro eliminaci nabíjení a zkvalitnění snímku je možné snížit urychlovací napětí a používat nízké vakuum [57]. Dalšími způsoby eliminace nabíjecích jevů je pokovování (nanesení vrstvičky kovu o tloušťce 10 – 20 nm) a napařování vzorku uhlíkem. Kovová vrstva odvádí negativní náboj, zvyšuje produkci sekundárních elektronů a také chrání preparát před teplem, které uvolňují brzdící primární elektrony [62]. Nejčastěji se používaným kovem je zlato, platina nebo slitina zlata a paládia [62]. Nejčastějším způsobem pokovení je tzv. katodové napařování. Principem je vznik doutnavého náboje v prostředí argonové atmosféry za velmi nízkého tlaku pomocí elektrického napětí mezi katodou a anodou. Výboj způsobí ionizaci plynu a vzniklé ionty putují ke katodě obkroužené prstencem z napařovaného kovu. Z prstence se díky urychleným iontům plynu vyrazí částice kovu, které směřují k anodě tvořené stolkem, na kterém se nacházejí vzorky. Postupně vznikne částicový mrak, který obaluje povrch preparátu vrstvou kovu [57, 62]. Výsledná tloušťka kovové vrstvy by neměla způsobit zakrytí povrchových detailů, ale měla by být dostatečná k odvedení náboje [57].

Napařování uhlíkem probíhá ve speciální napařovací aparatuře, kde jsou uhlíkové nebo grafitové tyče, z nichž jedna má zúžený konec. Konce tyčí se o sebe opírají a při průchodu elektrického proudu v místě zúžení dojde ke zvýšení odporu a v důsledku toho i zvýšení teploty na hodnotu, při které se z daného místa začne vypařovat uhlík [62].

Jak bylo zmíněno, měkké tkáně se v prvním kroku musí chemicky zafixovat za účelem stabilizace a zamezení autodegradace. Zároveň dojde ke zpevnění povrchových struktur. Nejvíce používanými fixačními činidly jsou glutaraldehyd, formaldehyd a oxid osmičelý [62].

Cílem odvodnění je nahrazení vody v preparátu příslušným organickým rozpouštědlem. Nejčastěji se používají rozpouštědla dobře mísitelná s vodou jako je aceton či ethanol. Při celém procesu je vzorek vystaven řadě roztoků se zvyšující se koncentrací rozpouštědla (30 až 100 %) [57].

Po úplném nahrazení vody je vzorek třeba zbavit dehydratačního činidla. Kvůli existenci povrchového napětí nelze vzorek sušit přirozeně na vzduchu, jelikož dochází k tvarovým deformacím. Řešením je metoda kritického bodu, která umožňuje vyhnout se působení povrchového napětí dehydratační kapaliny na preparát [62].

Metoda kritického bodu je založena na skutečnosti, že při zahřívání kapaliny v omezeném prostoru se docílí stavu, který se označuje jako kritický a je charakterizován kritickou teplotou a tlakem. V tomto stavu mizí veškeré rozdíly mezi oběma fázemi a zmíněné povrchové napětí klesá na nulu. V tomto bodě je tedy výhodné převést kapalinu na plyn, který se vypustí z uzavřené komory, a tímto způsobem vysušit připravovaný vzorek bez poškození. Docílit kritické teploty a tlaku v laboratorních podmínkách je možné pouze u některých kapalin. Nejvíce se k těmto účelům využívá kapalný oxid uhličitý a speciální aparatury do kterých se kapalný oxid uhličitý napouští. S postupně rostoucí teplotou roste i tlak v komoře. Po dosažení kritického bodu otevřeme vypouštěcí ventil a pomalu vypustíme plynný oxid uhličitý. Po dosažení atmosférického tlaku se komora otevře a vyjmeme vysušené preparáty [57, 62].

K zabránění opětovnému zvlhnutí se vysušené vzorky lepí na vhodné nosiče a pokovují. Nejčastěji se používají hliníkové kruhové podložky lišící se podle typu mikroskopu, které se vkládají do karuselového držáku pro podložky. Použité lepidlo (uhlíkové adhezivní disky) nesmí obsahovat vodu a nemělo by být vzlínavé, aby nezakrývalo povrchové detaily vzorku. Mělo by být stabilní ve vakuu a neměnit zde své vlastnosti, mělo by být elektricky vodivé a nemělo by emitovat stejně jako nosič zpětně odražené elektrony [57, 62]. Na obrázku č. 13 jsou zobrazeny uhlíkové disky nalepené na hliníkových podložkách.



Obrázek 13: Uhlíkové lepicí disky a hliníkové podložky pro vzorky SEM, převzato z [64]

Dalším způsobem úpravy vzorků jsou tzv. mrazové metody. Vyznačují se rychlostí přípravy při zachování povrchové struktury. Mrazové lámání, leptání a sušení jsou nejvýznamnější metody. Mrazové lámání dobře odhalí vnitřní povrchy buněčných organel. Lámání se nejčastěji provádí pomocí pinzet pod hladinou kapalného dusíku nebo na chlazeném kovovém bloku. Výhodou této metody je, že při ní nedochází k poškození povrchu tlakem žiletky nebo jiným řezným nástrojem. Mrazové leptání zkoumá povrch odhalený po odkrojení zmrzlého preparátu. Spočívá v částečné sublimaci ledu z takto obnaženého povrchu za sníženého tlaku, při které se zvýrazní povrchové struktury. Mrazové sušení spočívá v tom, že zmrzlý preparát je přemístěn do vakua, nechá se z něj vysublimovat led a poté je pokovem. Mrazové sušení se provádí ve specializovaných aparaturách, kde je možné řídit rychlost sublimace [57, 62].

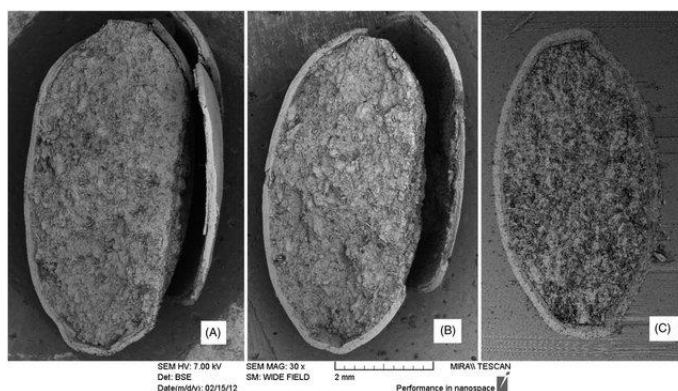
1.8.8 Příprava matricových tablet pro SEM

Správná produkce generických pevných lékových forem vyžaduje vysokou kvalitu analytických dat a přístrojů. Dnešní analytické techniky umožňují získat mnoho informací o sledovaném produktu. Jednou z důležitých analytických metod pro hodnocení kvality lékových forem je skenovací elektronová mikroskopie (SEM). Využívá se pro pozorování a hodnocení jednotlivých vrstev, jádra a povrchu pevných lékových forem. Další metodou pro charakterizaci jednotlivých složek je FTIR [63].

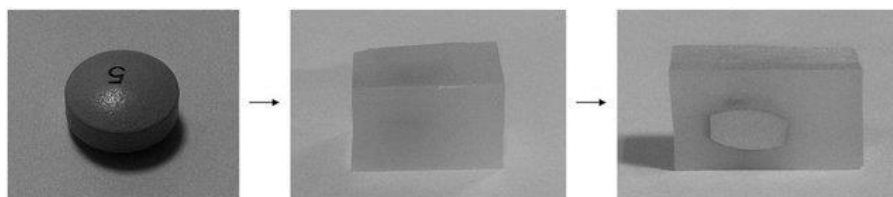
K přípravě vzorků běžným způsobem se používá skalpel, ostrý nůž nebo rozdělovač tablet. Nicméně, vzorky připravené těmito nástroji nejsou vždy optimální a kvalitní. Často dochází k rozmazání vrstev, popraskání tablet a vytvoření nerovného povrchu, což je vážný

problém pro další analýzu pomocí SEM a FTIR. Na obrázku č. 14 jsou vidět jednotlivé řezy s použitím různých nástrojů (A – skalpel, B – dělič tablet, C – mikrotom). Dobře připravené vzorky vyhodnocené SEM a FTIR poté umožňují stanovení obsahu a distribuce excipientů a aktivní léčivé látky [63].

Nejnovější metoda přípravy vzorků využívá mikrotom. Mikrotom má čepele vyrobené z oceli, skla, oceli obsahující diamanty nebo diamantu samotného. Pro řezy pomocí mikrotomu se nejlépe osvědčil parafínový vosk, do kterého byla zkoumaná tableta vložena, jak naznačuje obrázek č. 15. Tento nový způsob zabudování pevné lékové formy eliminuje praskání a rozmazávání vrstev a řez je lépe vyhlazený [63].



Obrázek 14: Řezy tablety pomocí skalpelu (A), děliče table (B), mikrotomu (C), převzato z [63]



Obrázek 15: Řez tablety vložené do parafínového vosku, převzato z [63]

2. Experimentální část

2.1 Disoluční testy

2.1.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- Předvažovací váhy PT 210 (*Sartorius, Göttingen, Německo*)
- Analytické váhy Kern ALT 310-4AM (*Kern&Sohn, Balingen, Německo*)
- Disoluční aparatura SOTAX AT 7 Smart (*SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o., Allschwil, Švýcarsko*)
- UV/VIS spektrometr Agilent 8453 (*Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Německo*)
- Manuální lis (*Trystom spol. s.r.o, Olomouc, ČR*)
- Forma pro lisování (*PIKE technologies, Madison, USA*)
- Sušárna Memmert Model 600 (*Memmert. Schwabach, Německo*)
- Lékovky
- Kyvety $d = 0,5$ cm (Fisher, Mnichov, Německo)
- Běžné laboratorní sklo

2.1.2 Chemikálie

- HCl, 35 % p.a. (*Penta, Praha, ČR*)
- NaOH (*Penta, Praha, ČR; p. a. čistota*)
- Ethanol 96 % p. a. (*Lach-Ner s.r.o, Neratovice, ČR*)
- Destilovaná a redestilovaná voda
- NaCl p. a. (Lach – Ner s.r.o., Neratovice, ČR)
- Tramadol hydrochlorid ≥ 99 % (HPLC) (*Sigma Aldrich*)
- Prosolv[®] SMCC90 (*JRS Pharma, Rosenberg, Německo*)
- Kollidon[®] SR (*SIGMA-ALDRICH Co., Německo*)
- Alginát sodný (*SIGMA-ALDRICH Co., Velká Británie*)
- Stearát hořečnatý (*Acro Organics, USA*)
- LubriTose[™] MCC

Příprava zásobního roztoku HCl:

Do 100 ml odměrné baňky bylo převedeno 36 ml 35 % HCl a následně doplněno destilovanou vodou po rysku.

Disoluční médium – pH 1,2:

Do 2 l odměrné baňky byly převedeny 4 g NaCl a následně bylo přidáno 14 ml zásobního roztoku HCl. Roztok byl doplněn redestilovanou vodou na objem 2 l a pH zkontrolováno pH metrem.

2.1.3 Použité programy

- Graph Pad Prism
- MS Word
- OriginPro

2.1.4 Příprava matricových tablet

Celkem 7 hydrofilních matricových tablet s účinnou látkou tramadol hydrochlorid bylo připraveno metodou přímého lisování. Přesné procentuální složení jednotlivých formulací je uvedeno v následující tabulce (tab. 3).

