

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Studium rozpadu matricových tablet na bázi přírodních biopolymerů

Kamila Žaláková

Bakalářská práce

2019

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kamila Žaláková**
Osobní číslo: **C16306**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Studium rozpadu matricových tablet na bázi přírodních biopolymerů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Proveďte stručnou literární rešerši na téma: použití chitinu, chitosanu a alginátu při přípravě léčiv s účinnou látkou tramadol hydrochlorid.
2. Prostudujte vlastnosti chitosanu a alginátu z hlediska účinku na lidský organismus.
3. Připravte tablety s obsahem tramadol hydrochloridu a předloženými biopolymery, popište vizuální změny tablety během jejího rozpadu v roztoku.
4. Na základě experimentálních dat porovnejte vliv disolučního média na rozpad matricových tablet s tramadol hydrochloridem.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Václav Lochař, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie

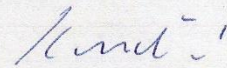
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....

Kamila Žaláková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla velice poděkovat panu Ing. Václavu Lochařovi, Ph.D. za odborné vedení a poskytnuté rady při psaní této bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je věnována použití chitosanu a alginátu při přípravě léčiv s účinnou látkou tramadol hydrochlorid. Podrobně jsou zde prostudovány vlastnosti těchto biopolymerů a jejich účinky na lidský organismus. Byly připraveny matricové tablety s obsahem obou polymerů. Byl studován jejich rozpad pod vlivem různých disolučních médií pomocí vizuálního sledování disolučního testu s pádélkovou metodou. Byl studován index bobtnání a erozní index pomocí záznamu úbytku hmotnosti tablet během disoluce. V rámci provedení disoluční zkoušky byl získán disoluční profil studovaných tablet.

KLÍČOVÁ SLOVA

chitosan, alginát, tramadol hydrochlorid, rozpad tablet, disoluční test

TITLE

Study of disintegration of matrix tablets based on natural biopolymers

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with the use of chitosan and alginate in the preparation of drugs with the active substance tramadol hydrochloride. The properties of these biopolymers and their effects on the human body are studied in detail. Matrix tablets containing both polymers were prepared. Their dissolution under the influence of various dissolution media was studied by visual observation of the dissolution test with a paddle method. Swelling index and erosion index were studied by recording tablet weight loss during dissolution. The dissolution profile of the studied tablets was obtained as part of the dissolution test.

KEY WORDS

chitosan, alginate, tramadol hydrochloride, tablet disintegration, dissolution test

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	10
ÚVOD	11
1 TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1 Chitin	12
1.1.1 Struktura chitinu.....	12
1.1.2 Rozpustnost chitinu	13
1.1.3 Aplikace chitinu	13
1.2 Chitosan	15
1.2.1 Struktura chitosanu	15
1.2.2 Rozpustnost chitosanu	15
1.2.3 Aplikace chitosanu.....	16
1.3 Alginát	18
1.3.1 Struktura alginátu	19
1.3.2 Fyzikálně chemické vlastnosti.....	19
1.3.3 Aplikace alginátu	20
1.4 Tramadol hydrochlorid.....	22
1.5 Pevné lékové formy.....	23
1.5.1 Zkouška rozpadavosti	24
1.5.2 Disoluční zkouška	25
1.5.3 Index bobtnání a eroze	28
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
2.1 Laboratorní přístroje a pomůcky	29
2.2 Použité chemikálie	29
2.3 Příprava disolučních médií	30
2.4 Použité PC programy	30
2.5 Příprava a složení tablet	30
2.6 Studium rozpadu tablet během disolučního testu	31
2.7 Stanovení tramadol hydrochloridu pomocí UV/VIS spekter	31
2.8 Stanovení indexu bobtnání a eroze	32
3 VÝSLEDKY	33
3.1 Disoluční test.....	33
3.2 Chování tablet v různých disolučních médiích.....	33
3.2.1 Kyselé disoluční médium pH 1,2.....	33
3.2.2 Kyselé disoluční médium pH 2,2.....	33
3.2.3 Octanový pufr pH 4,5.....	34

3.2.4	Octanový pufr pH 5,5.....	35
3.2.5	Fosfátový pufr pH 6,8	35
3.3	Disoluční profil tablet s TH	35
3.4	Index bobtnání a eroze.....	36
3.5	Diskuze výsledků	37
4	ZÁVĚR.....	40
5	LITERATURA.....	41

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 - Strukturální vzorec chitinu (převzato z [5]).....	13
Obrázek 2 - Strukturální vzorec chitosanu (převzato z [7]).....	15
Obrázek 3 - Strukturální vzorec alginátu sodného (převzato z [12]).....	19
Obrázek 4 - Tramadol hydrochlorid (převzato z [17])	23
Obrázek 5 - DT50 pro zkoušku rozpadavosti (převzato z [22])	24
Obrázek 6 - ZT 720 pro zkoušku rozpadavosti (převzato z [23]).....	25
Obrázek 7 - Nádoba s pádélky od firmy Sotax (převzato z [22]).....	26
Obrázek 8 - Plně automatizovaný systém RoboDis II od firmy Erweka (převzato z [23]).....	27
Obrázek 9 - Plně automatizovaný systém ATF Xtend s výsledky UV-Vis v reálném čase od firmy Sotax (převzato z [22]).....	27
Obrázek 10 - Tableta před disolucí.....	33
Obrázek 11 - Tablety po disoluci.....	34
Obrázek 12 - Tablety po sušení	35
Obrázek 13 - Množství uvolněného tramadol hydrochloridu v závislosti na čase	36
Obrázek 14 - Nelineární regresní analýza disolučního profilu tramadol hydrochloridu v disolučním médiu o pH 1,2.....	38
Obrázek 15 - Nelineární regresní analýza disolučního profilu tramadol hydrochloridu v disolučním médiu o pH 4,5.....	39

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1- Složení tablet v miligramech.....	31
Tabulka 2 - Hmotnosti tablet, indexy bobtnání a eroze pro různá disoluční média	37
Tabulka 3 - Čas uvolnění 50 % tramadol hydrochloridu u jednotlivých médií.....	39

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

TH	tramadol hydrochlorid
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
PAMP	molekulární vzory spojené s patogeny
PRR	receptor rozpoznávání vzorů
INF- γ	interferon gama
IL-33	interleukin 33
CMC	karboxymethylchitosan
IL-6	interleukin 6
LPS	lipopolysacharid

ÚVOD

V současné době je trendem použití přírodních biodegradabilních biopolymerů k výrobě mnoha léčiv. Tyto látky slouží jako nosiče léků. Jejich použití zajistí vyšší terapeutický účinek v požadovaném místě a nižší toxický účinek na ostatní tkáň.

Aplikace těchto polymerů řeší mnoho problémů spojených s řízeným uvolňováním léčiv. Chrání léky před degradací v gastrointestinálním traktu, díky čemuž se zajistí uvolnění léčiva v cílené lokalitě. Zároveň zlepšují prodloužené uvolňování účinné látky, takže jsou vhodné nosiče pro opioidní analgetika, jako je tramadol hydrochlorid.

Využití přírodních biopolymerů získává v současnosti převahu nad syntetickými polymery, jelikož nedochází k tolika nežádoucím interakcím. Mezi nejčastěji využívané biopolymery při výrobě léčiv patří chitin, chitosan, alginát, celulóza a škrob.

Léčiva se připravují do různých forem. Vyrábí se například hydrogely obsahující chitosan spolu s polyethylenglykolem, které následně reagují za určitého pH a mohou se využívat při výrobě léčiv s řízeným uvolňováním. Při použití chitosanu se využívá interakce pozitivně nabitých aminoskupin chitosanu s negativně nabitou částicí. Příkladem takové negativně nabité částice je roztok alginátu. Kombinace alginátu s chitosanem při výrobě mikrokapslí či tablet s prodlouženým uvolňováním účinné látky, kterou může být TH, je často studované téma [1].

V teoretické části práce se věnuji vlastnostem chitinu, chitosanu a alginátu z hlediska účinku na lidský organismus. V další části byla popsána zkouška rozpadavosti a disoluční studie. Byly zde zahrnuty i nejnovější přístroje pro tyto zkoušky. Cílem experimentální části bylo popsat vizuální změny tablety během jejího rozpadu a zároveň i vliv disolučního média na rozpad matricových tablet s účinnou látkou TH. Dále byly studovány indexy bobtnání a eroze.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Chitin

Chitin patří mezi významné přírodní biopolymery na světě. Po celulóze je druhým nejvíce se vyskytujícím polysacharidem. Je syntetizován mnoha živými organismy. U členovců tvoří základní složku exoskeletu, u hub a kvasinek buněčnou stěnu. Dále se také vyskytuje v nižších říších rostlin a živočichů, například v hmyzu nebo červech. Za hlavní zdroj chitinu jsou považovány mořští korýši jako krevety, krabi a humři [2][3].

Chitin se získává extrakcí z korýšů. Působením kyseliny se uhličitan vápenatý rozpustí, čímž získáme různě barevný produkt. Výsledná čistota chitinu se liší podle množství zbytkového proteinu a pigmentu. Nízká čistota chitinu může způsobit problémy při využití pro biomedicínskou aplikaci [2].

Chemické vlastnosti chitinu umožňují jeho využití v biomedicíně a biotechnologiích. Dále také v potravinářském průmyslu, k imobilizaci protilátek (v přítomnosti alginátu), k výrobě obvazů a hojení ran, v tkáňovém inženýrství, k diagnóze rakoviny a jako protinádorové činidlo [4].

