

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie



Diplomová práce

Sprejové sušení suspenze léčiva v roztoku
chitosanu

Spray drying of a suspension of the drug in a solution of chitosan

Hradec Králové, 2021

Eva Bartoňová

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

V Hradci Králové, Eva Bartoňová

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce PharmDr. Petře Svačinové, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, za věcné připomínky, rady a za čas, který mi věnovala. Poděkování patří také Mgr. Janě Brokešové, Mgr. Tereze Vařilové a Lence Svobodové, za pomoc s realizací experimentální části práce.

Chtěla bych také poděkovat své rodině a partnerovi za poskytnutou podporu při vypracovávání práce a při studiu.

Obsah

1	ABSTRAKT	6
2	ABSTRACT.....	8
3	ZADÁNÍ A CÍLE PRÁCE	10
4	ÚVOD.....	11
5	TEORETICKÁ ČÁST	12
5.1	Chitosan.....	12
5.1.1	Vlastnosti	12
5.1.2	Využití	15
5.2	Bezpečnost použití chitosanu a toxicita	23
5.2.1	Farmakokinetika	23
5.2.2	Toxicita	23
5.3	Sprejové sušení.....	25
5.4	Příklady sprejově sušeného chitosanu.....	27
5.4.1	Sprejově sušené částice chitosanu a ibuprofenu	27
5.4.2	Sprejově sušené mikrosféry chitosanu a H ₂ -antagonistů	28
5.4.3	Sprejově sušené mikročástice chitosanu a salbutamol-sulfátu	29
5.4.4	Sprejově sušené mikročástice chitosanu a methotrexátu	32
5.4.5	Mikrosféry chitosanu a paracetamolu připravené sprejovým sušením	33
5.4.6	Sprejově sušené mikročástice chitosanu a venlafaxinu	34
5.4.7	Mukoadhezivní mikrosféry na bázi chitosanu připravené sprejovým sušením pro oromukosální podání léčiv	36
5.4.8	Sprejově sušené částice chitosanu a celekoxibu	37
5.4.9	Sprejově sušené mikročástice chitosanu a kyseliny kávové.....	39
5.4.10	Chitosanové mikročástice připravené sprejovým sušením.....	40

6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
6.1	Použité suroviny	42
6.2	Použité přístroje	42
6.3	Metody přípravy	44
6.3.1	Sprejové sušení	44
6.3.2	Optická mikroskopie	45
6.3.3	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	46
6.3.4	Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)	46
6.3.5	Disoluce a spektrofotometrie	47
7	DISKUZE A VÝSLEDKY	50
7.1.1	Vliv koncentrace roztoku a parametrů sušení na vzhled částic	52
7.2	Vyhodnocení tepelných vlastností vzniklých částic pomocí DSC	61
7.3	Hodnocení uvolňování léčiva zkouškou disoluce a spektrofotometrie	68
8	ZÁVĚR	75
9	BIBLIOGRAFIE	77

1 ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutická technologie

Školitel: PharmDr. Petra Svačinová, Ph.D.

Posluchač: Eva Bartoňová

Název diplomové práce: Sprejové sušení suspenze léčiva v roztoku chitosanu

Při sprejovém sušení dochází k přeměně kapalného roztoku, suspenze nebo emulze na pevné částice za pomoci horkého sušicího média. Nastavené parametry sušení mohou ovlivnit vlastnosti vzniklých částic. Tato práce se zabývá přípravou částic ze suspenze meloxikamu v roztoku chitosanu a vlivem parametrů sušení a koncentrace tohoto roztoku na vlastnosti částic. Koncentrace roztoku byla 0,5 %, 1 %, 1,5 % a 2 %. Vstupní teplota byla nastavena na 170, 190 a 210 °C. Vzorek o koncentraci 2 % nebyl sušen, vzhledem k vysoké viskozitě a ucpávání trysky.

Částice byly hodnoceny pomocí optické mikroskopie, skenovací elektronové mikroskopie (SEM), diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC) a dále byla použita disoluční zkouška k hodnocení uvolňování léčiva z částic. Pomocí DSC byla provedena dvě měření, první M1 po usušení částic a druhé M2 po 6 měsících.

Vzniklé částice byly kulovitěho nepravidelného tvaru a tvořily shluky. Na tvar částic neměla vliv koncentrace roztoku, ani teplota sušení. Na DSC termogramech byly viditelné píky dehydratace chitosanu (70,5–92,6 °C), teploty tání meloxikamu (248,6–251,4 °C) a dekompozice meloxikamu (250,8–253,8 °C). Po druhém měření byly pozorovány změny teplot zejména u dehydratace chitosanu až o 17,8 °C. Změny ve vzorcích meloxikamu byly minimální, meloxikam se tedy v částicích nachází ve stabilní formě. Po disoluční zkoušce bylo zjištěno vyšší uvolnění léčiva v porovnání se samotným meloxikamem a u 0,5% a 1% koncentrace také v porovnání s fyzikální směsí. Přímá závislost koncentrace a vstupní teploty na uvolňování léčiva nebyla

pozorována. S rostoucím množstvím chitosanu se zvýšilo uvolnění léčiva z fyzikální směsi.

2 ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultant: PharmDr. Petra Svačinová, Ph.D.

Student: Eva Bartoňová

Title of Thesis: Spray drying of a suspension of the drug in a solution of chitosan

During spray drying a liquid solution, suspension, or emulsion is converted to solid particles by means of a hot drying medium. The set drying parameters can affect the properties of the resulting particles. This work deals with the preparation of particles from a suspension of meloxicam in a solution of chitosan and the influence of the drying parameters and the concentration of this solution on the properties of the particles. The concentration of the solution was 0,5 %, 1 %, 1,5 % and 2 %. The inlet temperature was set at 170, 190 and 210 °C. The 2% sample was not dried due to high viscosity and nozzle clogging.

The particles were evaluated by optical microscopy, scanning electron microscopy (SEM), differential scanning calorimetry (DSC) and a dissolution test was used to evaluate the drug release from the particles. Two measurements were performed by DSC, the first M1 after drying the particles and the second M2 after 6 months.

The resulting particles were spherical and irregular in shape and formed clumps. The particle shape was not affected by the solution concentration or the drying temperature. Peaks of chitosan dehydration (70.5–92.6 °C), melting points of meloxicam (248.6–251.4 °C) and decomposition of meloxicam (250.8–253.8 °C) were visible on DSC thermograms. After the second measurement, temperature changes were observed, especially in the dehydration of chitosan by up to 17.8 °C. The changes in meloxicam samples were minimal, so meloxicam is in a stable form in the particles. After the dissolution test, a higher drug release was found compared to meloxicam and

at 0.5% and 1% concentrations also, compared to the physical mixture. No direct dependence of concentration and inlet temperature on drug release was observed. With increasing amounts of chitosan, the release of the drug from the physical mixture increased.

3 ZADÁNÍ A CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je příprava sprejově sušených částic s obsahem chitosanu a léčivé látky a jejich následné hodnocení. Experiment bude zaměřen především na ověření praktické proveditelnosti sprejového sušení viskózních roztoků a nastavení postupů přípravy částic a jejich hodnocení.

Částice budou připraveny z roztoků chitosanu v ředěné kyselině octové, léčivá látka bude v tomto roztoku suspendovaná. Sušení bude probíhat při různé teplotě. Vliv teploty sušení a koncentrace chitosanu na vzhled částic bude dále sledován mikroskopicky, pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie budou zkoumány tepelné charakteristiky připravených materiálů a vliv chitosanu na uvolňování léčiva bude hodnocen disoluční zkouškou.

Získané výsledky budou sloužit k nastavení parametrů sprejového sušení a nastavení metodiky hodnocení sprejově sušených částic s obsahem chitosanu a budou následně využity pro další experimenty.

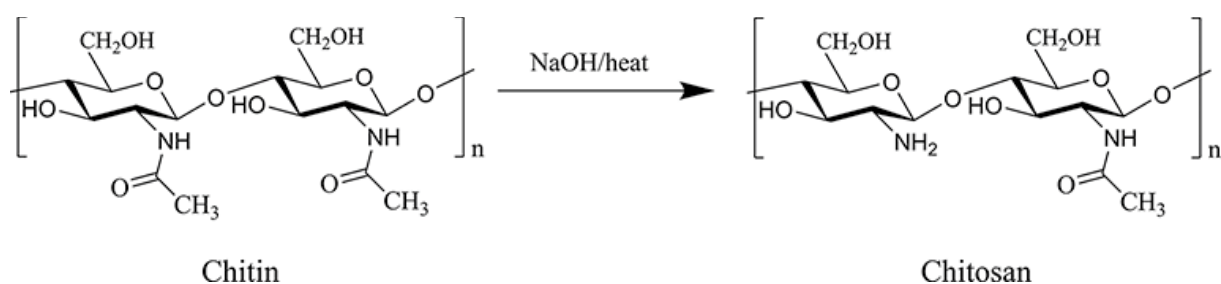
4 ÚVOD

Sprejové sušení je metoda, při které dochází k vysušení původního roztoku, suspenze, nebo emulze na suché částice látky nebo látek, které byly pro přípravu kapalného vzorku použity. Kapalina je při sušení rozprašována (atomizována) do sušicí komory a sušena horkým plynem. Díky odpařování rozpouštědla dochází k tvorbě malých částic, které jsou následně přepraveny pomocí cyklonu do sběrné nádoby. Ovlivnění parametrů sprejového sušení nebo složení a vlastností kapaliny může vést ke změnám vlastností produktu. Ve farmacii se tato metoda využívá pro svou rychlost a nízký obsah vlhkosti v produktu, pro přípravu lékových forem s řízeným uvolňováním, inhalačních forem, nebo například pro zvýšení biodostupnosti. Chitosan je biopolymerní látka, která nachází využití například v potravinářství, zemědělství a také ve farmacii při podání léčiv, u kterých zvyšuje permeaci. Vzhledem k vývoji léčiv, která jsou špatně rozpustná ve vodném prostředí, může být problémem formulace těchto látek do lékových forem, které musí zajistit dostatečnou biologickou dostupnost. Sprejové sušení patří k metodám, kterými mohou být připraveny částice, jejichž vlastnosti vedou ke zvýšení rozpustnosti špatně rozpustných léčiv. V této diplomové práci byly sprejovým sušením připraveny částice ze suspenze meloxicamu v roztoku chitosanu. [1] [2] [3] [4]

5 TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Chitosan

Chitosan je biopolymerní látka, která je tvořena jednotkami N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukosaminu spojenými β -1,4 glykosidickými vazbami. Je získáván částečnou alkalickou deacetylací chitinu (Obrázek 1), tedy odstraněním acetylových skupin, kdy se na chitin působí koncentrovanou zásadou (40%–50% KOH nebo NaOH) při teplotě 100 °C a více. Deacetylace se pohybuje v rozmezí 70 až 95 %. Chitosan patří mezi polysacharidy a je nejvýznamnějším derivátem chitinu, který je získáván ze schránek korýšů jako např. krabů, krevet či garnátů. [5] [6] [7]



Obrázek 1: Deacetylace chitinu na chitosan [8]

5.1.1 Vlastnosti

Chitosan je jemný, bílý až nahnědlý prášek bez zápachu. Patří mezi látky tvořící hydrogely, má tedy schopnost vázat velké množství vody. Fyzikálně-chemické vlastnosti chitosanu (např. rozpustnost, teplota tání) závisí na několika faktorech, [9]

- na koncentraci deacetylačního činidla a délce jeho působení,
- na hmotnostním zlomku chitinu a použité zásady,
- na teplotě prostředí, ve kterém reakce probíhá,
- na typu chitinu (původ).

Molekulární hmotnost chitosanu se uvádí v jednotkách kDa (kilodalton) a pohybuje se v rozmezí jednotek až tisíců kDa. Podle této veličiny rozlišujeme nízkomolekulární a vysokomolekulární chitosan. [10]

Ve vodě chitosan bobtná, je nerozpustný v bezvodém ethanolu, ale dobře rozpustný v kyselých roztocích. Tato rozpustnost je dána stupněm deacetylace, který je charakterizován jako poměr mezi jednotkami N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukosaminu. Pokud stupeň deacetylace dosáhne 50 %, stává se látka rozpustnou ve zředěných kyselinách. Hodnota pH kyseliny musí být nižší než 6,0. Chitosan je díky přítomnosti volných aminoskupin považován za silnou bazi a hodnota pH rozpouštědla má schopnost ovlivnit jeho vlastnosti. Při nízkém pH rozpouštědla by došlo k protonizaci aminoskupin a látka by se stala pozitivně nabitým, ve vodě rozpustným polyelektrolytem. Pokud by hodnota pH rozpouštědla vzrostla nad 6,0, polymer by ztratil svůj náboj a stal se nerozpustným. Rovnováha těchto stavů nastává při pH mezi 6,0 a 6,5. Chitosan je rozpustný např. v kyselině octové, mravenčí dusičné a chlorovodíkové. Nejlepším rozpouštědlem je kyselina mravenčí (0,2–100%), nejpoužívanějším kyselina octová (1%, pH 4). [6] [7] [10] [11]

V alkalických roztocích s pH vyšším než 6,5 vytváří chitosan hydratovanou gelovou sraženinu v důsledku neutralizace amino-skupin a eliminace repulzních meziřetězcových elektrostatických sil, což umožňuje vznik intenzivních vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí. Gelace lze dosáhnout i v kyselém prostředí, přidáním např. polyaniontů, formaldehydu nebo glyoxalu. [12]

Mukoadhezivní vlastnosti chitosanu jsou založeny na jeho kationtovém charakteru. Na základě přítomnosti kationických primárních aminoskupin a jejich interakci s negativně nabitými strukturami kyseliny sialové a sulfonové v mukóze, lze dosáhnout adheze. Ve srovnání s jinými polymerními pomocnými látkami jako jsou karbomer, nebo kyselina hyaluronová je mukoadheze samotného chitosanu slabší. Tato vlastnost je závislá na pH. V tabletách chitosanu je v rozmezí pH 2–6 mukoadhezivní síla i práce potřebná pro oddělení částic chitosanu od mukózy konstantní, při hodnotách pH 1 a 7 obě tyto veličiny klesají. Důvodem může být snížená rozpustnost v těchto prostředích a také vlastnosti mucinu. Při pH 1 brání

vysoká iontová síla rozpuštění polymeru a při pH 7 je polymer nerozpustný v důsledku nedostatečné protonizace aminoskupin. Aby bylo dosaženo vyšší mukoadheze, musí polymer vykazovat kohezivní vlastnosti, které u chitosanu nejsou příliš dobré. K jejich zlepšení vede tvorba komplexů s multivalentními aniontovými činidly, anebo částečnou acetylací aminoskupin. Multivalentní aniontová činidla způsobí zesílení chitosanu, čímž se polymer stává koprecipitován, nedochází tedy k jeho srážení při vyšším pH a rozšíří se pH oblast, ve které je chitosan rozpustný. Tato metoda ale částečně omezuje iontové interakce s vrstvou hlenu, protože aniontové sloučeniny blokují kationtové podstruktury chitosanu. Další možností zvýšení schopnosti mukoadheze je trimethylace a pegylace (připojení polyethylenglykolu do molekuly), nebo thiolace primárních aminoskupin. Thioloovaný polymer je schopen tvořit disulfidické vazby s glykoproteiny hlenové vrstvy, čímž se zvyšuje nejen mukoadheze, ale i kohezivní vlastnosti. [13] [14] [4] [15]

Mechanismus zodpovědný za zvýšení průchodu léčiv přes epitel střeva je stejně jako mukoadheze založen na kladných nábojích polymeru, které interagují s buněčnou membránou a vedou k reorganizaci proteinů a k otevření *tight junctions*. [4] [16].

Strukturní vlastnosti, mezi které patří molekulová hmotnost a stupeň deacetylace ovlivňují permeaci. Chitosan s vysokým stupněm deacetylace a molekulovou hmotností vykazuje zvýšení epiteliální permeace. Ke zlepšení průchodu nedochází pouze v gastrointestinálním traktu, ale také například na nosní sliznici. [4]

Chitosan se vyznačuje antimikrobiální, antioxidační a protinádorovou aktivitou. Působí také jako antitrombotikum a má schopnost snižovat cholesterol v krvi. [11]

Co se týče antimikrobiální aktivity, chitosan má oproti některým jiným dezinficiencím výhodu ve své nízké toxicitě k savcím buňkám. Mechanismus této aktivity prozatím není znám. Nejpravděpodobnější teorií je změna permeability

membrány, zapříčiněna interakcí pozitivně nabitě molekuly chitosanu (při pH nižším než 6,5) a negativně nabitě membrány. [11]

Svou roli má v předcházení oxidačnímu stresu. Samotný chitosan a jeho deriváty mohou totiž působit jako donory vodíku a tím předcházet oxidačnímu stresu, se kterým se pojí řada onemocnění. Tato aktivita závisí na molekulové hmotnosti chitosanu a stupni deacetylce. Molekuly s nižší molekulovou hmotností a vysokým stupněm deacetylce (až 90 %) mají vyšší schopnost vychytávání volných radikálů. [11]

Protinádorová aktivita chitosanu a jeho derivátů je dána inhibicí růstu nádorových buněk, způsobená podporou imunitního systému, konkrétně zvýšenou produkcí lymfokinů. [11]

Hemostatické účinky chitosanu a jejich mechanismus jsou stále neobjasněny, ale pravděpodobně jsou za ně zodpovědné sorpce plazmy, srážení erytrocytů a adheze, agregace a aktivace krevních destiček. Schopnost absorpce velkého množství tekutiny vede ke zvýšení koncentrace erytrocytů a destiček v místě poranění. Sorpce je závislá na molekulové hmotnosti a stupni deacetylce. Se zvyšujícím se stupněm deacetylce roste rychlost sorpce a také množství molekul vody, které se navážou. Kontakt chitosanu s krví vede k morfologickým změnám erytrocytů. Ztrácejí svůj typický bikonkávní tvar a dochází k jejich vzájemné afinitě. Chitosan také zvyšuje adhezi erytrocytů a absorbuje fibrinogen a další plazmatické proteiny, které vedou ke zvýšení adheze erytrocytů a ke koagulaci. Koagulace erytrocytů a adheze a agregace destiček nevede k systematické aktivaci hemostázy, ale pouze k rychlejší tvorbě krevní sraženiny. [17]

5.1.2 Využití

Chitosan patří mezi přírodní polymery a díky tomu má na rozdíl od polymerů syntetických vlastnosti jako jsou biodegradabilita, biokompatibilita a netoxičita. K hlavnímu využití patří oblast biochemie, biotechnologie, potravinářství a farmacie.

Našel ale také využití v papírenském průmyslu, oftalmologii, kosmetologii nebo fotografii. [18]

Potravinářský průmysl

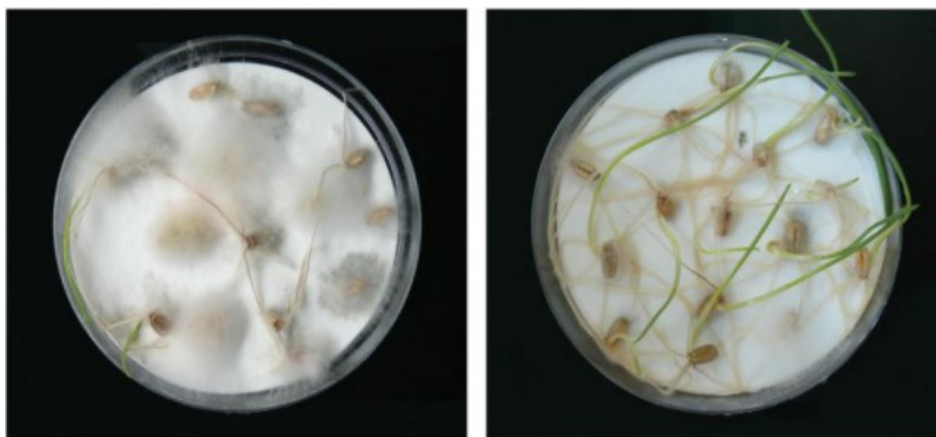
V potravinářském průmyslu se chitosan využívá ke konzervaci, obalování a udržení mikrobiální stability. Jeho využití je vhodné zejména díky jeho schopnosti vytvořit antimikrobiální film a pro vyvarování se chemickým konzervačním látkám. Vrstva chitosanu může působit proti bakteriím, virům nebo houbám v mnoha produktech potravinářského průmyslu, jako jsou například cereálie, džusy, maso. [11] [18]

Zemědělství

Použití chitosanu v zemědělství je relativně novým pojmem. V posledních letech je v oblasti zemědělství snahou nahradit pesticidy jinými, šetrnějšími látkami. Pesticidy jsou látky používané k hubení škůdců a předcházení nemocí rostlin, problémem je ale jejich toxicita a dopad na životní prostředí. Chitosan je pro své antimikrobiální působení vhodným kandidátem pro předcházení nemocí rostlin. Se snižující se molekulární hmotností chitosanu, roste jeho antimikrobiální aktivita. Největší využití má díky svému širokému spektru fungicidní aktivity v boji proti houbám. Inhibuje růst mnoha druhů hub *in vitro* a *in vivo* a jeho působení bylo pozorováno u různých vývojových stádií. Dále brání růstu několika druhů patogenních bakterií, zejména Gram-pozitivních. Je schopen narušit replikaci virů a viroidů a tím zabránit jejich šíření. [18] [19]

Konkrétní možností, jak chitosan využít, je ochrana osiva v kombinaci s esenciálními oleji. U esenciálních olejů byla prokázána antimikrobiální aktivita, ale také značná těkavost. Jejich použitím spolu s chitosanem můžeme docílit lepší odolnosti a udržet jejich vysokou koncentraci na povrchu osiva. Příkladem je použití směsi chitosanu s tymiánovým a tea tree olejem, kdy tyto oleje byly začleněny do filmu chitosanu a byl studován jeho vliv na nemoci a snížení rizika napadení patogeny. Film s obsahem esenciálních olejů omezuje růst plísně na osivu, aniž by zasáhl do

procesu klíčení a snižuje závažnost plísňových onemocnění v raných fázích vývoje rostlin. Srovnání neošetřeného a ošetřeného osiva je znázorněno na Obrázku 2.