Tabulka 3: Procentuální složení jednotlivých formulací

Formulace	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Tramadol hydrochlorid	20	20	20	20	20	20	20
Kollidon® SR	-	-	-	-	10	20	10
Alginát sodný	20	30	40	50	20	10	30
LubriTose™ MCC	1	1	1	1	1	1	1
Prosolv® SMCC 90	59	49	39	29	49	49	39

Všechny komponenty byly naváženy na analytických vahách a poté převedeny do mísící patry. Ve vibračním mlýnku byla provedena homogenizace s postupně se zvyšující intenzitou kmitů za sekundu (10, 13, 15) s celkovou délkou trvání 1 minuty. Směs byla převedena do lisovací formy a bylo zahájeno přímé lisování pomocí ručního lisu. Po lisovacím procesu, který trval 5 minut při konstantním tlaku 8 kN, vznikly tablety válcovitého tvaru (obr. 16). Celková hmotnost pro jednotlivé tablety byla 500 ± 5 mg. Pro každý disoluční test byly připraveny 6 tablet stejného složení s účinnou látkou TH a 1 tableta bez účinné látky (slepá tableta, „blank“).



Obrázek 16: Tableta F2 před počátkem disoluce

2.1.5 Disoluční zkouška

V této práci byla pro disoluční zkoušku zvolena pádelková metoda. Disoluční test byl prováděn dle Českého lékopisu [50]. Skleněné, válcovité nádoby (tzv. žaludky) byly naplněny 900 ml disolučního média o pH 1,2. Teplota během disoluce byla udržována na $37 \pm 0,5$ ° C. Po vytemperování disolučního média byly do jednotlivých nádob vloženy tablety a byla zahájena disoluce. Rychlost míchání byla nastavena na 100 rpm (otáčky za minutu).

V průběhu testu byly odebrány 3 ml vzorku v následujících časových intervalech:

Tabulka 4: Časové intervaly odběrů vzorků pro formulaci F2

Formulace 2	
Počet odebraných vzorků	Časový interval odběrů [min]
8	15
4	30
8	60
6	120

Tabulka 5: Časové intervaly odběrů vzorků pro formulace F1, F3, F4, F7

Formulace 1, 3, 4, 7	
Počet odebraných vzorků	Časový interval odběrů [min]
3	10
14	15
12	60

Tabulka 6: Časové intervaly odběrů vzorků pro formulace F5, F6

Formulace 5, 6	
Počet odebraných vzorků	Časový interval odběrů [min]
3	10
14	15
12	60



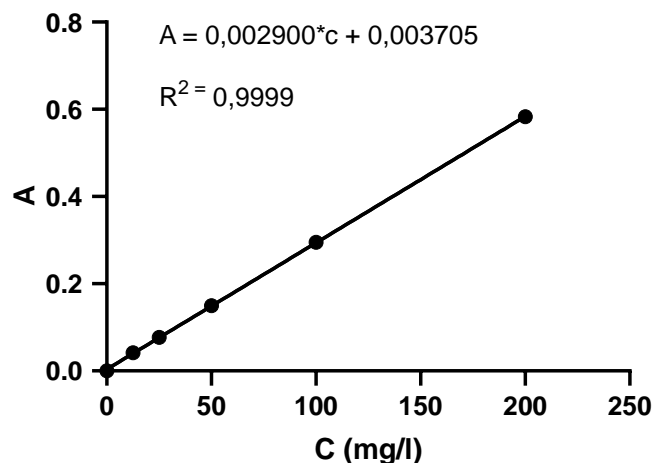
Obrázek 17: Disoluční aparatura Sotax AT 7 Smart

2.1.6 UV/VIS spektroskopie

U všech odebraných vzorků byla stanovena koncentrace uvolněného TH pomocí UV/VIS spektroskopie. Byly odečítány hodnoty absorbance při vlnové délce 271 nm. Při této vlnové délce nedochází k interferenci použitých excipientů. Odečet absorbance byl prováděn metodou fixní vlnové délky s tříbodovou korekcí pozadí (240 a 300 nm).

2.1.7 Kalibrační závislost

Do 100 ml baňky bylo naváženo 20 mg účinné látky TH. Objem byl doplněn po rysku disolučním roztokem o pH 1,2. Z takto připraveného zásobního roztoku byl odebrán vzorek a pomocí dvojkového ředění byla sestavena kalibrační řada roztoků o koncentracích (20 mg/l – 1,25 mg/l). Vzorky byly změřeny na UV/VIS spektrometru proti samotnému disolučnímu médiu o pH 1,2 při vlnové délce 271 nm. Bylo potvrzeno, že pro rozmezí koncentrací tramadol hydrochloridu v němž probíhala analýza, platí Lambert-Beerův zákon. Naměřené hodnoty absorbancí odpovídající jednotlivým vzorkům kalibrační řady byly zpracovány pomocí lineární regrese. Získaná kalibrační přímka je uvedena na obrázku 18.



Obrázek 18: Závislost absorbance (A) na koncentraci TH

2.2 Skenovací elektronová mikroskopie – SEM

2.2.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- Skenovací elektronový mikroskop VEGA 3 SBU (*TESCAN, a.s., Brno, Česká Republika*)
- EDAX – energiově disperzní systém Quantax (*Bruker Nano XFlash® Detector 410-M, software Esprit, Bruker Nano GmbH, Berlin, Germany*)
- Uhlíkové terčíky (*Pelco Tabs™, 12 mm, Ted Pella, Inc., CA, USA*).
- Hliníkové podložky
- Dusík 4.0 (*Linde Gas a.s., Praha*)
- Nůž

2.2.2 Příprava vzorků tablet pro SEM

K pozorování byly použity formulace F1 – F4, jejichž složení bylo totožné s tím, které se nachází v tabulce č. 3. V prvním kroku bylo nutné tabletu rozdělit na dvě části. V rámci této diplomové práce byl použit ostrý ocelový nůž. Jedna část tablety byla použita na zkoumání vnějšího povrchu a druhá část na zkoumání v místě řezu. V místě řezu bylo potřeba povrch co nejlépe vyhladit, aby byly snímky co nejkvalitnější. Následně byl na hliníkovou podložku nalepen oboustranně lepící uhlíkový disk, na který byly nalepeny obě části tablety a poté byl vzorek vložen do komory mikroskopu.



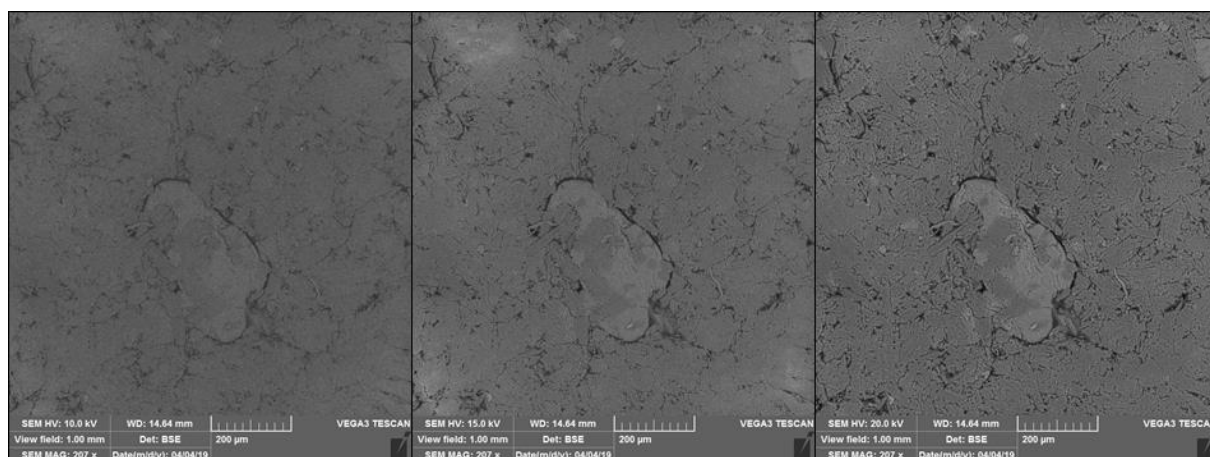
Obrázek 19: Vzorek tablety před vložením do komory



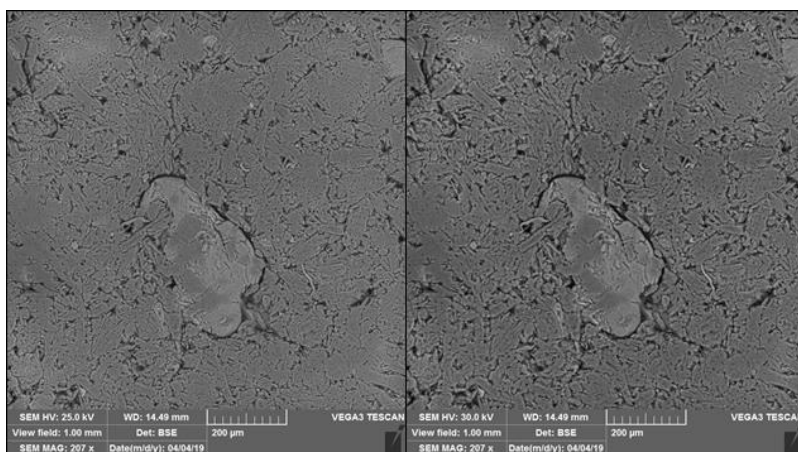
Obrázek 20: Mikroskop VEGA 3 SBU

2.2.3 Optimalizace nastavení SEM

Před samotným pozorováním vzorků bylo nutné vyzkoušet a následně vybrat vhodné parametry. K testování byla použita tableta tzv. blank, která neobsahovala účinnou látku TH. Hlavní parametry, které byly během testu měněny, byl tlak v komoře, urychlovací napětí a intenzita elektronového svazku (BI). Ostření a úprava jasu a kontrastu bylo řešeno automatikou přístroje.

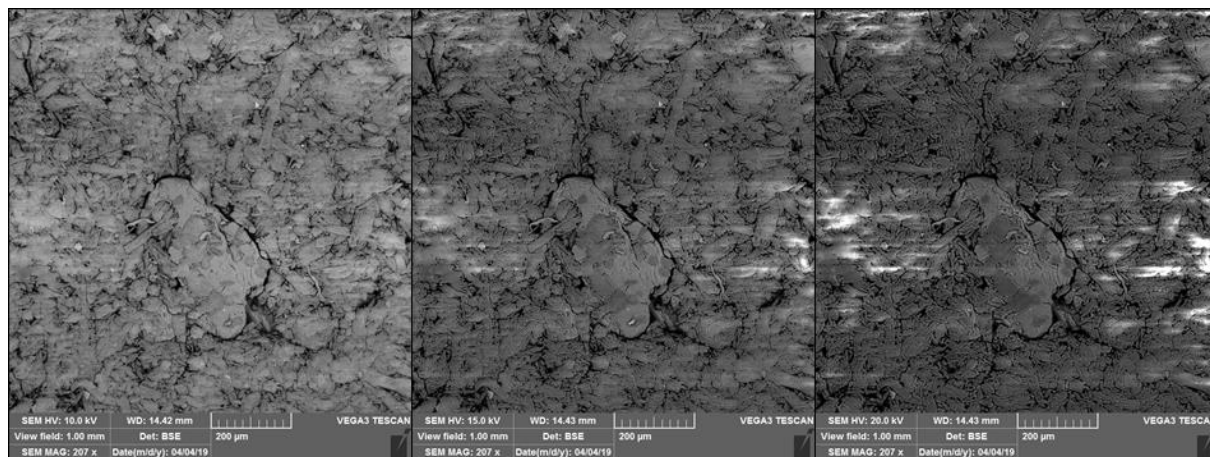


Obrázek 21: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa ($BI = 10$, $U = 10, 15, 20$ kV).