1.1.1 Struktura chitinu

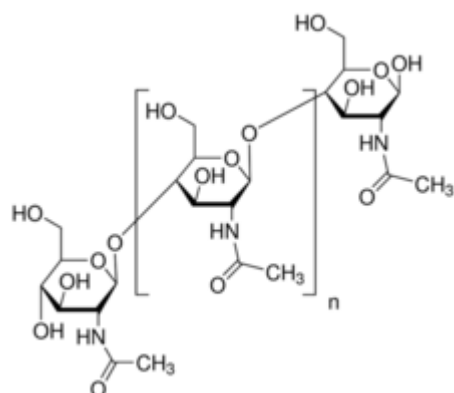
Biopolymery chitinu jsou syntetizovány enzymem chitin syntázou. Po vzniku tuhých krystalků dojde ke vzniku organizované sítě vláken. Toto uspořádání dodává organismu potřebnou tuhost a odolnost. Podle orientace mikro fibril můžeme rozlišit tři modifikace chitinu: alfa, beta a gama-chitin [3][4].

Alfa-chitin je nejrozšířenější forma chitinu. Můžeme ho najít v mořských korýších, v pokožce hmyzu nebo ve stěně plísní a kvasinek. Kromě přírodních zdrojů, lze chitin získat také biosyntézou in vitro, rekrystalizací z roztoku nebo enzymatickou polymerací.

Beta-chitin se vyskytuje převážně v měkkýších jako jsou chobotnice nebo olihně. Dále také v mořských řasách a prvocích. Nejčistší formu lze získat z trnů vylučovaných rozsivkou. Oproti alfa-chitinu se beta-chitin nepodařilo získat biosyntézou in vitro ani rekrystalizací z roztoku [2][3].

Gama-chitin se nejvíce nachází v houbách. Podrobné analýzy dokázaly, že gama-chitin je pouze varianta alfa rodiny. Jednotlivé formy chitinu lze odlišit pomocí infračervené spektroskopie [2][3].

Z chemického hlediska se jedná o lineární molekulu složenou z N-acetyl-D-glukosaminu. Chemický vzorec je poly [$\beta(1\rightarrow4)$ -N-acetyl-D-glukosamin] [3][5].



Obrázek 1 - Strukturní vzorec chitinu (převzato z [5])

1.1.2 Rozpustnost chitinu

Chitin je v běžných rozpouštědlech nerozpustný díky intramolekulárním vodíkovým vazbám. Nerozpouští se tedy ve vodě, v koncentrovaných zásadách i zředěných kyselinách. Rozpustný je pouze v silných koncentrovaných kyselinách, jako jsou kyselina chlorovodíková, 70–90 % kyselina sírová, kyselina fosforečná a bezvodá kyselina mravenčí [3].

1.1.3 Aplikace chitinu

Chitin patří mezi látky s nízkou toxicitou a zároveň je inertní v gastrointestinálním traktu člověka. Má široké uplatnění v různých odvětvích. Významnou funkci zastávají chitinázy při obraně hostitele proti bakteriální infekci, kdy degradují stěny chitinu u bakteriálních buněk. Chitin také aktivuje peritoneální makrofágy *in vivo*. Makrofágy poté zastaví množení nádorových buněk a navodí nespecifickou rezistenci hostitele proti infekci bakterií *Escherichia coli* [2].

Dalším využitím může být imobilizace enzymů a celých buněk. V potravinářském průmyslu se aplikuje imobilizace enzymů například pro čištění ovocných šťáv a při zpracování

mléka. Díky svým vlastnostem, jako je biologická rozložitelnost, netoxičita či inertnost našel uplatnění při výrobě biosenzorů [2].

Chitin se vyskytuje v různých formách jako jsou vlákna, filmy, hydrogely a další. Všechny tyto materiály jsou nealergické, antibakteriální a mají schopnost regulovat vlhkost a urychlují hojení ran. Proto nacházejí uplatnění v lékařských a farmaceutických oblastech. Slouží pro výrobu obvazů na rány, léčiv s řízeným uvolňováním, past pro řízenou regeneraci defektů periodontálních kostí a protinádorových léčiv. Stehy vytvořené z chitinu odolávají žluči i pankreatickým šťávám [2][4].

Vliv na imunitní systém

U savců se chitin přirozeně nevyskytuje, a proto je rozpoznáván imunitním systémem pomocí specifických receptorů. Po výskytu mikrobů s chitinem se chitinázy vážou na povrch chitinu a tím může dojít k vývoji různých patofyziologických stavů, jako je infekce, alergie nebo fibróza. Chitin a chitinázy se tedy významně podílí na tvorbě imunitní odpovědi. Na tvorbu imunitní reakce mají také vliv fyzikální vlastnosti chitinu. Velikost chitinu je nejvýznamnějším faktorem. Molekuly chitinu o velké velikosti jsou biologicky inertní, zatímco malé fragmenty chitinu jsou schopny stimulovat produkci prozánětlivého cytokinu TNF- α . Tento cytokin se podílí na vývoji zánětlivé odpovědi.

Imunitní systém rozpoznává chitin jako PAMP pomocí PRR receptorů na povrchu buněk. Po aktivaci receptorů rozpoznávajících PAMP dochází k aktivaci fagocytózy, produkci zánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku. Chitin je dále schopen aktivovat makrofágy alternativní cestou, kdy přítomnost chitinu slouží jako aktivační signál. Dále má také vliv na NK buňky. Ty pod jeho vlivem zvýšeně produkují prozánětlivý INF- γ .

Další významný cytokin je IL-33. Tento cytokin je exprimován pneumocyty typu II během infekce parazity nesoucí chitin. V kombinaci s dalšími cytokiny vyvolává eosinofilní zánět v plicích. Pokud však tento cytokin chybí k zánětu plic nedochází. Experimentálně bylo dokázáno, že léčba chitinem může zastavit rozvoj zánětu plic. Také má vliv na snížení hladiny imunoglobulinu IgE.

Chitin má také vliv na aktivaci komplementu. Ten je aktivován klasickou a alternativní cestou. V přítomnosti chitinu je komplement aktivován hlavně alternativní cestou [4].

Během infekcí se uplatňují dva typy T-lymfocytů: Th1 a Th2. Th1 má protektivní charakter. Th2 se podílí na tvorbě protilátek. Pokud je chitin rozpoznán chitotriosidázami, dojde

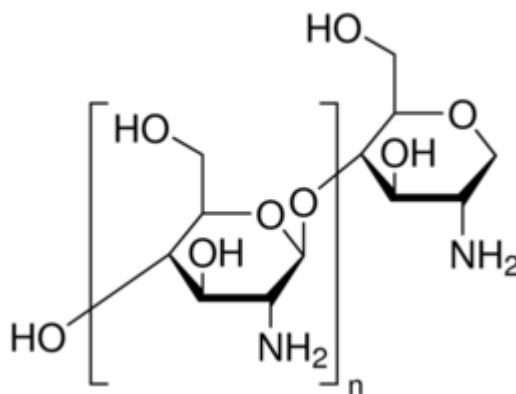
k škodlivé diferenciaci Th2 buněk. K diferenciaci přispívají i dendritické buňky. Dendritické buňky pod vlivem mikročástic chitinu slouží jako antigen prezentující buňky pro T-lymfocyty. Ty poté produkovaly až sedmkrát vyšší množství INF- γ [4].

1.2 Chitosan

Je přírodní polymer vzniklý částečnou deacetylací chitinu za alkalických podmínek nebo enzymatickou hydrolyzou za pomoci enzymu chitin deacetylázy. Jelikož je rozpustný ve vodných roztocích je snadno zpracován do různých forem jako jsou vlákna, hydrogely, filmy, prášky nebo roztoky. Za hlavní zdroj chitosanu je považován chitin, avšak chitosan můžeme najít také u některých hub [2][3].

1.2.1 Struktura chitosanu

Chitosan je polymer s lineární strukturou složený z deacetylovaných jednotek D-glukosaminu spojených β (1 \rightarrow 4) chemickou vazbou a acetylovaných jednotek N-acetyl-D-glukosaminu. Chemický vzorec je znázorněn na obrázku č. 2 [6].



Obrázek 2 - Strukturní vzorec chitosanu (převzato z [7])

1.2.2 Rozpustnost chitosanu

Rozpustnost chitosanu udává stupeň deacetylace chitinu. Pokud deacetylace dosáhne 50 %, chitosan se stává rozpustným. Je nerozpustný v běžných rozpouštědlech například ve vodě, koncentrované kyselině nebo zásadě, alkoholu a acetonu. Není rozpustný i v organických rozpouštědlech dimethylsulfoxidu nebo dimethylformamidu. Rozpouští se ve zředěné kyselině dusičné, octové a mravenčí, která je nejvhodnější rozpouštědlo.

Rozpustnost chitosanu souvisí s mnoha faktory, jako je molekulová hmotnost nebo iontová koncentrace. Hodnota pH je také jedním z významných faktorů. Je prokázáno, že chitosan je rozpustný v pH nižším než 6. Zatímco rozpustnost v neutrálním pH je pouze 50 %. Důležitým faktorem je i protonace chitosanu. Při průměrném stupni ionizace chitosanu odpovídá rozpustnost chitosanu pH 4,5-5 [2][3].

1.2.3 Aplikace chitosanu

Chitosan a jeho deriváty jsou využívány ve farmaceutických a biomedicínských oblastech, v kosmetice a v dalších aplikacích. Jeho vlastnosti zvyšují adsorpci léčiv hlavně v neutrálním pH. Derivát n-laurylkarboxymethylchitosan je vhodným nosičem pro hydrofobní léky proti rakovině. Chitosanové gely a kapsle se využívají jako základní složka pro řízené uvolňování léčiv. Jelikož má dobrou biologickou aktivitu používá se v zemědělství k ochraně rostlin před růstem bakterií a zároveň aktivuje přirozenou obranyschopnost rostlin. Dále se také chitosan s fosforečnanem vápenatým užívá k opravě nebo plnění kostí. Chitosan se také používá k ošetřování ovoce a zeleniny, čímž se může oddálit jejich rozklad [2].

Chitosan nemá zásadní vliv na imunitní systém jako chitin. Lze ho použít ve formě léčiv nebo vakcín k vyvolání cílené zánětlivé reakce [4].