Obrázek 2: Uměle infikované osivo *F. graminearum* inkubováno 7 dní za teploty 25 °C bez ošetření (vlevo) a osivo, které bylo ošetřeno roztokem chitosanu a tea tree oleje (vpravo). [19]

Kosmetika

Díky svým fungicidním a fungistatickým vlastnostem se chitosan využívá také v kosmetice jako přísada do krémů, locíí, šamponů a dalších přípravků. [20]

V kombinaci s hydroxyapatitem tvoří gelovou polymerní matici, která působí antibakteriálně a absorbuje ultrafialové záření. Díky těmto vlastnostem může být gel potenciálním kandidátem pro použití jako ochranný opalovací krém, nebo jako aditivum do opalovacích krémů pro již poškozenou pokožku. [18] [21]

Směsí chitosanu, kyseliny hyaluronové a kolagenu, mohou být vytvořeny filmy, které mají pozitivní vliv na mechanické vlastnosti, pevnost, tloušťku a vzhled vlasů. [18] [21]

Hojení ran a krytí

Použití chitosanu v oblasti hojení je vhodné zejména pro jeho antimikrobiální a hemostatickou aktivitu a také pro jeho stimulační a regenerační vlastnosti. Chitosan

stimuluje proliferaci buněk, podporuje funkci makrofágů a přispívá k organizaci tkání při hojení. Důležitým faktorem není pouze krytí rány, ale vyvarování se přítomnosti faktorů, které by mohly vést ke vzniku infekce. [18] [20]

Jednou ze strategií pro zvýšení antimikrobiální aktivity při hojení je kombinace chitosanu s nanočásticemi kovů, např. ZnO (oxidem zinečnatým), nebo TiO₂ (oxidem titaničitým). Přidáním oxidu titaničitého se zvyšuje mechanická pevnost a mikrobiální odolnost. Jedná se tedy o vhodný potenciální obvazový materiál pro hojení ran. [18]

Pro chirurgické hojení byl vyvinut komplex chitosan-želatina. Chitosan rozpuštěný v roztoku kyseliny v kombinaci s želatinou v určitém poměru a přísadkou plastifikátoru má na rozdíl od obvyklých obvazových materiálů skvělé adhezivní vlastnosti k podkožnímu tuku. [20]

Dalším příkladem využití chitosanu pro hojení je obvazový materiál tvořený polyelektrolytovými komplexy chitosanu se sulfonovaným chitosanem. Proces hojení je urychlen rozkladem chitosanu na oligomery pomocí tkáňových enzymů. Tento materiál má schopnost regenerovat tkáň v oblasti poranění. [20]

Řízená distribuce léčiv

Technologie řízeného uvolňování léčiv se objevila již v 80. letech. Účelná je v tomto odvětví inkorporace biodegradabilních prvků do systému. Biodegradabilita, netoxičita, schopnost gelace *in situ*, mukoadhezivní vlastnosti a hydrofilní charakter dělají z chitosanu vhodný materiál pro formulace s řízeným uvolňováním a usnadňují vývoj systémů pro podávání léčiv. Uvolňování léčiv absorbovaných nebo obalených do polymerů spočívá v kontrolované difuzi přes polymerní materiál. Léčiva vázána na biodegradabilní polymer kovalentní vazbou nebo dispergována v polymerní matici mohou být uvolňována erozí nebo degradací polymeru. Molekuly komplexně navázány na polymerní gel mohou být uvolněny difuzí. Konkrétním využitím může být příprava nanočástic. [4] [20]

Pro cílenou léčbu rakoviny byl vyvinut nanokompozit tvořený jádrem z nanočástic Fe₃O₄ a chitosanu, obalen mezoporózní křemičitou vrstvou. Řízené

uvolňování z těchto materiálů je podmíněno elektrostatickými interakcemi mezi pozitivně nabitým doxorubicinem a negativně nabitou křemičitou vrstvou. Tento nanokompozit je pH senzitivní, k uvolnění účinné látky tedy dochází při určitých hodnotách pH prostředí. Jeho použití jakožto nosiče léčiva doxorubicinu vykazuje vysokou protinádorovou aktivitu. Uvolnění doxorubicinu během 48 h při pH 4,5 a 5,8 dosáhlo hodnot 86,1 % a 71,0 %. Mohl by být tedy vhodným kandidátem pro cílenou distribuci. [18] [22]

Nanočástice chitosanu mohou zlepšit stabilitu polyfenolů a předcházet jejich oxidaci, nebo degradaci v gastrointestinálním traktu. Polyfenoly jsou sloučeniny obsaženy např. v čaji, kávě nebo červeném víně, které mají farmakologický potenciál pro své antioxidační a protizánětlivé vlastnosti, ale také mohou pomáhat v prevenci kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny a Alzheimerovy choroby. Samotné polyfenoly jsou ale špatně rozpustné, mají nízkou permeabilitu a vstřebatelnost v gastrointestinálním traktu. Vytvořením nanočástic chitosanu se zapouzdřenými polyfenoly může vést ke zlepšení těchto vlastností. Dochází také ke zvýšení absorpce otevřením epiteliálních *tight junctions* a k přímému vychytávání pomocí endocytózy. Stabilita chitosanových nanočástic může být ale ovlivněna mnoha faktory, se kterými se při průchodu gastrointestinálním traktem setkávají, jako jsou různé hodnoty pH, trávicí enzymy, přítomnost iontů a vrstva hlenu. V závislosti na pH a iontových interakcích se mění velikost nanočástic. V kyselém pH je velikost nanočástic nižší, při zvyšujícím se pH jejich velikost roste, stejně tak i v důsledku iontové přitažlivosti. Vrstva hlenu, která tvoří ochrannou bariéru gastrointestinálního traktu může bránit kontaktu nanočástic s buňkami epitelu. Naopak záporný náboj jednotek vrstvy hlenu vede k jeho interakci s pozitivně nabitými skupinami chitosanu. Díky těmto interakcím mohou nanočástice pronikat hlenem a transportovat se do buněk tenkého střeva. [18] [20] [23]

Perorální podání léčiv

Vlastnosti chitosanu jako je např. mukoadheze, gelace *in situ* nebo zvýšení permeace přes epitel vedly k vývoji systémů pro podávání léčiv k různým místům aplikace. Mezi perorální systémy obsahující chitosan patří tablety. Tablety jsou

pevnou lékovou formou, která je vedle tobolek velmi častá hlavně pro svou jednoduchou výrobu, snadnou manipulovatelnost a přesnou dávku léčiva v jednotce. Léčivo se zhomogenizuje s chitosanem a je přímo lisováno do tablet. Vzhledem k precipitaci chitosanu při pH vyšším než 7 dochází ke ztrátě mukoadhezivních vlastností a permeace v distálních částech střev a tím ke snížení absorpce. Metody ke zvýšení mukoadheze byly uvedeny výše. Dalším příkladem lékové formy pro perorální podání jsou nanočásticové systémy. [4]

Alginátové a chitosanové nanočástice osahující inzulin poskytují při perorálním podání výrazně zvýšenou intestinální absorpci inzulinu. Nanočástice snižovaly hladinu glukózy v séru potkanů a hypoglykemický účinek byl významně vyšší než při podání roztoku inzulinu, nebo směsi perorálního inzulinu a prázdných částic. Nanočástice se proto jeví jako potenciální forma pro perorální podání inzulinu a dalších terapeutických proteinů. [4] [24]

Oční podání léčiv

Díky svému netoxickému charakteru, vlastnostem zvyšujícím permeaci a fyzikálně chemickým vlastnostem je chitosan vhodným materiálem pro oční podání léčiv. Formulace k oftalmologickému použití jsou hydrogely, nanočástice a potažené koloidní systémy. Tyto formulace mají potenciál pro zlepšení retence a biodistribuce léčiv aplikovaných lokálně na oko. Využitím *in situ* gelačních vlastností lze chitosan aplikovat na oční povrch v téměř kapalně formě a poté transformovat do gelového stavu. Tímto způsobem lze dosáhnout prodloužení doby léčiva na očním povrchu a lepší terapeutické účinnosti. [4] [25]

Koloidní systémy na bázi chitosanu fungují i jako transmukózní nosiče léčiv, a to jak při usnadňování transportu léčiva do vnitřního oka, tak při jeho hromadění v epitelu rohovky. Studie *in vivo* ukazují, že nanotobolky tvořené chitosanem vykazují zvýšenou koncentraci modelového léčiva indometacinu v rohovce a komorové vodě. Dochází také ke zvýšení biologické dostupnosti léčiva. [4] [26]

Možností je také použití chitosanu k přípravě hydrogelu společně s kyselinou hyaluronovou, jako prostředí pro účinnou látku mitomycin C. Tato látka se používá

v oblasti oční chirurgie, kde se aplikuje lokálně při operaci glaukomu, aby se předešlo zjizvení a zakalení po výkonu. Tento hydrogel se jeví jako bezpečný a relativně vysoce účinný i v terminálních fázích glaukomu. [27]

Chitosan má všechny vlastnosti požadované k výrobě kontaktních čoček, jako jsou optická čírost, mechanická stabilita, propustnost vzduchu, smáčivost a imunologická kompatibilita. Jeho antimikrobiální a krycí vlastnosti s možností vytvářet film z něj dělají materiál vhodný k vývoji očních „obvazových“ čoček. Tyto čočky slouží jako mechanická ochrana při poranění oka, nemají schopnost ostření, a proto neslouží ke korekci zraku. [20] [28]

Nosní podání léčiv

Překážkami pro nosní podání léčiv jsou nízká permeabilita membrány, krátká doba expozice léčiva na sliznici a její sekrece. Biologická dostupnost je zde poměrně špatná. Látky, které zvyšují permeaci a mají mukoadhezivní vlastnosti jsou cestou ke zlepšení absorpce. Poskytují prodloužený kontakt mezi lékovou formulací a absorpčními místy v dutině nosní tím, že oddálí mukociliární clearance formulace. Mukoadhezivní systémy mohou být ve formě prášků, kapalin, nebo kapalných *in situ* gelačních systémů. Příkladem je lepší absorpce při podání isosorbid dinitrátu, inzulínu v nanočásticích chitosanu, nebo fentanylu v nosním spreji. [4] [29] [30] [31] [32]

Vaginální podání léčiv

Příprava vaginálních tablet přímým lisováním s obsahem chitosanu, alginátu sodného, mikrokrystalické celulózy a karboxymethylcelulózy obsahujících metronidazol jako léčivou látku vykazovala až 100% uvolnění léčiva z tablet během 8 hodin při pH 4,8. Tablety se liší od ostatních díky potřebě nízkého lisovacího tlaku pro dosažení maximální adheze, což může být výhodou při zavádění tablety do pochvy. [33]

Vaginální formulace s chitosanem jsou ale nevhodné pro léčbu chronických onemocnění. Antimikrobiální vlastnosti mohou mít nepříznivý dopad na vaginální mikroflóru. [4]

Bukální podání léčiv:

Mezi další potenciální farmaceutické využití může být zařazeno bukální podání, vzhledem ke schopnosti mukoadheze a zvýšení permeace, čímž dochází k vzestupu hladiny léčiva v plazmě. Takto může být zvýšena absorpce hydrofilních molekul při použití trimethylovaného chitosanu, nebo v případě thiolovaného chitosanu i terapeutických peptidů. [4] [34]

Podání vakcín

Na konci 20. století se ukázalo, že chitosan stimuluje produkci IgM lidských lymfocytů, což vedlo k vyvíjení systémů pro podání vakcín. Pravděpodobně prvním použitím byla nazální imunizace u myši proti bakterii *Bordetella pertusis*, která způsobuje onemocnění černý kašel. Byly navrženy a hodnoceny nosiče na bázi chitosanu a různých antigenů, které ukazují systematickou i lokální imunitní odpověď. Využitím modifikace chitosanu trimethylací byla imunitní odpověď ještě zvýšena. Podobně k tomu dochází i při orálním podání vakcín s chitosanem. [29] [35] [36]

5.2 Bezpečnost použití chitosanu a toxicita

Pomocné látky léčivých přípravků musejí být stejně jako léčivé látky bezpečné pro použití. Přestože v Evropě neexistují žádné specifické pokyny pro hodnocení bezpečnosti, měla by být zkoumána toxikologie a farmakokinetika pomocné látky používané poprvé ve farmaceutické oblasti. Nová pomocná látka musí být posouzena vhodnými studii a hodnocením rizika a prospěšnosti. Byla již provedena řada studií, které se věnují biokompatibilitě chitosanu. [37]

5.2.1 Farmakokinetika

Při orálním podání chitosanu zvířatům dochází k jeho natrávení na látky s nízkou molekulovou hmotností. U člověka dochází k trávení jen omezeně, systémově dostupný chitosan je pravděpodobně degradován na složky glukosamin a N-acetylglukosamin pomocí enzymů, jako je lysozym. Studie na zvířatech ukázaly, že glukosamin prochází rychlou clearance játry a ledvinami a část dávky se vylučuje močí, zbytek končí v kosterním svalstvu a kloubní chrupavce. N-acetylglukosamin je také vylučován, nebo je distribuován do pojivové tkáně či chrupavky. [37]

5.2.2 Toxicita

Při akutním i opakovaném orálním podání chitosanu v gramových dávkách na kilogram váhy nebyla prokázána toxicita, ani karcinogenita. Skutečná hodnota systémové expozice ale nebyla měřena. V literatuře nejsou známy ani údaje o reprodukční toxicitě či genotoxicitě. [38] [37]

U studií, které provedli Tanaka a kol. [39] a Carreno a kol. [40] byly prokázány histologické změny při podání vysokých dávek chitosanu králíkům a myším. Pravděpodobně byly tyto změny způsobeny agregací krevních buněk. Některé studie biokompatibility *in vitro* [40] ukazují, že chitosan může působit cytotoxicky a způsobovat lýzu erytrocytů. Studie Ishihara a kol. [41] cytotoxicitu vyvracejí. Vzhledem ke své biologické aktivitě byla prokázána koagulace, tvorba trombů a adheze i agregace krevních destiček.

Chitosan má podle výše uvedených dat dobrý potenciál pro použití jako farmaceutická pomocná látka zejména pro perorální užití. K bezpečnému použití pro parenterální podání je potřeba dalších studií, k prokázání bezpečnosti, vzhledem k jeho hemostatickým vlastnostem. [37]

5.3 Sprejové sušení

Sprejové sušení je metoda, při které dochází k přeměně materiálu ve formě roztoku, emulze nebo suspenze na částicovou formu pomocí rozprašování do horkého sušicího media. Cílem této metody ve farmaceutické technologii je získání požadovaných vlastností suchých částic. Částice vznikající touto metodou mají často lepší vlastnosti než ty, které jsou získávány jinými metodami sušení. [3]

Proces sušení probíhá na sušicím zařízení – sprejové sušárně (Obrázek 3) a má tři hlavní fáze. První z nich je atomizace, při které je materiál rozprašován na jemné kapičky pomocí zařízení – atomizéru. V další fázi dochází k interakci kapiček a horkého plynu, což vede k odpařování rozpouštědla a k tvorbě pevných suchých částic. Tato fáze je tedy fází sušení. V poslední fázi se musí vysušené částice oddělit od sušicího plynu a odvést do sběrné nádoby. Každá fáze, stejně jako podmínky, při kterých jsou prováděny, má velký vliv na účinnost procesu a vlastnosti produktu. Vznikající částice jsou většinou pelety nebo mikročástice. [3]

K základním částem sprejové sušárny patří atomizér, který slouží k rozptýlení kapaliny v sušicí komoře. Ihned po atomizaci je kapalina vystavena sušicímu plynu přiváděnému přes rozprašovací zařízení. Jako sušící medium se používá nejčastěji vzduch. Dusík nebo inertní plyny jsou náročné cenově i instalačně. Kapičky, které proudí do sušicí komory jsou různě velké a podle toho také dochází k jejich vysušení. Příliš velké kapičky nemusí být vysušeny sušícím médiem hned, ale mohou ulpívat a zasychat na stěnách sušicí komory. [7] [2]



Obrázek 3: Sprejová sušárna Büchi Mini Spray Dryer B-290

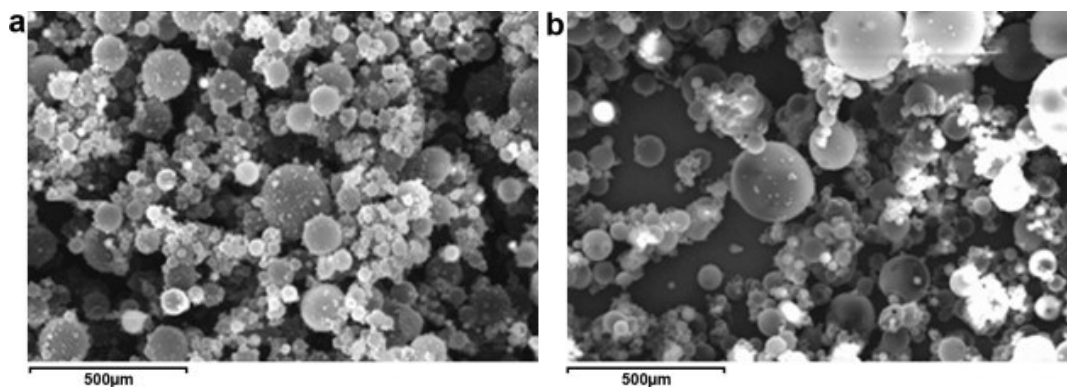
5.4 Příklady sprejově sušeného chitosanu

Sprejově sušený chitosan se používá do různých lékových formulací zejména k ovlivnění uvolňování léčiva. Vlastnosti sušených částic se mohou měnit v závislosti na použitých parametrech sušení a přítomnosti dalších látek, například síťovacích činidel nebo rozpouštědel. Samotná koncentrace chitosanu a jeho molekulární hmotnost může mít vliv na vlastnosti částic. [42] [43]

5.4.1 Sprejově sušené částice chitosanu a ibuprofenu

Cílem práce Sogiase a kol. [13] bylo srovnat chitosan a poloacetylovaný chitosan (HACHI) jako pomocné látky v mukoadhezivních tabletách obsahujících ibuprofen. Práškové formulace obsahující polymery a léčivo byly připraveny společným sprejovým sušením (vstupní teplota 170 °C) nebo mletím. Finální koncentrace chitosanu nebo HACHI ve vzorcích před sušením byla 1,5 % (hmotnost/objem) a ibuprofen byl obsažen v hmotnostním poměru 1 : 1 k chitosanům.

Hodnocením pomocí SEM (skenovací elektronové mikroskopie) byly pozorovány (Obrázek 4) shluky sférických částic o velikostech od 5 do 25 μm . Na obrázcích nejsou viditelné krystaly samotného ibuprofenu, léčivo je tedy plně zabudováno do mikrosfér. Pomocí DSC (diferenciální skenovací kalorimetrie) byla zjištěna zvýšená rozpustnost léčiva u vzorku mletého chitosanu s ibuprofenem. FTIR (infračervené spektroskopie a Fourierovy transformace) spektrum ukázalo, že sprejově sušený ibuprofen vykazuje nové molekulární rysy. Docházelo k interakci ibuprofenu s chitosanem i HACHI. Množství uvolněného ibuprofenu bylo hodnoceno při pH 2,0 a 7,0 disolučními zkouškami. Při pH 2,0 došlo k uvolnění ze sprejově sušené směsi za použití chitosanu asi 60 % léčiva, u směsi s HACHI k uvolnění asi 70 % po 300 min. U tablet připravených sprejovým sušením docházelo k rychlejšímu uvolnění léčiva než u tablet připravených z mleté směsi. Při pH 7,0 byla rychlost uvolňování léčiva u HACHI vyšší než při pH 2,0 a zároveň se uvolnilo větší množství než u chitosanu.



Obrázek 4: a) částice sušeného chitosanu, b) částice chitosanu s ibuprofenem.
Upraveno podle [13]

5.4.2 Sprejově sušené mikrosféry chitosanu a H₂-antagonistů

Cílem práce He a kol. [42] bylo studium fyzikálně-chemických vlastností mikrosfér připravených sprejovým sušením (vstupní teploty 140, 160 a 180 °C) zesíťovaného a nezesíťovaného chitosanu obsahující léčiva ze skupiny H₂-antagonistů jako jsou cimetidin, famotidin a nizatidin. Roztoky byly připraveny z chitosanu (výsledná koncentrace 0,1–0,5%), kyseliny octové 1% a síťovacích činidel formaldehydu nebo glutaraldehydu.

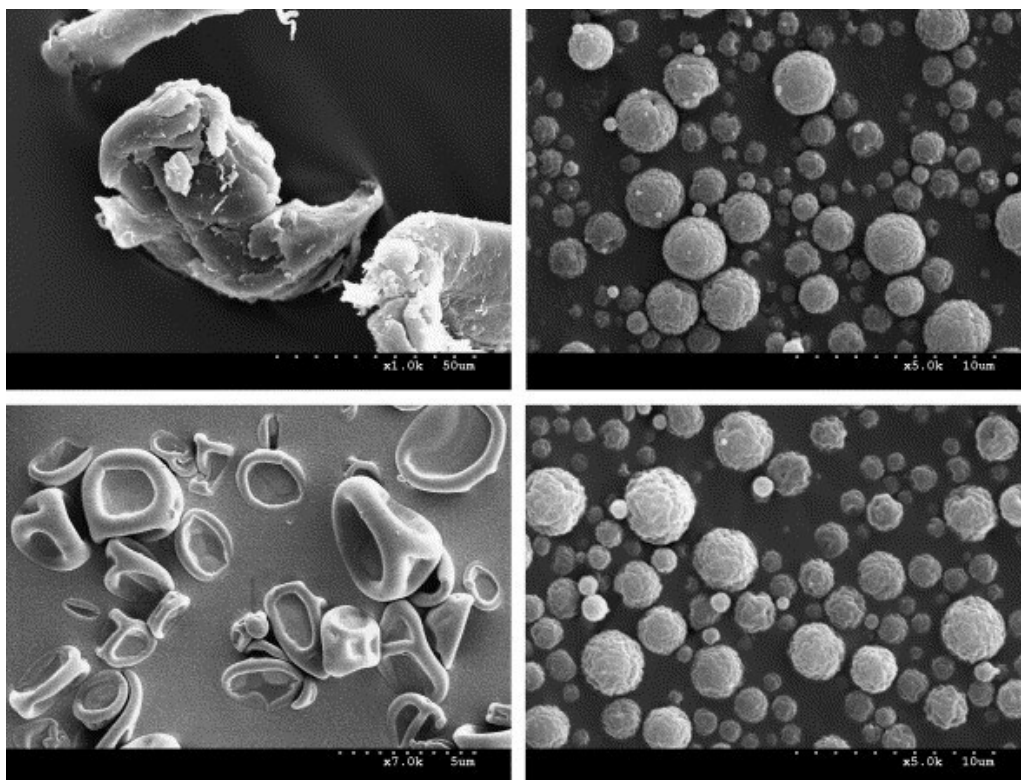
Pomocí SEM byly pozorovány částice sférického tvaru, jejichž velikost se pohybovala v jednotkách mikrometrů a měnila se v závislosti na přítomnosti a množství síťovacího činidla a teplotě. Čím vyšší byla použitá teplota a přítomnost síťovacího činidla, tím menší byly částice. Menší částice vznikaly také při vyšší rychlosti proudění sušicího média (dusík) a při použití chitosanu s nižší molekulovou hmotností a nižší koncentrací v roztoku. Optimální vstupní teplota pro přípravu chitosanových mikrosfér z vodných roztoků chitosanu byla 160 °C. Jakmile byla teplota nastavena pod 140 °C nebo byl výkon pumpy vyšší než 10 ml/min, rozpouštědlo se nemohlo zcela odpařit a některé kapičky kapaliny zůstávaly na stěnách sušicí komory. Metoda DSC byla použita pro sledování tepelných změn molekul při zvyšování nebo snižování teploty. Použitím fyzikálních směsí léčiva a chitosanu byl vždy viditelný pík léčiva, zatímco u sušených mikrosfér pík nebyl pozorován. Znamená to, že léčivo bylo plně začleněno v částicích a nacházelo se ve formě tuhého

roztoku. Toto platí i při vyšší koncentraci léčiva (70 %). Disoluční zkouška a spektrofotometrické metody ukázaly, že léčiva byla uvolněna během několika minut. Rychlé uvolnění může být způsobeno hydrofilní povahou polymeru i léčiva, a tudíž jejich afinitou k vodě, nebo také tím, že léčiva byla dispergována v polymerní matrici. [42]

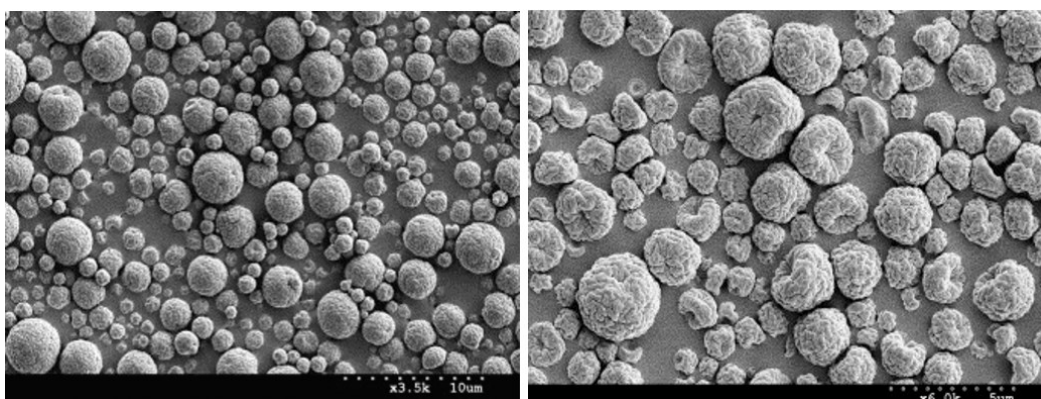
5.4.3 Sprejově sušené mikročástice chitosanu a salbutamol-sulfátu

Cílem studie Corrigan a kol. [43] bylo pozorování uvolňování léčiva a vlastností mikročástic připravených sprejovým sušením chitosanu a salbutamol-sulfátu. Rozpouštědlem byla kyselina octová 1% (chitosan 0,2 %) nebo kyselina chlorovodíková HCl 0,8% (chitosan 0,12 %). Byly připraveny částice za přítomnosti nebo nepřítomnosti síťovacího činidla formaldehydu. Vstupní teplota sušení byla nastavena na 140 °C, pumpa 15 %, průtok vzduchu 600 l/h, aspirátor 100 %. Pro porovnání byly pozorovány i vzorky nesusušeného mletého chitosanu.