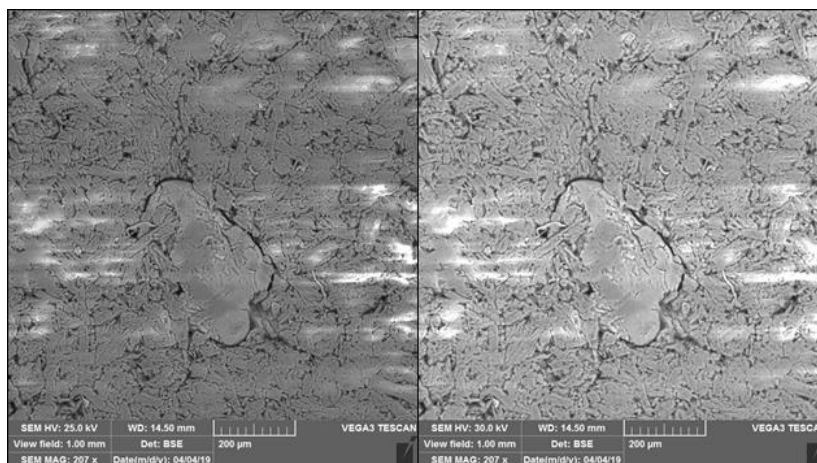


Obrázek 22: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa ($BI = 10$, $U = 25, 30$ kV).

Na obrázcích 21 a 22 je možné pozorovat vliv urychlovacího napětí na kvalitu snímku. Je patrné, že zvyšující se napětí více urychluje elektronový svazek a tím elektrony získávají větší rychlost a tím roste i počet zpětně odražených elektronů. Nejlepší kvalitu obrazu při zvolené intenzitě elektronového svazku vykazuje snímek s hodnotou urychlovacího napětí 30 kV. Při zvolené intenzitě elektronového svazku je tlak 10 Pa dostačující k tomu, aby nedocházelo k nabíjení vzorku, a tudíž ke snižování kvality snímků.

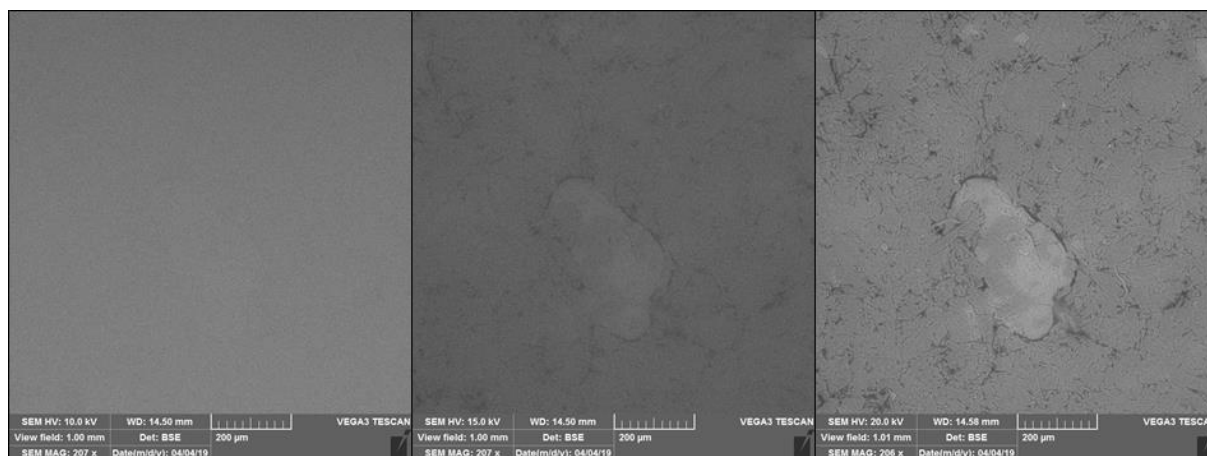


Obrázek 23: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa ($BI = 17$, $U = 10, 15, 20$ kV).

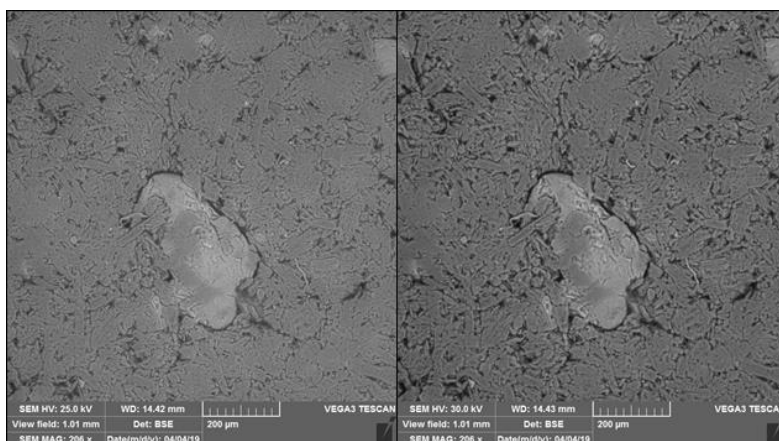


Obrázek 24: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa ($BI = 17$, $U = 25, 30$ kV).

Na obrázcích 23 a 24 je možné vidět postupně se zvyšující intenzitu nabíjení povrchu vzorku (velká intenzita plošného náboje), projevující se světlými až bílými plochami na snímku. Problémy při odvádění náboje z povrchu vzorku spojené s rostoucí intenzitou elektronového svazku mají za následek horší kvalitu pořízených snímků. Kvalitu snímků také ovlivňuje zvyšující se urychlovací napětí, které zvýrazňuje světlé plochy na snímcích.



Obrázek 25: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 50 Pa ($BI = 17$, $U = 10, 15, 20$ kV).



Obrázek 26: Zobrazení povrchu tablety při tlaku 10 Pa ($BI = 17$, $U = 25, 30$ kV).

Na obrázcích 25 a 26 je možné pozorovat značný vliv hodnoty tlaku v komoře na kvalitu zobrazení. Při zvýšení tlaku na 50 Pa dochází k lepšímu odvádění plošného náboje z povrchu, nicméně je potřeba zvýšit intenzitu elektronového svazku a také velikost urychlovacího napětí. První snímek z obrázku 25 ukazuje, že při vyšším tlaku je nutné zvýšit napětí i intenzitu elektronového svazku, protože slabé urychlovací nedodá primárním elektronům dostatečnou energii, a tudíž nedochází k dostatečné produkci zpětně odražených elektronů na detektor. Z toho důvodu nedojde k zobrazení povrchu pozorovaného vzorku. Dále je patrné, že při zvětšujícím se urychlovacím napětí dochází ke zlepšení kvality snímků, jelikož vyšší urychlovací napětí dodá primárním elektronům větší energii, a tudíž dochází po interakci se vzorkem k větší produkci zpětně odražených elektronů a detekční systém je schopen zobrazit požadovaný povrch. Při tlaku 50 Pa a $BI = 10$ byly snímky nekvalitní, a proto zde nejsou uvedeny.

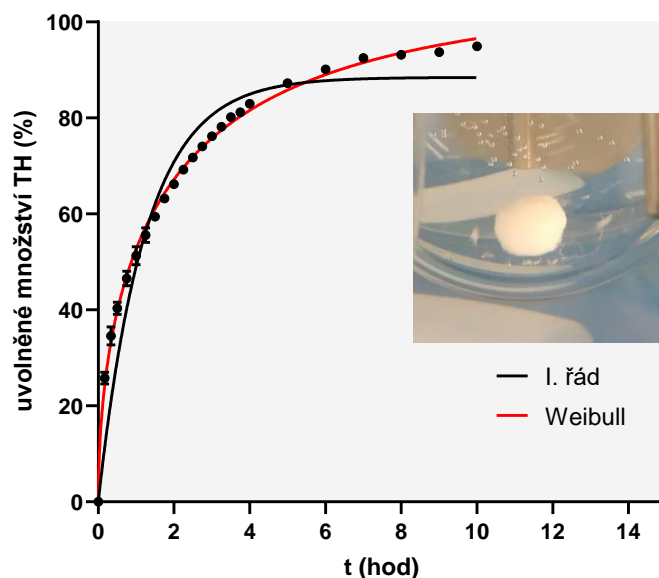
Na základě výše zmíněných poznatků byl mikroskop nastaven na tyto parametry: tlak v komoře 10 Pa, urychlovací napětí 20 kV a intenzita elektronového svazku $BI = 15$.

3. Výsledky a diskuze

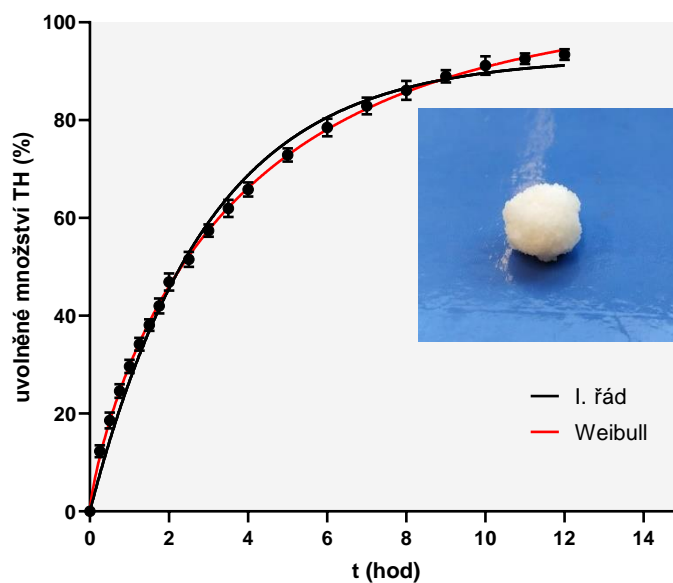
3.1 Disoluční testy

3.1.1 Nelineární regresní analýza disolučních profilů

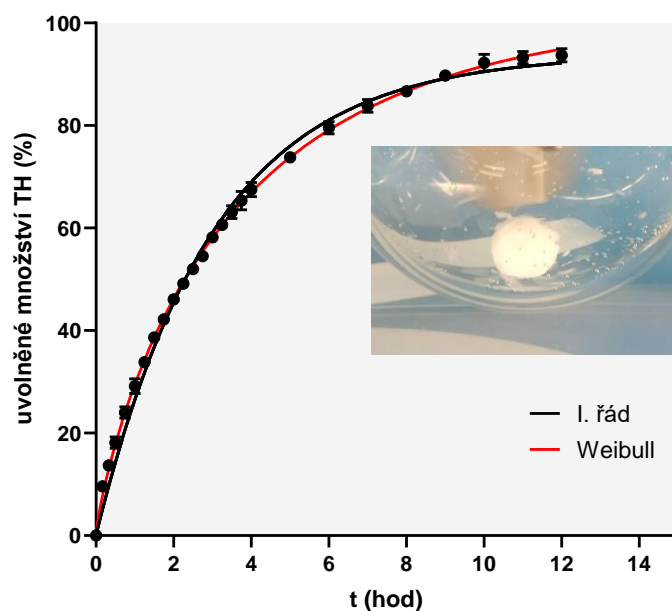
Všechny naměřené disoluční profily (F1 – F7) byly vyhodnoceny pomocí nelineární regresní analýzy. Nelineární analýza je důležitým krokem pro matematický popis disolučních profilů, ale také pomáhá k určení mechanismu uvolňování účinné látky z jednotlivých typů matric. Pro statistické zpracování byly použity následující modely: kinetický model I. řádu, Weibullův statistický model a model Korsmeyer-Peppas, který se aplikuje na 60 % uvolněného množství účinné látky.



