

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Vliv pomocné látky chitosanu na disoluci meloxicamu.
The effect of chitosan as excipient on dissolution of meloxicam.

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jana Brokešová

Hradec Králové, 2022

Barbora Machová

„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.“

Barbora Machová

Nyní bych chtěla moc poděkovat vedoucí mé diplomové práce doc. PharmDr. Ludmile Matysové, Ph.D a také Mgr. Janě Brokešové jakožto konzultantce z Katedry farmaceutické technologie. Velmi si vážím času, který mi obě věnovaly, děkuji za veškeré odborné rady, příjemný přístup a ochotu pomoci. Děkuji i ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie (například Bc. Janě Hovorkové), kteří mi byli nápomocni u praktické části. V neposlední řadě patří poděkování mým blízkým.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Barbora Machová

Školitel: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Jana Brokešová

Název diplomové práce: Vliv pomocné látky chitosanu na disoluci meloxikamu.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo vyvinout vhodnou disoluční metodu pro hodnocení uvolňování meloxikamu z tobolek a následné zjištění vlivu pomocné látky chitosanu na disoluci tohoto léčiva. Byl sledován také vliv způsobu přípravy směsi v tobolkách. Směs tvořila kombinace meloxikamu s chitosanem (MX-CH) v poměru 1:8, která byla připravena mísením v přístroji Turbula 3D, nebo mletím pomocí planetárního kulového mlýna po dobu 5 či 30 minut. Samotná disoluce probíhala v disolučním přístroji s míchadlem (pádlem). Jako médium byl zvolen fosfátový pufr o pH 6,8. Byly testovány čtyři formulace, přičemž jednou z nich byly tobolky se samotným léčivem a další tři formulace obsahovaly tobolky plněné zmiňovanou směsí (MX-CH). Postupně byly v časových intervalech odebírány vzorky a následně proměřeny pomocí UV/VIS spektrofotometru.

Z naměřených a vypočítaných hodnot je jednoznačné, že pomocná látka chitosan napomáhá k lepšímu a rychlejšímu uvolňování meloxikamu z tobolek. Důkazem toho je, že samotné léčivo se po 60 minutách testování neuvolnilo ani z 20 %, zatímco z tobolek plněných směsí MX-CH se léčivo uvolnilo úplně (100 %). Dle výsledků je také možné konstatovat, že ze směsi připravené mísením, se léčivo uvolňuje ihned po vložení do disolučního média, zatímco u směsi mleté lze pozorovat zpožděný nástup o pět minut. Dále je viditelné, že delší dobou mletí se docílí pomalejšího, ale rovnoměrnějšího uvolňování léčiva.

Tato práce se také zabývá vývojem UHPLC metody pro stanovení meloxikamu. Podařilo se částečně vyvinout dvě vhodné metody, které je třeba v budoucnu dovyvinout a validovat.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Barbora Machová

Supervisor: doc. PharmDr. Ludmila Matysová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Jana Brokešová

Title of the diploma thesis: The effect of chitosan as excipient on dissolution of meloxicam.

The main objective of this diploma thesis was to develop a suitable dissolution method for evaluating the release of meloxicam from capsules and subsequently determining the effect of chitosan as excipient on the dissolution of this drug. The influence of preparation method of mixture in the capsules was also monitored. The mixture consisted of combination meloxicam with chitosan (MX-CH) in a ratio of 1:8, which was prepared by mixing in a Turbula 3D instrument, or by grinding using a planetary ball mill for 5 or 30 minutes. The dissolution was performed in a dissolution device with a paddle. The phosphate buffer with a pH of 6,8 was selected as a medium. Four formulations were tested including capsules filled with drug only and capsules filled with the mentioned mixture (MX-CH). Samples were gradually collected at time intervals and then measured with UV/VIS spectrophotometer.

Based on the measured and calculated values, it is clear, that the excipient chitosan helped to better and faster release of meloxicam from capsules. It was observed that the drug alone was not released even 20% after 60 minutes of testing, while the drug from capsules filled with MX-CH were released completely (100%). It can be stated according to the results that the drug release from the mixture prepared by mixing was immediate after insertion the capsule into the dissolution medium while the delayed onset of five minutes was observed in case of the drug release from the ground mixture. Then it can be seen, that the longer grinding time led to the slower, but more uniform release of the drug.