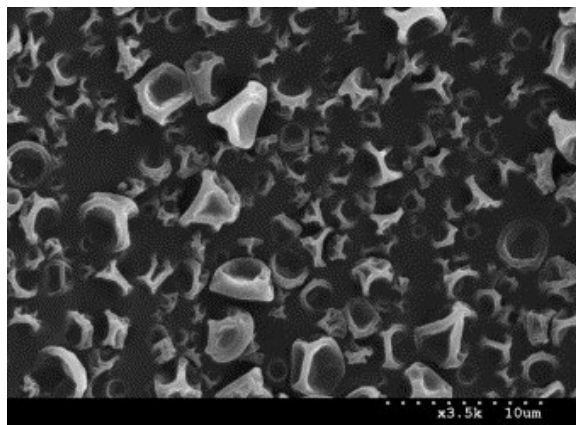
Analýza SEM ukázala, že velikost samotných chitosanových částic se po sprejovém sušení zmenšila a změnila se jejich morfologie (Obrázek 5). Vliv množství léčiva ve vzorku na morfologii částic je patrný na obrázcích 6 a 7. [43]



Obrázek 5: Vlevo nahoře částice nesušeného mletého chitosanu, vpravo nahoře částice sušeného chitosanu z roztoku kyseliny octové, vlevo dole částice sušeného chitosanu z roztoku HCl, vpravo dole částice sušeného chitosanu z roztoku kyseliny octové zesíťného formaldehydem [43]

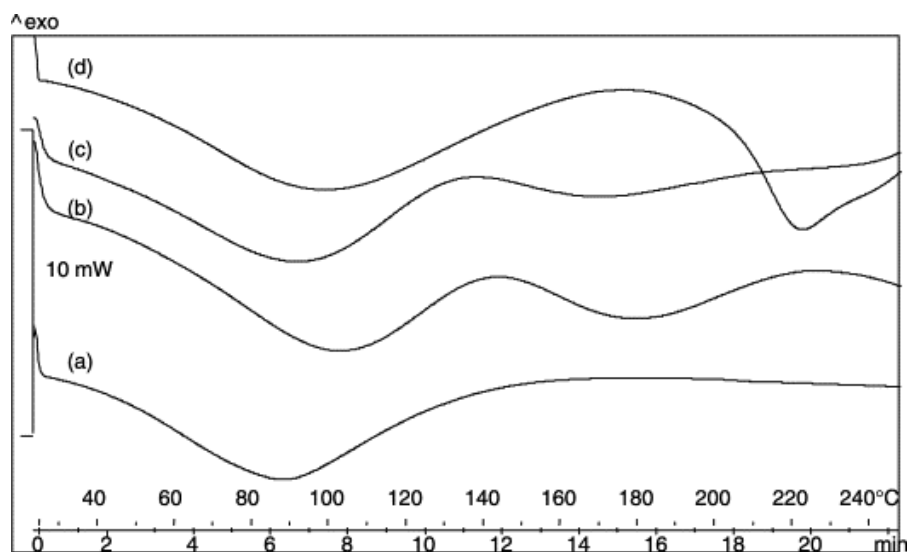


Obrázek 6: vlevo částice s obsahem 10 % léčiva, vpravo částice s obsahem 20 % léčiva. Upraveno podle [43]



Obrázek 7: Částice s obsahem 40 % léčiva. Upraveno podle [43]

DSC sken (Obrázek 8) zobrazuje jednotlivé formy chitosanu. U nezpracovaného chitosanu lze pozorovat endotermický pík v okolí hodnoty 90 °C, ostatní chitosany vykazovaly dva široké endotermy. Ačkoliv má chitosan krystalické oblasti, teplota tání nebyla detekována kvůli přítomnosti intra a intermolekulárních vodíkových vazeb. Chitosan vykazuje skelný přechod následován rychlou tepelnou degradací, ale DSC neposkytuje informace o teplotě skelného přechodu polysacharidů. U sušených směsí s léčivem nebyly viditelné žádné endotermy pro léčivo, což by mohlo znamenat, že je léčivo plně dispergováno uvnitř matrice ve formě tuhého roztoku. U zesíťovaných systémů byly DSC skeny podobné systémům nezesíťovaným. [43] [44] [45]



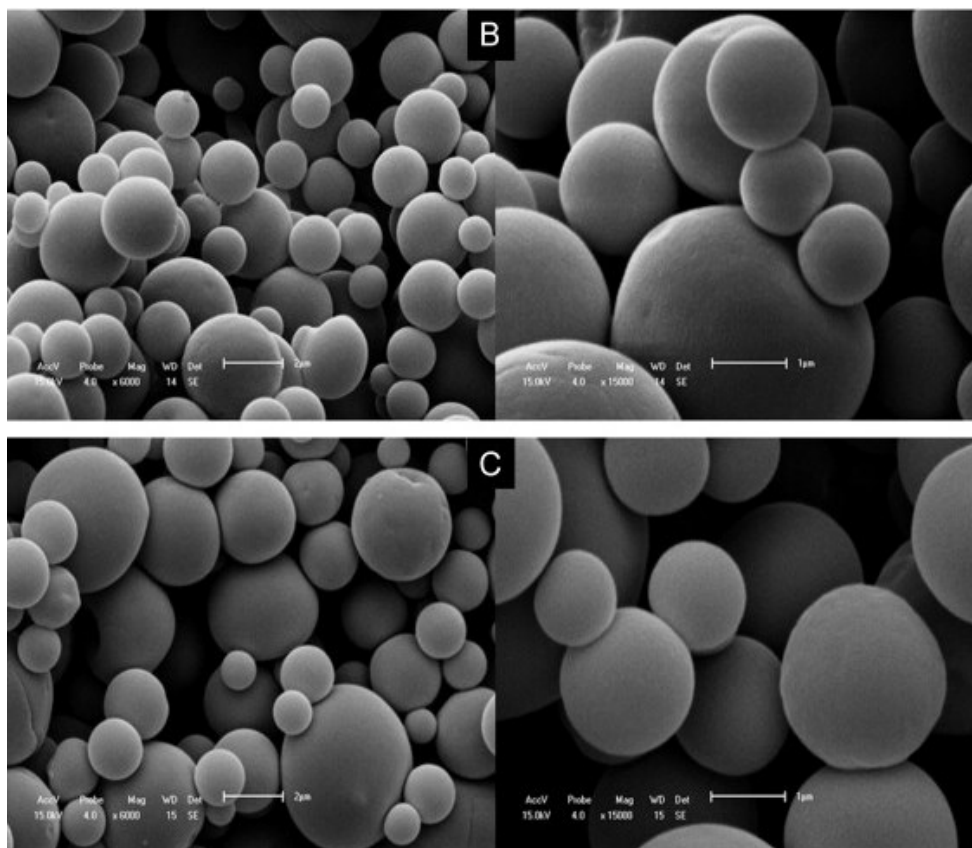
Obrázek 8: DSC sken: a) nesušený chitosan, b) chitosan sprejově sušený z 1% roztoku kyseliny octové, c) chitosan sprejově sušený z 0,8% roztoku HCl, d) zesítěný chitosan sprejově sušený z 1% roztoku kyseliny octové. [43]

5.4.4 Sprejově sušené mikročástice chitosanu a methotrexátu

Cílem studie, kterou provedl Mesquita a kol. [46] bylo hodnocení fyzikálně-chemických aspektů podílejících se na uvolňování léčiva z částic chitosanu nasycených methotrexátem (MTX) připravených sprejovým sušením a výběr takových, které vedou k prodlouženému uvolňování léčiva. Léčivo bylo v mikročásticích obsaženo v různém procentuálním zastoupení. K rozpuštění látek byla použita kyselina octová 0,1 M, vstupní teplota byla nastavena na 140 °C, průtok vzduchu 500 Nl/h, rychlost nástřiku 3 ml/min, aspirátor 90 %. Pro kontrolní analýzu byly také připraveny fyzikální směsi MTX a chitosanu.

Fotografie pořízené pomocí SEM (Obrázek 9) ukazují, že připravené částice byly hladké, sférického tvaru pro všechny použité koncentrace léčiva. Na snímcích nebyla zachycena přítomnost krystalů, což značí homogenní nasycení matrice léčivem. Vstupní teplota byla vyšší než teplota varu směsi rozpouštědel, což vedlo k tvorbě par uvnitř částic. Za použití FTIR analýzy bylo zjištěno, že mezi polymerem a léčivem nedošlo k žádné reakci. XRD spektrum potvrdilo nepřítomnost krystalického MTX,

tato skutečnost indikuje úplné rozpuštění léčiva v polymerní matrici. Vzniklé mikročástice vykazovaly požadované prodloužené uvolňování. [46]



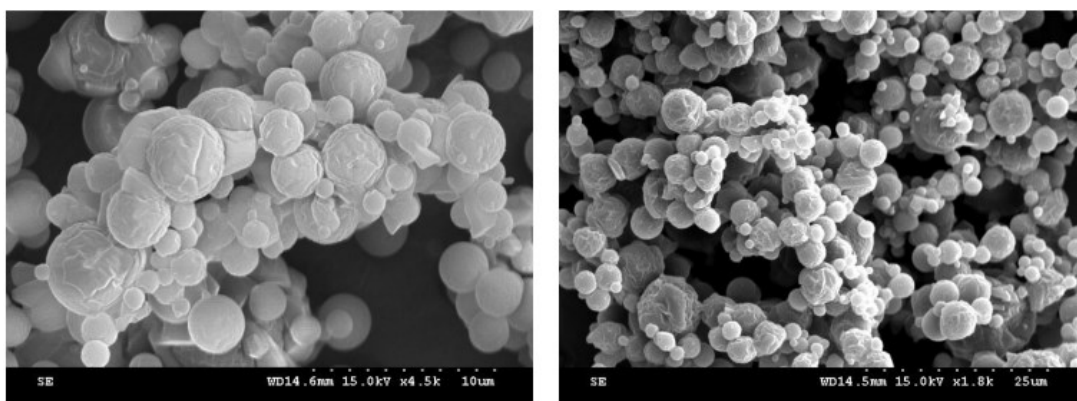
Obrázek 9: B) Mikročástice chitosanu s obsahem 18 % MTX, C) mikročástice chitosanu s obsahem 27 % léčiva, vlevo 6000x zvětšení, vpravo 15000x zvětšení. Upraveno podle [46]

5.4.5 Mikrosféry chitosanu a paracetamolu připravené sprejovým sušením

Cílem studie Liu a kol. [47] bylo prozkoumat kinetiku uvolňování paracetamolu ze sprejově sušených chitosanových mikrosfér. Paracetamol byl dispergován v 1% kyselině octové, následně byl přidán chitosan a roztok síťovacího činidla tripolyfosforečnanu (TPP), formaldehydu (FA) nebo glutaraldehydu (GA) v 1% nebo 2% koncentraci. Vzniklá suspenze byla sušena při vstupní teplotě 175 °C, rychlosti nástřiku 2 ml/min a průtokem sušicího media 1,2 m³/min. Pro porovnání

zapouzdření léčiva v mikrosférách byly připraveny vzorky v HCl a měřena jejich absorbance.

Povrchová morfologie částic byla pozorována pomocí SEM a byla ovlivněna typem a koncentrací použitého síťovacího činidla (Obrázek 10). Částice, u kterých byl použit TPP měly nejhladší povrch. Ačkoliv bylo léčivo v mikrosférách téměř zcela inkorporováno (96,3–98,7 %), krystaly léčiva byly přítomny na všech formulacích mikrosfér. Kumulované množství uvolněného léčiva bylo ovlivněno typem a koncentrací síťovacího činidla. Mikrosféry zesítněné 1% roztoky vykazovaly vyšší uvolňování léčiva, než mikrosféry zesítněné 2% roztoky činidla. Při použití TPP dochází k zesítnění iontového charakteru, kdežto u FA a GA dochází k chemickému zesítnění chitosanu. Mikrosféry s TPP vykazovaly vyšší kumulované množství uvolněného léčiva než ty s obsahem FA a GA v obou koncentracích, což značí vyšší rigiditu částic s FA a GA. [47]



Obrázek 10: Vlevo částice sprejově sušeného chitosanu, léčiva a TPP, vpravo částice sprejově sušeného chitosanu, léčiva a GA. Upraveno podle [47]

5.4.6 Sprejově sušené mikročástice chitosanu a venlafaxinu

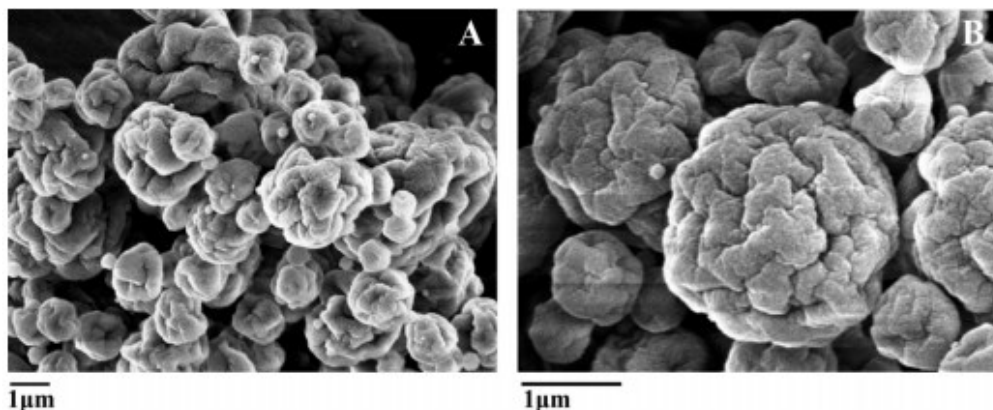
V této studii Aranaz a kol. [48] byl formulován venlafaxin do chitosanových mikrosfér za účelem přípravy částic vhodných pro řízené uvolňování. Pro rozpuštění chitosanu byla použita kyselina octová 1% a pro zesítnění chitosanu byl použit roztok TPP (0,1–0,5%). Byly testovány dva různé vzorky chitosanu lišící se molekulovou hmotností a stupněm deacetylace (CS-1 s vyšší molekulovou hmotností a vyšší viskozitou a CS-2 s nižší molekulovou hmotností a nižší viskozitou). Vstupní teplota

pro sušení byla 160 °C. Jednotlivé vzorky pro sušení se lišily poměrem chitosanu a TPP, z čehož následně vycházely rozdíly ve výtěžku a účinnosti zapouzdření léčiva do mikročástic, které můžeme pozorovat na Obrázku 11. Výtěžek se pohyboval v rozmezí od 40 do 75 %. Nižší výtěžky mohou být způsobeny použitím vodného rozpouštědla a lehkými částicemi, které ulpívají na stěnách komory. [48]

označení formulace	CS vzorek	[TPP],%	CS:TPP	praktický výtěžek, %	UZ. %
A1	CS-1	0	-	63	56 ± 3
A2	CS-2	0	-	53	88 ± 3
A3	CS-1	0.1	100:30	44	81 ± 2
A4	CS-2	0.1	100:30	65	94 ± 1
A5	CS-1	0.2	100:30	45	76 ± 3
A6	CS-2	0.2	100:30	62	90 ± 3
A7	CS-1	0.5	100:30	55	51 ± 5
A8	CS-2	0.5	100:30	62	66 ± 3
A9	CS-2	0.5	100:80	64	37 ± 3
A10	CS-2	0.5	100:100	74	38 ± 4

Obrázek 11: Formulace mikročástic a hlavní charakteristiky, UZ: účinnost zapouzdření. Upraveno podle [48].

Částice byly pozorovány pomocí SEM. Všechny mikrotobolky byly sférického tvaru s patrnými prohlubněmi a bez krystalů venlafaxinu na povrchu (Obrázek 12). Velikost částic se pohybovala v rozmezí 3 až 10 µm bez významných rozdílů mezi jednotlivými formulacemi. XRD ukazuje, že venlafaxin tvoří v polymerní matici molekulární disperzi, což se shoduje se snímky SEM, na kterých nejsou patrné krystaly léčiva. Uvolňování venlafaxinu bylo zkoumáno v simulované žaludeční tekutině o pH 1,2 a simulované intestinální tekutině o pH 7,4. Uvolňování léčiva bylo udržitelnější v kyselém prostředí simulované žaludeční tekutiny než v simulované intestinální tekutině. Hlavním parametrem pro vliv na uvolňování léčiva z formulací byl poměr chitosan : TPP. Formulace na bázi chitosanu s nízkou viskozitou a poměru chitosan: TPP 100 : 100 vykazovala nejmírnější hodnoty řízeného uvolňování s maximálním uvolněním 60 % za 6 hodin v simulované intestinální tekutině. [48]



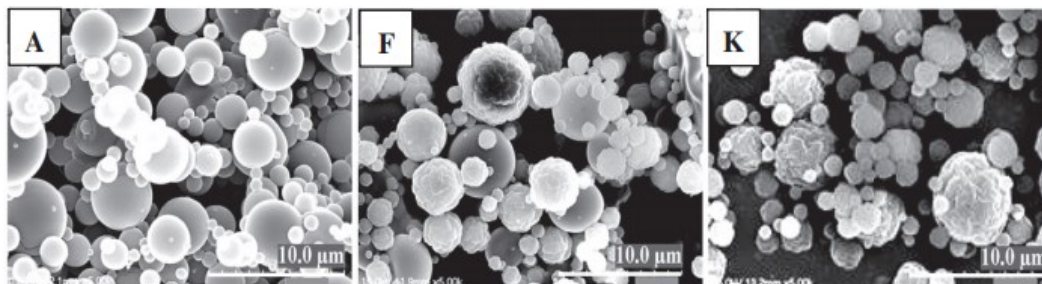
Obrázek 12: Mikrotobolky zesítně TPP. Formulace A3 (A), Formulace A5 (B). Upraveno podle [48].

5.4.7 Mukoadhezivní mikrosféry na bázi chitosanu připravené sprejovým sušením pro oromukosální podání léčiv

Cílem studie Jiang a kol. [49] byla příprava sprejově sušených mikrosfér chitosanu o nízké molekulové hmotnosti (LMW-Chitosan), vysoké molekulové hmotnosti (HMW-Chitosan) a karboxylového derivátu chitosanu, za účelem zvýšení účinnosti dodání léčiva – benzydaminu. Léčivo bylo rozpuštěno v destilované vodě a k roztoku byla přidána kyselina octová 0,25% k úpravě pH kvůli rozpuštění přidaného chitosanu. Léčivo a polymer byly ve vzorcích obsaženy v pěti různých poměrech. Roztok byl sušen za nastavení vstupní teploty 150 °C, aspirátoru 100 % a pumpy 20 % (5 ml/min). Pro porovnání rychlosti uvolnění léčiva byly připraveny mikročástice samotného benzydaminu.

Mezi jednotlivými typy chitosanu nebyly patrné větší odchylky ve výtěžku a spíše než na molekulové hmotnosti a typu chitosanu záviselo na poměru chitosanu a léčiva. Při větším zastoupení chitosanu ve o vzorku byl výtěžek vyšší a celkově se pohyboval v rozmezí 40,2 až 63,8 %. Vizualizací částic pomocí SEM se ukázalo, že všechny částice měly sférický tvar, ale povrch částic se lišil v závislosti na použitém derivátu (Obrázek 13). Uvolnění léčiva z mikročástic samotně sušeného benzydaminu bylo rychlejší a léčivo bylo uvolněno již během 2 minut, naproti tomu u částic sušeného chitosanu společně s léčivem se tento čas prodlužoval se zvyšujícím se

množstvím polymeru ve formulaci. Je zde tedy závislost mezi rychlostí uvolnění léčiva a množstvím polymeru a použití chitosanu by vedlo k systémům s prodlouženým uvolňováním. Přítomnost chitosanu také zvyšuje mukoadhezivní sílu částic léčiva na sliznici a zlepšuje retenci léčiva i po působení slin. [49]



Obrázek 13: SEM zobrazení částic při poměru léčivo: chitosan 10 : 90. A: karboxylový derivát, F: LMW-Chitosan, K: HMW-Chitosan. Upraveno podle [49]

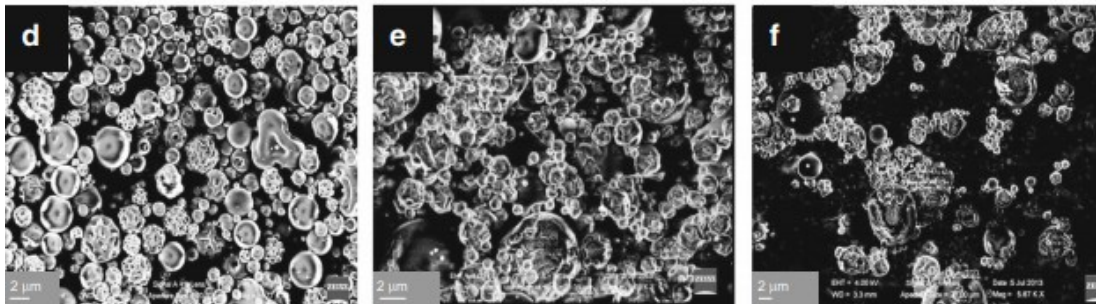
5.4.8 Sprejově sušené částice chitosanu a celecoxibu

Sprejově sušené mikročástice obsahující chitosan a celecoxib (CB) připravili Lopedota a kol. [50] pro chemoprevenci rakoviny močového měchýře. K některým vzorkům byly přidány dva komplexy cyklodextrinu (C1 a C2) pro zlepšení rozpouštění léčiva. Chitosan (1, 2, 3 a 4%) byl rozpuštěn v roztoku kyseliny octové a následně bylo přidáno léčivo, popřípadě C1 nebo C2. Složení jednotlivých vzorků je zobrazeno na Obrázku 14. Suspenze nebo roztok byly sušeny za vstupní teploty 145 °C, nastavením aspirátoru 90 % a pumpou 10 %.