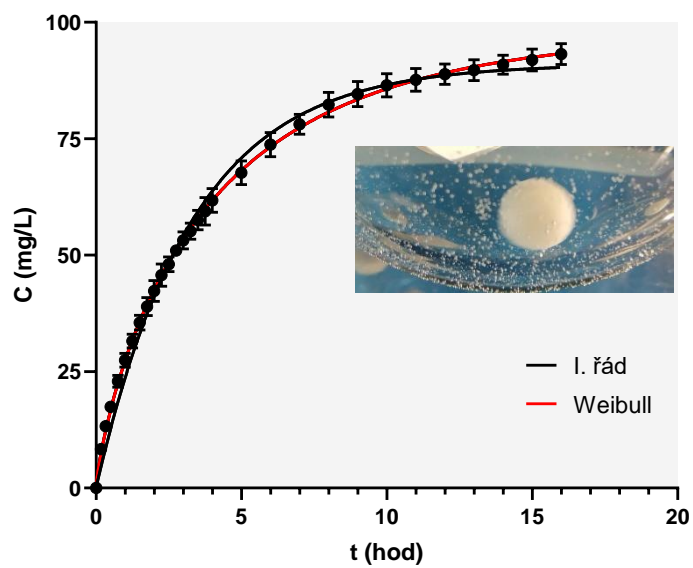
Graf 1: Disoluční profil formulace F1 a vzhled tablety po 60 minutách, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull



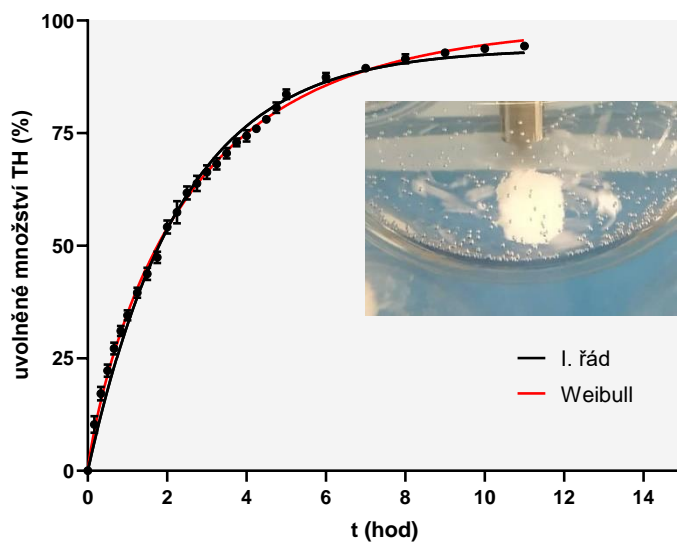
Graf 2: Disoluční profil formulace F2 a vzhled tablety po skončení disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull



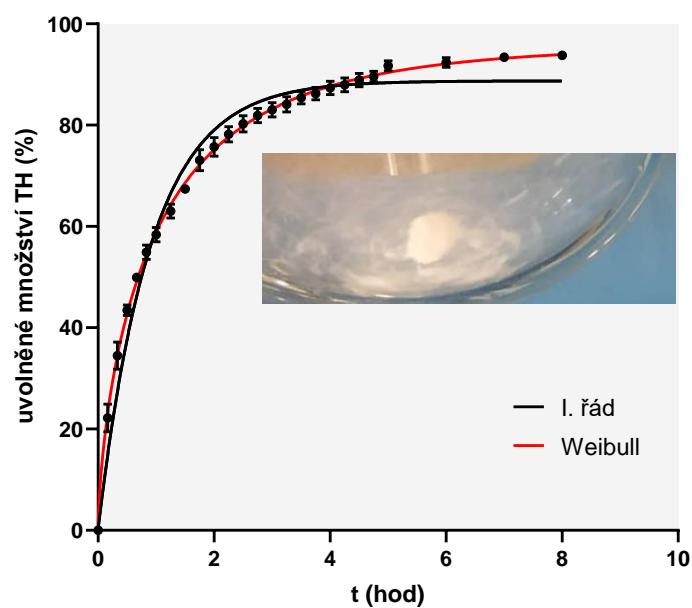
Graf 3: Disoluční profil formulace F3 a vzhled tablety po 45 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull



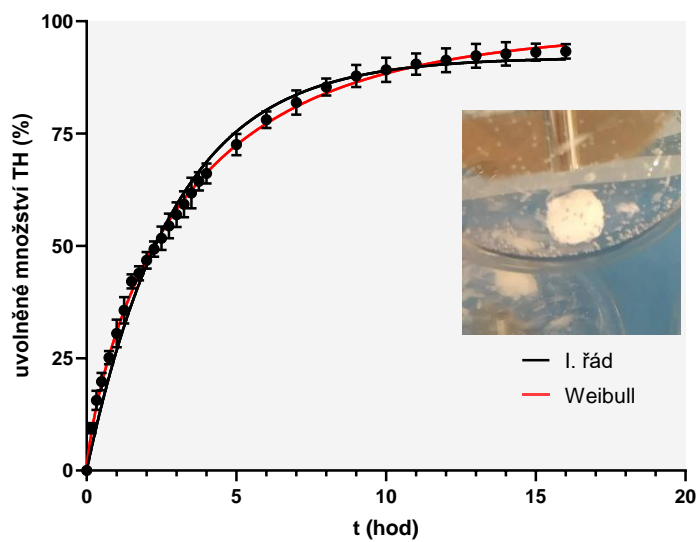
Graf 4: Disoluční profil formulace F4 a stav tablety po 45 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull



Graf 5: Disoluční profil formulace F5 a vzhled tablety po 30 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull



Graf 6: Disoluční profil formulace F6 a vzhled tablety po 15 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull



Graf 7: Disoluční profil formulace F7 a vzhled tablety po 30 minutách od počátku disoluce, proloženo kinetickým modelem I. řádu a modelem Weibull

3.1.2 Tabelární přehled výsledků nelineární regresní analýzy

Všechny získané disoluční profily byly zpracovány pomocí nelineární regresní analýzy. Souhrnný přehled výsledků nelineární regresní analýzy je uveden v Tab. 7 – 9.

Tabulka 7: Regresní analýza disolučních profilů po proložení modelem I. řádu

Formulace	I. řád	$C_{t(t)} = C_0 \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$		
	$k \pm SD$ (hod ⁻¹)	$C_0 \pm SD$ (%)	RSS	R ²
F1	0,806 ± 0,112	88,46 ± 3,45	1735	0,9358
F2	0,336 ± 0,017	92,91 ± 1,70	412	0,9916
F3	0,331 ± 0,015	93,95 ± 1,73	239	0,9939
F4	0,303 ± 0,012	90,74 ± 1,36	697	0,9898
F5	0,419 ± 0,015	94,28 ± 1,34	381	0,9933
F6	1,098 ± 0,106	88,63 ± 2,09	668	0,9748
F7	0,343 ± 0,016	91,95 ± 1,48	974	0,9859

Tabulka 8: Regresní analýza disolučních profilů po proložení modelem Weibull

Formulace	Weibull	$C_{t(t)} = C_0 \cdot (1 - e^{(-k \cdot t)^b})$		
	$k \pm SD$ (hod ⁻¹)	$C_0 \pm SD$ (%)	$b \pm SD$	R ²
F1	0,689 ± 0,036	105,7 ± 3,20	0,549 ± 0,275	0,9972
F2	0,341 ± 0,011	102,3 ± 2,11	0,796 ± 0,030	0,9979
F3	0,339 ± 0,008	102,3 ± 2,21	0,823 ± 0,023	0,9989
F4	0,329 ± 0,009	97,81 ± 1,93	0,799 ± 0,293	0,9965
F5	0,433 ± 0,012	98,93 ± 1,66	0,856 ± 0,029	0,9970
F6	0,951 ± 0,036	95,82 ± 1,52	0,691 ± 0,029	0,9974
F7	0,377 ± 0,012	98,13 ± 2,01	0,787 ± 0,035	0,9944

Tabulka 9: Regresní analýza disolučních profilů po proložení modelem Korsmeyer-Peppas

Formulace	Korsmeyer – Peppas model		$A = at^n$
	$a \pm SD$	$n \pm SD$	
F1	$51,37 \pm 0,73$	$0,367 \pm 0,023$	0,9967
F2	$29,74 \pm 0,66$	$0,599 \pm 0,025$	0,9940
F3	$29,22 \pm 0,44$	$0,629 \pm 0,016$	0,9980
F4	$27,46 \pm 0,64$	$0,599 \pm 0,022$	0,9926
F5	$34,13 \pm 0,59$	$0,641 \pm 0,024$	0,9951
F6	$60,01 \pm 2,46$	$0,513 \pm 0,060$	0,9918
F7	$30,82 \pm 0,91$	$0,572 \pm 0,032$	0,9855

Z disolučního profilu formulace F1 (graf 1), která obsahovala 20 % alginátu sodného, a regresní analýzy disolučního profilu (tab. 7, 8) je patrné, že naměřená data nesplňují kinetický model I. řádu, ale pro model Weibull byla dosažena vysoká hodnota koeficientu determinace (tab. 8). Rychlostní konstanta I. řádu má hodnotu $k = 0,806 \pm 0,112 \text{ hod}^{-1}$ (tab. 7). Hodnota parametru $n = 0,367 \pm 0,023$ (tab. 9) Korsmeyer-Peppasova modelu potvrzuje, že mechanismem uvolňování TH z matrice je primárně difuze.

Počátek disolučního profilu formulace F2 (30 % alginátu sodného) splňuje kinetiku I. řádu, ovšem zhruba po uvolnění 50 % účinné látky odpovídá profil více statistickému modelu Weibull. Z disolučního profilu je zřejmé, že celkový profil vystihuje lépe model Weibull, což dokládá i vyšší koeficient determinace ($R^2 = 0,9979$) než u modelu I. řádu ($R^2 = 0,9916$). Rychlostní konstanta této formulace je $k = 0,336 \pm 0,0167 \text{ hod}^{-1}$. To svědčí o výrazném zpomalení uvolňování účinné látky oproti formulaci F1. Hodnota parametru $n = 0,599 \pm 0,025$. Korsmeyer-Peppasova modelu ukazuje, že mechanismus uvolňování TH z matrice je kombinací difuze a eroze (superpozice transportních dějů).

Disoluční profil formulace F3 (40 % alginátu sodného) je velmi podobný disolučnímu profilu F2 (30 % alginátu sodného), o čemž svědčí nalezené hodnoty rychlostních konstant (tab. 7). Disoluční profil nejlépe vystihuje model Weibull s koeficientem determinace $R^2 = 0,9989$. Hodnota parametru $n = 0,629 \pm 0,017$ značí, že mechanismem uvolňování TH z matrice je kombinace difuze a eroze.