Využití při hojení ran

Chitosan stejně jako chitin urychluje regeneraci pojivové tkáně a angiogenezi. Pro hojení ran je důležitá normální funkce makrofágů. Ty mají účinek na aktivitu fibroblastů a syntézu kolagenu. Chitosan vyvolává aktivaci peritoneálních makrofágů. Jejich aktivace vede k syntéze růstových faktorů a cytokinů, zvýšené metabolické aktivitě a zvýšení jejich fagocytární aktivity. Vzniklé růstové faktory se podílí na regeneraci epitelu. Aktivované makrofágy mají významnou roli v obraně hostitele proti patogenům. Avšak nekontrolovaná aktivace by mohla vést k septickému šoku a smrti. Hlavní mechanismus regulace je apoptóza (programovaná buněčná smrt). Chitosan má schopnost vyvolat apoptózu peritoneálních makrofágů. Buňky ošetřené chitosanem se začnou agregovat a zemřou. Pokud použijeme chitin nebo nízko molekulární chitosan buňky zůstanou neovlivněny [9].

Hojení ran je složitý systém buněčných a biochemických dějů. Zahrnuje proliferaci a migraci různých druhů buněk a proteinů, proces zánětu nebo neovaskularizaci. Chitosan a jeho CMC deriváty nacházejí uplatnění při výrobě obvazových materiálů. Ideální obvaz

na rány musí splňovat řadu podmínek. Nesmí být alergenní, toxický, adherentní. Dále také musí zachovat vlhkost, umožňovat výměnu plynů a být odstranitelný bez vzniku dalšího traumatu. Slouží jako bariéra proti patogenům, proto musí mít vynikající antimikrobiální vlastnosti. Obvazy mohou být využity při hojení rohovkového epitelu, popálenin, dorsálních ran nebo hemostatických ran [8][10].

Využití alginátu s derivátem CMC je ideální matricí pro regenerativní medicínu. Tyto hydrogely bobtnají ve fyziologických tekutinách čímž se zvětší velikost pórů. Tím je usnadněno pronikání buněk k místu poranění. Aplikace CMC derivátu snižuje riziko závažných zdravotních komplikací, jako porucha funkce orgánů, snížení fertility, potíže s bolestí a jiné [8].

Využití antimikrobiálních vlastností

Chitosan má významné antimikrobiální vlastnosti. Účinně působí při inhibici růstu bakterií. Existuje několik mechanismů inhibice. Jeden z nich je založen na interakci kladně nabitých aminoskupin chitosanu se záporně nabitými složkami buněčných membrán. Další se týká vnikání nízkomolekulárního chitosanu do buňky, kde způsobí částečnou inhibici mRNA navázáním na DNA. Chitosan může také chelatovat stopové kovy potřebné růstu mikroorganismů.

Bakterie můžeme rozdělit na grampozitivní a gramnegativní. Proti grampozitivním bakteriím je účinnější nízkomolekulární chitosan (470 kDa), zatímco proti gramnegativním bakteriím je účinnější chitosan o vyšší molekulové hmotnosti (1160 kDa). Baktericidní účinky proti grampozitivním bakteriím jsou však výrazně vyšší. Nízkomolekulární chitosan má oproti vysokomolekulárnímu mnohonásobně vyšší inhibiční účinek. Molekulová hmotnost chitosanu je tedy důležitým faktorem při inhibici růstu. Vysokomolekulární chitosan způsobí inhibici zastavením přívodu živin do bakterie, tím že zaplní její vnější povrch. Zatímco nízkomolekulární chitosan působí již dříve popsaným mechanismem.

Inhibice růstu kvasinek a plísní závisí na koncentraci chitosanu, teplotě a pH. Pokud se použije vyšší teplota a kyselé pH inhibiční účinek chitosanu se velmi zvýší. Přidání nanočástic stříbra do matrice obsahující chitosan může zlepšit antibakteriální aktivitu. Toho se využívá hlavně při výrobě biologicky rozložitelných chirurgických stehů [3][8][10].

Využití antioxidačních vlastností

Volné radikály a reaktivní formy kyslíku způsobují různé patologické jevy, jako buněčnou degradaci, poškození DNA, zánět a vznik nádorů. Tyto jevy následně vedou k řadě

onemocnění od diabetu, aterosklerózy, revmatoidní artritidy až k rakovině. Před oxidativním poškozením organismus vyvinul řadu ochranných antioxidačních systémů. Látky sloužící k ochraně před volnými radikály jsou antioxidanty. Chitosan také nachází uplatnění jako slibný antioxidant. Za přírodní antioxidant můžeme považovat chitosan o nízké molekulové hmotnosti, rozpustný ve vodě a částečně N-acetylovaný. Mechanismus účinku není doposud přesně popsán. Nejspíše je založen na reakci amino a hydroxyskupin vázaných na pyranozovém cyklu v pozicích 2, 3 a 6 s volnými radikály za vzniku stabilnějších radikálů [8][10].

Využití při výrobě léčiv

Chitosan se v dnešní době využívá jako nosič léčiv. CMC derivát se využívá jako nosič pro podávání protizánětlivých, antimikrobiálních a protinádorových léčiv. Výhodou je podání cílené dávky léčiva do organismu způsobem, který zvýší farmaceutickou dávku v místě potřeby. Tato interakce s nemocnou tkání zajistí prodloužené, lokalizované a cílené působení léčiva. Účinnost matrice je závislá na mnoha faktorech. Důležité je pH prostředí. Při pH 6,8 až 7,4 dochází k bobtnání a efektivnějšímu uvolňování léčiva. Další důležité faktory jsou biologická odbouratelnost, snadná aplikace, netoxičita produktů rozkladu a prodloužené uvolňování léčiva [8].

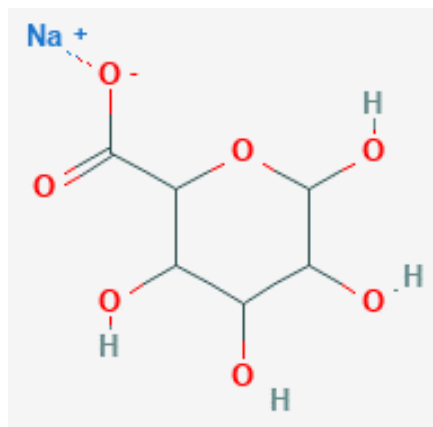
Chitosan se nejvíce využívá jako nosič protinádorového léčiva. Jeho účinnost je opět závislá na jeho vlastnostech. Nízkomolekulární chitosan vykazuje mnohem vyšší protinádorovou aktivitu než vysokomolekulární chitosan. Aplikuje se při léčbě nádorů močového měchýře, žaludku a tlustého střeva. Hlavní nevýhodou je však vysoká toxicita a špatná rozpustnost [10].

1.3 Alginát

Alginát je polymerní sacharid získaný extrakcí z hnědých mořských řas. V těchto řasách se vyskytuje jako složka buněčné stěny ve formě solí nerozpustných ve vodě. Zajišťuje řasám dostatečnou pevnost a pružnost. Stejnou funkci plní i pektin a celulóza u rostlin. Podle místa výskytu řas se liší jejich pevnost, která může ovlivnit schopnost alginátu tvořit gely. Změnou molekulárního složení kopolymerů mannuronátu a guluronátu přítomných v alginátu ovlivňuje rostlina pevnost gelu [11].

Nejběžněji využívané algináty se získávají z hnědých řas rodů *Macrocystis* nebo *Laminaria*. Alginát také produkují bakterie čeledi *Pseudomonadaceae* procesem fermentace. Tento typ však není v současné době komerčně dostupný [11].

Mezi algináty řadíme soli a deriváty kyseliny alginové. Nejvíce využívaným alginátem je alginát sodný. Pro získání požadovaných vlastností se algináty vytváří smícháním alginátů z různých zdrojů. Na obrázku č. 3 lze vidět strukturu alginátu sodného [11].



Obrázek 3 - Strukturní vzorec alginátu sodného (převzato z [12])

1.3.1 Struktura alginátu

Z chemického hlediska se jedná o polymery složené z β -1,4-D-mannuronové kyseliny a α -1,4-L-gulurové kyseliny. Konkrétně se jedná o blokové kopolymery, kdy kyselina β -1,4-D-mannuronová se označuje jako M-blok a kyselina α -1,4-L-gulurová jako G-blok. Uspořádány jsou do homopolymerních nebo heteropolymerních bloků. Homopolymerní blok je tvořen pouze polymery mannuronátu nebo guluronátu. Zatímco struktura heteropolymerního bloku závisí na kombinaci obou a zároveň i na jejich konformaci. Konformace a délka bloků ovlivňuje různé fyzikálně-chemické vlastnosti alginátů, jako jsou schopnost tvořit gel, a dále jeho rozpustnost a viskozitu [11].

1.3.2 Fyzikálně chemické vlastnosti

Roztoky alginátu mají schopnost tvořit gely. Můžeme využít dvě metody, a to acidifikaci a vazbu dvojmocného iontu. Při acidifikaci dochází k tvorbě gelu během protonace karboxylových skupin vlivem anorganické kyseliny, pokud pH roztoku alginátu klesne pod hodnotu pK_a kyseliny mannuronové a guluronové. U druhé metody se využívá schopnosti

alginátu vázat ionty, zejména Ca^{2+} , kdy po navázání iontu dojde k tvorbě gelu. Při vyšším množství G-bloků v polymeru se afinita pro vápník zvyšuje. Výslednou kvalitu gelu velmi ovlivňuje použitá metoda pro jeho tvorbu.

Viskozitu gelů vzniklých z alginátových roztoků ovlivňuje hned několik faktorů, například koncentrace alginátu, množství přítomných dvojmocných iontů, molekulová hmotnost a struktura alginátu a jiné.

Rozpustnost alginátu je závislá na typu použité soli. Ve vodě rozpustné jsou algináty sodné, draselné a amonné [11].

1.3.3 Aplikace alginátu

Alginát nachází uplatnění v mnoha oblastech. Už po desetiletí se využívá jeho vlastností v potravinářském průmyslu. Díky jeho schopnosti tvořit gely, stabilizační vlastnosti a schopnosti zadržet vodu se používá jako přísada při výrobě salátových zálivek nebo jogurtů [11].