This thesis also deals with the development of UHPLC method for the determination of meloxicam. Two suitable methods have been partially developed. In the future, their development needs to be finished, and the methods needs to be validated.

Obsah

1	Seznam použitých zkratek.....	8
2	Úvod.....	9
3	Cíl.....	10
4	Teoretická část.....	11
4.1	Meloxikam (meloxicamum).....	11
4.1.1	Obecné vlastnosti léčiva.....	11
4.1.2	Farmakologické vlastnosti.....	11
4.1.3	Degradační produkty.....	12
4.2	Chitosan.....	13
4.2.1	Chemická struktura a vznik.....	13
4.2.2	Vlastnosti a využití.....	13
4.2.3	Rozpustnost.....	14
4.2.4	Zvýšení rozpustnosti léčiva, kombinace s pomocnými látkami.....	14
4.3	Disoluce.....	15
4.3.1	Pravá a zdánlivá disoluce.....	17
4.3.2	Disoluční přístroje.....	19
4.3.3	Využití.....	25
4.4	UHPLC.....	26
4.4.1	Přístroj.....	27
4.4.2	Separční módy.....	29
4.4.3	Využití.....	30
4.5	Rešerše prací založených na disoluci meloxikamu a stanovení tohoto léčiva metodou (U)HPLC a UV/VIS spektrofotometrií.....	31
4.5.1	Disoluce.....	31
4.5.2	(U)HPLC.....	32
4.5.3	UV/VIS spektrofotometrie.....	33
5	Experimentální část.....	34
5.1	Použité suroviny a chemikálie.....	34
5.2	Použité přístrojové vybavení a pomůcky.....	35
5.3	Příprava disolučního média.....	36

5.4 Příprava roztoků.....	37
5.4.1 Zásobní roztoky standardu a nečistoty B.....	37
5.4.2 Mobilní fáze	37
6 Výsledky a diskuze	38
6.1 Disoluce	38
6.1.1 Složení tobolek.....	38
6.1.2 Kalibrační křivka	39
6.1.3 Disoluce a její hodnocení.....	41
6.1.3.1 Formulace F4.....	44
6.1.3.2 Formulace F1.....	46
6.1.3.3 Formulace F2.....	48
6.1.3.4 Formulace F3.....	50
6.1.3.5 Kontrolní měření	52
6.1.3.6 Porovnání disolučních křivek	57
6.1.4 Diskuze shrnutí.....	58
6.1.4.1 Vliv pomocné látky chitosanu	58
6.1.4.2 Vliv způsobu přípravy směsi	58
6.2 Vývoj metody UHPLC	59
6.2.1 Analytická kolona	59
6.2.2 Vlnová délka.....	59
6.2.3 Mobilní fáze	59
6.2.4 Nástřik standardu.....	63
7 Závěr.....	64
8 Literatura.....	65
9 Seznam tabulek	70
10 Seznam obrázků.....	71

1 Seznam použitých zkratek

A	absorbance
\bar{A}	průměrná absorbance
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m} = 0,1 \text{ nm}$), jednotka délky
c	molární koncentrace [mol/l]
c'	hmotnostní koncentrace [g/l]
ČL	Český lékopis
GIT	gastrointestinální trakt
F1(2,3,4)	formulace 1(2,3,4)
F1.01(02)	formulace 1, první (druhá) zkouška disoluce
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KH_2PO_4	dihydrogenfosforečnan draselný
m	hmotnost [g]
$m_{\text{celk.}}$	celkové množství uvolněného léčiva [mg]
$m_{\text{nádoba}}$	hmotnost uvolněného léčiva v nádobě [mg]
m_{vzorek}	hmotnost uvolněného léčiva v odebraném vzorku [mg]
$V_{\text{nádoba}}$	objem disolučního média v nádobě [ml]
$m_{\text{rel.}}$	relativní množství uvolněného léčiva [%]
M	molární hmotnost [g/mol]
MF	mobilní fáze
MX-CH	směs meloxikamu s chitosanem
NaOH	hydroxid sodný
r^2	koeficient determinace
SF	stacionární fáze
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	ultrafialová/viditelná část spektra
V	objem [l]
ZR	zásobní roztok

2 Úvod

Disoluční zkouška slouží ke stanovení množství uvolněné léčivé látky z lékové formy v předepsaném čase a médiu. Dle takového testu lze předpokládat, jakým způsobem se bude účinná látka uvolňovat v živém organismu. V této diplomové práci je prostřednictvím testu disoluce stanoveno uvolňování léčivé látky meloxicamu z tobolek.