Formulace F4, která obsahovala 50 % alginátu sodného, vykazuje nejnižší hodnotu rychlostní konstanty $k = 0,303 \pm 0,012 \text{ hod}^{-1}$ I. řádu. Zvyšující se obsah alginátu sodného má za následek zpomalení uvolňování účinné látky z hydrofilních matricových tablet. U této formulace nejlépe popisuje daný disoluční profil model Weibull s koeficientem determinace $R^2 = 0,9965$. Na základě hodnoty parametru $n = 0,599 \pm 0,023$ je mechanismem uvolňování TH z matrice kombinace eroze a difuze.

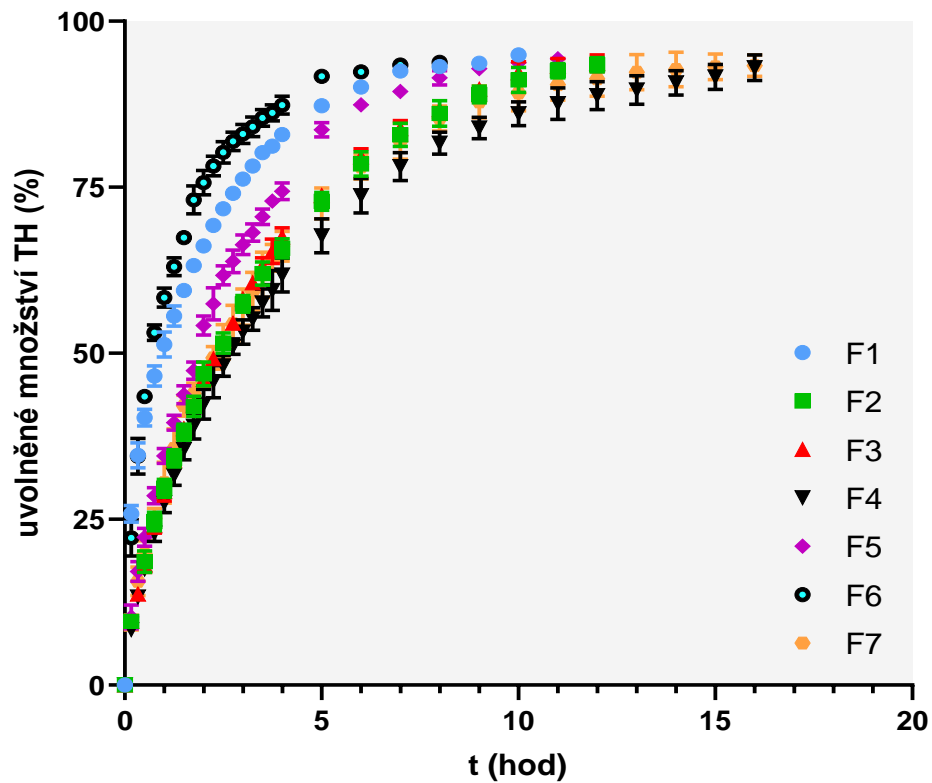
Formulace F5 obsahovala 20 % alginátu sodného a 10 % Kollidon[®] SR. Kollidon[®] SR byl do formulace přidáván za účelem zpomalení uvolňování účinné látky z tablety. Nicméně, hodnota rychlostní konstanty $k = 0,419 \pm 0,015 \text{ hod}^{-1}$ (tab. 7) je vyšší než u formulace F2. Disoluční profil splňuje kinetiku I. řádu přibližně do hodnoty 75 % uvolněného množství, což potvrzuje vysoká hodnota koeficientu determinace ($R^2 = 0,9933$). Poté nastává jemný zlom a celá křivka má mírně esovitý charakter. Celkový disoluční profil ovšem lépe popisuje model Weibull ($R^2 = 0,9970$). Dle hodnoty parametru $n = 0,641 \pm 0,025$ je mechanismem uvolňování TH z matrice kombinace difuze a eroze.

Formulace F6 obsahovala 10 % alginátu sodného a 20 % kollidonu[®] SR. Celkový disoluční profil nejlépe popisuje model Weibull, což potvrzuje i vysoká hodnota koeficientu determinace ($R^2 = 0,9974$) oproti koeficientu determinace pro model I. řádu ($R^2 = 0,9748$). Z disolučního profilu, ale také z hodnoty rychlostní konstanty $k = 1,098 \pm 0,106 \text{ hod}^{-1}$ je zřejmé, že z této formulace došlo k nejrychlejšímu uvolnění účinné látky. U této formulace docházelo velmi brzy po kontaktu s disolučním médiem ke změně povrchu a rychlému rozpadu tablet, zatímco tableta bez účinné látky vykazovala značnou stabilitu a pomalý rozpad. Rozdíly v mechanické stabilitě i disolučním chování „blank“ tablety a tablety s účinnou látkou jsou ovlivněny vysokou rozpustností účinné látky. Kollidon[®] SR je vhodná retardující komponenta zejména pro účinné látky špatně rozpustné vodě. Mechanismus uvolňování účinné látky z formulace F6 je dle parametru $n = 0,513 \pm 0,061$ kombinací difuze a eroze.

Poslední formulace F7 obsahovala 30 % alginátu sodného a 10 % Kollidonu[®] SR. Z disolučního profilu je patrné, že danou závislost vystihuje lépe model Weibull ($R^2 = 0,9944$). Hodnota rychlostní konstanty je $k = 0,343 \pm 0,016 \text{ hod}^{-1}$ (tab. 4). Mechanismem uvolňování účinné látky je dle parametru $n = 0,573 \pm 0,033$ kombinace difuze a eroze.

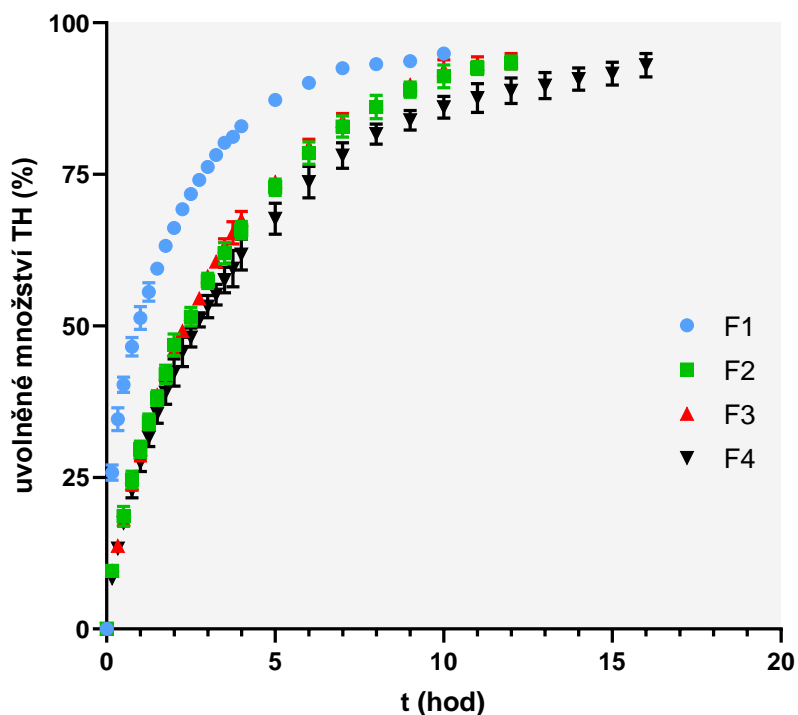
3.1.3 Disoluční profily formulací F1 – F7

Všechny hydrofilní matricové tablety (F1 – F7) byly testovány na základě disoluční zkoušky v disolučním médiu o pH 1,2. Disoluční profily tablet byly sestrojeny na základě statistického zpracování šesti stejných vzorků. Jednotlivé množství účinné látky bylo stanoveno pomocí UV/VIS spektroskopie.



Graf 8: Disoluční profily formulací F1-F7

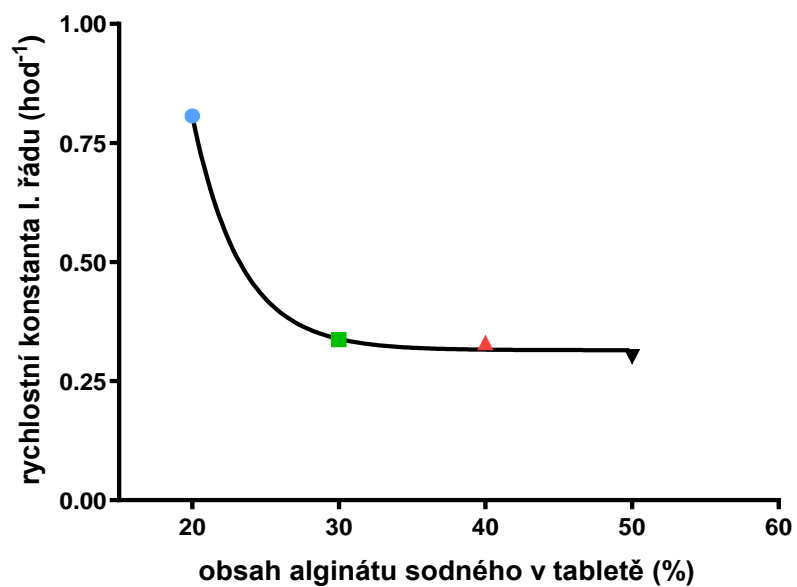
3.1.4 Disoluční profily formulací F1-F4 obsahující alginát sodný



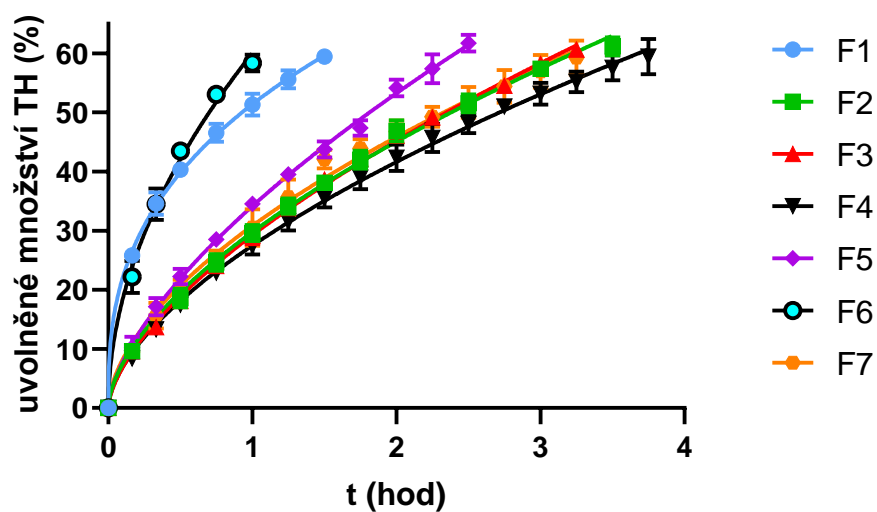
Graf 9: Disoluční profily formulací obsahující alginát sodný

V grafu 8 jsou disoluční profily zobrazeny ve formě aritmetických průměrů spolu se směrodatnými odchylkami. Z grafu 1 je patrné, že nejrychlejší uvolňování účinné látky probíhá u formulace F6 obsahující 20 % Kollidon® SR a 10 % alginátu sodného. U Kollidonu® SR se předpokládalo, že jeho použití v kombinaci s alginátem sodným jako nosnou maticí způsobí prodloužené uvolňování účinné látky. Nicméně, v porovnání s formulací F2, která obsahuje jako nosnou maticí 30 % alginátu sodného je patrné delší uvolňování účinné látky z tablety. To může poukazovat na to, že Kollidon® SR je vhodnější pro léčiva špatně rozpustné ve vodě. Naopak nejpomalejší uvolňování vykazuje formulace F4, kterou tvoří 50 % alginátu sodného.