Celosvětová epidemie obezity je v současné době velký problém. S obezitou dochází k rozvoji různých metabolických onemocnění, jako jsou různá kardiovaskulární onemocnění i diabetes mellitus typu 2. Proto se vědci snaží vyvinout účinné a zároveň bezpečné terapie pro zvládnutí obezity. Jedna z nich zahrnuje i alginát, který se užívá jako doplněk na hubnutí. Alginát má vliv na funkce žaludku, kontrolu glykémie a další mechanismy [11][13].

Vliv alginátu na metabolismus glukózy

Alginát má pozitivní vliv na metabolismus glukózy. Fyzikálně-chemické vlastnosti alginátových vláken mají velký vliv na jejich biologickou aktivitu. Molekulová hmotnost alginátu má účinky na postprandiální glykémii. Alginát s molekulovou hmotností 100 kDa má schopnost inhibovat odpověď organismu na inzulín. Zatímco alginát s molekulovou hmotností 50 kDa může dodatečně pozastavit glykemickou odezvu. Další faktor ovlivňující glykémii je přítomnost vápníku, který v kombinaci s alginátem významně snižuje glykemickou odpověď. Ovšem poměr mezi M- a G-bloky na ni nemá žádný vliv. Glykémii také výrazně ovlivňuje opožděné vyprazdňování žaludku způsobené alginátem [11].

Alginát má schopnost tvořit gely s vyšší viskozitou, čímž může působit na absorpci živin v tenkém střevě. Zvýšená viskozita tráveniny může způsobit její zpomalený průchod. Tím

se sníží rychlost absorpce glukózy a dojde ke zmírnění postprandiálních výkyvů glukózy. Alginát zároveň reaguje s trávicím traktem a může způsobit inhibici amyláz, ale i dalších trávicích enzymů, jako jsou proteázy či lipázy. Inhibice těchto enzymů způsobí zpomalení trávení a tím i absorpci živin [11].

Vliv alginátu na koncentraci lipidů v organismu

Porucha metabolismu lipidů je hlavním rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění. Sérová koncentrace triacylglycerolů a celkového cholesterolu je důležitým ukazatelem obezity. Ze studie na zvířatech bylo dokázáno, že alginát sníží hladinu celkového cholesterolu až o 68 %. Dále také snižuje hladinu LDL a HDL cholesterolu a triglyceridů. Alginát bohatý na G-bloky snižuje hypercholesterolémii až o 23 %, zatímco alginát s převahou M-bloků snižuje hladinu cholesterolu jen o 10 %. Pokud porovnáme vliv viskozity na snížení hladiny cholesterolu, tak alginát s nízkou viskozitou snižuje koncentraci cholesterolu. Ovšem alginát s vysokou viskozitou nemá na koncentraci cholesterolu žádný vliv.

Porucha enterohepatické cirkulace žlučových kyselin může mít za následek snižování hladiny cholesterolu. Při léčbě alginátem dochází ke zvýšenému vylučování cholesterolu a žlučových kyselin stolicí. Tato zvýšená ztráta se projevuje snížením hladiny cholesterolu v játrech. Dochází k vystavení LDL receptoru, na který se poté váže cholesterol přítomný v krvi. Po navázání je absorbován, čímž se sníží jeho hladina v krvi a klesá riziko kardiovaskulárních onemocnění [11][14].

V současné době není mnoho studií o vlivu alginátu na lidský organismus. Aplikace alginátu u pacientů s ileostomií způsobí sníženou absorpci tuku v ileu, zvýší resorpci žlučových kyselin, avšak nemá žádný vliv na koncentraci cholesterolu v plazmě. Jelikož se metabolismus lipidů u člověka a zvířat značně liší, nemohou být výsledky studií na zvířatech využity u člověka [11].

Vliv alginátu na zánětlivé cytokiny

TNF- α a IL-6 jsou prozánětlivé cytokiny. Lipopolysacharid je důležitý faktor ovlivňující permeabilitu a zánět střev. Koncentrace LPS, TNF- α a IL-6 slouží jako ukazatel zánětu v lidském těle. Při užití alginátu dochází jeho vlivem ke snížení hladiny LPS a IL-6 v séru. Avšak koncentrace TNF- α se zvýšila. Alginát tedy může zmírnit chronický zánět v těle [14].

Vliv alginátu na mikroživiny

Jelikož má alginát vliv na trávení živin a jejich adsorpci, může negativně ovlivnit biologickou dostupnost minerálů. Dochází ke snížení absorpce manganu a železa. Absorpce ostatních významných minerálů jako jsou vápník, zinek, hořčík a fosfor zůstává nezměněna. Dále také snižuje sérové koncentrace karotenoidů, například lycopenu nebo luteinu až o 70 %.

Užití alginátu sodného může mít negativní vliv na krevní tlak. Sodík je hlavní složka lidské plazmy. Při příjmu alginátu sodného dochází ke zvyšování koncentrace sodíku, a to má vliv na osmolaritu plazmy. Může dojít k aktivaci renin-angiotenzin-aldosteronového systému, který způsobí vazokonstrikci periferních cév. Následkem je poté zvýšení krevního tlaku. Zároveň se vlivem změny v osmolaritě plazmy aktivují osmoreceptory, a to vede k většímu pocitu žízně [11].

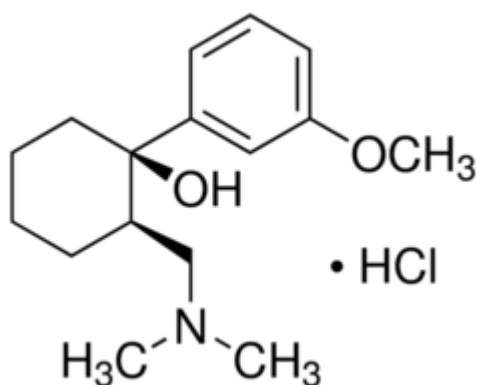
Využití při výrobě mikrokapslí

Alginát v kombinaci s chitosanem se využívá k výrobě mikrokapslí, které slouží jako nosiče pro léčiva s řízeným uvolňováním. Příkladem takového léčiva může být Tramadol hydrochlorid. Jejich důležitou vlastností je vysoká bobtnavost a s tou je spojena i vysoká pórovitost a drsnost povrchu. Ty mají velký vliv na kinetiku uvolňování léčiva. Pokud nastane kontakt kapslí s vodou nebo biologickou tekutinou, dojde k nabobtnání a léčivo začne difundovat do okolí. Při podávání těchto léčiv je naším cílem zajistit, aby se účinná látka začala uvolňovat až v tenkém střevě, kde dochází k největší absorpci látek. Využití alginátu je tedy výhodné, jelikož alginát v kyselém prostředí tolik nebobtná. Bobtnání a následné rozpouštění je realizováno až v neutrálním či bazickém prostředí střev. Mezi výhody těchto kapslí patří snížení frekvence podávání léčiva a zároveň je zachován požadovaný analgetický účinek. [15].

1.4 Tramadol hydrochlorid

Je slabé centrálně působící opioidní analgetikum. Byl vyvinut firmou Grünenthal s cílem předejít vzniku závislosti. Jeho výhodou je, že nemá tolik nežádoucích účinků jako jiné opioidní léky. Díky nízkým nákladům na výrobu a jednoduché syntéze je v současné době hodně využívaným léčivem [16].

Připravuje se syntézou z tramadolu s chlorovodíkem. Chemický vzorec je (\pm) -cis-2-(Dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol hydrochlorid. Někdy se také označuje jako tramadol HCl [17].



Obrázek 4 - Tramadol hydrochlorid (převzato z [17])

Řadí se mezi centrálně působící opioidní analgetika. Je agonistou opioidních receptorů μ , δ a κ a zároveň má vysokou afinitu k μ receptoru. Inhibuje také zpětné vychytávání noradrenalinu a serotoninu, čímž přispívá k analgetickému účinku. Mezi další výhody patří i antitusický účinek. Nezpůsobuje útlum dechového centra a gastrointestinální trakt ovlivňuje mnohem méně než ostatní opioidy. V současné době se používá k tlumení středně silné bolesti [16][18].

1.5 Pevné lékové formy

Nejčastěji využívanou formou léčiv při perorálním užívání jsou pevné formy léčiv, jako jsou tablety, tobolky, čípky, prášky, granuláty a jiné. Množství uvolněné účinné látky závisí na fyzikálně chemických vlastnostech tablet i na místě aplikace [19].

Pevné lékové formy můžeme také rozlišit podle způsobu uvolňování účinné látky. Máme lékové formy s běžným uvolňováním, u nichž očekáváme, že se 75 % účinné látky uvolní do 45 minut, po aplikaci. Dále máme lékové formy se zpožděným uvolňováním, které uvolňují účinnou látku částečně nebo úplně podle podmínek při aplikaci.

Ve své práci se zabývám matricovými tabletami s prodlouženým uvolňováním. U této formy dochází k postupnému uvolňování léčiva po dobu předem stanovenou. Důvodem pro vyvinutí těchto forem léčiv byly problémy vznikající po aplikaci obvyklých léků vícekrát denně. Nejčastěji docházelo ke vzniku nežádoucích komplikací vlivem nestálé hladiny léku v krvi [20][21].

1.5.1 Zkouška rozpadavosti

Při tomto testu se stanovuje, jestli se tableta rozpadne v tekutém médiu během stanovené doby za předem definovaných experimentálních podmínek. Rozpadavost neznamená v této zkoušce úplnou disoluci lékové formy ani její účinné látky. Jako úplný rozpad chápeme stav, kdy z tablety nezůstane žádný zbytek nebo pouze zbytky nerozpustného obsahu tablet. Podle velikosti tablet můžeme pro zkoušku rozpadavosti využít dva přístroje. Pro tablety s rozměrem nad 18 mm se využívá přístroj A. Přístroj B pak pro tablety s rozměrem nad 18 mm [20].