Meloxicam je lék ze skupiny nesteroidních antiflogistik a používá se nejčastěji k terapii bolesti, revmatoidní artritidy a osteoartrózy. Je však velmi špatně rozpustný ve vodném prostředí, proto lze předpokládat, že jeho uvolnění z lékové formy a následná absorpce bude nízká.

Chitosan je polysacharid vznikající z chitinu, který má (nejen) ve farmaceutické technologii široké využití, a to především díky svým vlastnostem mezi které patří biokompatibilita, biologická rozložitelnost a nulová toxicita. Používá se, mimo jiné, jako polymerní nosič léčiv.

Tato práce se také zabývá vývojem vhodné chromatografické metody, která může být využívána pro stanovení meloxicamu a následně vzorků získaných disolucí tohoto léčiva. UHPLC metoda je pro své výhody oproti jiným metodám upřednostňována. Důvodem je především její rychlost, citlivost a nižší náklady na analýzu.

3 Cíl

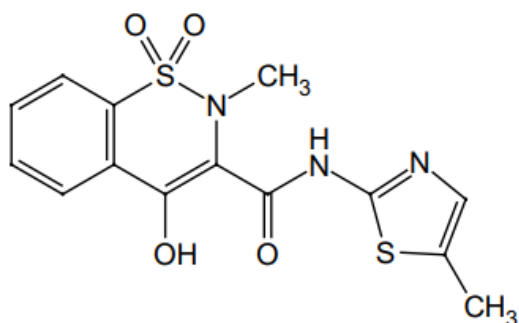
Hlavním cílem této práce bylo vyvinout vhodnou disoluční metodu pro hodnocení uvolňování meloxikamu z tobolek. Jelikož se meloxikam ve vodném prostředí velmi špatně uvolňuje, byly na Katedře farmaceutické technologie Univerzity Karlovy v Hradci Králové připraveny tobolky se směsí tohoto léčiva a pomocné látky chitosanu v poměru 1:8 (MX-CH). Dalším cílem tedy bylo, zjistit vliv této pomocné látky a různého způsobu přípravy směsi (mísáním, či mletím) na disoluci meloxikamu.

Vzorky získané z disoluce byly analyzovány pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Jelikož bylo snahou zmiňované vzorky analyzovat také prostřednictvím UHPLC přístroje, bylo třeba tuto metodu pro stanovení samotného meloxikamu vyvinout. To se stalo posledním cílem experimentu.

4 Teoretická část

4.1 Meloxicam (meloxicamum)

4.1.1 Obecné vlastnosti léčiva



Obrázek 1: Strukturální vzorec meloxicamu [1]

- Strukturální vzorec (Obrázek 1)
- Sumární vzorec: $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$
- Molekulová hmotnost: 351,39
- Chemicky se jedná o 4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methylthiazol-2-yl)-1,1-dioxo-2H-1λ⁶,2-benzothiazin-3-karboxamid
- Obsah: 99,0 % až 101,0 % sloučeniny $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ (vysušená látka)
- Vzhled: Světle žlutý prášek
- Rozpustnost: Prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dimethylformamidu, velmi těžce rozpustný v ethanolu 96 % [1].

4.1.2 Farmakologické vlastnosti

Meloxicam je lék ze skupiny nesteroidních antiflogistik (podskupina oxikamy). Jedná se o látky s protizánětlivým, analgetickým a antipyretickým účinkem. Mechanismem účinku je inhibice enzymu cyklooxygenázy, což vede ke snížené tvorbě prekurzorů prostaglandinů. Meloxicam se řadí mezi relativně selektivní (preferenční) COX-2 inhibitory, zejména při nižší terapeutické dávce. To znamená, že by měl vykazovat stejnou účinnost, jako ostatní neselektivní nesteroidní antiflogistika, ale lepší gastrointestinální snášenlivost, jelikož neovlivňuje negativně cytoprotektivní účinek prostaglandinů (vznikajících pomocí COX-1) v žaludku a duodenu [2, 4, 5, 6, 7].