V grafu 9 jsou zobrazeny disoluční profily formulací F1 – F4. Všechny tyto formulace obsahovaly jako nosnou maticí alginát sodný. Rozdíly těchto formulací spočívají v procentuálním zastoupení alginátu sodného. Je patrné, že formulace F1 (20 % alginátu sodného) vykazuje nejrychlejší uvolňování účinné látky. Naopak již zmíněná formulace F4 (50 % alginátu sodného) vykazuje nejpomalejší průběh uvolňování. Ze získaných disolučních profilů je patrné, že s rostoucím obsahem alginátu sodného klesá rychlost uvolňování účinné látky, což je potvrzeno snižující se hodnotou rychlostní konstanty I. řádu (graf 10).



Graf 10: Porovnání rychlostních konstant I. řádu formulací F1-F4 v závislosti na obsahu alginátu sodného



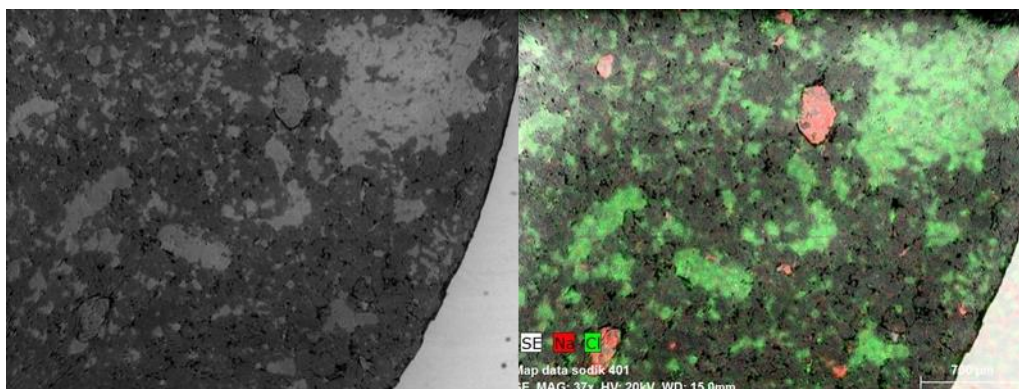
Graf 11: Disoluční profily formulací F1-F7, proloženy modelem Korsmeyer-Peppas

3.2 SEM

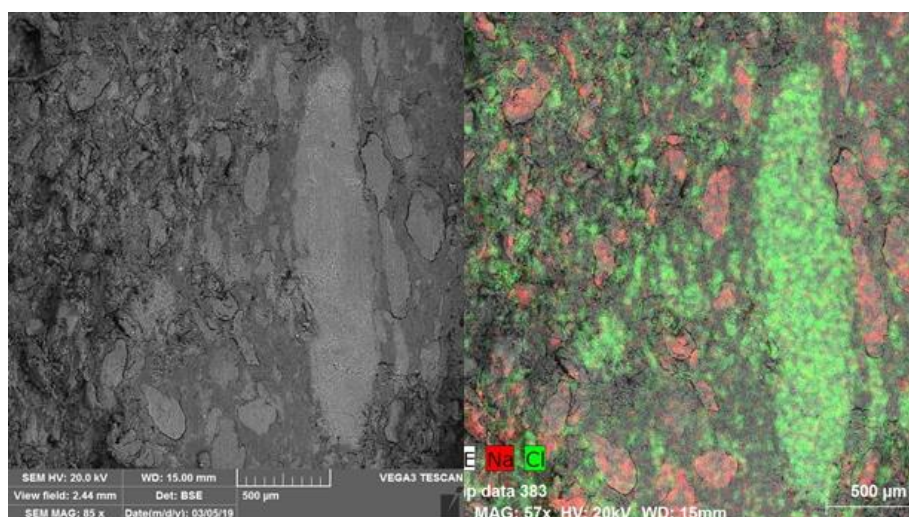
3.2.1 Ověření homogenity připravených formulací

V této části práce byl testován vliv metody přímého lisování tablet na homogenitu připravených tablet pomocí SEM-EDX. Jedná se o relativně nedestruktivní rentgenovou spektroskopickou metodu k určení lokálního chemického složení materiálů. Principem této metody je měření intenzity charakteristického RTG záření vybuzeného ze vzorku (viz. 1.8.6 Detektory). Z následného charakteristického spektra lze určit kvalitativní, semikvantitativní a kvantitativní chemické složení.

Formulace 1

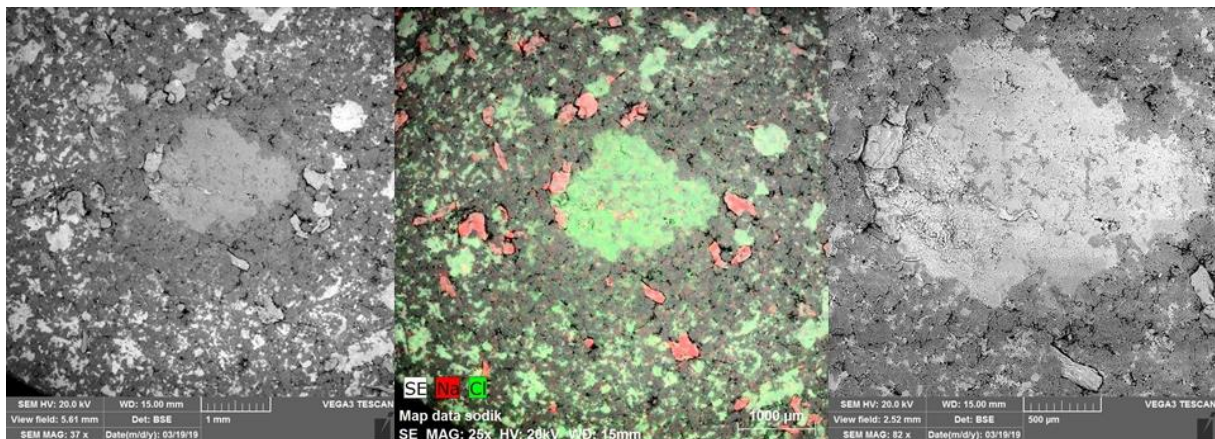


Obrázek 27: Zobrazení povrchu tablety F1 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)

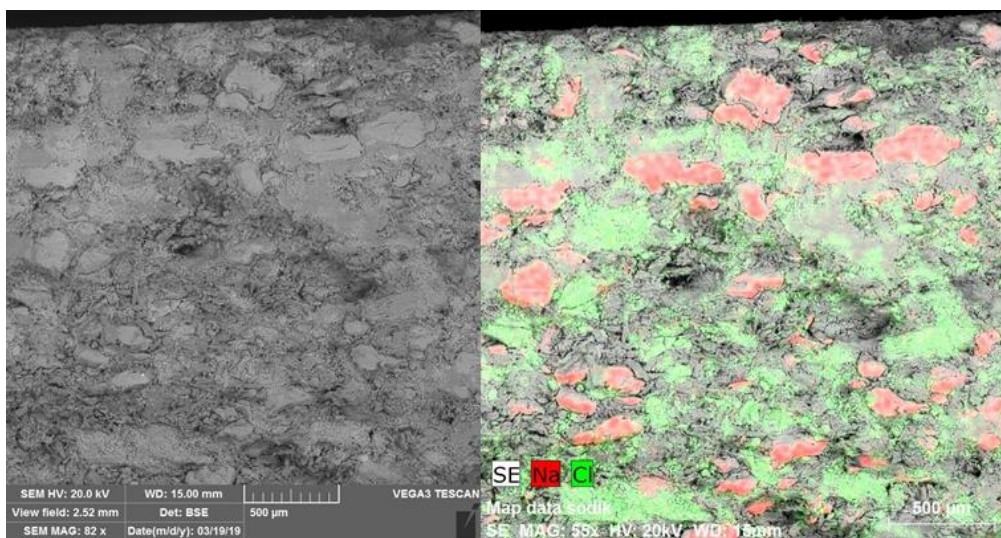


Obrázek 28: Zobrazení řezu tablety F1 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)

Formulace 2

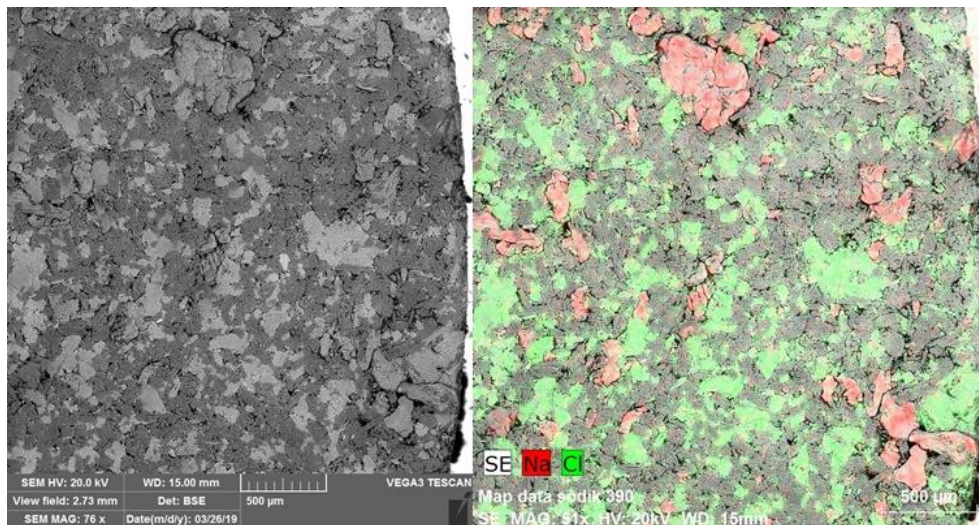


Obrázek 29: Zobrazení povrchu tablety F2 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX

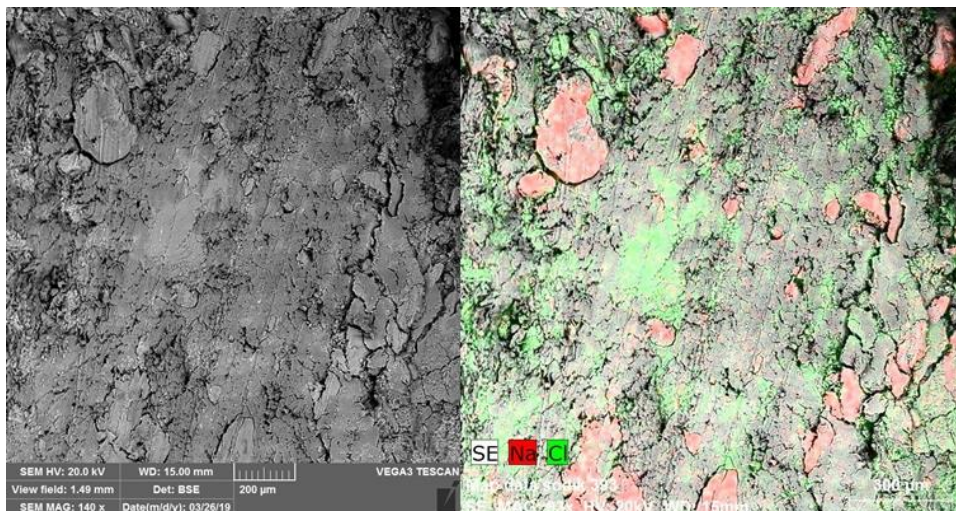


Obrázek 30: Zobrazení řezu tablety F2 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)