Firma Sotax nabízí celou řadu přístrojů pro zkoušku rozpadavosti. Nejnovější z nich je plně automatizovaný DT50. Jeho výhodou je snadná manipulace, velmi krátké doby ohřevu a 100 % záruka detekce koncového bodu při rozpadu tablet. Další významná firma dodávající tyto přístroje je Erweka, která nabízí automatický ZT 720. Výhodou je teplotní čidlo udržující stálou teplotu vodní lázně, možnost zabudování jedné nebo dvou zkušebních stanic a výběr typu koše buď pro 6 zkumavek na standardní tablety nebo 3 zkumavek pro tablety větší [22][23].



Obrázek 5 - DT50 pro zkoušku rozpadavosti (převzato z [22])



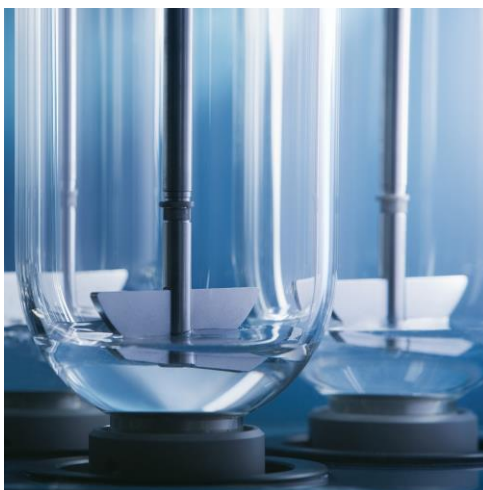
Obrázek 6 - ZT 720 pro zkoušku rozpadavosti (převzato z [23])

1.5.2 Disoluční zkouška

Disoluční zkouška slouží jako důležitá lékopisná kontrolní metoda pro stanovení pevných lékových forem. Díky ní se stanovuje množství uvolněné účinné látky v předepsaném čase při definovaných experimentálních podmínkách. Před zkouškou je důležité definovat základní podmínky, jako složení, objem a teplotu disolučního média, rychlost otáčení případně průtok disolučního roztoku. Také musíme definovat použité tablety. Jejich složení, druh a poměr použitých složek i podmínky při výrobě tablet. Pro disoluci perorálních léků lze využít přístroje s pádélky, košíčky, vratnou celou nebo průtokovou celou [24][25].

Přístroj s pádélky

Zařízení se skládá z válcových nádob s kulatým dnem tvořených ze skla nebo jiného průhledného inertního materiálu. Jednotlivé nádoby mají objem 1000 ml. Dále se přístroj skládá z motoru a hnací hřídele s pádélkem. Nádoby jsou umístěny ve vodní lázni opatřené vyhřívacím zařízením udržujícím teplotu na 37 °C. Lázeň také zajišťuje plynulý pohyb disolučního média. Celý prostor je krytý víkem, které omezuje odpařování. Uvnitř nádob jsou umístěny pádla tvořené hřídelí s lopatkovým míchadlem. Míchací jednotky jsou umístěny tak, aby se zajistil plynulý pohyb média a nedošlo k ovlivnění výsledků [20].



Obrázek 7 - Nádoba s pádélky od firmy Sotax (převzato z [22])

Přístroj s košíčky

Využívá se stejné zařízení jako u přístroje s pádélky, avšak jako míchací jednotka se používá hnací hřídel s válcovitým košíčkem. Hřídel může mít maximální odchylku 2 mm jinak by docházelo k porušení plynulé rotace [20].

Přístroj s vratným válcem

Tento typ přístroje využívá válcové nádoby s plochým dnem. Nádoby jsou opatřené skleněnými vratnými válci. Válce jsou překryty sítkou na horním a dolním konci, aby se zabránilo úniku tablety z válce. Zařízení je sestaveno tak, aby se předešlo porušení svislého pohybu válců uvnitř nádob [20].

Přístroj s průtokovou celou

Uspořádání přístroje je odlišné od předchozích typů. Skládá se ze zásobní nádoby s pumpou vytlačující disoluční médium skrze průtokovou celu. Cela je tvořena z průhledného inertního materiálu a je spojena s filtračním systémem zabraňujícím uniku částic z cely. Tabletou umístíme do spodní části cely na malé skleněné kuličky. Dále přístroj tvoří vodní lázeň udržující teplotu média [20].

V současné době patří mezi nejznámější dodavatele disolučních aparatur pro disoluční zkoušku Sotax nebo Erweka. Obě firmy nabízí tři druhy přístrojů určené pro zkoušku disoluce. Nejvíce využívané jsou plně automatické systémy na obrázcích, avšak nevýhodou je vysoká pořizovací cena. Příklady disolučních aparatur od obou firem jsou na obrázcích č. 8 a 9. Dále se často využívají poloautomatické. Existují také manuální umožňující přesnou mechanickou

kalibraci, avšak jejich hodnocení je ve srovnání s automatickými a poloautomatickými nejnižší [22][23].



Obrázek 8 - Plně automatizovaný systém RoboDis II od firmy Erweka (převzato z [23])



Obrázek 9 - Plně automatizovaný systém ATF Xtend s výsledky UV-Vis v reálném čase od firmy Sotax (převzato z [22])

1.5.3 Index bobtnání a eroze

Index bobtnání vyjadřuje schopnost tablety absorbovat vodu. Vypočítá se odečtením hmotnosti tablety suché od hmotnosti vlhké hydratované tablety [26].

Výpočet indexu bobtnání:

$$B = \frac{m_B}{m_0}$$

kde index bobtnání je označen B, m_B [g] hmotnost tablety po disoluci, m_0 [g] hmotnost tablety před disolucí [27].

Index eroze vyjadřuje ztrátu materiálu. K erozi může docházet na povrchu, ale i v celém objemu tablety. Proces eroze se využívá hlavně k uvolňování účinné látky z léčiv, které se špatně rozpouští [28].

Výpočet indexu eroze:

$$E = \left(1 - \frac{m_0 - m_s}{m_0}\right) * 100 [\%]$$

kde index eroze je označen E [%], m_0 [g] hmotnost tablety před disolucí, m_s [g] hmotnost tablety po vysušení [27].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K přípravě tablet s daným složením byly užity běžně užívané laboratorní přístroje. Pro porovnání vlivu disolučního média na rozpad tablet byly použity fotografie se stejným rozlišením.

2.1 Laboratorní přístroje a pomůcky

- lékovka a běžné laboratorní sklo
- lžička
- lisovací souprava
- analytické váhy Kern ALT 310-4AM (KERN & Sohn GmbH, Německo)
- vibrační mlýnek Retsch MM200
- mlecí komůrka
- hydraulický lis (TRYSTOM spol. s.r.o., Olomouc)
- disoluční jednotka SOTAX Smart AT7 (SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o.)
- UV-VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Německo)
- Fotoaparát 20,7 MP (součást mobilního telefonu Sony Xperia Z2)
- laboratorní vakuová sušárna Memmert
- termostat Julabo 26
- míchadlo s míchací kotvou Heidolph

2.2 Použité chemikálie

- Prosolv SMCC 90
- Tramadol hydrochlorid p. a.
- Stearát horečnatý p. a.
- Alginát sodný p. a.
- Chitosan p. a.
- redestilovaná voda
- HCl (35 %) p. a.
- NaCl p. a.
- octan sodný p. a.
- kyselina octová (min. 98 %)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ p. a.

- NaOH p. a.

2.3 Příprava disolučních médií

- Disoluční médium – roztok o pH 1,2

Příprava média:

500 ml 0,2 M NaCl + 850 ml 0,2 M HCl do 2 l doplněno redestilovanou vodou

- Disoluční médium – roztok o pH 2,2

Příprava média:

500 ml 0,2 M NaCl + 78 ml 0,2 M HCl do 2 l doplněno redestilovanou vodou

- Disoluční médium – roztok o pH 4,5

Příprava média:

5,89 g octanu sodného + 28 ml 2 M kyseliny octové do 2 l doplněno redestilovanou vodou

- Disoluční médium – roztok o pH 5,5

Příprava média:

11,96 g octanu sodného + 6 ml 2 M kyseliny octové do 2 l doplněno redestilovanou vodou

- Disoluční médium – roztok o pH 6,8

Příprava média:

15,374 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ rozpustit v 1600 ml redestilované vody + 1,8 g NaOH rozpustit v 100 ml redestilované vody, poté oba roztoky smíchat a doplnit na 2 l redestilovanou vodou

2.4 Použité PC programy

- programy použité pro vyhodnocení získaných dat – MS Excel 2010, OriginPro 9

2.5 Příprava a složení tablet

Zkoumané tablety byly připraveny z uvedených chemikálií podle tabulky č. 1, kdy tablety měly celkovou hmotnost 500 mg. K vytvoření homogenní směsi byl užit vibrační mlýnek a mlecí komůrka. Homogenizační rychlost byla 10, 13 a 15 rpm po dobu 60 sekund. Homogenní směs byla poté převedena do tabletovací formy. Ta byla umístěna do hydraulického lisu. Po nastavení lisovací síly 10 kN byly tablety lisovány po dobu 5 minut. Vytvořené tablety byly umístěny poté do lékovky.

Tabulka 1- Složení tablet v miligramech

Formulace	Prosolv SMCC90	Tramadol hydrochlorid	Stearát hořečnatý	Alginát sodný	Chitosan
Tableta	195 mg	100 mg	5 mg	100 mg	100 mg
Blank	200 mg	0 mg	5 mg	100 mg	100 mg

2.6 Studium rozpadu tablet během disolučního testu

Pro disoluční test byla vybrána pádélková metoda. Skleněné válcové nádoby byly naplněny 900 ml média o pH 1,2; 2,2; 4,5; 5,5 a 6,8. Vodní lázeň spolu s nádobami byla vytemperována na teplotu $37 \pm 0,5$ °C. Poté byla nastavena vybraná metoda s nastavenou rychlostí míchání 100 rpm. Po vytemperování soustavy byly tablety ve speciálních nosičích vloženy do jednotlivých nádob. Disoluce trvala 24 hodin. Při testu bylo získáno 29 odběrů (v intervalech 24x15min, 4x60 min, 1x840 min), které byly následně proměřeny spektrofotometricky. Během disoluce byly tablety pozorovány a bylo pořízeno video pro následné porovnání vlivu disolučních médií na rozpad tablet. Dále byly tablety váženy před disolucí, po proběhnutí testu a po 24-hodinovém sušení v sušárně při teplotě 40 °C. Ze získaných hmotností byly vypočítány indexy bobtnání a eroze.