Vzorek	CH % w/v	CB/Me- β -CD % w/v	CB % w/v
F1	1	–	–
F2	3	–	–
F3	1	–	0.02
F4	1	C ₁ (3.38)	0.02 ^a
F5	1	C ₂ (2.90)	0.02 ^a
F6	3	–	0.02
F7	3	C ₁ (3.38)	0.02 ^a
F8	3	C ₂ (2.90)	0.02 ^a

Obrázek 14: Složení jednotlivých vzorků pro sušení. Me- β -CD: methyl- β -cyklodextrin. Upraveno podle [50]

Výtěžek mikročástic s obsahem chitosanu 1 % byl vyšší než 50 %, při vyšším obsahu chitosanu (3 %) se ale snížil k hodnotě 30 %. Účinnost zapouzdření u vzorku F3 dosahovala 25,6 %, může to být způsobeno precipitací CB kvůli nepřítomnosti cyklodextrinů s následkem ulpívání léčiva na stěnách nádoby, ze které je suspenze získávána. Vzorek F6, který rovněž neobsahuje cyklodextriny vykazuje účinnost zapouzdření 71,6 %, což může být způsobeno vyšší viskozitou suspenze a nemožností sedimentace léčiva. Účinnost je také vyšší u vzorků formulovaných za přítomnosti cyklodextrinů. Vzniklé částice (Obrázek 15) měly sférický tvar se zdrsňelým povrchem a velikost kolem 2 μ m, což je kompatibilní s intravezikálním podání katetrem. Malé rozdíly ve velikosti mezi vzorky byly způsobeny rozdílnou viskozitou. DSC sken prokázal u vzorků F3 a F6 přítomnost CB v krystalickém stavu (viditelný pík při teplotě 162 °C), tento pík nebyl přítomen u ostatních vzorků, ve kterých bylo léčivo rozpuštěno a CB se zde tedy nacházel v amorfní formě. Pro vzorky F3 a F6 po vyhodnocení uvolňování léčiva bylo zjištěno, že tyto vzorky vykazují prodloužené uvolňování s dobrou mukoadhezí ke sliznici močového měchýře. Vzorky s obsahem cyklodextrinů vykazovaly téměř okamžité uvolnění léčiva. Oba typy těchto systémů by byly vhodné pro podání katetrem do močového měchýře, čímž se dá vyhnout orálnímu podání, které je zodpovědné za nízkou biologickou dostupnost CB. [50]

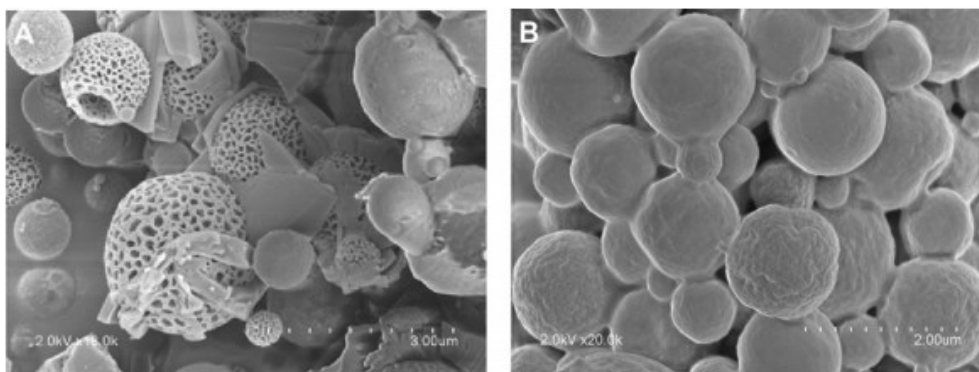


Obrázek 15: SEM zobrazení mikročástic F6 (d), F7 (e), F8 (f). Upraveno podle [50]

5.4.9 Sprejově sušené mikročástice chitosanu a kyseliny kávové

Cílem studie Spagnol a kol. [51] bylo vyvinout dva typy mikročástic obsahující kyselinu kávovou (CA) a zkoumat vliv morfologie částic na profil uvolňování a permeaci. První typ mikročástic byl připraven z hydroalkoholického roztoku (MPI), kdy byl chitosan rozpuštěn v kyselině octové 1% a následně byl přidán ethanol, CA a stearylamin. Druhý typ byl připraven z vodného roztoku (MPII), kdy byl přidán k roztoku chitosanu v kyselině octové 1% a CA polysorbát 80. Vzorky obsahovaly 30 % CA. Vstupní teplota se mezi vzorky lišila, u MPI byla nastavena na 85 °C a u MPII na 180 °C.

Velikost a morfologie vzniklých částic byly charakterizovány pomocí SEM, která ukázala, že MPII byly sférické s hladkým povrchem, což je ideální pro řízené uvolňování, zatímco MPI byly porózní s rezidui na povrchu. Velikost částic se pohybovala v rozmezí 1 až 5 µm (Obrázek 16). Pro hodnocení permeace a uvolňování CA byly připraveny disperze, film a emulze s obsahem MPI a MPII. Porózní částice MPI mají větší povrch, který vede k většímu kontaktu s médiem a k rychlejšímu uvolnění CA. MPII s hladkým, pravidelným a méně porézním povrchem měly schopnost více regulovat uvolňování CA ve všech formulacích. Studium permeace prokázala závislost toku permeantu na viskozitě systému. Čím viskóznější systém, tím se zpomaluje tok permeantu. Z výsledků je patrné, že způsob přípravy MP a jejich složení ovlivňuje profil uvolňování CA. [51]



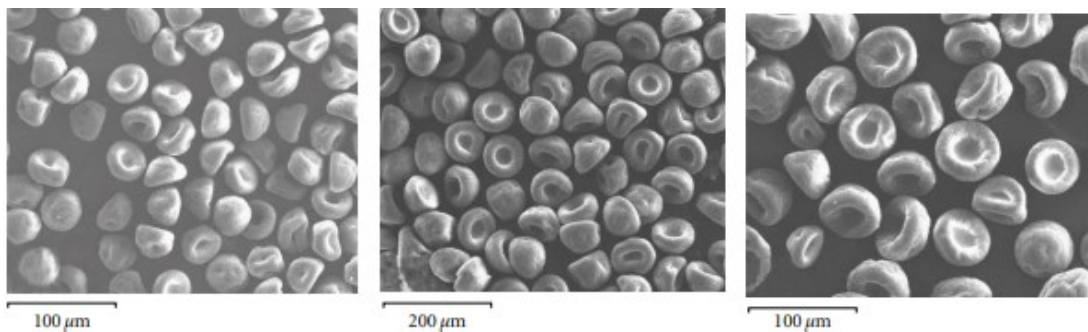
Obrázek 16: zobrazení MPI (A) a MPIO (B). Upraveno podle [51]

5.4.10 Chitosanové mikročástice připravené sprejovým sušením

Ve studii Liu a kol. [52] byly sprejovým sušením připraveny mikročástice chitosanu o vysoké molekulové hmotnosti a různé koncentraci (0,5%, 1% a 1,5%) pro hodnocení velikosti a morfologie částic. Vzorky byly připraveny rozpuštěním chitosanu v kyselině octové 1% a k některým byla přidána laktóza v různých poměrech. Roztoky chitosanu byly umístěny do skleněných lahví s uzávěrem a skladovány v inkubátoru při 35 °C, kdy byl proveden proces kyselé degradace po dobu 18 dnů, kdy vždy po několika dnech byly pozorovány změny roztoků. Sušení proběhlo nultý den, kdy byly roztoky připraveny a 18. den po ukončení inkubace. Při sušení byla vstupní teplota 180, 160, 140 a 120 °C pro studium vlivu teploty na morfologii částic.

Byla zkoumána viskozita roztoků a ukázalo se, že se zvyšující se koncentrací roztoku viskozita roste, zároveň při inkubaci roztoků ale viskozita postupně klesá (až o 72 %). Metoda FTIR byla použita ke zkoumání strukturálních změn molekuly chitosanu po inkubaci vzorků před sušením. Spektrum bylo téměř nezměněno, došlo pouze ke změnám intenzity některých píků, způsobených hydrolyzou O-glykosidové vazby a N-acetylové. Použitá koncentrace chitosanu měla vliv na velikost částic, čím vyšší koncentrace, tím větší jsou částice. Koncentrace ale neměla vliv na morfologii částic. Vliv teploty při sušení se ukázal jako důležitý faktor. Vzorky sušené vyšší teplotou měly tendenci k deformaci, zatímco částice získané při sušení nižší teplotou byly téměř sférické. Tento jev lze vysvětlit rozdílnou rychlostí sušení, kdy při vyšší

teplotě dochází v rychlejšímu sušení a tendenci částice k jejímu zhroucení. Velký vliv měla na podobu částic inkubace roztoků. Částice vzniklé po inkubaci byly menší a zhroucené, pravděpodobně kvůli snížení molekulové hmotnosti chitosanu (Obrázek 17). Naproti tomu částice před inkubací měly pravidelnější tvar a byly větší. Přítomnost laktózy ve vzorku zapříčinila hladší povrch a kulovitý tvar. Tyto vlastnosti se zlepšují se zvyšujícím se množstvím laktózy ve vzorku. [52]



Obrázek 17: SEM fotografie částic připravených z inkubovaných roztoků s rozdílnou koncentrací chitosanu. Zleva 0,5%, 1% a 1,5%. Upraveno podle [52]

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části byla příprava suspenzí, jejich následné sušení na sprejové sušárně a hodnocení vlastností vzniklého produktu.

6.1 Použité suroviny

Chitosan č.š. JB-CH190301, JBiChem, Čína

Meloxikam poskytnutý společností Zentiva, šarže není k dispozici

Tobolky želatinové 0, č.š. 4100000397

Fosforečnanový pufr o pH 6,8, příprava: Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 , Dr. Kulich Pharma, s.r.o.) 6,8 g byl rozpuštěn ve 250ml vody a doplněn do 1000ml

Roztok kyseliny octové o koncentraci 0,5 a 1 %

Čištěná voda

Methanol, č.š. 1948/10, Lab-Scan Analytical Sciences Corporate Profile, Polsko

6.2 Použité přístroje

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

Sprejová sušárna BÜCHI Mini spray dryer B-290, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko

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

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

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

PC s programem analySIS auto 5,1, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH,
Německo

Laboratorní síta 0,16 mm, 0,08 mm, STAST, Československo

Strojek pro plnění tobolek, HEROS, Česká republika

Filtr ze skleněných mikrovláken GF/D, 25 mm, GE Healthcare, USA

Sinker 11-31 AT 7,

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

Mísící zařízení Turbula T2F, WAB-GROUP, Německo

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

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

Váhy CAHN 26, Cahn instruments Inc, USA

Hliníkové kelímky Netzsch 100 DSC, Netzsch-Geratebau GmH, Selb, Německo

Ruční lis pro uzavření hliníkových kelímků, Netzsch-Geratebau GmH, Selb,
Německo

Netzsch DSC 200 F3 Maia, Netzsch-Geratebau GmH, Selb, Německo

6.3 Metody přípravy

Příprava probíhala na sprejové sušárně, kdy po vysušení suspenzí byly ze vzniklého produktu připraveny vzorky pro optickou a digitální mikroskopii, disoluci a DSC.

6.3.1 Sprejové sušení

Pro sprejové sušení byly nejprve připraveny roztoky rozpuštěním chitosanu ve 200 ml 0,5% kyseliny octové tak, aby vznikla vždy požadovaná koncentrace roztoku (0,5%, 1%, 1,5% a 2%). Složení jednotlivých vzorků je uvedeno v Tabulce 1. Roztoky byly následně míchány na magnetické míchačce do úplného rozpuštění chitosanu. V třence byl rozdrobňen meloxicam, vždy o hmotnosti 2 g a následně byl postupně přidáván roztok chitosanu do vzniku suspenze. K sušárně byl otevřen přívod vzduchu a nastaveny požadované parametry (Tabulka 2), které byly kontrolovány po celý průběh sušení. Po nahláti sušárny byla suspenze v kádince opět umístěna na míchačku, byla spuštěna pumpa a suspenze se začala nasávat směrem k trysce. Suspenze byla rozprašována tryskou do sušicí komory a vzniklý produkt byl zachycen do sběrné nádoby. Po vyčerpání suspenze bylo do kádinky převedeno malé množství 0,5% kyseliny octové, která sloužila k propláchnutí trysky a hadiček. Následně po vychladnutí, byly jednotlivé části sušárny rozebrány k vyčištění a výsledný produkt se sebral ze sběrné nádoby.

Tabulka 1: Složení vzorků pro sušení

Označení vzorku	Množství chitosanu (g)	Množství meloxicamu (g)
CH 0,5	1	2
CH 1	2	2
CH 1,5	3	2
CH 2	4	2

Tabulka 2: Parametry sušení

Parametry sušení	Experimentální podmínky
Vstupní teplota	170–210 °C
Výstupní teplota	88–137 °C
Výkon pumpy	5 %
Účinnost aspirátoru	100 %
Průtok vzduchu	30 mm ~ 439,11 L/h
Průměr trysky	1,4 mm
Frekvence čištění trysek	5

6.3.2 Optická mikroskopie

Po usušení produktu bylo kopistkou odebráno z každého jednotlivého vzorku malé množství částic. Pomocí laboratorního síta 0,16 mm se tento vzorek přesel přímo na podložní sklíčko z důvodu rozptýlení shluků částic a byl vložen na posuvný stolek mikroskopu Olympus BX 51. Pomocí PC programu byly pořízeny snímky připravených částic. Následně bylo totéž provedeno se samotnými nesušenými částicemi chitosanu a meloxikamu, pro porovnání vzhledu částic. Parametry použité pro optickou mikroskopii jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry optického mikroskopu

Zvětšení	10x
Rozlišení kamery	1360x1024 px
Rozlišení fotoaparátu	1360x1024 px
Velikost jednoho pixelu	0,2164 μm

6.3.3 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Částice byly pozorovány také pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Phenom Pro s detektorem zpětně odražených elektronů. Vzorky byly nejprve nalepeny na hliníkový terčík pomocí uhlíkové pásky a následně byla na povrch vzorku poprášeniím aplikována přibližně 10 nm vrstva zlata. Parametry mikroskopu pro pořízení fotografií byly nastaveny na zvětšení 2000x a 500x a urychlovací napětí 5 kV. Pořízení snímků proběhlo za asistence Mgr. Terezy Vařilové v Povodí Labe v Hradci Králové.

6.3.4 Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Pro hodnocení pomocí DSC bylo nejprve potřeba přenést sušený materiál do hliníkových kelímků. Nejprve byl zvážen hliníkový kelímek s víčkem, do kterého se udělal malý otvor. Následně pomocí kopistky, bylo do kelímku převedeno množství vzorku odpovídající hmotnosti 5 až 10 mg, bylo překryto víčkem a zváženo. Rozdíl mezi hmotnostmi kelímku se vzorkem a samotným kelímkem odpovídal naváženému množství vzorku. Následně byl kelímek se vzorkem vložen do ručního lisu a byl uzavřen. Manipulace s kelímkem probíhala celou dobu pomocí pinzety. Takto připravený vzorek mohl být vložen do DSC přístroje. Jako referenční vzorek byl použit prázdný kelímek. Po nastavení parametrů (Tabulka 4), bylo spuštěno měření.

Tabulka 4: Parametry nastavení DSC

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

Do programu DSC 200 byly zadány údaje: název vzorku, měření s korekcí nebo bez korekce, hmotnost prázdného kelímku, hmotnost vzorku, hmotnost referenčního vzorku a teplotní program. V teplotním programu byly zahrnuty hodnoty počáteční teploty, cílové teploty a rychlost pro chlazení nebo zahřívání a teplota konečného stavu. Podle nastavení parametrů přístroje docházelo ke změnám teplotních podmínek, které vedly ke změnám ve vzorku. Ty byly následně zaznamenávány do termogramu. Na termogramech se zaznamenávají píky, které jsou charakterizovány plochou a teplotami začátku, konce, vrcholu a celkové teplotní oblasti. Po ukončení měření byly v PC programu vyhodnocena získaná data v termogramu. Měření každého vzorku bylo provedeno dvakrát. První měření bezprostředně po usušení vzorků (M1) a druhé po 6 měsících (M2). Aby mohly být termogramy hodnoceny, měření se provedlo také u samotných látek chitosanu a meloxikamu.

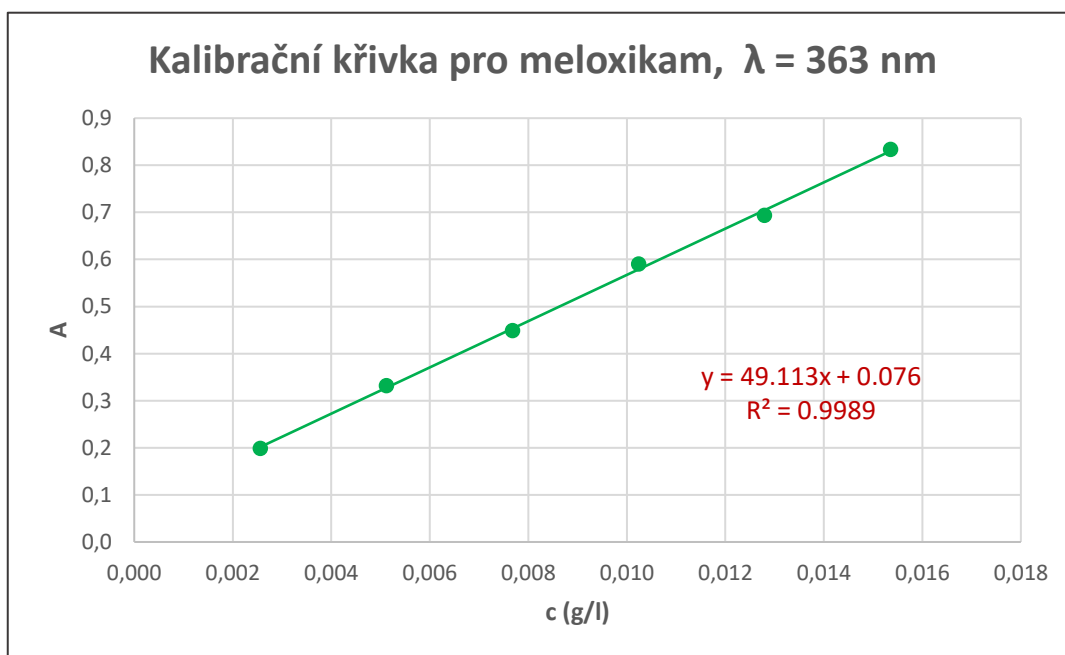
6.3.5 Disoluce a spektrofotometrie

Pro zjištění uvolňování léčiva, byla provedena zkouška disoluce se spektrofotometrickým vyhodnocením. Sprejově sušený produkt (100 mg) byl naplněn do želatinových tobolek velikosti 0. Byly připraveny také tobolky plněné fyzikální směsí chitosanu a meloxikamu. Směs byla vytvořena na základě poměru meloxikamu a chitosanu, který byl použit u směsí sušených (CH 0,5 – 2:1, CH 1 – 1:1, CH 1,5 – 2:3). Tyto směsi byly následně míseny po dobu 5 minut na Turbule a plněny do tobolek. Připraveny byly také tobolky obsahující pouze meloxikam 100 mg. Od každého vzorku sušené i fyzikální směsi a samotného meloxikamu byly připraveny vždy 3 tobolky obsahující stejný vzorek.

Pro disoluční zkoušku byl použit uzavřený disoluční systém s automatickým odběrem vzorků a následným doplněním media. Do každé z nádob disolučního systému bylo převedeno 500 ml pufru o pH 6,8. Dále byly do disolučního systému umístěny filtry, do kádinky umístěné vedle systému byl také převeden pufr, který sloužil k doplnění 5 ml objemu, který byl odebrán při odběru vzorku. Disoluční systém byl uzavřen, byla zapnuta míchadla, nastaven automatický odběr vzorků po 10 minutách s následným doplněním pufru a byla nastavena teplota systému na 37 °C. Po

nahřátí přístroje byly do systému umístěny sinkery s tobolkami a tím byla spuštěna disoluce. Zkouška probíhala 2 h.

Odebrané vzorky z disolučního systému byly převedeny do kyvet a vloženy do spektrofotometru s nastavením vlnové délky $\lambda = 363 \text{ nm}$, kde byly pomocí PC programu zjištěny hodnoty absorbance, ze kterých se vypočítal průměr a následně i koncentrace léčiva ze vzorce z kalibrační křivky (Obrázek 18). Jako slepý vzorek byl použit pufr o pH 6,8.



Obrázek 18: Kalibrační křivka pro meloxicam

Z vypočítané koncentrace byly následně vypočteny další veličiny týkající se uvolnění léčiva uvedeny v Tabulce 5.

Z důvodu možných ztrát léčiva a změn poměru léčivo : chitosan, bylo změřeno také množství meloxicamu v sušených vzorcích. 100 mg sušeného vzorku bylo převedeno do 10 ml methanolu, ve kterém se meloxicam dobře rozpouští a umístěno do ultrazvukové lázně. Následně byla suspenze zfiltrována přes filtr do kádinky a z té bylo odebráno 20 μl , které byly naředěny puftrem do 2 ml a byla změřena absorbance tohoto roztoku. Z naměřené absorbance byla vypočtena koncentrace podle vzorce z kalibrační křivky (Tabulka 5) a bylo zohledněno naředění. Z koncentrace bylo

vypočteno množství meloxikamu ve vzorcích. Tyto hodnoty byly použity pro výpočet množství uvolněného léčiva.

Tabulka 5: Vzorce pro výpočet veličin z disoluce

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

7 DISKUZE A VÝSLEDKY

Částice zkoumané v této práci byly připraveny metodou sprejového sušení, jejímž principem je sušení roztoků nebo suspenzí pomocí horkého sušícího media. Byly připraveny suspenze meloxicamu v roztoku chitosanu o jeho koncentraci 0,5 %, 1 %, 1,5 % a 2 %. Jednotlivé vzorky byly sušeny teplotou 170 °C, 190 °C a 210 °C na sprejové sušárně Büchi Mini Spray Dryer B-290.

Nejen parametry nastavení sprejové sušárny, ale i koncentrace roztoků, nebo množství použitých komponent, mohou ovlivnit výsledné vlastnosti částic, jako jsou velikost a morfologie, tepelné vlastnosti, nebo uvolňování léčiva. V této práci byl hodnocen vliv teploty sušení a koncentrace roztoku na vlastnosti částic.

Roztoky s 2% obsahem chitosanu nejsou v diskuzi hodnoceny, protože nebylo možné sušit vzhledem k vysoké viskozitě. Docházelo k ucpávání trysky a nemohl vznikat produkt.

Vzhled ostatních připravených částic byl hodnocen pomocí optického mikroskopu Olympus BX 51 a skenovacího elektronového mikroskopu Phenom Pro.