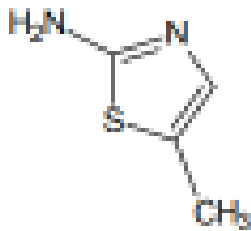
Jeho využití je zejména v terapii bolesti, lze ho uplatnit například u revmatoidní artritidy, či osteoartrózy. Bývá podáván v denní dávce 7,5 nebo 15 miligramů. Kontraindikací je anamnéza astmatu, kopřivky, či alergické reakce po aspirinu (acetylsalicylová kyselina), nebo jiném nesteroidním analgetiku. Dále je kontraindikována také přecitlivělost na meloxicam, či středně těžká až těžká renální insuficience. Mezi časté nežádoucí účinky patří problémy gastrointestinálního traktu (břišní diskomfort, bolest břicha, zácpa či průjem, nadýmání,

nevolnost, zvracení a jiné). Pro těhotné a kojící se nedoporučuje užívat. Riziko pro plod či kojence totiž nelze vyloučit [2, 3, 4, 5, 6].

I když má meloxicam dobrou biologickou dostupnost (89 %), jeho špatná rozpustnost ve vodě omezuje rychlost uvolňování z lékové formy a absorpci, což má za následek zpoždění nástupu účinku. Je široce distribuován bez akumulace ve tkáni. Plazmatické koncentrace jsou dosaženy po 3 až 5 dnech. Poločas eliminace je 20 hodin. Meloxicam se váže na proteiny až z 99 %. Toto léčivo je metabolizováno v játrech a jeho neaktivní metabolity se vylučují močí a stolicí [4, 6, 8].

4.1.3 Degradční produkty

Dle provedených studií je patrné, že roztok meloxicamu je velmi náchylný k degradaci v kyselém, či alkalickém prostředí. Nejčastějším analyzovaným degradačním produktem byl 5-methylthiazole-2ylamin, který odpovídá lékopisné nečistotě B (Obrázek 2) [9, 10, 11, 12].

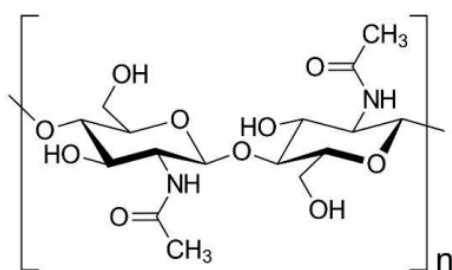


Obrázek 2: Nečistota B [1]

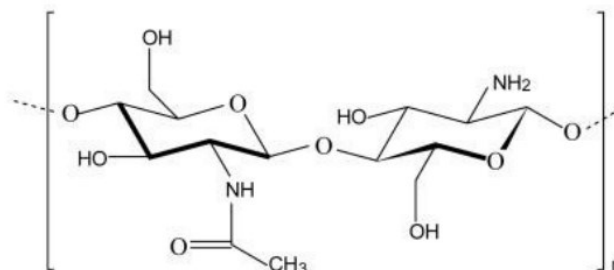
4.2 Chitosan

4.2.1 Chemická struktura a vznik

Chitosan je polysacharid, skládající se z jednotek glukosaminu a N-acetylglukosaminu spojených β -1,4 glykosidickými vazbami v nespecifickém poměru (Obrázek 4). Jedná se o derivát chitinu [poly(β -(1-4)-N-acetyl-D-glukosamin)] (Obrázek 3), který se nachází ve schránkách korýšů (například krabi, krevety) sloužících jako hlavní zdroj, dále měkkýšů. Chitin se vyskytuje také v buněčných stěnách hub či kvasinek, nebo je produkován hmyzem. To ho řadí jako druhý nejhojnější přírodní polymer hned po celulóze. Při průmyslovém zpracování se chitin extrahuje kyselinou (aby se rozpustil uhličitán vápenatý), následovně alkalickým roztokem pro rozpuštění bílkovin. Kromě toho se často přidává krok odbarvení, aby se odstranily pigmenty a získal se tak bezbarvý čistý chitin. Chitosan poté vzniká dostatečnou deacetylací (80-85 %) zmiňovaného chitinu^[13, 14].