Formulace 3

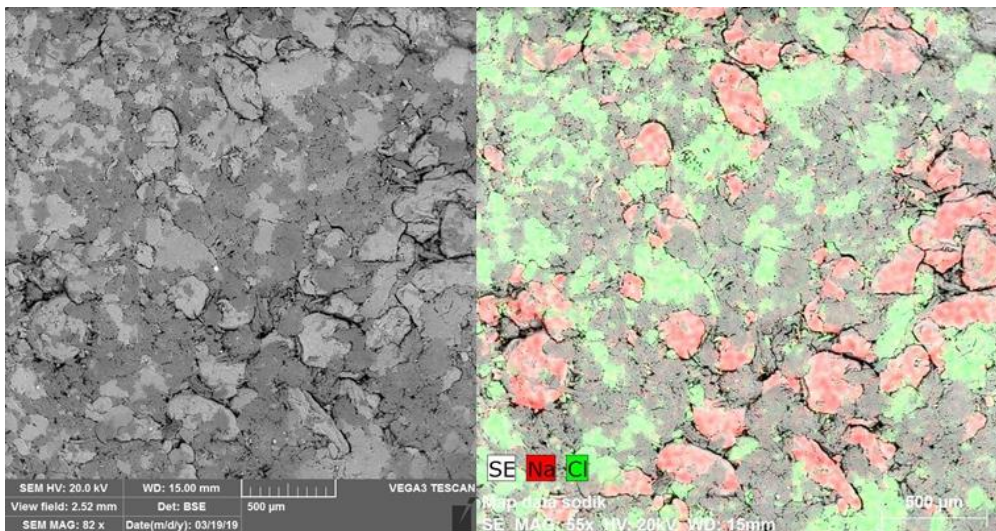


Obrázek 31: Zobrazení povrchu tablety F3 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)

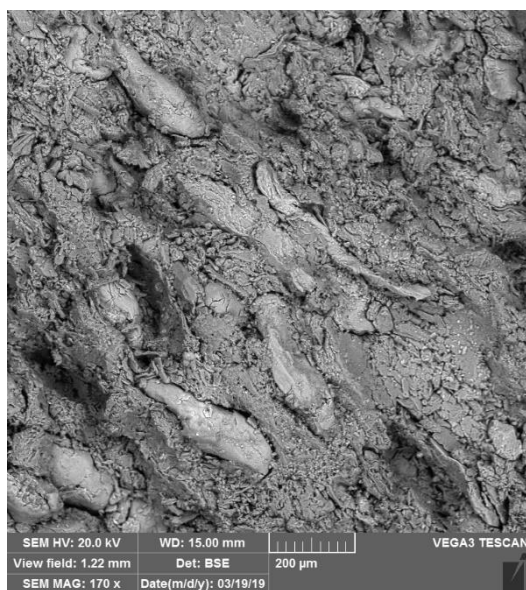


Obrázek 32: Zobrazení řezu tablety F3 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)

Formulace 4



Obrázek 33: Zobrazení povrchu tablety F4 pomocí BSE (vlevo) a SEM-EDX (vpravo)



Obrázek 34: Zobrazení řezu tablety F4 pomocí BSE

U formulace F1 byl postupně zkoumán povrch a poté podélný řez tablety. Na obrázku 27 je snímek povrchu tablety, kde je výrazně zobrazeno poměrně velké ložisko účinné látky TH. Po celém povrchu jsou dále vidět menší ložiska TH a také v menším množství částice alginátu sodného. Na druhém snímku bylo provedeno mapování povrchu elektronovou mikroanalýzou a hlavní pozorované složky tablety jsou barevně zobrazeny. TH je zobrazen zelenou barvou a alginát sodný červenou. V následujícím obrázku 28 je zobrazen řez tablety. Zde je zobrazeno velké ložisko TH spolu s částicemi alginátu sodného, které jsou oproti povrchové částici lehce zdeformované a mají více válcovitý tvar, což je způsobeno tlakem při lisování tablety.

Na obrázcích 29 a 30 je zobrazen povrch a řez tablety F2. U této formulace je na povrchu vidět velké ložisko TH. Na snímku je TH zobrazen výrazně světlou barvou než ostatní komponenty tablety. Tím, že TH obsahuje atomy chloru, které mají vyšší protonové číslo než ostatní přítomné atomy (sodík, uhlík, vodík), je zobrazen nejsvětlejší barvou. Částice alginátu sodného jsou zobrazeny tmavší barvou a můžeme si všimnout, že jsou zatlačeny do povrchu tablety a jsou velice dobře rozpoznatelné i bez použití elektronové mikroanalýzy. Na obrázku 30 je zobrazen řez tabletou kde můžeme pozorovat lehce zploštělé částice alginátu po stlačení. V řezu jsou pozorovány menší shluky TH a rozmístění je pravidelné bez větších ložisek TH.

Obrázky 31 a 32 zobrazují povrch a řez tabletou F3. Na povrchu tablety pozorujeme shluky TH, které jsou rozmístěny homogenněji než u formulace F2 a není zde pozorováno žádné velké ložisko. Vidět můžeme také větší částici alginátu sodného spolu s menšími částicemi vnořenými do povrchu tablety. Snímky na obrázku 33 zobrazují řez tabletou.

Na obrázku 33 je zobrazen povrch tablety F4. Pozorujeme velké množství částic alginátu sodného vtlačené do povrchu tablety. Mezi těmito částicemi můžeme vidět pravidelně rozmístěné shluky TH bez větších ložisek. V posledním obrázku 34 je zobrazen detail řezu tabletou. Můžeme si všimnout několika částic alginátu sodného, které jsou deformovány a vytváří oválné až ploché struktury. Důvodem těchto změn je tlak, který působí na částice a celou tabletu v průběhu lisování.

4. Závěr

V rámci této diplomové práce bylo připraveno sedm formulací hydrofilních matricových tablet obsahujících tramadol hydrochlorid jako účinnou látku. Všechny připravené tablety byly podrobeny disoluční zkoušce. Pomocí disoluční zkoušky byl určen mechanismus a také rychlost uvolňování účinné látky z tablety. Jako pojivo pro přípravu všech hydrofilních matric byl použit Prosolv® SMCC 90. Jedná se o směsné pojivo skládající se z 98 % mikrokrystalické celulosy a z 2 % koloidního oxidu křemičitého. Formulace F1-F4 obsahovaly jako retardující komponentu přírodní polysacharid alginát sodný. Formulace F5-F7 obsahovaly jako retardant kombinaci alginátu sodného a Kollidonu® SR (fyzikální směs polyvinylpyrrolidonu a polyvinylacetátu).

Z výsledných disolučních profilů a výsledků nelineární regresní analýzy je zřejmé, že nejpomalejšího uvolňování tramadol hydrochloridu bylo dosaženo u formulace F4 obsahující 50 % alginátu sodného. Nejrychlejšího uvolňování TH bylo dosaženo u formulace F6 obsahující 20 % Kollidonu® SR a 10 % alginátu sodného. Celkově u všech formulací obsahujících kombinaci Kollidonu® SR a alginátu sodného došlo ke zvýšení rychlostní konstanty, a tudíž k rychlejšímu uvolňování účinné látky oproti formulacím, které obsahují pouze alginát sodný. U tablet s Kollidonem® SR byla zjištěna vyšší rozpadavost tablet a můžeme tedy konstatovat, že Kollidon® SR není příliš vhodný pro tablety obsahující léčivo vysoce rozpustné ve vodě. Z výsledků regresní analýzy plyne, že disoluční profily lépe popisuje Weibullův statistický model, o čemž svědčí vysoké hodnoty koeficientu determinace. Z regresní analýzy pomocí modelu Korsmeyer-Peppas vyplývá, že mechanismem uvolňování účinné látky pro formulace F2-F7 je kombinace difuze a eroze (superpozice transportních jevů). Formulace F1 vykazuje čistě difuzní mechanismus uvolňování účinné látky.

Ve druhé části této práce byla ověřována homogenita připravených tablet pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Homogenita připravených tablet byla testována pouze u formulací obsahujících alginát sodný jako retardující složku. Z analýzy SEM je patrné, že u některých formulací dochází ke tvorbě ložisek TH, zřejmě následkem nedostatečné homogenizace na vibračním mlýnku. Tvorba těchto ložisek může zapříčinit větší rozdíly v rychlosti uvolňování účinné látky, jelikož hrozí, že bude uvolněno větší množství léčiva najednou. To může mít vliv na výsledný disoluční profil léčiva. Řešením by mohlo být zvýšení intenzity míchání ve vibračním mlýnku, popřípadě prodloužení času míchání při homogenizaci.

Pro zkoumání povrchu a řezu tablet byl využit detektor BSE, který zobrazuje pozorované částice na základě velikosti středního protonového čísla, a proto bylo možné rozlišit jednotlivé komponenty, hlavně tedy částice alginátu sodného a TH. TH je na snímcích vždy zobrazen nejsvětlejší barvou. Pro posouzení homogenního rozložení ÚL a alginátu sodného byla použita metoda SEM – EDX. Homogenní rozložení bylo potvrzeno u formulací F3 a F4. Nehomogenní rozložení bylo nalezeno u formulací F1 a F2.

5. Literatura

1. PARK, Kinam. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, 190, 3-8 [cit. 2019-04-05]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002508>
2. YUN, Y., LEE, B.K. & Park, K. Front. Chem. Sci. Eng. (2014) [online]. 8: 276. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1426-x>.
3. Applications of Scanning Electron Microscope in Pharmaceutical Research Field. *News medical* [online]. 2017. Dostupné z: <https://www.newsmedical.net/whitepaper/20170627/Applications-of-Scanning-Electron-Microscope-in-Pharmaceutical-Research-Field.aspx>
4. NOKHODCHI, Ali, Shaista RAJA, Pryia PATEL a Kofi ASARE-ADDO. The role of oral controlled release matrix tablets in drug delivery systems. *BioImpacts* [online]. 2012, 2(4), 178-187 [cit. 2019-04-05]. DOI: 10.5681/bi.2012.027. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678458>
5. WEN, Hong a Kinam PARK. Introduction and Overview of Oral Controlled Release Formulation Design. WEN, Hong, ed. a Kinam PARK, ed., Hong WEN, Kinam PARK. *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2010, 1-19 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1002/9780470640487.ch1. ISBN 9780470640487.
6. RABIŠKOVÁ, M.: Perorální matricové tablety s řízeným uvolňováním léčiva, *Remedia* [online]., 2007, 17, 188-192. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/ProficiencyNotification.aspx?ReturnUrl=%2fArchiv-rocniku%2fRocnik-2007%2f2-2007%2fPeroralni-matricove-tablety-s-rozenym-uvolnovanim-leciva%2fe-9p-9W-hD.magarticle.aspx>

7. KOMERSOVÁ, Alena, Václav LOCHAŘ, Kateřina MYSLÍKOVÁ, Jitka MUŽÍKOVÁ a Martin BARTOŠ. Formulation and dissolution kinetics study of hydrophilic matrix tablets with tramadol hydrochloride and different co-processed dry binders [online]. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 95. 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.08.002.