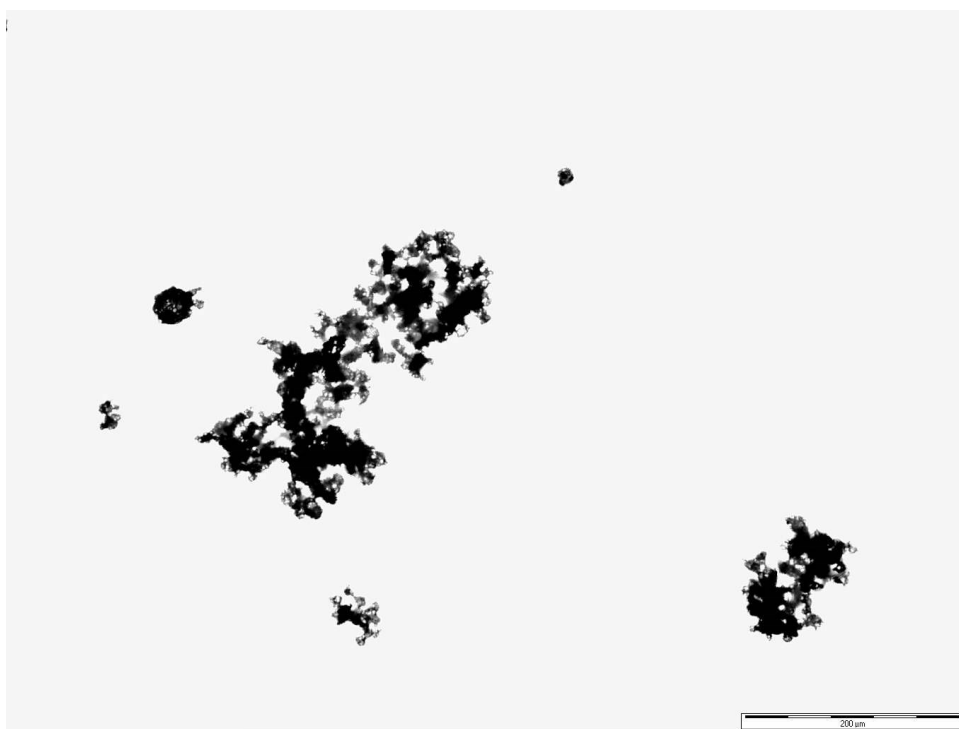
Metodou DSC na přístroji DSC 200 F3 NETZSCH Proteus byly zkoumány změny tepelných vlastností vzorků. Tyto změny byly pozorovány bezprostředně po vysušení vzorků a následně po 6 měsících. Vždy byly provedeny dva ohřevy. Ve výsledných termogramech bylo možné pozorovat změny jako jsou teplota tání, dehydratace, nebo dekompozice jednotlivých komponent vzorku v závislosti na teplotě.

Uvolňování léčiva bylo hodnoceno disoluční zkouškou a následnou spektrofotometrií z pevných lékových forem – tobolek. Disoluční systém Sotax AT7 Smart a Autosampler Sotax CH-4123 umožnily automatický odběr vzorků s následným doplněním media. Vzorky byly odebírány vždy po 10 minutách po dobu 120 minut. U odebraných vzorků byla následně změřena absorbance na UV/VIS Spektrofotometru Analytik Jena Specord 205 a vypočtena teoretická koncentrace

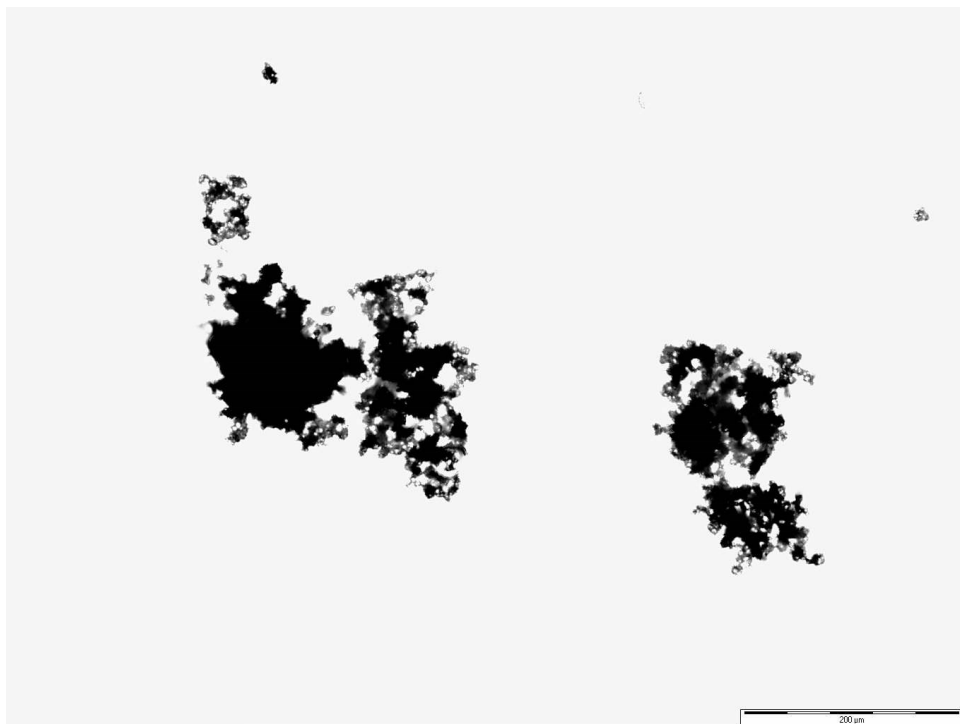
a množství uvolněného léčiva. Hodnoty u sprejové sušených vzorků byly srovnány se samotným meloxikamem a fyzikálními směsmi.

7.1.1 Vliv koncentrace roztoku a parametrů sušení na vzhled částic

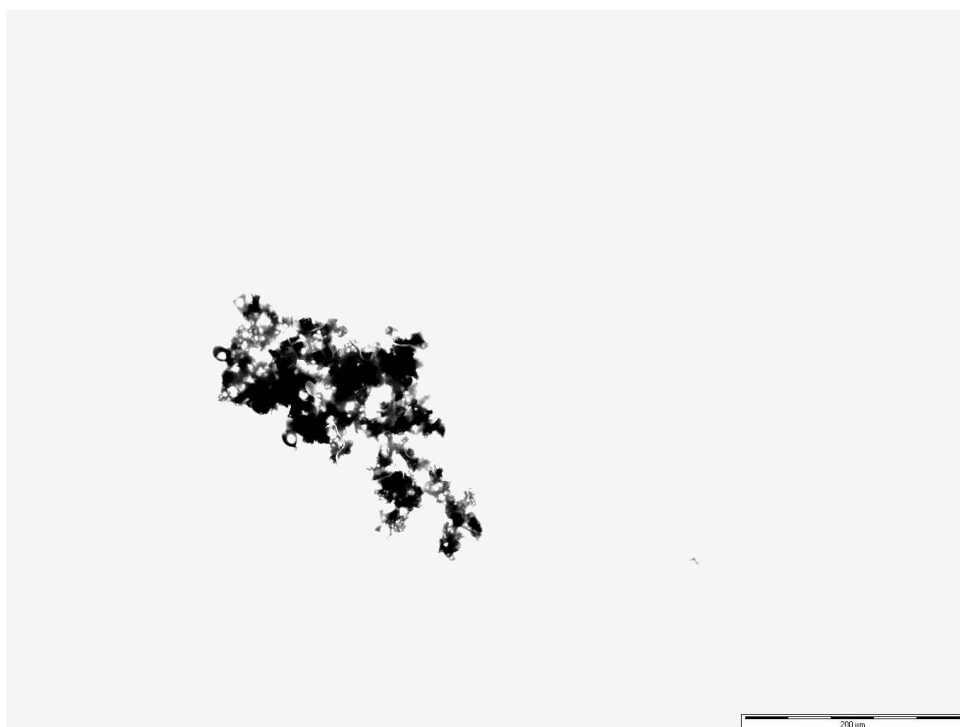
Na snímcích optického mikroskopu (Obrázky 19–27) je patrné, že malé částice tvořily shluky a velikost těchto shluků byla velmi různá. Primární částice mají spíše sférický tvar a výrazně se tak liší od původních částic chitosanu, které jsou destičkové. Shluky částic jsou pak nepravidelného tvaru a jednotlivé vzorky se mezi sebou výrazně neliší. Na vzhled částic pravděpodobně nemá vliv teplota sušení, ani koncentrace roztoků. Nebyla hodnocena velikost částic, kde by se mezi jednotlivými vzorky po prozkoumání mohly objevit rozdíly, především díky rozdílné koncentraci chitosanu. Snímky výchozích surovin můžeme pozorovat na Obrázcích 28 a 29. Ve studii He a kol. [42], kde se zabývali hodnocením vlastností sprejově sušeného chitosanu a H₂-antagonistů, zjistili, že použitá teplota i koncentrace roztoku má vliv na velikost částic. Proto by bylo pro další vzorky vhodné vyhodnocení i velikosti částic.



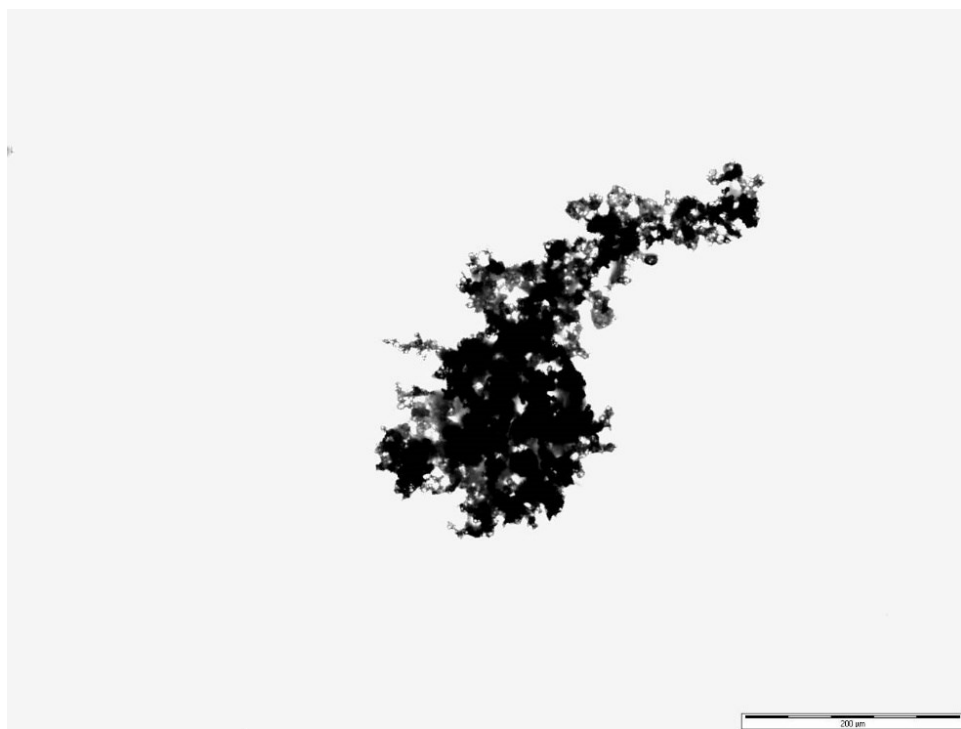
Obrázek 19: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 0,5 % při vstupní teplotě 170 °C



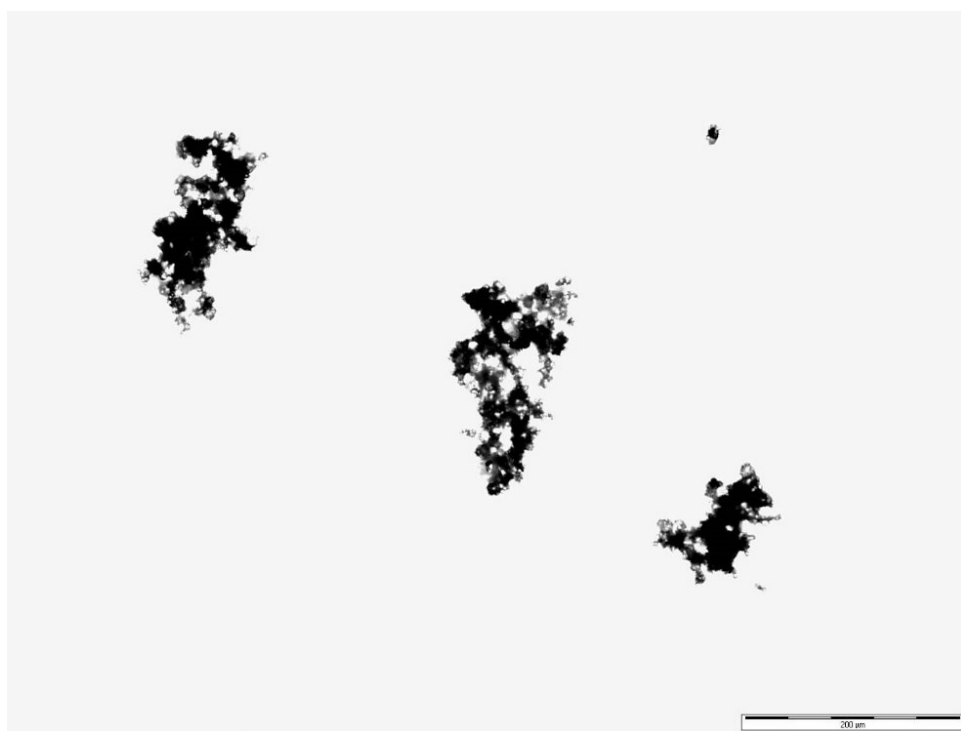
Obrázek 20: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 0,5 % při vstupní teplotě 190 °C



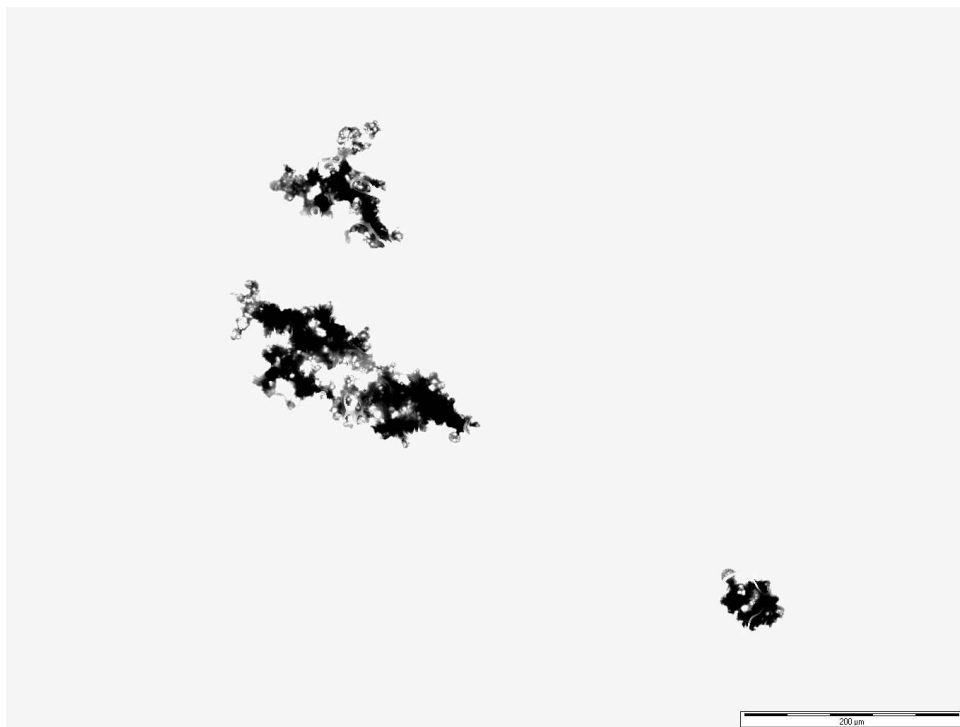
Obrázek 21: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 0,5 % při vstupní teplotě 210 °C



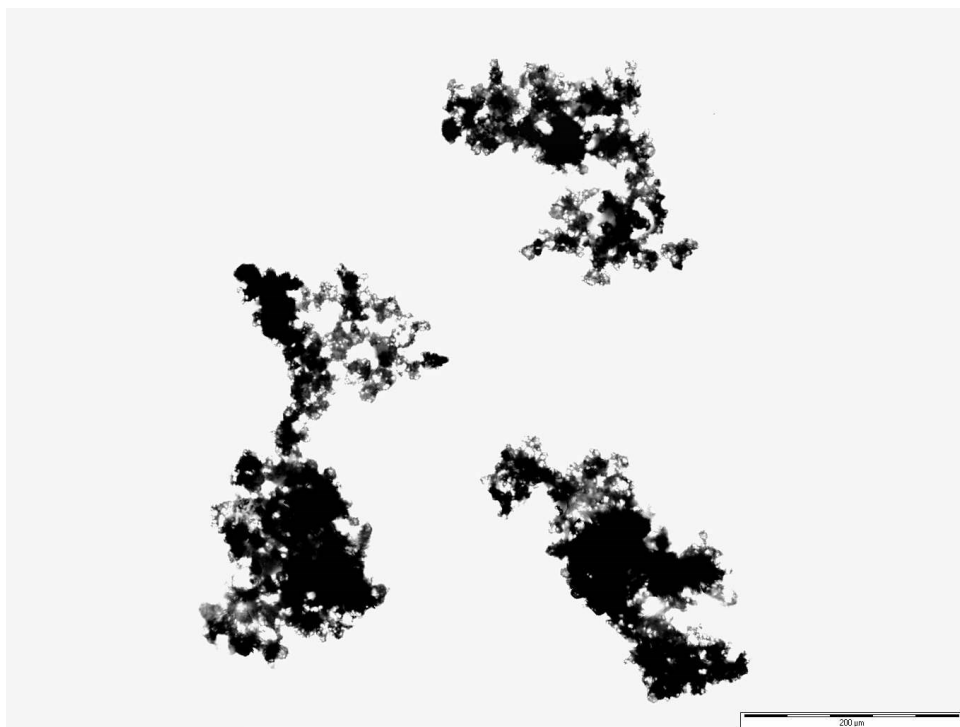
Obrázek 22: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 1 % při vstupní teplotě 170 °C



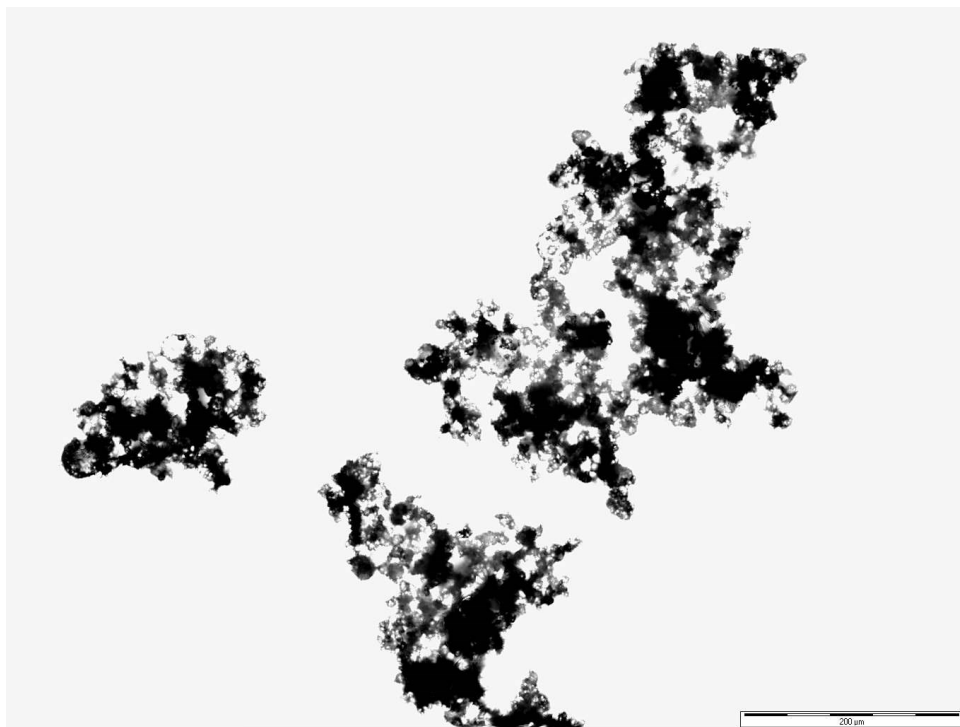
Obrázek 23: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 1 % při vstupní teplotě 190 °C



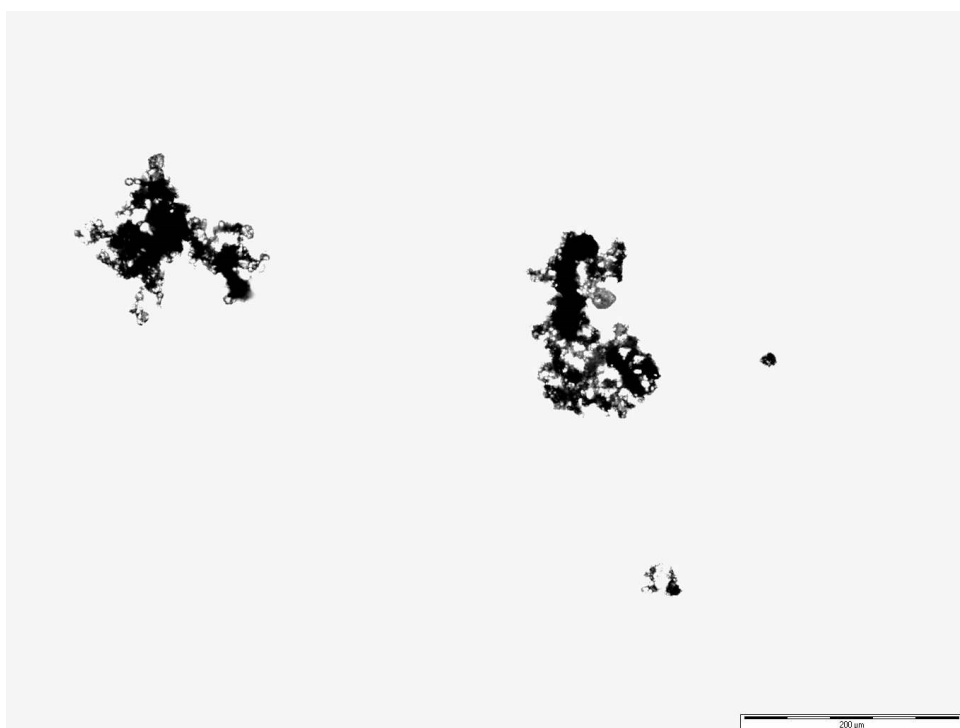
Obrázek 24: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 1 % při vstupní teplotě 210 °C



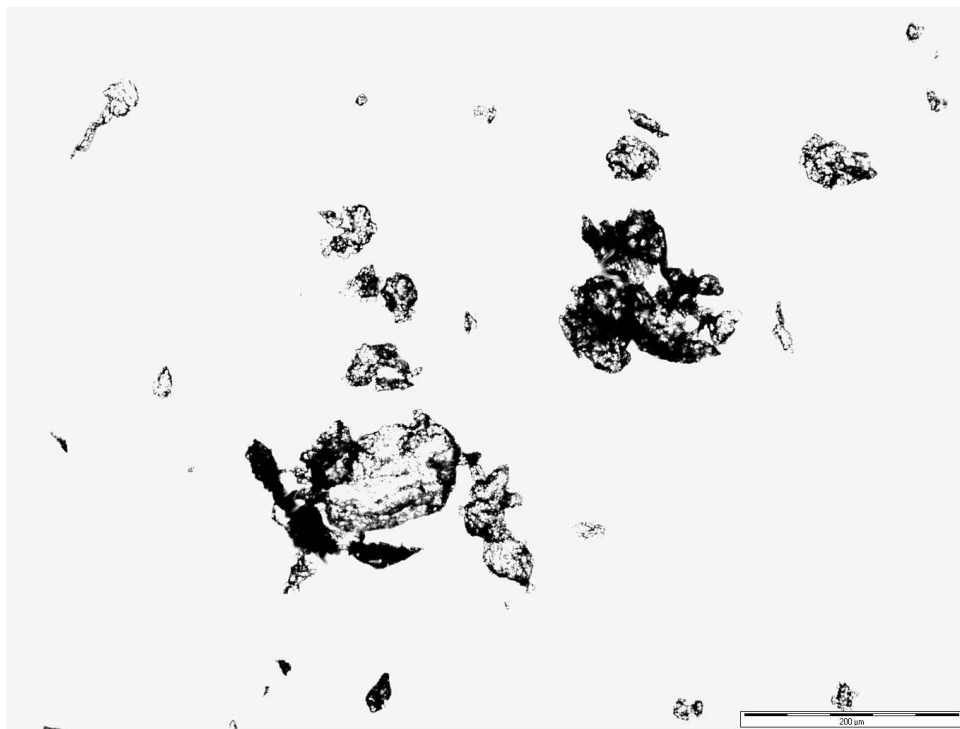
Obrázek 25: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 1,5 % při vstupní teplotě 170 °C