Obrázek 3: Chitin^[13]



Obrázek 4: Chitosan^[13]

4.2.2 Vlastnosti a využití

Jde o bioaktivní polymer se širokou škálou aplikací díky svým vlastnostem, které zahrnují antibakteriální a antioxidační aktivitu, snadnou modifikovatelnost, biodegradabilitu a nulovou toxicitu. Byly také popsány chelatační vlastnosti pro železo, měď, kadmium, nebo hořčík^[14, 15].

Chitosan je dostupný v nízkých a vysokých molekulových hmotnostech (v rozmezí od 3 800 do 20 000 Da) a s různými stupni deacetylace. Molekulová hmotnost a stupeň deacetylace silně ovlivňují jeho vlastnosti, zejména při vývoji mikro- a nanočástic^[15]. Jeho kvality a snadnost chemických modifikací ve struktuře (vznik derivátů), poskytují příležitost k produkci mnoha různých forem. V důsledku toho může být chitosan používán v orální, nosní i oční cestě pro podávání léků, nebo také v implantabilní a injekční formě^[15].

Používá se především v oborech biomedicíny, kosmetologie, při výrobě papíru, čištění odpadních vod, zemědělství, nebo ve farmacii. Byla odhalena určitá terapeutická aktivita (snížení cholesterolu, hojení ran, antiulcerózní působení). Je široce používán jako polymerní nosič léčiv díky své zmiňované biokompatibilitě, biologické rozložitelnosti a netoxickým znakům^[16, 17]. Využíval se jako nosič v inhalátorech suchého prášku, ke zlepšení stability, nebo zvýšení rychlosti rozpouštění karvedilolu^[18]. Je také charakterizován mukoadhezivními vlastnostmi v důsledku elektrostatické interakce mezi kladným nábojem na ionizovatelné R-NH₃⁺ skupině a záporným nábojem na slizničních plochách. Vlastnosti antimikrobiální,

antioxidační a protinádorové aktivity jsou využívány v oblasti konzervace a balení potravin [14, 15].

4.2.3 Rozpustnost

Chitosan je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný ve zředěných kyselých roztocích kyseliny octové, citrónové a vinné, avšak ne fosforečné nebo sírové s pH nižším než 6,5. Ve zředěném vodném kyselém roztoku jsou volné aminoskupiny chitosanu, které mají zdánlivou pK_a 6,5 podrobeny protonizaci a převedou se na ionizovatelný rozpustný $R-NH_3^+$ [15].

4.2.4 Zvýšení rozpustnosti léčiva, kombinace s pomocnými látkami

Rychlost rozpouštění léčiva může být zvýšena zmenšením velikosti částic, v důsledku zvětšené dostupné plochy povrchu částic pro disoluční médium, a změny tvaru částic [18]. Vyšší povrchová energie výsledného jemného prášku může ale vést k vyšší soudržnosti částic, což má za následek jejich agregaci. To paradoxně snižuje efektivní povrch, vede ke špatnému smáčení ve vodné fázi a negativně ovlivňuje rychlost rozpouštění. Problém lze vyřešit přidáním vhodné pomocné látky. V přítomnosti vhodného nosiče mohou být tyto aglomeráty narušeny (důsledkem míchání, či společného mletí). Mikronizované částice léčiva mohou přednostně přilnout k povrchu pomocných částic. Takové nově vytvořené interaktivní práškové aglomeráty představují žádoucí uspořádání interaktivních směsí s léčivou (mono)vrstvou na nosné ploše [19]. Hlavní výhodou je tedy snížení úrovně agregace léčiv, a tím lepší smáčivost léčiv a rychlejší rozpouštění spolu se zlepšenou homogenitou směsi a průtokovými vlastnostmi. Mezi typické takto používané pomocné látky patří laktóza, celulóza, povidon, mannitol nebo trehalóza. Chitosan by mohl účinkovat na stejném principu [18].

4.3 Disoluce

Zkouška disoluce slouží ke stanovení množství uvolněné léčivé látky z lékové formy v předepsaném čase a médiu. Lékovou formou může být tableta, či tobolka, v takovém případě se jedná o zkoušku disoluce pevných lékových forem (ČL kapitola 2.9.3). Lékopis dále pojednává o zkoušce disoluce transdermálních přípravků (náplastí) (ČL kapitola 2.9.4), lipofilních tuhých lékových forem (čípky, měkké želatinové tobolky) (ČL kapitola 2.9.42), nebo léčivých žvýkacích gum (ČL kapitola 2.9.25). U perorálních přípravků se poté stanovuje disoluce lékových forem s běžným, prodlouženým, či zpožděným uvolňováním [20, 21].