2.7 Stanovení tramadol hydrochloridu pomocí UV/VIS spekter

Po ukončení 24-hodinové disoluce byly odebrané vzorky média, v němž se tableta rozpouštěla, proměřeny. Pomocí UV/VIS spektrometrie bylo stanoveno množství uvolněné účinné látky. Při vlnové délce 271 nm byla odečtena hodnota absorbance proti médiu v němž se tableta rozpouštěla. Získaná vlnová délka odpovídá absorpčnímu maximu pro tramadol. Pro přepočet absorbance na koncentraci byla použita metoda kalibrační křivky. Rovnice kalibrační křivky byly převzaty z předchozích prací. Z bakalářské práce Disoluční kinetika léčiva Tralgit s účinnou látkou tramadol hydrochlorid od Pavli Filípkové [29] a z diplomové práce Kevina Matzicka s názvem In vitro disoluční testování matricových tablet s tramadol hydrochloridem [30].

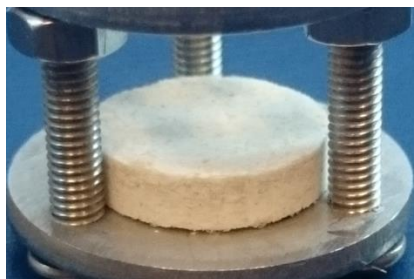
2.8 Stanovení indexu bobtnání a eroze

Pro stanovení indexu bobtnání a eroze byly provedeny kromě 24-hodinových disolucí i kratší 2 a 4 hodinové disoluce. Provedení 24-hodinové disoluce bylo popsáno v oddíle 2.6. Pro provedení kratších testů byl využit termostat s míchadlem opatřeným míchací kotvou. Tablety byly váženy i s nosičem před disolucí, po ukončení testu a po 24-hodinovém sušení v sušárně. Z výsledných hmotností byly vypočítány indexy bobtnání a eroze a ty byly následně porovnávány.

3 VÝSLEDKY

3.1 Disoluční test

Při dvaceti čtyř hodinových disolucích byly tablety vyfoceny před vložením, po disoluci a po vysušení. Zároveň byl pokus zaznamenáván pomocí videa v HD kvalitě.



Obrázek 10 - Tableta před disolucí

Tablety vždy o stejném složení byly podrobeny disolučnímu testu a byl zkoumán vliv různých disolučních médií na rozpad tablety. Obsah TH byl poté stanoven pomocí UV/VIS spektrometrie. Indexy bobtnání a eroze byly stanoveny pomocí měření úbytku hmotnosti jednotlivých tablet.

3.2 Chování tablet v různých disolučních médiích

3.2.1 Kyselé disoluční médium pH 1,2

Změna tvaru tablet po proběhnutí disolučního testu a po vysušení je uvedena na obrázcích č. 11 a 12. K nabobtnání došlo během prvních pěti minut disoluce po vložení do média. Poté docházelo k jejich pomalému rozpadu. Z obrázku je patrný průnik média až k jádrům tablet. Tableta po 2-hodinové disoluci byla nabobtnaná nejméně a vytvořila houbovitý útvar. Tableta po 4-hodinové disoluci byla nabobtnaná více než po dvou hodinách disoluce, zároveň začala zvětšovat svůj objem. Tableta maximálního nabobtnání a objemu dosáhla po 24 hodinách testu. Během testu se z tablet uvolňovaly drobné částice, avšak tablety zůstaly v celku. Po vysušení vytvořily všechny tablety houbovitý útvar uprostřed nosiče.

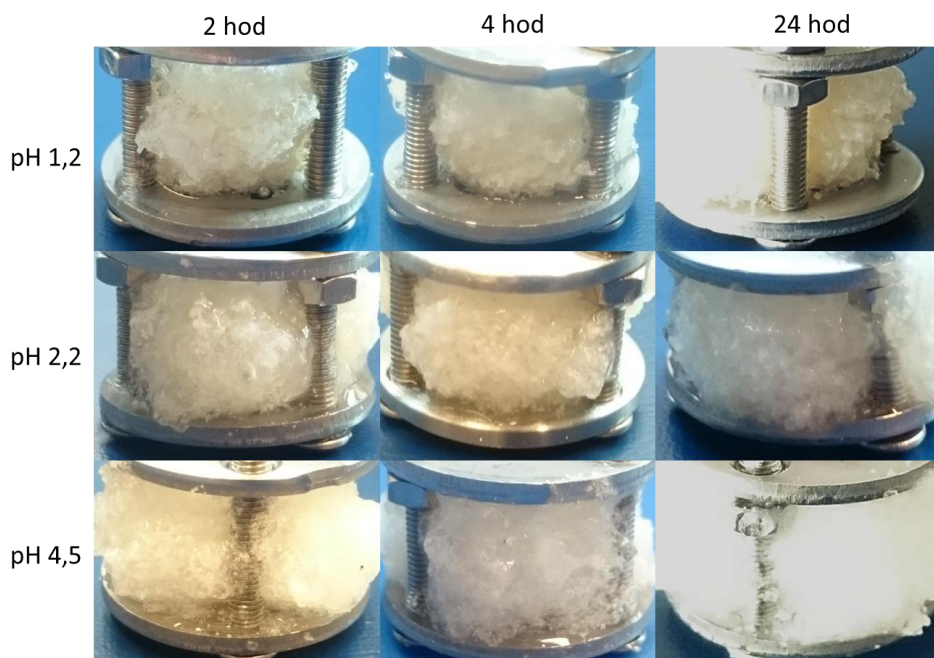
3.2.2 Kyselé disoluční médium pH 2,2

V médiu o pH 2,2 je změna tvaru tablet uvedena na obrázcích č. 11 a 12. Tablety nabobtnaly během prvních pěti minut disoluce a poté docházelo k jejich pomalému rozpadu, jako u pH 1,2. Médium opět proniklo až k pevnému jádru tablet. Při porovnání tablet podle časů ukončení disoluce je patrné, že tablety nabobtnaly mnohem více než u pH 1,2. Po disolucích

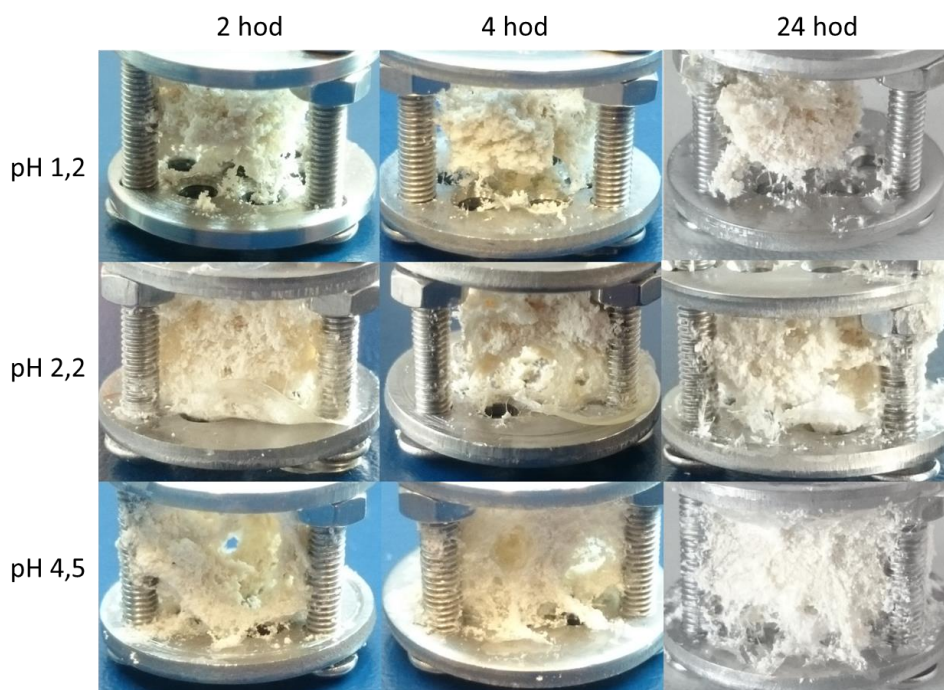
byly tablety nabobtnané do stran, avšak nejvíce po 24-hodinové disoluci. Během testu docházelo opět k uvolňování malých částic tablet do média, ale tablety zůstaly v celku. Jelikož byly tablety více nabobtnané, nevytvořily houbovitý tvar po vysušení, ale vyplnily vnitřní prostor nosiče.

3.2.3 Octanový pufr pH 4,5

Tvar tablet v médiu o pH 4,5 po disoluci a sušení je na obrázcích č. 11 a 12. Po vložení tablet do nádoby s médiem došlo k rychlému průniku média do jádra tablet, což vedlo k jejich nabobtnání do pěti minut. Dále docházelo k jejich pomalému rozpadu jako u předchozích médií. V porovnání s médiem o pH 1,2 a 2,2 nabobtnaly tablety v tomto médiu nejvíce a vyplnily celý prostor nosiče. Při porovnání časových záznamů je vidět, že tableta po 24-hodinovém testu byla maximálně nabobtnaná. Při testu se uvolňovalo mnohem více malých částic tablety do média než u předchozích, avšak tablety zůstaly stále v celku. Po vysušení tablety nevytvořily žádný útvar. Byly nabobtnané po celém nosiči. Dále byly také viditelné otvory uprostřed zbytků tablet.