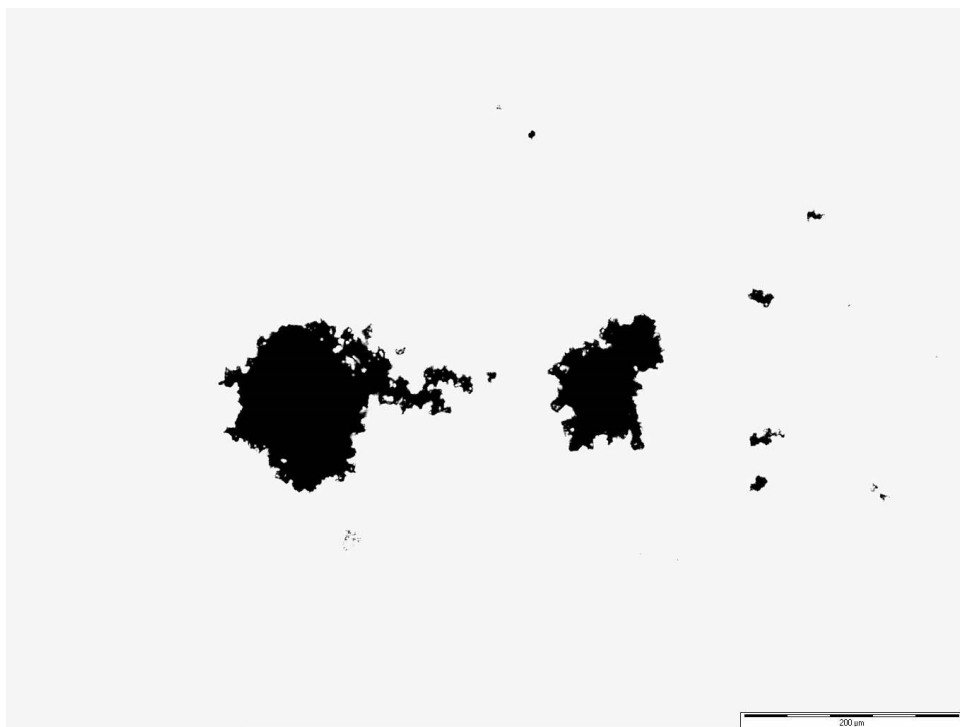
Obrázek 26: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 1,5 % při vstupní teplotě 190 °C



Obrázek 27: Částice sušeného chitosanu o koncentraci 1,5 % při vstupní teplotě 210 °C

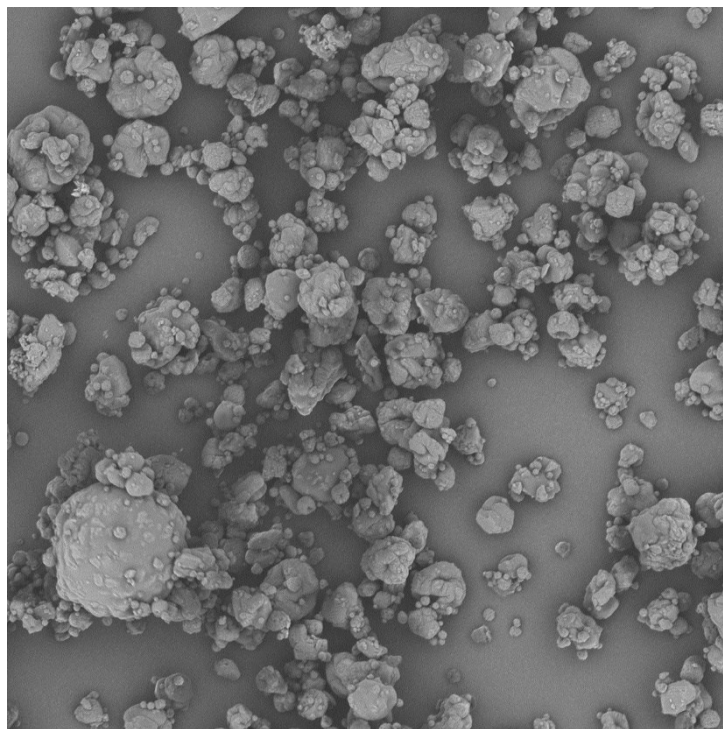


Obrázek 28: Částice nesušeného chitosanu

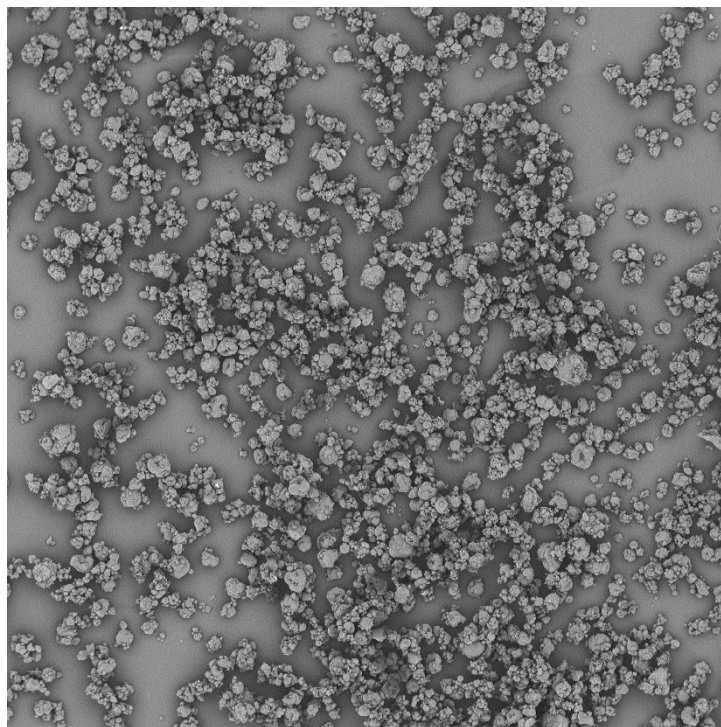


Obrázek 29: Částice nesušeného meloxicamu

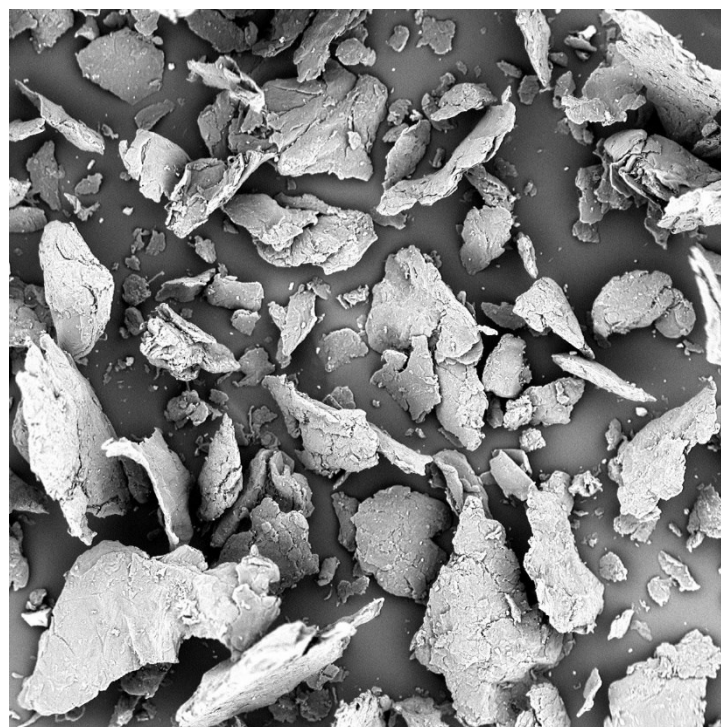
Pro hodnocení SEM byl vybrán vzorek s 1% koncentrací chitosanu sušený při teplotě 210 °C a částice byly zobrazeny 500x a 2000x zvětšené (Obrázky 30 a 31). Byly pořízeny také snímky samotného nesusušeného chitosanu a meloxikamu s přiblížením 500x (Obrázky 32 a 33). Při jejich porovnání se sprejově připraveným vzorkem je viditelný výrazný rozdíl jak ve velikosti, tak ve tvaru částic. U sušeného materiálu lze pozorovat jednotlivé částice, které mají nepravidelný kulovitý tvar a zvrásněný povrch. Kulovitý tvar částic vzniká díky tomu, že se během sprejového sušení po průchodu tryskou vytváří sférické kapičky. Potvrdilo se, že částice tvoří shluky, a ačkoliv nebyla měřena velikost částic, lze říct, že se pohybuje v rozmezí jednotek až desítek mikrometrů. Nejmenší pozorovatelné částice jsou často kulovitého tvaru. Obecně je velikost sušených částic menší v porovnání s částicemi samotného chitosanu, ale větší než částice samotného meloxikamu. Částice meloxikamu pak mohou být jednak obaleny a uzavřeny ve sférických částicích chitosanu nebo na jejich povrchu. Předpokládáme, že dochází ke kombinaci těchto možností. Částice s podobně zvrásněným povrchem připravili také Aranaz a kol. [48] nebo Jiang a kol. [49], kteří ve svých studiích použili chitosan o vysoké molekulové hmotnosti.



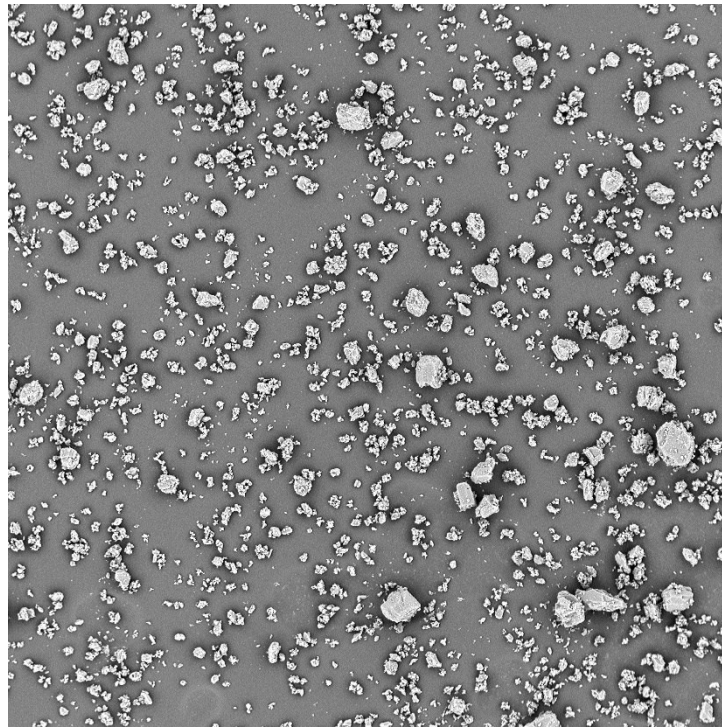
Obrázek 30: SEM snímek částic sušeného chitosanu o koncentraci 1 % a vstupní teplotě 210 °C se zvětšením 2000x



Obrázek 31: SEM snímek částic sušeného chitosanu o koncentraci 1 % a vstupní teplotě 210 °C se zvětšením 500x



Obrázek 32: SEM snímek nesusšeného chitosanu se zvětšením 500x

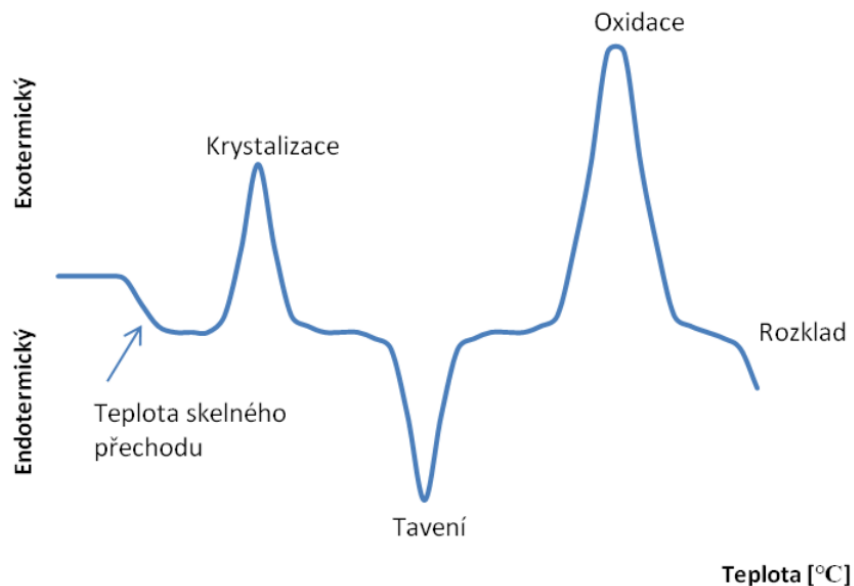


Obrázek 33: SEM snímek nesušeného meloxicamu se zvětšením 500x

7.2 Vyhodnocení tepelných vlastností vzniklých částic pomocí DSC

Metodou DSC, tedy diferenciální skenovací kalorimetrií, byly vyhodnoceny tepelné vlastnosti zkoumaných částic. Základní typy změn, které nastávají u polymerů jsou zobrazeny na Obrázku 34. Pro děje, které jsou vyjádřeny na termogramu endotermními píky platí, že je k jejich realizaci potřeba dodat energii. Naopak pro děje zobrazené exotermními píky platí, že dochází k uvolňování tepla. Termogramy částic byly nejprve porovnány s jednotlivými termogramy výchozích látek (Obrázky 35 a 36) a následně byl pozorován vliv koncentrace a teploty sušení na jednotlivé vzorky. Porovnány byly také píky mezi M1 a M2. Na termogramech jsou pozorovatelné endotermní píky, které vyjadřují dehydrataci chitosanu (Obrázek 35) a tání meloxicamu a jeden pík exotermní, který vyjadřuje dekompozici meloxicamu (Obrázek 36). Příklady termogramů vybraných vzorků (vzorků (CH 1 % 170 °C

a CH 1,5 % 190 °C) jsou na Obrázcích 37–40. Teploty píků jednotlivých dějů u všech vzorků jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.



Obrázek 34: Obecné zobrazení termogramu a termických změn, které nastávají v polymerech. Upraveno podle [53]

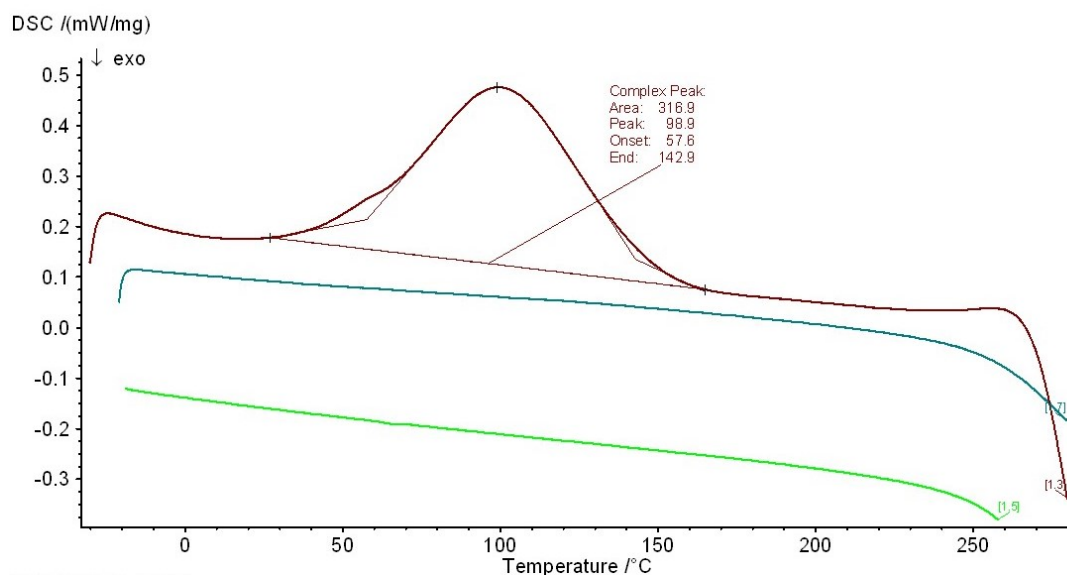
Prvním píkem na termogramu sušených částic je pík dehydratace chitosanu. Pík dehydratace odpovídá ztrátě vody vázané na polymer. U samotného chitosanu jako výchozí suroviny odpovídá pík dehydratace 98,9 °C. Podobnou teplotu zaznamenali pro chitosan také Neto a kol. [54], kde byl pozorován pík dehydratace samotného chitosanu v okolí 100 °C a Corrigan a kol. [43], kde byl pík přibližně 90°C. Při porovnání termogramů sušených vzorků s termogramem samotného chitosanu (Obrázek 35) bylo zjištěno, že došlo k poklesu hodnot jak při prvním měření M1 (pík se zde nacházel v rozmezí 70,5–92,6 °C) tak i při druhém měření M2 (rozmezí 63,4–98,8 °C). Teplota dehydratace sušených částic se při druhém měření snížila až o 35,5 °C v porovnání se samotným chitosanem a hodnoty jsou u většiny vzorků také nižší v porovnání s prvním měřením. Podobnou odchylku zaznamenali i Lopodota a kol. [50], kdy došlo k posunu od původních přibližně 100 °C k 80 °C při koncentraci roztoku 3 %. Při porovnání teplot dehydratace na základě koncentrace roztoku není

zřejmá závislost. M1 ukázalo, že nejvyšší hodnoty dehydratace byly dosaženy při teplotě sušení 190 °C, u M2 tato závislost ale patrná není.

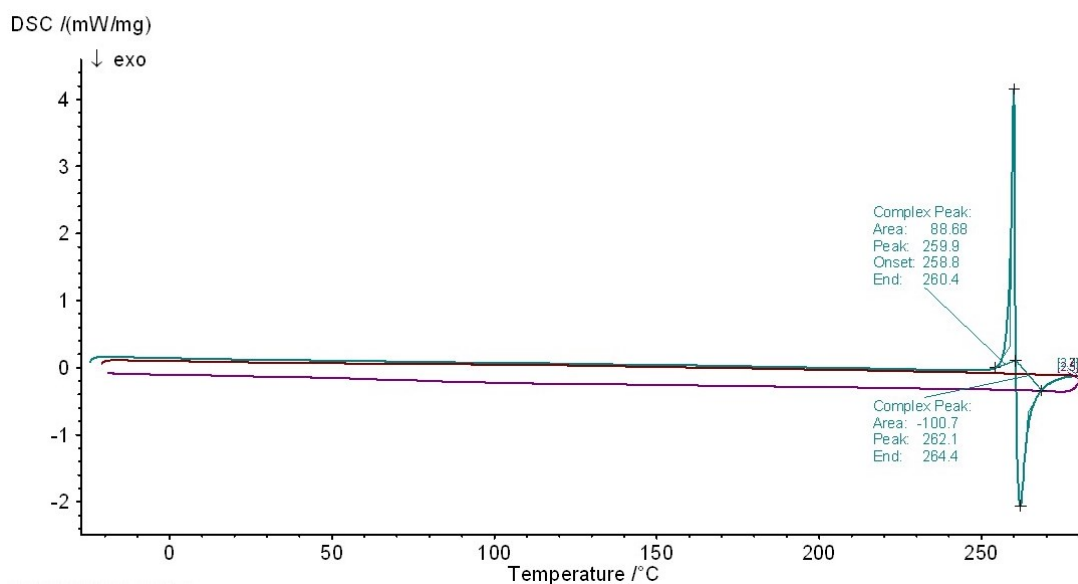
Na termogramu samotného léčiva (Obrázek 36) jsou viditelné dva píky, první prudce endotermní pík teploty tání meloxicamu při 259,9 °C a druhý prudce exotermní pík dekompozice při 262,1 °C. Ve studii Rus a kol. [55] byl pozorován pík teploty tání meloxicamu při 262,89 °C a ve studii Naidu a kol. [56] byl pík pozorován při teplotě 257,7 °C, což je v souladu s námi zjištěnými hodnotami. Odpovídající píky u sušených částic se pohybují u M1 mezi 248,5 °C a 251,4 °C a u M2 mezi 244,5 °C a 252,5 °C. Teplota tání meloxicamu se po sušení snížila cca o 10 °C. Snížení teploty tání meloxicamu po sprejovém sušení zaznamenali také Pomázi a kol. [57] a to o 25 °C. Při porovnání koncentrací roztoků zde nedochází k výrazným změnám teploty tání meloxicamu a stejně tak nemá vliv ani teplota sušení, i když u M1 i M2 byla zaznamenána nejvyšší teplota při 170 °C, kromě CH 1,5 při M2. Poklesy v rámci dalších teplot sušení jsou ale zanedbatelné. Pík dekompozice klesl stejně jako pík teploty tání přibližně o 10 °C a vliv koncentrace a teploty sušení je zde stejný jako u teploty tání.

Při porovnání jednotlivých píků mezi M1 a M2 jsou pozorovatelné změny u píku dehydratace chitosanu po 6 měsících, kdy u většiny vzorků došlo ke snížení teploty dehydratace. U vzorků CH 0,5 190 °C, CH 1 210 °C a CH 1,5 210 °C došlo ke zvýšení hodnoty o 6,2 až 8,2 °C. Celková odchylka se pohybovala mezi 6,2 až 17,8 °C. U teploty tání meloxicamu k tak výrazným změnám nedocházelo. Vzorky, které vykazovaly zvýšenou teplotu dehydratace chitosanu při M2, naopak vykazovaly snížení teploty tání meloxicamu. Ostatní vzorky vykazovaly zvýšení teploty tání. Tyto změny se pohybovaly mezi 0,1 až 5,2 °C. Kromě teploty tání meloxicamu u CH 1 210 °C, kde byla odchylka největší (5,2 °C), byly změny minimální. Meloxicam v částicích zůstává tedy i po 6 měsících podle teploty tání ve stejné formě jako bezprostředně po sušení a lze jej považovat za stabilní. U dekompozice meloxicamu jsou změny mezi M1 a M2, stejně jako u teploty tání minimální, kromě vzorku CH 1 210 °C, kde byla změna 5,3 °C (snížení).