Disoluční test obecně začíná naplněním disoluční nádoby stanoveným objemem disolučního média. Následuje jeho vytemperování. Pokračuje se vložení dávkové jednotky zkoušeného přípravku, nastaví se předepsaná rychlost rotace a testování se takto odstartuje. V daných časových intervalech se odebírá vzorek disolučního média. Pokud je odběr několikanásobný, doplní se odebraný objem stejným objemem čistého disolučního média o potřebné teplotě. Druhou možností je korigování změny objemu ve výpočtu, pakliže náhrada média není nutná. Poté se pomocí vhodných analytických metod stanoví obsah uvolněné léčivé látky [20, 21].

Dle Českého lékopisu 2017 (kapitola 5.17 Doporučení pro zkoušky lékových forem, 5.17.1 Doporučení pro zkoušku disoluce) je velmi důležité před testováním specifikovat přístroj (typ), dále informace o disolučním médiu (složení, objem a teplota), rychlost otáček, nebo průtokovou rychlost média, metodu, množství a čas pro odebírání vzorků, nebo podmínky průběžného sledování. V neposlední řadě také metodu analýzy a kritéria přijatelnosti.

- Přístroj
 - Volba přístroje závisí především na fyzikálně-chemických vlastnostech lékové formy. Jednotlivé typy jsou popsány v kapitole 4.3.2.
- Disoluční médium
 - Obecně bývá zvoleno vodné prostředí v rozmezí pH 1-8.
 - Voda lze použít pouze pokud různé hodnoty pH nemají vliv na disoluci.
 - Je-li třeba nastavit kyselé prostředí, využívá se kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l. Je možné ji kombinovat s chloridem sodným.
 - Používají se také tlumivé roztoky fosforečnanové, či acetátové.
 - Výhodou je možnost simulace střevní tekutiny o pH 6,8 či žaludeční tekutiny.
 - Existuje i možnost postupného zvyšování pH.
 - Médium může ve specifických případech obsahovat enzymy, povrchově aktivní látky, další anorganické a organické látky, či nízké koncentrace povrchově aktivních látek u léčiv ve vodě špatně rozpustných.
 - Objem média je obvykle 500 ml až 1000 ml (platí pro přístroj s míchadlem, nebo košíčkem).
 - Teplota může být 37 °C (pro perorální, rektální, vaginální, implantační či oční lékové formy). Druhou možností je 32 °C u dermálních přípravků.

- Rychlost míchání se pohybuje v rozmezí 50 až 100 otáček za minutu (nesmí přesáhnout 150 ot/min).
- Průtok kapaliny je v rozmezí 4 až 50 ml/min (přístroj s průtokovou celou).

Volba zmiňovaných podmínek má vliv na rychlost uvolňování. Ke zvýšení rychlosti uvolňování léčiva většinou dochází s rostoucí teplotou média, přidavkem zmiňované povrchově aktivní látky či enzymů. Také hodnota pH může rychlost velmi ovlivnit. U slabých kyselin se s rostoucím pH rychlost uvolňování zvyšuje, u slabých zásad je potřeba k tomuto účelu pH nižší. Naopak zpomalené uvolňování je způsobeno vzrůstající viskozitou média či rostoucí koncentrací léčiva v rozpouštěcí kapalině ^[20, 21, 22].

4.3.1 Pravá a zdánlivá disoluce

Lékopis rozeznává pravou a zdánlivou disoluci.