8. RABIŠKOVÁ, M. a FRICHOVÁ V. Perorální formy s řízeným uvolňováním léčiv. *Praktické lékařství*, 2008, 4 (4), 186-190. ISSN 1801-2434.

9. TAPASWI Rani Dash, PANKAJ Varma. Matrix Tablets: An Approach towards Oral Extended Release Drug Delivery. *International Journal of Pharma Research & Review*. 2017, 2(2). Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/256663537_Matrix_Tablets_An_Approach_towards_Oral_Extended_Release_Drug_Delivery

10. MUHAMMAD, U. a R BARBARA. Hydrophilic Matrices for Oral Control Drug Delivery. *American Journal of Pharmacological Sciences*. [online]. 2015, 3(5), 103-109 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.12691/ajps-3-5-1. Dostupné z: <http://pubs.sciepub.com/ajps/3/5/1>

11. COLOMBO. P, BETTINI. R, SANTI. P a DE ASCENTTIS. A, Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *Journal of Controlled Release* Volume 39, Issues 2–3, May 1996, 231-237. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00158-1](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00158-1).

12. MUHAMMAD U. Ghori, Barbara R Conway. Hydrophilic Matrices for Oral Control Drug Delivery. *American Journal of Pharmacological Sciences*. Vol. 3, No. 5, 2015, 103-109. <http://pubs.sciepub.com/ajps/3/5/1>

13. Modification of drug release. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems [online]. Elsevier, 2015, 15-28 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100092-2.00002-3. ISBN 9780081000922. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081000922000023>

14. VAVŘÍKOVÁ. E, VINŠOVÁ J, Chitosan a jeho farmaceutické. *Chem. Listy* 103, 56–65 (2009). Farmaceutická fakulta UK, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_01_56-65.pdf
15. SEDLÁKOVÁ M., RABIŠKOVÁ M., SPILKOVÁ J., Přírodní polymery pro formulaci hydrofilních matricových tablet [online]. *ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE* Ročník LV – Číslo 1 – LEDEN 2006. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků 1Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, Katedra farmakognozie.
16. SKAUGRUD Ø., HAGEN A., BORGERSEN H., & Michael DORNISH (1999). Biomedical and Pharmaceutical Applications of Alginate and Chitosan [online]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16:1, 23-40, DOI: [10.1080/02648725.1999.10647970](https://doi.org/10.1080/02648725.1999.10647970). Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.1999.10647970>
17. DAEMI H. a BARIKANI M., Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles [online]. *Scientia Iranica* Volume 19, Issue 6, December 2012, 2023-2028. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.005>.
18. FERTAHA M., BELFKIRA A., TAOURIRTEA M., Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed [online]. *Arabian Journal of Chemistry* Volume 10, Supplement 2, May 2017, 3707-3714. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214000793>
19. *Alginate production methods* [online], [cit. 2019-05-05].
20. KUMBAR, Sangamesh G., LAURENCIN, Cato T. a DENG, Meng. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* [online]. US: Elsevier, 2014 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpNSBP0002/natural-synthetic-biomedical/natural-synthetic-biomedical>. ISBN: 978-0-12397-290-3.

21. YANG S., LIANG L., WANG L., Shirui Mao, Evaluation of chitosane anionic polymers based tablets for extended-release of highly watersoluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24-30 [online]. [cit. 2019-05-05].
22. JENNINGS, J. *Chitosan Based Biomaterials* [online]. [cit. 2019-05-05]. US: Elsevier, 2017. Dostupné z: <http://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCBBVF005/chitosan-based-biomaterials/chitosan-based-biomaterials>. ISBN: 978-0-08-100257-5.
23. MARTÍNEZ-IBARRA, Diana Margarita a Dália I. SÁNCHEZ-MACHADO, 2018. Hydrogel wound dressings based on chitosan and xyloglucan: Development and characterization. *Journal of applied polymer science* [online]. [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.1002/app.47342.
24. NO H. K., PARK N. Y., LEE S. H., *Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights*. [online], [cit. 2019-04-05]: *Int. J. Food Microbiol.* 74, 65 (2002). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11929171>
25. CHEN S., WU G., ZENG H.: *Carbohydrate Polymers*. [online], [cit. 2019-04-05]: 60, 33 (2005).
26. TALUKDAR, M.M. a R. KINGET, Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 120 (1995) 63-72 [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517394004107>
27. ZATKOWSKI, Tomasz a Agnieszka KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, 2015. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan composites. *Physicochemical Problems of Mineral Processing* 51(2):575-585 [online]. [cit. 2019-04-01]. DOI: 10.5277/ppmp150217. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/281717561_Synthesis_and_characterization_of_hydroxyapatitechitosan_composites

28. BORN, K., Langendorff, V., Boulenguer, P. *Biopolymers*, Vol. 3 [online]. [cit. 2019-04-01]. Weinheim, Wiley-VCH 2003, 261-292.
29. FERTAHA M., BELFKIRA A., TAOURIRTEA M., Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed [online]. [cit. 2019-04-01]. *Arabian Journal of Chemistry Volume 10, Supplement 2, May 2017*, 3707-S3714. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214000793>
30. XIE W., XU P., WANG W., LIU Q.: *Carbohydr. Polymers*. 50, 35 (2002). Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861701003708>
31. BENECKE., Willy, GmbH, Hamburg: *Gum arabic*, 2004, 3 s. Dostupné z: <https://www.willy-benecke.com/?lang=en>
32. BHARDWAJ, T. R., KANVAR, M., LAL, R., GUPTA, A.: *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 2000; 26, 1025-1038. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11028217>
33. SRIAMORNSAK, P.: Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1999; 8, 221-227. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10379045>
34. *SWICOFIL: Chitosan* [online]. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.swicofil.com/swicofil/company-information>
35. HERBSTREITH FOX KG, Neuenbürg/Württ: Diverse textures from different pectins, 2004, 8 s. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/270663770_Pectins_of_different_origin_and_their_performance_in_forming_and_stabilizing_oil-in-water-emulsions
36. MURATA, Y., SASAKI, N., MIYAMOTO, E., KAWASHIMA, S.: Use of floating alginate gel beads for stomach-specific drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000; 50, 221-226. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962231>

37. *Sigma-Aldrich* [online]. b.r. [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/42965?lang=en®ion=CZ>
38. PROSOLV® SMCC. JRS PHARMA. [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: https://www.jrspharma.com/pharma_en/products-services/excipients/hfe/prosolv-smcc.php
39. PROSOLV® SMCC LM. American Pharmaceutical Review. [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/>
40. SELF LUBRICATING EXCIPIENTS. LubriTose™. [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <https://www.ejderkimya.com/lubritose-brochure.pdf>
41. KOLLIDON® SR. Excipients for drug formulation. [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: <https://pharmaceutical.basf.com/en/Drug-Formulation.html>
42. RAFFA, R. Opioid and Nonopioid Components Independently Contribute to the Mechanism of Action of Tramadol, an 'Atypical' Opioid Analgesic. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* [online]. [cit. 2019-04-25]. 1992, 260(1), 275-285. ISSN 0022-3565. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309873>.
43. SÚKL. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. Dostupné z: <http://www.sukl.eu/modules/medication/download.php?file=SPC110003.pdf&type=spc&as=tramadol-sandoz-retard-spc>.
44. TRAMADOL HYDROCHLORIDE. PubChem. [online]. [cit. 2019-04-25]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tramadol_hydrochloride
45. *Tramadol Update Review Report, Agenda item 6.1: Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting* [online]. 2014 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/6_1_Update.pdf

46. SWEILEH, Waleed M. a Naser Y. SHRAIM, Worldwide research productivity on tramadol: a bibliometric analysis. *Springerplus*. 2016; 5(1): 1108. [online]. [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1186/s40064-016-2801-5. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4949195/>
47. *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. [cit. 2018-04-30]. Dostupné z: [http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search_for\]=tramadol](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=tramadol)
48. In Vitro Dissolution Testing For Solid Oral Dosage Forms, *Particle Sciences Technical Brief: 2010: Volume 5* [online]. [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2010/in-vitro-dissolution-testing-for-solid-oral-dosage-forms.html>
49. DVOŘÁČKOVÁ, K., BAUTZOVÁ T. a RABIŠKOVÁ M. DISOLUČNÍ STUDIE V HODNOCENÍ PERORÁLNÍCH LÉKŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM LÉČIVA. *Chemické Listy* [online]. 2011, **105**, 50-54 [cit. 2018-05-01].
50. ČESKÝ LÉKOPIS 2009. Zkouška disoluce pevných lékových forem. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. Praha: Grada Publishing a.s., 11199-11204. ISBN: 978-80-247-2994-7.
51. DASH, SUVAKANTA, Murthy PN a Nath L, KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, Vol. 67 No. 3 pp. 217-223, 2010 [online]. [cit. 2019-05-01].
52. COSTA, P. a SOUSA LOBO, J.M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. [online]. [cit. 2019-05-01]. 2001, Sv. 13, 123-133.
53. RAMTEKE, K.H, P.A DIGHE, A. R KHARAT a S.V PATIL, Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)*, 2014; 3(5): 388-396 [online]. [cit. 2019-05-05].

54. Mathematical models of drug release. *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* [online]. Elsevier, 2015, s. 63-86 [cit. 2018-04-15]. DOI:10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9. ISBN 9780081000922. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081000922000059>
55. In Vitro Dissolution Testing For Solid Oral Dosage Forms, *Particle Sciences - Technical Brief: 2010: Volume 5* [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2010/in-vitro-dissolution-testing-for-solid-oral-dosage-forms.html>
56. BUSHRA, S., *DISSOLUTION TESTING APPARATUS* [online]. [cit. 2019-04-20].
57. KUBÍNEK, Roman, Klára ŠAFÁŘOVÁ a Milan VŮJTEK, *Elektronová mikroskopie* [online]. Katedra experimentální fyziky, Univerzita Palackého v Olomouci [cit. 2019-05-01].
58. THERMO FISHER SCIENTIFIC., SEM [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://blog.phenom-world.com/what-is-sem>
59. ENCYKLOPEDIE FYZIKY. Interakce elektronů se vzorkem. [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1678-interakce-elektronu-se-vzorkem>
60. INTRODUCTION TO SCANNING ELECTRON MICROSCOPY. [online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/MuhammadAliSiddiqui6/vacuum-metallurgy-lecture-scanning-electron-microscopy>
61. SCANNING ELECTRON MICROSCOPE. VEGA SEM 3. *Instruction for use*. 2011 TESCAN, a.s., Brno, Czech Republic
62. NEBESÁŘOVÁ, Jana, Elektronová mikroskopie pro biology: *Detekce sekundárních a odražených elektronů* 2001[online]. [cit. 2019-05-05].

63. SIMEK, Michal, Veronika GRÜN WALDOVÁ a Bohumil KRATOCHVÍL, A new way of solid dosage form samples preparation for SEM and FTIR using microtome. *PubMed, April 2013 Pharmaceutical Development and Technology 194(4)* [online]. [cit. 2019-05-05]. DOI: 10.3109/10837450.2013.788515. Dostupné z:
https://www.researchgate.net/publication/236275180_A_new_way_of_solid_dosage_form_samples_preparation_for_SEM_and_FTIR_using_microtome
64. CARBON TABS for adhesion of SEM specimens. [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z:
https://archive.proscitech.com/?navaction=show_page&chapter=i&page=3