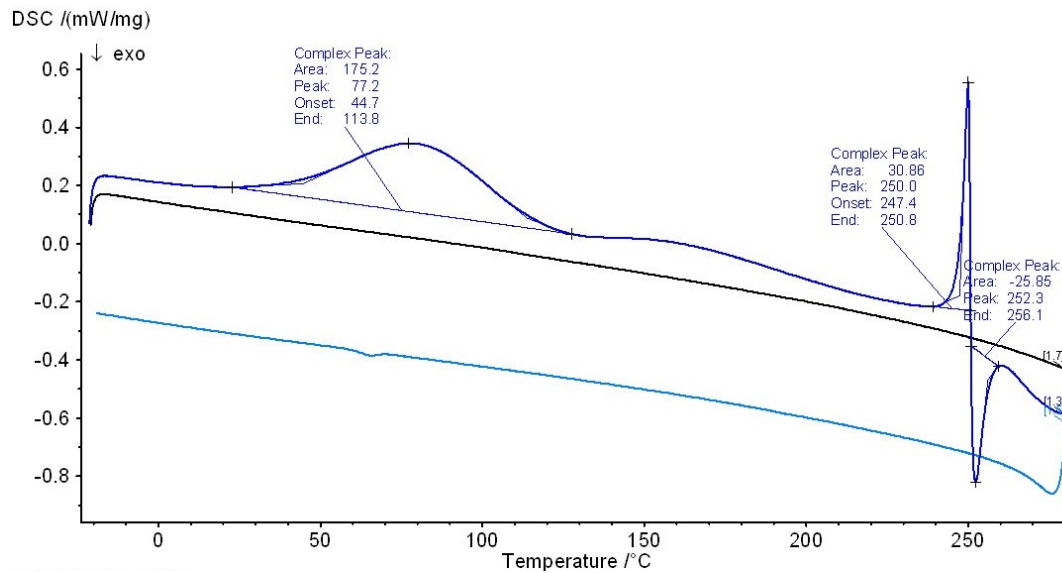
U chitosanu se také objevuje teplota skelného přechodu, což je teplota, při které polymer přechází z tuhého (skelného) stavu, do stavu viskózního. Tento děj není u našich vzorků pozorovatelný díky nízké citlivosti přístroje. Mohl by být zaznamenán pomocí jiné, citlivější metody, jako je například dynamické DSC. [58]



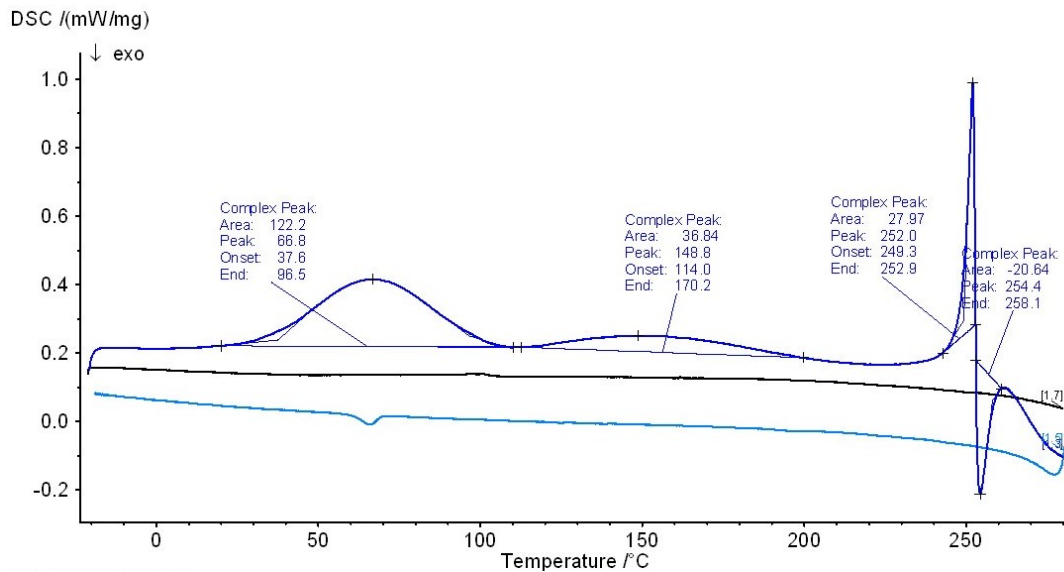
Obrázek 35: Termogram nesušeného chitosanu. Křivka prvního ohřevu (hnědá), křivka druhého ohřevu (tmavě zelená), křivka chlazení (světle zelená)



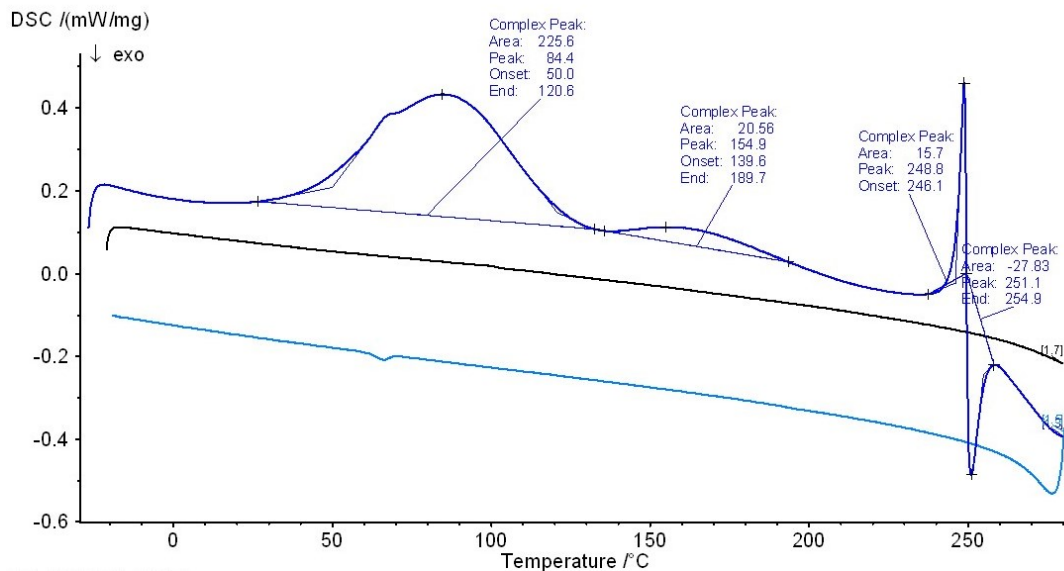
Obrázek 36: Termogram nesusšeného meloxicamu. Křivka prvního ohřevu (zelená), křivka druhého ohřevu (hnědá), křivka chlazení (růžová)



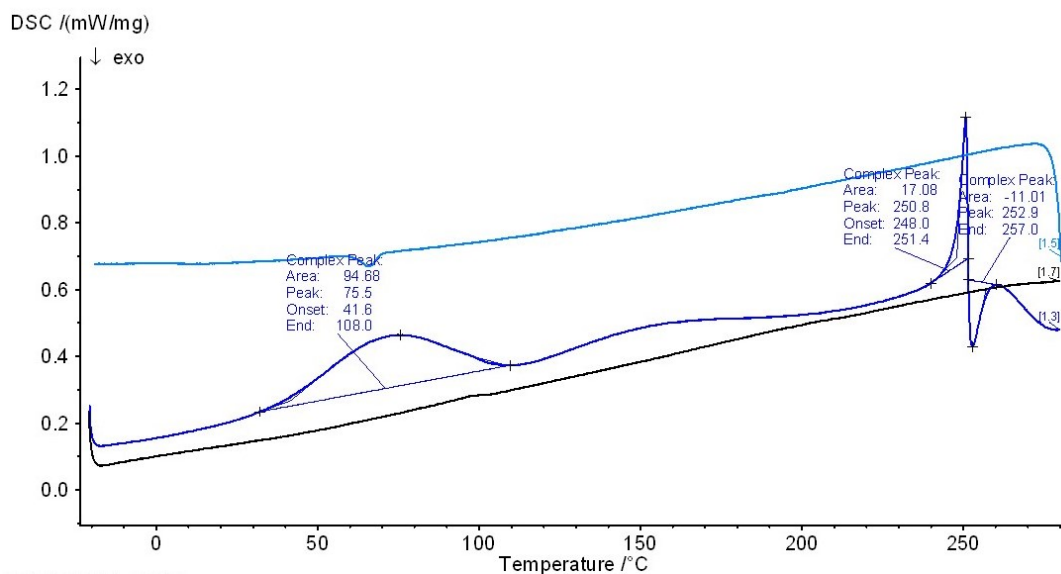
Obrázek 37: Termogram vzorku CH 1 170 °C při M1. Křivka prvního ohřevu (tmavě modrá), křivka druhého ohřevu (černá), křivka chlazení (světle modrá)



Obrázek 38: Termogram vzorku CH 1 170 °C při M2. Křivka prvního ohřevu (tmavě modrá), křivka druhého ohřevu (černá), křivka chlazení (světle modrá)



Obrázek 39: Termogram vzorku CH 1,5 190 °C při M1. Křivka prvního ohřevu (tmavě modrá), křivka druhého ohřevu (černá), křivka chlazení (světle modrá)



Obrázek 40: Termogram vzorku CH 1,5 190 °C při M2. Křivka prvního ohřevu (tmavě modrá), křivka druhého ohřevu (černá), křivka chlazení (světle modrá)

Tabulka 6: Teploty píků jednotlivých dějů z termogramů vzorků při M1

M1	Dehydratace chitosanu (°C)	Teplota tání meloxicamu (°C)	Dekompozice meloxicamu (°C)
CH 0,5, 170 °C	70,5	251,4	253,8
CH 0,5, 190 °C	92,6	248,5	250,8
CH 0,5, 210 °C	85,9	248,6	251,0
CH 1, 170 °C	77,2	250,0	252,3
CH 1, 190 °C	85,4	249,1	251,4
CH 1, 210 °C	81,7	249,7	252,2
CH 1,5, 170 °C	80,3	250,2	252,3
CH 1,5, 190 °C	84,4	248,8	251,1
CH 1,5, 210 °C	71,5	249,7	252,0

Tabulka 7: Teploty píků jednotlivých dějů z termogramů vzorků při M2

M2	Dehydratace chitosanu (°C)	Teplota tání meloxicamu (°C)	Dekompozice meloxicamu (°C)
Ch 0,5, 170 °C	63,4	252,5	254,8
Ch0,5, 190 °C	98,8	247,7	250,1
Ch 0,5, 210 °C	68,1	251,4	253,7
Ch 1, 170 °C	66,8	252,0	254,4
Ch 1, 190 °C	77,5	250,4	252,7
Ch1, 210 °C	89,5	244,5	246,9
Ch 1,5, 170 °C	70,0	250,5	252,7
Ch 1,5, 190 °C	75,5	250,8	252,9
Ch 1,5, 210 °C	79,7	249,6	251,8

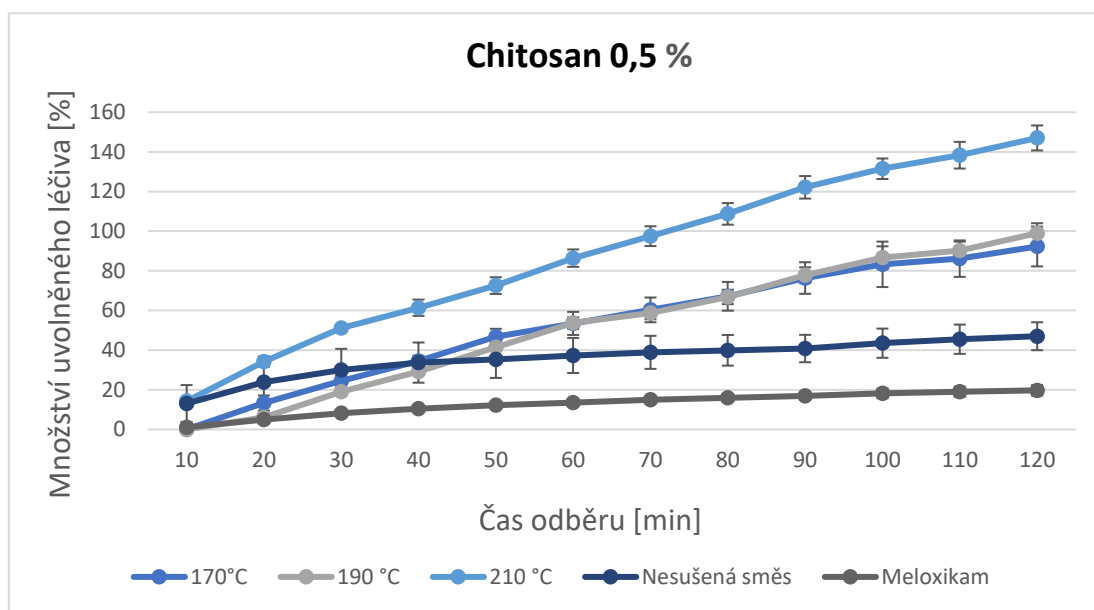
7.3 Hodnocení uvolňování léčiva zkouškou disoluce a spektrofotometrie

Při porovnání uvolňování léčiva ze vzorků CH 0,5 (Obrázek 41) při všech teplotách, v nesusušené fyzikální směsi a v tobolkách meloxicamu bylo zjištěno, že uvolňování léčiva ze sušených vzorků bylo vyšší než u nesusušené směsi a tobolek meloxicamu. Po 120 minutách disoluce bylo z tobolek meloxicamu uvolněno pouze 19,72 % a z nesusušené směsi 47,02 %. U sušených vzorků bylo uvolňování vyšší, vzorky sušené při 170 °C a 190 °C vykazovaly velmi podobný profil uvolňování a po 120 minutách dosáhly hodnot 92,28 % a 99,01 %. Ze vzorku sušeném při 210 °C bylo uvolněno 147,03 %. Pro takto vysoké hodnoty může být několik důvodů. Jedním z nich je neúplné rozpuštění meloxicamu při stanovování množství léčiva ve vzorku. Při filtraci pak ulpívalo množství nerozpuštěného chitosanu s meloxicamem na filtru a léčivo tak nebylo obsaženo v analyzovaném vzorku. Tento problém by mohl být vyřešen např. prodloužením doby rozpouštění, popřípadě zvolením jiné metody nebo rozpouštědla. Dalším důvodem mohla být nehomogenita směsi, kdy byl pro stanovení obsahu použit vzorek s menším obsahem léčiva. Celkový profil uvolňování je pro vzorky CH 0,5 spíše pozvolný, nedochází k rychlému uvolnění léčiva na začátku a v prvních 40 minutách jsou hodnoty nižší než u fyzikální směsi (s výjimkou teploty 210 °C). Ve studii He a kol. došlo [42] k rychlému uvolnění léčiv ze skupiny H₂-antagonistů ze sprejově sušených částic s chitosanem, a to již během několika minut. Toto rychlé uvolnění mohlo být způsobeno hydrofilní povahou polymeru i léčiva.

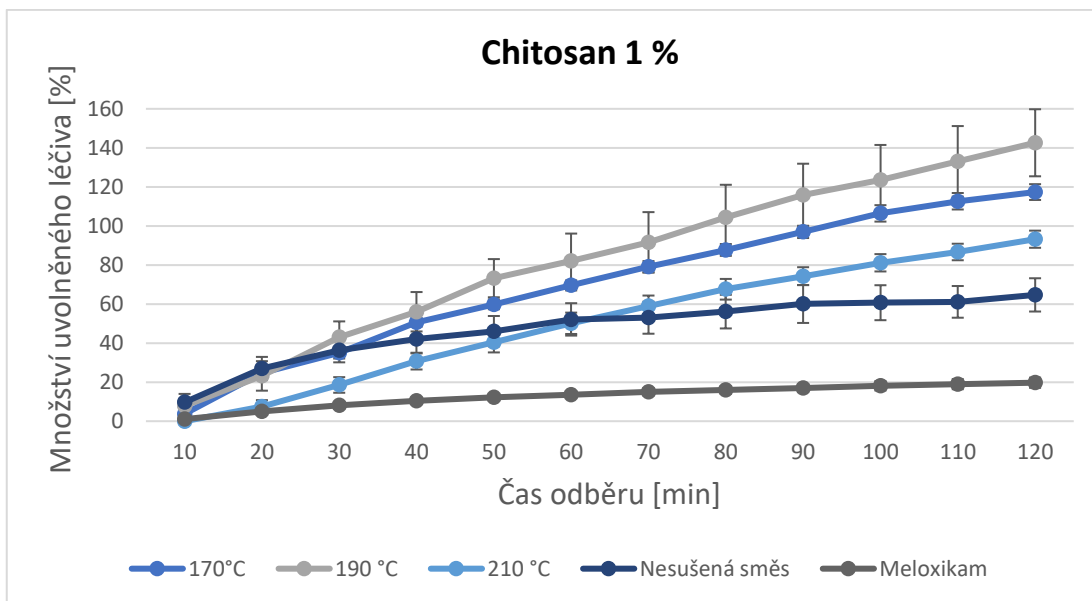
Ve vzorcích CH 1 (Obrázek 42) bylo ze vzorku nesusušené směsi uvolněno po 120 minutách 64,69 % léčiva, ze vzorku sušeném při 170 °C 117,37 %, ze vzorku sušeném při 190 °C 142,61 % a ze vzorku sušeném při 210 °C 93,21 %. Stejně jako u koncentrace chitosanu 0,5 %, i zde je uvolňování postupné a v prvních 30 minutách srovnatelné s fyzikální směsí. V tomto případě ale vzorek sušený při 210 °C vykazoval nejpomalejší uvolňování. Ve vzorcích CH 1,5 (Obrázek 43) bylo z nesusušené směsi uvolněno po 120 minutách 94,22 % léčiva, ze směsi sušené při 170 °C bylo uvolněno 82,2 %, ze vzorku sušeného při 190 °C 78,77 % a ze vzorku sušeném při 210 °C 117,96 %. Nejvyšší koncentrace chitosanu, v porovnání s fyzikální směsí, uvolňování léčiva snížila. Pouze u vzorku sušeného při 210 °C došlo po 80 minutách ke zvýšení. Zároveň lze také pozorovat trend zvýšení uvolňování léčiva z fyzikální směsi s rostoucím obsahem chitosanu. Už při prostém mísení tak dochází k vyššímu uvolnění v porovnání se samotným meloxicamem a chitosan jako nosič tak ještě podporuje rozpouštění léčiva. Ve studii Sogiasse a kol. [15] bylo porovnáno uvolňování ibuprofenu z fyzikální směsi chitosanu a léčiva a sušených částic. Při pH 7 došlo k uvolnění většího množství léčiva z fyzikální směsi než ze vzorků sprejově sušených, a to o cca 20 %, kdy se množství uvolněného léčiva dostalo po 300 minutách k 50 %. Ve studii Al-Helw a kol. [59] byl porovnáván vliv uvolnění fenobarbitalu z mikrosfér chitosanu o různé molekulové hmotnosti. Byla zjištěna závislost uvolňování léčiva na molekulové hmotnosti, kdy s vyšší molekulovou hmotností dochází k nižšímu uvolnění léčiva až o cca 45 % po 6 hodinách.

Na obrázcích 44 až 46 lze porovnat uvolňování v závislosti na teplotě. Ačkoliv při teplotě 170 a 190 °C bylo uvolněno největší množství léčiva ze vzorku CH 1 (vzorky o koncentraci 0,5 % a 1,5 % mají podobný profil uvolňování), u teploty 210 °C bylo uvolňování u tohoto vzorku nejnižší. Zde jsou také patrné největší rozdíly v disolučních profilech. Nelze tedy říct, že by uvolňování léčiva bylo přímo závislé na použité teplotě sušení nebo koncentraci roztoku. Můžeme pozorovat podobné profily disoluce hlavně pro koncentrace 0,5 a 1,5 % a teploty sušení 170 a 190 °C. Pozvolný profil uvolňování léčiva ze sprejově sušených vzorků pak může být způsoben tím, že část částic meloxicamu je obalena chitosanem, část je volná nebo vázaná na povrch větších částic ve vzorku a ke kontaktu s disolučním médiem dochází postupně.

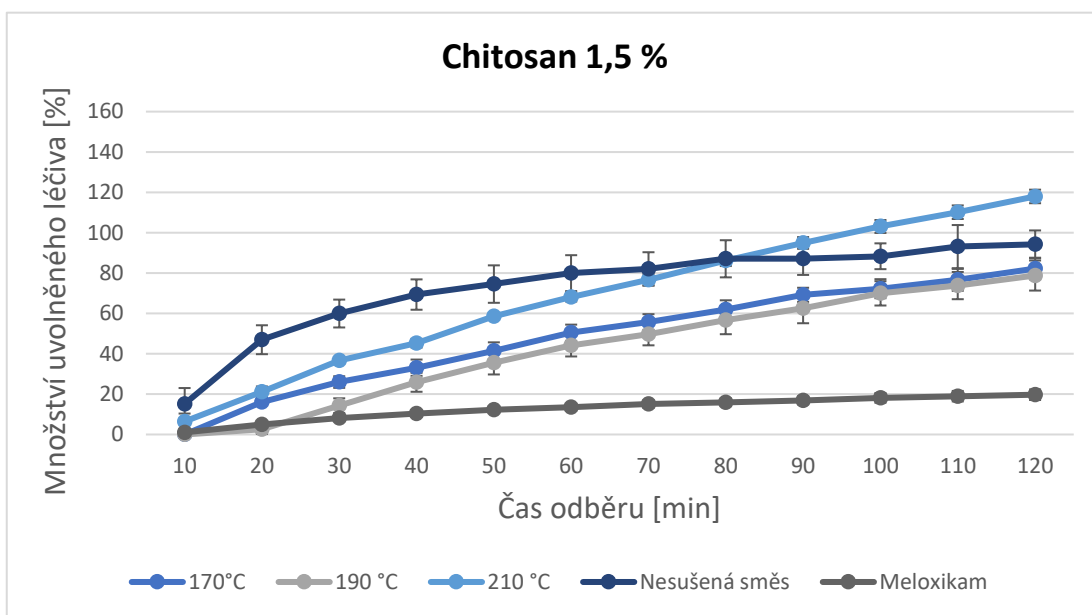
Nejprve to jsou volné částice léčiva navázané na povrchu sprejově sušených částic a až následně ty, které se uvolní díky erozi. Chitosan v použitém pufru není rozpustný (pH 6,8) a během zkoušky docházelo ke slepení částic, které i po ukončení zkoušky měly tvar použité tobolky. Na Obrázku 47 jsou fotografie vzorků CH 0,5 sušených při 170 a 190 °C již po disoluci. Je zde vidět, že i po disoluci se vzorek kompletně nerozpadl.