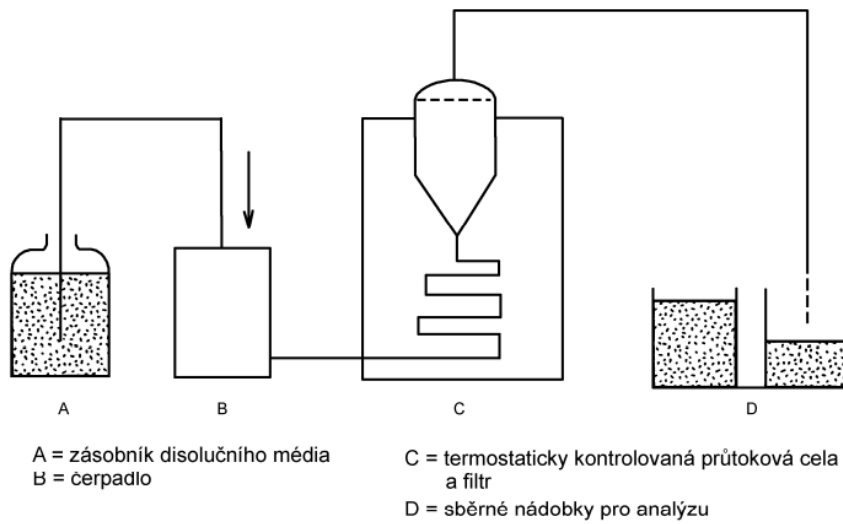
Pravá disoluce:

Pravá disoluce se určuje u čisté látky v pevném stavu po jejím slisování. Jedná se o teoretickou hodnotu, která se vztahuje k čisté pevné látce o nulové porositě. Rychlost pravé disoluce je definována jako rychlost rozpouštění čistých látek po slisování za podmínek konstantní plochy povrchu. Díky ní se charakterizují léčivé a pomocné látky. Na rychlost mají vliv jak vlastnosti pevné fáze (např. velikost částic, specifický povrch, vzhled krystalů), tak vnější faktory (teplota, viskozita, pH a jiné). Součástí je i příprava výlisku pomocí přístroje, který se skládá z razidla a matrice. Disoluce tak probíhá u konstantní plochy látky, vlivem vhodného disolučního média, konstantní rychlosti míchání, teploty, iontové síly a hodnoty pH. Vyjadřuje se jako množství látky uvolněné za jednotku času z jednotky povrchu [$\text{mg}/\text{min}\cdot\text{cm}^2$] ^[21, 23].

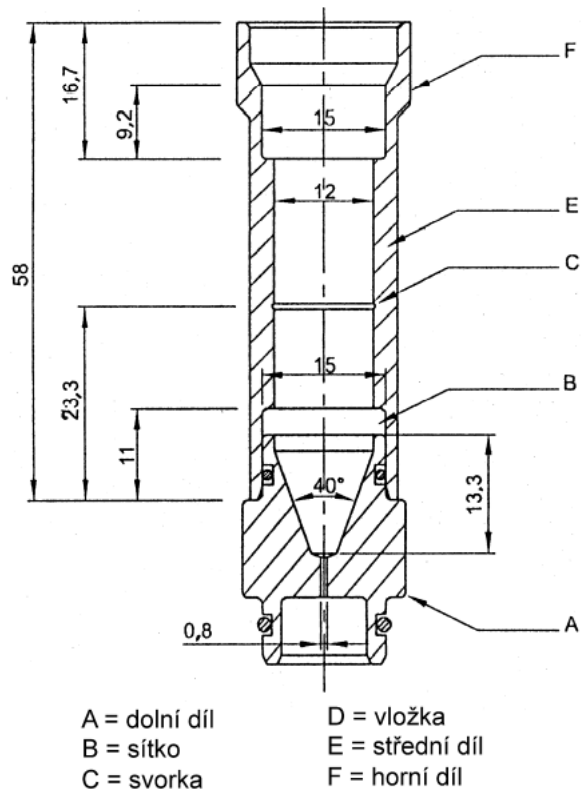
Zdánlivá disoluce:

Používá se ke stanovení zdánlivé disoluční rychlosti čistých pevných látek, či látek ve formě prášků a granulí. Všechny části přístroje, které přicházejí se vzorkem, nebo médiem do styku, musí být chemicky inertní, neabsorbující vzorek ani s ním nijak neinterferující. Přístroj nesmí vykazovat žádné vibrace, či pohyby. Skládá se ze zásobníku na disoluční médium, čerpadla (čerpá médium), průtokové cely opatřené filtračním systémem a vodní lázně udržující danou teplotu (Obrázek 5). Průtoková cela je složena ze tří dílů (Obrázek 6). Na dolní díl (síta a filtry) se umístí prášek, střední díl zachytává pomocí vložky vzorek (vložka obsahuje síto umístěné na vzorku a svorky). Další filtrační systém je umístěn nahoře ve střední části, následuje připojení k hornímu dílu, kterým odtéká z cely disoluční médium. Z tohoto média se musí před začátkem testování odstranit plyny, aby nedocházelo k ovlivnění výsledků.