Obrázek 11 - Tablety po disoluci



Obrázek 12 - Tablety po sušení

3.2.4 Octanový pufr pH 5,5

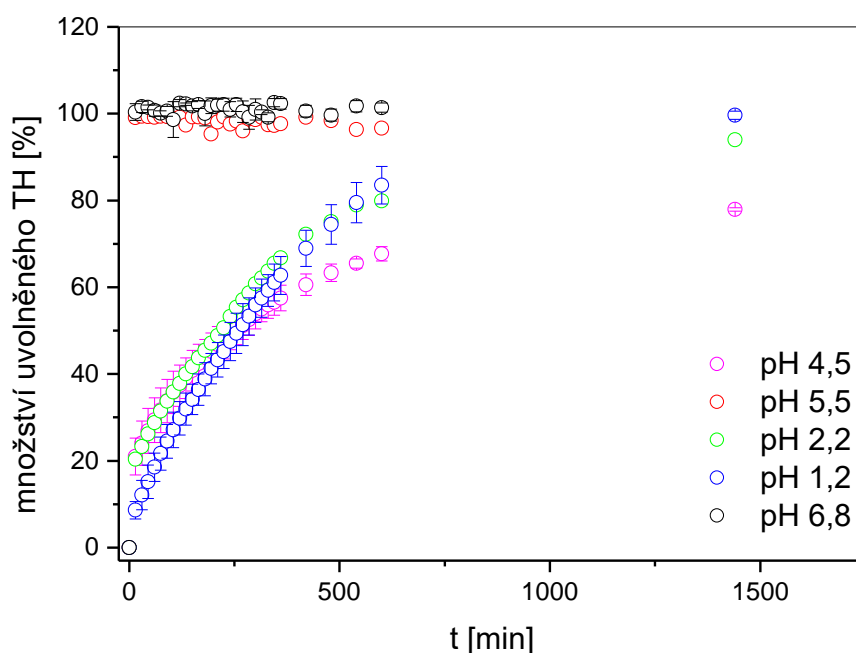
Při provedení testu v médiu o pH 5,5 se tablety rozpadly na malé částice během prvních 2 až 3 minut testu. Při porovnání s předchozími médii byly částice mnohonásobně větší.

3.2.5 Fosfátový pufr pH 6,8

V tomto médiu se tablety rozpadly po prvních 2 až 3 minutách, jako v médiu o pH 5,5. Velikost částic byla srovnatelná s částicemi v médiích o pH 1,2; 2,2 a 4,5.

3.3 Disoluční profil tablet s TH

Pro získání disolučních profilů studovaného léčiva byly disoluční testy provedeny se třemi stejnými tabletami. Obrázek č. 13 zobrazuje závislost množství uvolněného TH na čase. V případě disolučních profilů TH v disolučním médiu o pH 1,2; 4,5 a 6,8 jsou vyneseny body průměrných hodnot se směrodatnými odchylkami. U disolučních profilů TH v disolučním médiu o pH 2,2 a 5,5 nebyly průměrné směrodatné odchylky počítány, jelikož disoluce v těchto disolučních médiích byly pouze informativní.



Obrázek 13 - Množství uvolněného tramadol hydrochloridu v závislosti na čase

3.4 Index bobtnání a eroze

Pro výpočet indexu bobtnání a eroze byly tablety v nosiči váženy před disolucí, po ukončení testu a po 24-hodinovém sušení. Index bobtnání je definován jako množství vody, kterou tableta absorbovala. Oproti tomu index eroze odpovídá procentuální ztrátě materiálu tablety. Z dat 24-hodinových disolucí byly odvozeny časy kratších disolucí, kdy bylo množství uvolněného tramadolu 50 a 85 %. Na základě hmotností získaných z 2 a 4 hodinových disolucí, byly vypočteny indexy bobtnání a eroze v časech 2, 4 a 24 hodin, které jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Příklad výpočtu indexu bobtnání:

$$B = \frac{m_B}{m_0} = \frac{15,3577}{12,9976} = 1,18158$$

Příklad výpočtu indexu eroze:

$$E = \left(1 - \frac{m_0 - m_S}{m_0}\right) * 100 = \left(1 - \frac{12,9976 - 12,8882}{12,9976}\right) * 100 = 99,15831 \%$$

Tabulka 2 - Hmotnosti tablet, indexy bobtnání a eroze pro různá disoluční média

pH	čas (hod)	hmotnost v nosiči před disolucí	hmotnost v nosiči po disoluci	hmotnost v nosiči po vysušení	index bobtnání B	index eroze E (%)
1,2	2	12,9976	15,3577	12,8882	1,18158	99,15831
		13,6629	15,9517	13,5726	1,16752	99,33909
	4	13,7157	16,1696	13,5979	1,17891	99,14113
		13,6604	16,4558	13,5379	1,20464	99,10325
	24	13,7998	18,5085	13,6383	1,266875	98,82969
2,2		13,9966	16,4097	12,8278	1,26262	98,70119
	2	13,7315	16,6757	13,6196	1,21441	99,18509
		13,7309	16,8689	13,6254	1,22854	99,23166
	4	13,7991	16,8779	13,6486	1,22312	98,90935
		13,0024	15,8530	12,8275	1,21924	98,65486
4,5	24	13,7950	17,7020	13,6254	1,28322	98,77057
	2	12,9969	16,3547	12,7035	1,25835	97,74254
		13,7962	17,3930	13,6376	1,26071	98,85041
	4	13,7340	17,1935	13,4874	1,25189	98,20446
		138019	16,8273	13,5590	1,21920	98,24009
4,5	24	13,7929	18,8464	13,5964	1,36638	98,57535
		13,6634	18,5705	13,4478	1,35914	98,42206
		13,7129	18,5538	13,5138	1,35302	98,54808

3.5 Diskuze výsledků

Ze získaných dat bylo provedeno porovnání vlivu disolučních médií na rozpad matricových tablet s účinnou látkou tramadol hydrochlorid. Porovnávány byly pH 1,2; 2,2 a 4,5 u nichž byly získány hodnoty indexů bobtnání a eroze. Disoluce při použití disolučních médií o pH 5,5 a 6,8 postrádají charakter postupného uvolňování, jelikož se tablety rozpadly ihned po vložení do média.

U pH 1,2 byl stanovený index bobtnání nejmenší. Zatímco index eroze byl největší ze všech porovnávaných pH. Záznamy tablet na obrázcích č. 11 a 12 potvrzují vypočtené indexy.

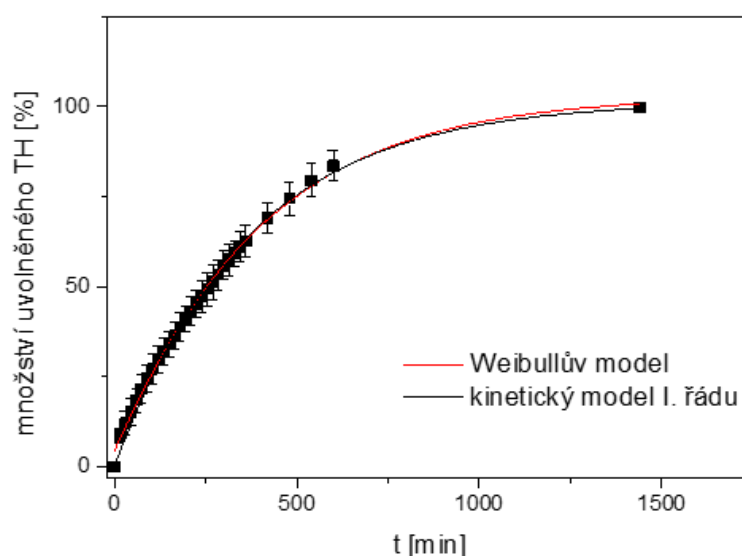
Z obrázku č. 11 a 12 vyplývá, že tablety vložené do pH 2,2 měly vyšší index bobtnání, avšak index eroze se mírně snížil, oproti předchozímu pH. Vypočtené indexy bobtnání a eroze naše závěry potvrdily.

V případě pH 4,5 z vypočtených indexů vyplývá, že index bobtnání dosáhl nejvyšší hodnoty ze všech pH. Index eroze byl však nejnižší ze všech. Obrázky č. 11 a 12 potvrdily tyto závěry.

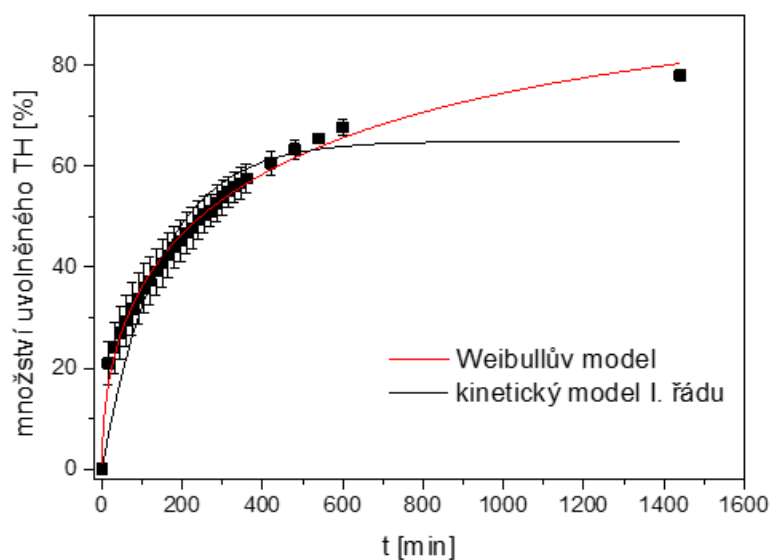
Je tedy zřejmé, že pH disolučních médií je zásadním faktorem působícím na míru bobtnání a eroze. Se zvyšujícím se pH se míra bobtnání zvyšuje, zatímco stupeň eroze stoupá se snižujícím se pH.