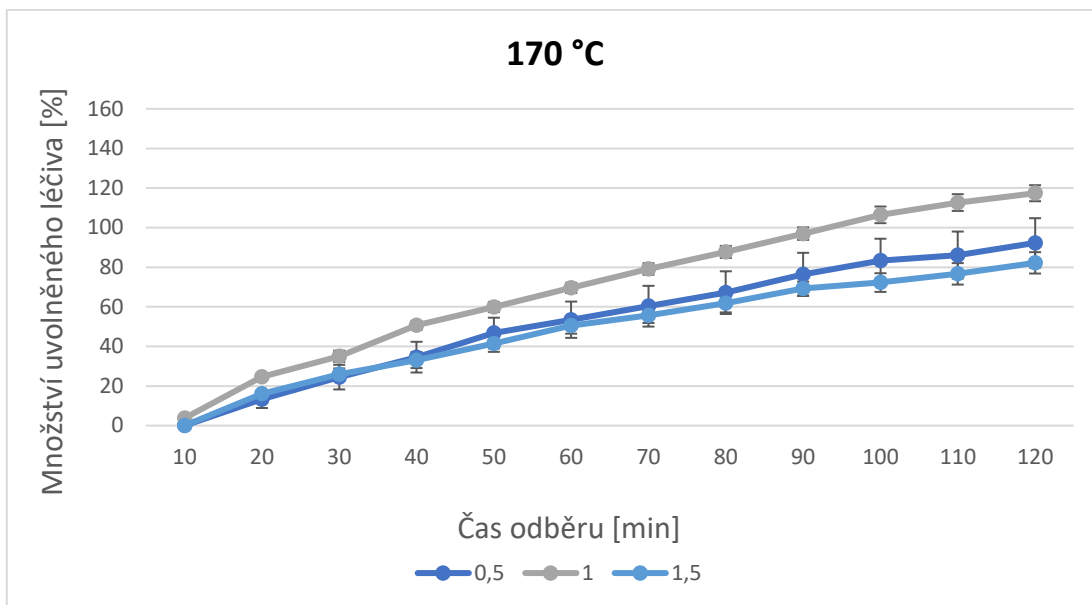
Obrázek 41: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas ve vzorku CH 0,5 při všech teplotách, v nesušené směsi a u samotného meloxicamu



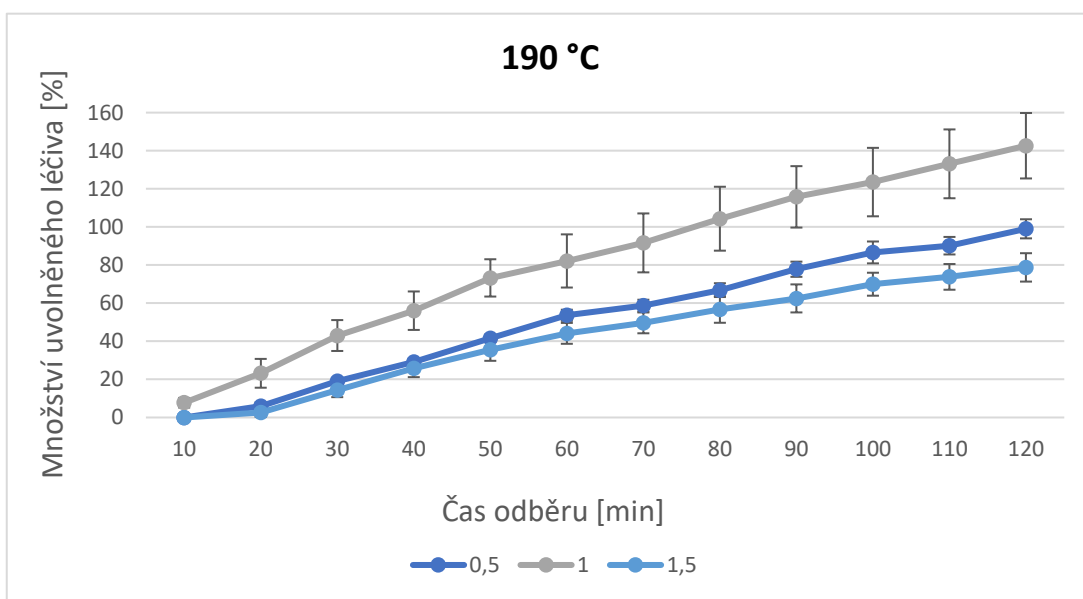
Obrázek 42: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas ve vzorku CH 1 při všech teplotách, v nesušené směsi a u samotného meloxicamu



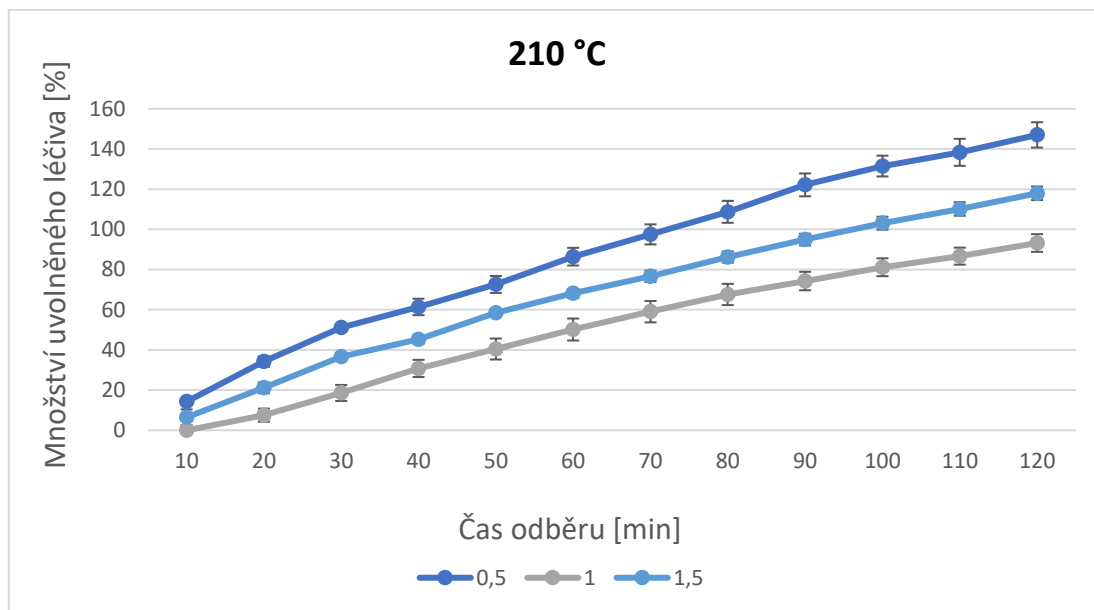
Obrázek 43: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas ve vzorku CH 1,5 při všech teplotách, v nesušené směsi a u samotného meloxicamu



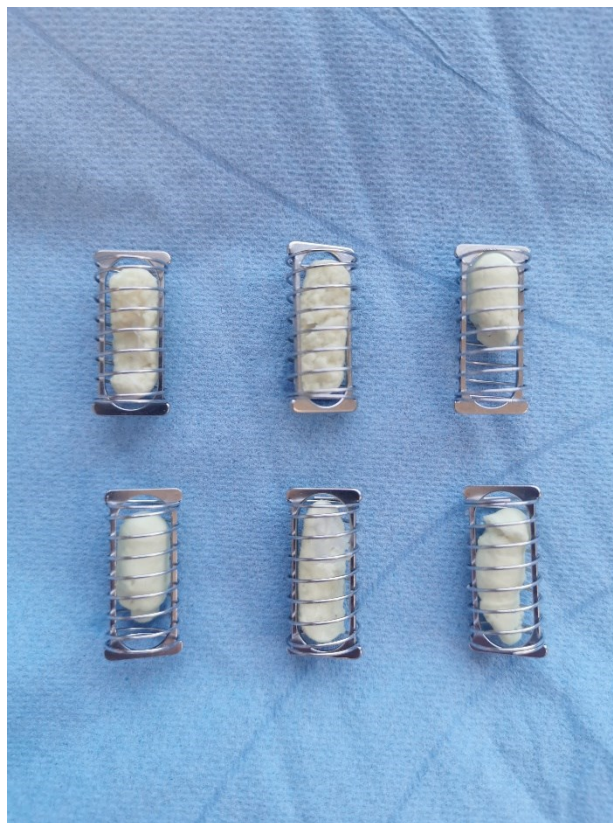
Obrázek 44: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas při teplotě 170 °C u jednotlivých vzorků



Obrázek 45: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas při teplotě 190 °C u jednotlivých vzorků



Obrázek 46: Graf závislosti množství uvolněného léčiva za čas při teplotě 210 °C u jednotlivých vzorků



Obrázek 47: Fotografie vzorků CH 0,5 sušených při 170 °C (nahore) a 190 °C (dole) po disoluční zkoušce

8 ZÁVĚR

Cílem práce bylo zjistit, zda je možné připravit sprejovým sušením ze suspenze meloxicamu v roztoku chitosanu částice, které by ovlivnily uvolňování léčiva a vyhodnotit také vliv parametrů sušení a koncentrace roztoku na vlastnosti výsledného produktu. Byly připraveny roztoky o koncentraci 0,5 %, 1 %, 1,5 % a 2 % a sušeny teplotami 170, 190 a 210 °C. Pro hodnocení vzniklých částic byly použity metody optické mikroskopie, skenovací elektronové mikroskopie (SEM), diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a disoluční zkouška se spektrofotometrií.

Z původně připravených 4 suspenzí o různé koncentraci chitosanu, bylo možné sušit pouze 3 vzorky. U suspenzí o koncentraci 2% roztoku chitosanu nebylo možné sušení realizovat, vzhledem k vysoké viskozitě a následnému ucpávání trysky.

Připravené částice mají nepravidelný kulovitý tvar. Ve všech vzorcích tvoří shluky a mezi vzorky nebyly pozorovány významné rozdíly ve vzhledu jednotlivých částic. Pro další studii by bylo vhodné porovnat také velikost částic v závislosti na koncentraci a teplotě.

Hodnocení tepelných vlastností vzorků prokázalo posun teploty dehydratace chitosanu v sušených vzorcích směrem k nižším hodnotám až o 35,5 °C. U meloxicamu došlo k posunu teploty tání o cca 10 °C. U M2 byly u teploty dehydratace chitosanu pro většinu vzorků zjištěny nižší teploty. U meloxicamu byly změny po 6 měsících minimální, lze tedy říct, že meloxicam se nachází ve vzorcích ve stabilní formě. Pro zjištění teploty skelného přechodu chitosanu by bylo vhodné použít přesnější metodu, např. dynamické DSC.

Během disolučních zkoušek došlo k výraznému zvýšení uvolňování léčiva oproti samotnému meloxicamu, které dosahovalo po 120 minutách 19,72 %. U nesusušených směsí chitosanu a léčiva bylo množství uvolněného léčiva závislé na obsahu chitosanu, kdy se zvyšujícím se obsahem došlo ke zvýšení i uvolňování meloxicamu. U sušených vzorků nebyla pozorována závislost na teplotě sušení. U 1,5% koncentrace došlo k výraznějším zpomalení hlavně při porovnání s fyzikální

směsí. Větší než 100% uvolnění léčiva může být vysvětleno nedokonalou homogenitou směsí nebo nedostatečným rozpuštěním léčiva při ověřování jeho množství ve vzorku. Řešením by mohla být jiná metoda pro určování množství léčiva v sušených vzorcích nebo např. prodloužení doby rozpouštění. K podrobnějšímu hodnocení disoluce by bylo také vhodné nastavit častější odběry.

Ačkoliv došlo ke zvýšení uvolňování meloxikamu v porovnání s čistým léčivem, rychlost uvolnění nebyla natolik vysoká, aby tato metoda byla vhodná k přípravě formulací meloxikamu s rychlým uvolněním léčiva, které by bylo vhodné např. pro akutní léčbu bolesti. Uvolňování je v tomto případě spíše pozvolné.

9 BIBLIOGRAFIE

- [1] OKÁČOVÁ, Ladislava, David VETCHÝ, Aleš FRANC, Miloslava RABIŠKOVÁ a Bohumil KRATOCHVÍL. ZVÝŠENÍ BIODOSTUPNOSTI TĚŽCE ROZPUSTNÝCH LÉČIVÝCH LÁTEK JEJICH MODIFIKACÍ. *Chemické Listy* [online]. 2010, 104(1), 21-26 [cit. 2021-05-10]. Dostupné z: http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_01_21-26.pdf
- [2] KUCHAR, Miroslav. *Farmaceutický encyklopedický slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-876-4.
- [3] CAL, Krzysztof a Krzysztof SOLLOHUB. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, 99(2), 575-586. ISSN 00223549.
- [4] BERNKOP-SCHNÜRCH, Andreas a Sarah DÜNNHAUPT. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2012, 81(3), 463-469. ISSN 0939-6411.
- [5] ALVARENGO, Elson Santiago. Characterization and Properties of Chitosan. MAGDY, Elnashar. *Biotechnology of Biopolymers*. Croatia: IntechOpen, 2011, s. 91. ISBN 978-953-307-179-4.
- [6] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. *Český lékopis*. 1. Praha: Grada Publishing, 2017, 4904 s. ISBN 978-80-271-0500-7.
- [7] MOKREJŠ, Pavel a Ferdinand LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008a, 90 s. ISBN 978-80-7318-674-6.
- [8] RUIZ, Gustavo a Hector CORRALES. Chitosan, Chitosan Derivatives and their Biomedical Applications. SHALABY, Emad. *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. 1st pub. Croatia: IntechOpen, 2017, s. 89, 328 s. ISBN 978-953-51-2860-1.
- [9] MOKREJŠ, Pavel a Ferdinand LANGMAIER. *Aplikace přírodních polymerů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008b. ISBN 978-80-7318-674-6.

- [10] PILLAI, C.K.S., Willi PAUL a Chandra P. SHARMA. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. 2009, 34(7), 641-678. ISSN 0079-6700.
- [11] YOUNES, Islem a Marguerite RINAUDO. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*. 2015, 13(3), 1133-1174. ISSN 1660-3397.
- [12] MOLINA, R., P. JOVANCIC, S. VILCHEZ, T. TZANOV a C. SOLANS. In situ chitosan gelation initiated by atmospheric plasma treatment. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 103, 472-479. ISSN 0144-8617.
- [13] SOGIAS, Ioannis A, Adrian C. WILLIAMS a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Chitosan-based mucoadhesive tablets for oral delivery of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 2012, 436(1-2), 602-610. ISSN 0378-5173.
- [14] WERLE, Martin a Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH. Thiolated chitosans: useful excipients for oral drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2008, 60(3), 273-281. ISSN 2042-7158.
- [15] SOGIAS, Ioannis A., Adrian C. WILLIAMS a Vitaliy V. KHUTORYANSKIY. Why is Chitosan Mucoadhesive?. *Biomacromolecules*. 2008, 9(7), 1837-1842. ISSN 1525-7797.
- [16] SCHIPPER, Nicolaas G.M., Kjell M. VÅRUM, Patric STENBERG, Göran OCKLIND, Hans LENNERNÄS a Per ARTURSSON. Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999, 8(4), 335-343. ISSN 09280987.
- [17] POGORIELOV, Maksym V. a Vitalii Z. SIKORA. Chitosan as a Hemostatic Agent: Current State. *European Journal of Medicine. Series B*. 2015, 2(1), 24-33. ISSN 2409-6296.
- [18] MUXIKA, A., A. ETXABIDE, J. URANGA, P. GUERRERO a K. DE LA CABA. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017, 105, 1358-1368. ISSN 01418130.

- [19] ORZALI, Laura, Beatrice CORSI, Cinzia FORNI a Luca RICCIONI. Chitosan in Agriculture: New Challenge for Managing Plant Disease. SHALABY, Emad A. *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. 1st pub. Croatia: IntechOpen, 2017, s. 20-25. ISBN 978-953-51-2860-1.
- [20] RAVI KUMAR, Majeti N.V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*. 2000, 46(1), 1-27. ISSN 13815148.
- [21] ARANAZ, Inmaculada, Niuris ACOSTA, Concepción CIVERA, Begoña ELORZA, Javier MINGO, Carolina CASTRO, María GANDÍA a Angeles HERAS CABALLERO. Cosmetics and Cosmeceutical Applications of Chitin, Chitosan and Their Derivatives. *Polymers*. 2018, 10(2). ISSN 2073-4360.
- [22] YUAN, Q., J. SHAH, S. HEIN a R.D.K. MISRA. Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. *Acta Biomaterialia*. 2010, 6(3), 1140-1148. ISSN 17427061.
- [23] LIANG, Jin, Hua YAN, Pradeep PULIGUNDLA, Xueling GAO, Yibin ZHOU a Xiaochun WAN. Applications of chitosan nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of tea polyphenols: A review. *Food Hydrocolloids*. 2017, 69, 286-292. ISSN 0268005X.
- [24] SARMENTO, B., A. RIBEIRO, F. VEIGA, P. SAMPAIO, R. NEUFELD a D. FERREIRA. Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical Research*. 2007, 24(12), 2198-2206. ISSN 0724-8741.
- [25] GUPTA, Himanshu, T. VELPANDIAN a Sanyog JAIN. Ion- and pH-activated novel in-situ gel system for sustained ocular drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 2010, 18(7), 499-505. ISSN 1061-186X.
- [26] CALVO, Pilar, José L VILA-JATO a María J ALONSO. Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, 153(1), 41-50 [cit. 2021-03-13]. ISSN 03785173.
- [27] VIL'DANOVA, R. R., N. N. SIGAEVA, O. S. KUKOVINETS, V. P. VOLODINA, L. V. SPIRIKHIN, I. S. ZAIDULLIN a S. V. KOLESOV. Modification of hyaluronic acid and chitosan, aimed at developing hydrogels for

- ophthalmology. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2014, 87(10), 1547-1557. ISSN 1070-4272.
- [28] TERRY, Patsy. *Bandage Contact Lenses: Information for patients*. Oxford University Hospital NHS Trust, 2017. Dostupné z: <https://www.ouh.nhs.uk/patient-guide/leaflets/files/11034Pbandage.pdf>
- [29] ILLUM, Lisbeth. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *Journal of Controlled Release*. 2003, 87(1-3), 187-198. ISSN 01683659.
- [30] ILIUM, Lisbeth. Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*. 1998, 15(9), 1326-1331. ISSN 07248741.
- [31] FERNÁNDEZ-URRUSUNO, Rocío, Pilar CALVO, Carmen REMUÑÁN-LÓPEZ, Jose Luis VILA-JATO a María JOSÉ ALONSO. Enhancement of Nasal Absorption of Insulin. *Pharmaceutical Research*. 1999, 16(10), 1576-1581. ISSN 07248741.
- [32] NA, Lidong, Shirui MAO, Juan WANG a Wei SUN. Comparison of different absorption enhancers on the intranasal absorption of isosorbide dinitrate in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010, 397(1-2), 59-66. ISSN 03785173.
- [33] EL-KAMEL, Amal, Magda SOKAR, Viviane NAGGAR a Safaa AL GAMAL. Chitosan and sodium alginate—Based bioadhesive vaginal tablets. *AAPS PharmSci*. 2002, 4(4), 224-230. ISSN 1522-1059.
- [34] LANGOTH, Nina, Hermann KAHLBACHER, Gudrun SCHÖFFMANN, Ivo SCHMEROLD, Maximilian SCHUH, Sonja FRANZ, Peter KURKA a Andreas BERNKOP-SCHNÜRCH. Thiolated Chitosans: Design and In Vivo Evaluation of a Mucoadhesive Buccal Peptide Drug Delivery System. *Pharmaceutical Research*. 2006, 23(3), 573-579. ISSN 0724-8741.
- [35] JABBAL-GILL, Inderjit, Anthony Neil FISHER, Rino RAPPUOLI, Stanley Stewart DAVIS a Lisbeth ILLUM. Stimulation of mucosal and systemic antibody responses against Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin and recombinant pertussis toxin after nasal administration with chitosan in mice. *Vaccine*. 1998, 16(20), 2039-2046. ISSN 0264410X.

- [36] VAN DER LUBBEN, I. Chitosan microparticles for oral vaccination: preparation, characterization and preliminary in vivo uptake studies in murine Peyer's patches. *Biomaterials*. 2001, 22(7), 687-694. ISSN 01429612.
- [37] BALDRICK, Paul. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2010, 56(3), 290-299. ISSN 02732300.
- [38] TAKAHASHI, Miwa, Kaoru INOUE, Midori YOSHIDA, Tomomi MORIKAWA, Makoto SHIBUTANI a Akiyoshi NISHIKAWA. Lack of chronic toxicity or carcinogenicity of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47(2), 462-471. ISSN 02786915.
- [39] TANAKA, Yoshinori, Shin-ichiro TANIOKA, Miyoko TANAKA et al. Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials*. 1997, 18(8), 591-595. ISSN 01429612.
- [40] CARREÑO-GÓMEZ, Begoña a Ruth DUNCAN. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997, 148(2), 231-240. ISSN 03785173.
- [41] ISHIHARA, Masayuki, Kuniaki NAKANISHI, Katsuaki ONO et al. Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*. 2002, 23(3), 833-840. ISSN 01429612.
- [42] HE, Ping a Stanley S DAVIS. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, 187(1), 53-65. ISSN 03785173.
- [43] CORRIGAN, Deirdre O., Anne Marie HEALY a Owen I. CORRIGAN. Preparation and release of salbutamol from chitosan and chitosan co-spray dried compacts and multiparticulates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006, 62(3), 295-305. ISSN 09396411.
- [44] KIM, Seong Soo, Seon Jeong KIM, Yoon Duk MOON a Young Moo LEE. Thermal characteristics of chitin and hydroxypropyl chitin. *Polymer*. 1994, 35(15), 3212-3216. ISSN 00323861.

- [45] LEE, Seung Jun, Seong Soo KIM a Young Moo LEE. Interpenetrating polymer network hydrogels based on poly(ethylene glycol) macromer and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2000, 41(2), 197-205. ISSN 01448617.
- [46] MESQUITA, Philippe C., Alice R. OLIVEIRA, Matheus F. Fernandes PEDROSA, Anselmo Gomes DE OLIVEIRA a Arnóbio Antônio DA SILVA-JÚNIOR. Physicochemical aspects involved in methotrexate release kinetics from biodegradable spray-dried chitosan microparticles. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2015, 81, 27-33. ISSN 00223697.
- [47] LIU, Chengsheng, Kashappa Goud H. DESAI, Xuexi TANG a Xiguang CHEN. Drug Release Kinetics of Spray-Dried Chitosan Microspheres. *Drying Technology*. 2007, 24(6), 769-776. ISSN 0737-3937.
- [48] ARANAZ, Inmaculada, Ines PAÑOS, Carlos PENICHE, Ángeles HERAS a Niuris ACOSTA. Chitosan Spray-Dried Microparticles for Controlled Delivery of Venlafaxine Hydrochloride. *Molecules*. 2017, 22(11). ISSN 1420-3049.
- [49] JIANG, Wang-Zhan, Yang CAI a Hao-Ying LI. Chitosan-based spray-dried mucoadhesive microspheres for sustained oromucosal drug delivery. *Powder Technology*. 2017, 312, 124-132. ISSN 00325910.
- [50] LOPEDOTA, Angela, Annalisa CUTRIGNELLI, Valentino LAQUINTANA et al. Spray Dried Chitosan Microparticles for Intravesical Delivery of Celecoxib: Preparation and Characterization. *Pharmaceutical Research*. 2016, 33(9), 2195–2208. ISSN 0724-8741.
- [51] SPAGNOL, Caroline Magnani, Ana Melero ZAERA, Vera Lucia Borges ISAAC, Marcos Antonio CORRÊA a Hérída Regina Nunes SALGADO. Release and permeation profiles of spray-dried chitosan microparticles containing caffeic acid. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018, 26(3), 410-415. ISSN 13190164.
- [52] LIU, Wenjie, Winston Duo WU, Cordelia SELOMULYA a Xiao Dong CHEN. Uniform Chitosan Microparticles Prepared by a Novel Spray-Drying Technique. *International Journal of Chemical Engineering*. 2011, 2011, 1-7. ISSN 1687-806X.

- [53] LEJSEK, Jaroslav. *Termické analýzy – optimalizace měřicích podmínek* [online]. Plzeň, 2017 [cit. 2021-05-04]. Dostupné z: https://otik.zcu.cz/bitstream/11025/27965/1/DP_Lejsek.pdf. Diplomová práce. Západočeská Univerzita v Plzni, fakulta elektrotechnologická.
- [54] NETO, C.G.T., J.A. GIACOMETTI, A.E. JOB, F.C. FERREIRA, J.L.C. FONSECA a M.R. PEREIRA. Thermal Analysis of Chitosan Based Networks. *Carbohydrate Polymers*. 2005, 62(2), 97-103. ISSN 01448617.
- [55] RUS, LUCIA MARIA. DEVELOPMENT OF MELOXICAM ORAL LYOPHILISATES: ROLE OF THERMAL ANALYSIS AND COMPLEMENTARY TECHNIQUES. *FARMACIA*. 2019, 67(1), 56-67. ISSN 00148237.
- [56] NAIDU, N.Buchi, K.P.R. CHOWDARY, K.V.R. MURTHY, V. SATYANARAYANA, A.R. HAYMAN a G. BECKET. Physicochemical characterization and dissolution properties of meloxicam–cyclodextrin binary systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004, 35(1), 75-86. ISSN 07317085.
- [57] POMÁZI, Anita, Rita AMBRUS, Péter SIPOS a Piroska SZABÓ-RÉVÉSZ. Analysis of co-spray-dried meloxicam–mannitol systems containing crystalline microcomposites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011, 56(2), 183-190. ISSN 07317085.
- [58] BÖHM, Stanislav a Svatava SMRČKOVÁ-VOLTROVÁ. *Strukturní analýza organických sloučenin*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0235-9.
- [59] AL-HELW, A. A., A. A. AL-ANGARY, G. M. MAHROUS a M. M. AL-DARDARI. Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone. *Journal of Microencapsulation*. 2008, 15(3), 373-382. ISSN 0265-2048.