Jak je vidět na obrázku č. 13, prodloužené uvolňování TH z matricových tablet bylo možné pozorovat v prostředí média o pH 1,2; 2,2 a 4,5. Zatímco při disoluci v médiu o pH 5,5 a 6,8 došlo k uvolnění účinné látky do 5 minut disolučního testu, což odpovídá charakteru okamžitého uvolňování.

Získané disoluční profily byly dále zpracovány pomocí nelineární regresní analýzy za použití dvou nejvíce využívaných modelů (statistický Weibullův model, kinetický model I. řádu). Je zřejmé, že disoluční médium o pH 1,2 po provedení nelineární regresní analýzy vyhovuje oběma použitým modelům: Weibullovu modelu i kinetickému modelu I. řádu. V případě disolučního média o pH 4,5 vyhovuje pouze Weibullův model, zatímco kinetický model I. řádu tomuto pH nevyhovuje.



Obrázek 14 - Nelineární regresní analýza disolučního profilu tramadol hydrochloridu v disolučním médiu o pH 1,2



Obrázek 15 - Nelineární regresní analýza disolučního profilu tramadol hydrochloridu v disolučním médiu o pH 4,5

Na základě grafického vyhodnocení na obrázku č. 13 byly získány časy t_{50} . Tato hodnota nás informuje o čase, kdy se uvolnilo již 50 % účinné látky do média. V případě disolučního média o pH 1,2 byl čas t_{50} roven 264 minutám, pro médium o pH 2,2 byl t_{50} 220 minut a pro pH 4,5 byla hodnota t_{50} 245 minut.

Tabulka 3 - Čas uvolnění 50 % tramadol hydrochloridu u jednotlivých médií

pH	t_{50} [min]
1,2	264
2,2	220
4,5	245

4 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnout a zhodnotit vlastnosti přírodních biopolymerů chitinu, chitosanu a alginátu z hlediska účinku na lidský organismus, dále také prozkoumat použití těchto polymerů při přípravě léčiv s účinnou látkou tramadol hydrochlorid. Součástí práce bylo i sledování vizuálních změn tablet během jejich rozpadu vlivem různých disolučních médií. Pro posouzení způsobu rozpadu bylo využito vizuálního sledování disolučního testu s pádélkovou metodou. Byl stanoven disoluční profil studovaného léčiva s tramadol hydrochloridem ve všech disolučních médiích.

Dále bylo zjištěno, že pH disolučního média je důležitým faktorem pro rozpad matricových tablet s účinnou látkou tramadol hydrochlorid. Je zřejmé, že se zvyšujícím se pH se zvyšuje stupeň bobtnání. Zatímco se snižujícím se pH se zvyšuje stupeň eroze. Pokud došlo k překročení určité hodnoty pH tablety se rozpadly na drobné částice, které měly různou velikost podle daného pH.

Na základě získaných výsledků bych chtěla navrhnout další postup výzkumu v této oblasti. Jelikož tablety byly zkoumány pouze v jedné formulaci, bylo by dobré vyzkoušet i další poměry látek, což by mohlo přispět k širšímu popisu nalezených jevů.

5 LITERATURA

- [1] JACOB, Joby, Józef T. HAPONIUK, Sabu THOMAS a Sreeraj GOPI. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. *Materials Today Chemistry*. 2018, **9**(1), 43-55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2018.05.002>. ISSN 2468-5194.
- [2] RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, **31**(7), 603-632. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>. ISSN 0079-6700.
- [3] YEUL, Vijay S. a Sadhana S. RAYALU. Unprecedented Chitin and Chitosan: A Chemical Overview. *Journal of polymers and the Environment*. 2013, **21**(2), 606-614. DOI: 10.1007/s10924-012-0458-x. ISSN 1566-2543.
- [4] KOMI, Daniel Elieh Ali, Lokesh SHARMA a Charles S. DELA CRUZ. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2018, **54**(2), 213-223. DOI: 10.1007/s12016-017-8600-0. ISSN 1080-0549.
- [5] *Chitin from shrimp shells* [online]. Praha: SIGMA-ALDRICH, 2019 [cit. 2019-06-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c7170?lang=en@ion=CZ>
- [6] *Chitosan* [online]. Bethesda: PubChem, 2005 [cit. 2019-06-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chitosan>
- [7] *Chitosan* [online]. Praha: SIGMA-ALDRICH, 2019 [cit. 2019-06-01]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c3646?lang=en@ion=CZ>
- [8] ZAHRA, Shariantinia. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018, **120**(B), 1406-1419. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.131>. ISSN 0141-8130.
- [9] MORI, Takashi, Masaaki MURAKAMI, Masahiro OKUMURA, Tsuyoshi KADOSAWA, Toshimitsu UEDE a Toru FUJINAGA. Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2005, **67**(1), 51-56. DOI: 10.1292/jvms.67.51. ISSN 1347-7439.
- [10] VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. CHITOSAN A JEHO FARMACEUTICKÉ APLIKACE. *Chemické listy*. 2009, **103**(1), 56-65. ISSN 1213-7103.
- [11] JENSEN, M. Georg, C. PEDERSEN, M. KRISTENSEN, G. FROST a A. ASTRUP. Review: efficacy of alginate supplementation in relation to appetite regulation and

- metabolic risk factors: evidence from animal and human studies. *OBESITY REVIEWS*. 2013, **14**(2), 129-144. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2012.01056.x. ISSN 1467-7881.
- [12] *Sodium alginate* [online]. Bethesda: PubChem, 2005 [cit. 2019-06-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5102882#section=Structures>
- [13] ODUNSI, Suwebatu T., Maria I. VAZQUEZ-ROQUE, Michael CAMILLERI, et al. Effect of Alginate on Satiety, Appetite, Gastric Function, and Selected Gut Satiety Hormones in Overweight and Obesity. *OBESITY*. 2010, **18**(8), 1579-1584. DOI: 10.1038/oby.2009.421. ISSN 1930-7381.
- [14] WANG, Xiong, Fang LIU, Yuan GAO, Chang-hu XUE, Robert W. LI a Quing-juan TANG. Transcriptome analysis revealed anti-obesity effects of the Sodium Alginate in high-fat diet-induced obese mice. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*. 2018, **115**(1), 861-870. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.042. ISSN 0141-8130.
- [15] ACOSTA, N., I. ARANAZ, C. PENICHE a A. HERAS. Tramadol release from a delivery system based on alginate-chitosan microcapsules. *MACROMOLECULAR BIOSCIENCE*. 2003, **3**(10), 546-551. DOI: 10.1002/mabi.200300009. ISSN 1616-5187.
- [16] RÁDL, Stanislav. TRAMADOL OPĚT VE STŘEDU ZÁJMU. *Chemické listy*. 2016, **110**(2), 662-665. ISSN 1213-7103.
- [17] *Tramadol hydrochloride* [online]. Praha: SIGMA-ALDRICH, 2019 [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/42965?lang=en&ion=CZ>
- [18] *TRAMADOL SANDOZ RETARD 200MG Tableta s prodlouženým uvolňováním* [online]. Praha: SÚKL, 2018 [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: *Tramadol hydrochloride* [online]. Praha: SIGMA-ALDRICH, 2019 [cit. 2019-06-15]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/42965?lang=en&ion=CZ>
- [19] *léčích* [online]. Praha: SÚKL, 2019 [cit. 2019-06-06]. Dostupné z: <http://www.olecich.cz>
- [20] *Český lékopis 2009 (ČL 2009) Pharmacopoea Bohemica MMIX (Ph. B. MMIX)*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7., s. 320, s.324-326, s. 332
- [21] RABIŠKOVÁ CSC, Miroslava a Vítězslava FRIČOVÁ. Perorální formy s řízeným uvolňováním léčiv. *Praktické lékařství*. 2008, **4**(4), 186-190. ISSN 1803-5329.
- [22] *Solutions for Pharmaceutical Testing*. [online]. Praha: SOTAX Pharmaceutical Testing, 2019 [cit. 2019-06-19]. Dostupné z: <https://www.sotax.com>

- [23] ERWEKA GmbH: *Home* [online]. Langen: ERWEKA, 2019 [cit. 2019-06-19].
Dostupné z: <https://www.erweka.com>
- [24] DVOŘÁČKOVÁ, Kateřina, Tereza BAUTZOVÁ a Miroslava RABIŠKOVÁ. DISOLUČNÍ STUDIE V HODNOCENÍ PERORÁLNÍCH LÉKŮ S ŘÍZENÝM UVOLŇOVÁNÍM LÉČIVA. *Chemické listy*. 2011, **105**(1), 50-54. ISSN 1213-7103.
- [25] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR; 2014; Zkouška disoluce pevných lékových forem; Český lékopis 2009 a Doplnky 2010 – 2016; 1. vydání; Praha: GRADA Publishing a. s.; 11199-11204; ISBN: 978-80-247-2994-7
- [26] KEIICHI, Taniguchi a Kakuta HIROTOSHI. Bixalomer, a novel phosphate binder with a small swelling index, improves hyperphosphatemia in chronic kidney disease rat. *European Journal of Pharmacology*. 2015, **766**(1), 129-134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.001>. ISSN 0014-2999.
- [27] ZOUNAROVÁ, Martina. *Degradace nosičů léčiv in vitro*. Hradec Králové, 2009. Rigorózní práce. Univerzita Karlova.
- [28] MAGNE, Aplsten, Björn BAKE, Ulf E. JONSSON, Maria ERIKSSON-LEPKOWSKA a Annhild LARSSON. Drug absorption from nifedipine hydrophilic matrix extended-release (ER) tablet-comparison with an osmotic pump tablet and effect of food. *Journal of Controlled Release*. 1998, **52**(3), 301-310. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00267-8). ISSN 0168-3659.
- [29] FILÍPKOVÁ, Pavla. Disoluční kinetika léčiva Tralgit s účinnou látkou tramadol hydrochlorid. Pardubice, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice.
- [30] MATZICK, Kevin. In vitro disoluční testování matricových tablet s tramadol hydrochloridem. Pardubice, 2018. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.