Postupuje se tak, že na dno kužele dolního dílu se umístí kulička o průměru 5 ($\pm 0,5$) mm a na ni se vloží kuličky o menším průměru. Na kuličky je položeno sítko, filtr a na vršek dolního dílu sítko druhé. Na dolní díl se nasadí díl střední a zařízení se zvaží. Na sestavený filtrační systém se umístí vzorek, který se v cele opět zvaží. Na vzorek se poté umístí kuželové sítko vložky, nastaví se poloha svorky (umístěná uprostřed středního dílu), která zadržuje další pohyb síta. Na vršek středního dílu se vloží další sítko a filtr (druhý filtrační systém), jímž odtéká z cely disoluční médium, poté se připevní horní díl cely. Na řadu přichází vytemperování média a nastavení rychlosti průchodu média pomocí čerpadla skrz dno cely. Volí se okruh otevřený, či uzavřený. Pokud průtokovou celou proudí neustále čerstvé disoluční médium s nulovou koncentrací léčiva, jedná se o systém otevřený (lze použít i několik médií v průběhu jednoho experimentu). Pokud naopak médium koluje v jednom systému během celé analýzy, jde o systém uzavřený. Vzorky se poté odebírají na výstupu z cely, filtrují se a následně analyzují vhodnou metodou. Výsledky mohou být vyjádřeny dvěma způsoby, jako množství rozpuštěné látky za jednotku času, či se stanoví disoluční čas celého vzorku a dílčích etap ^[21, 24, 25].



Obrázek 5: Přístroj s průtokovou celou [24]



Obrázek 6: Průtoková cela [24]

4.3.2 Disoluční přístroje

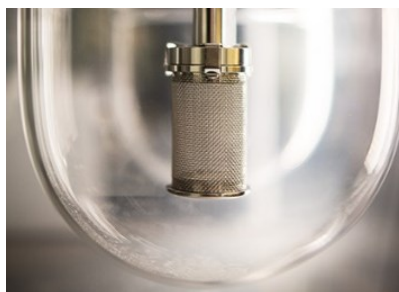
Zkouška disoluce pevných lékových forem:

1. Přístroj s košíčkem

Skládá se ze skleněné nebo jiné nádoby z inertního průhledného materiálu, může být zakrytá víkem. Dále je součástí motor, hnací hřídel umožňující plynulou rotaci a válcovitý košíček sloužící jako míchací jednotka (Obrázek 7, 8). Hřídel i košíček bývají vyrobeny z nerezové oceli. Zmiňovaná nádoba je částečně ponořená ve vodní lázni, která udržuje teplotu disolučního média. Případně může být vybavená vyhřívaným pláštěm. Součástí je i zařízení regulující rychlost otáček. Veškerý materiál, ze kterého je zařízení vyrobeno, musí být chemicky inertní, aby negativně neovlivňoval zkoušený přípravek. Dávková jednotka se vkládá na začátku každé zkoušky do suchého košíčku. Vzdálenost mezi vnitřním dnem nádoby a spodkem košíčku je 25 (± 2) mm ^[26].



Obrázek 7: Košíček, ze stránek firmy SOTAX



Obrázek 8: Nádoba s košíčkem ^[a]

2. Přístroj s míchadlem (pádlem)

Zařízení je shodné s přístrojem číslo jedna, avšak míchací jednotka je v tomto případě tvořena hřídelí s lopatkovým míchadlem (pádlem) (Obrázek 9, 10). Míchadlo i hřídel jsou vyrobené z kovu, či jiného inertního neohebného materiálu a tvoří společně během zkoušky jeden celek. Rotace hřídele musí být opět plynulá, aby nehrozilo zkreslení výsledků. Vzdálenost mezi spodkem míchadla a vnitřním dnem nádoby se během zkoušky udržuje taktéž na 25 (± 2) mm. Jednotka zkoušeného přípravku se vloží na dno nádoby před spuštěním míchadla. Přípravek se nesmí vznášet, či plavat v disolučním médiu. Tomu lze předejít použitím vhodných pomůcek (například malá spirálka z nereaktivního materiálu) ^[26].



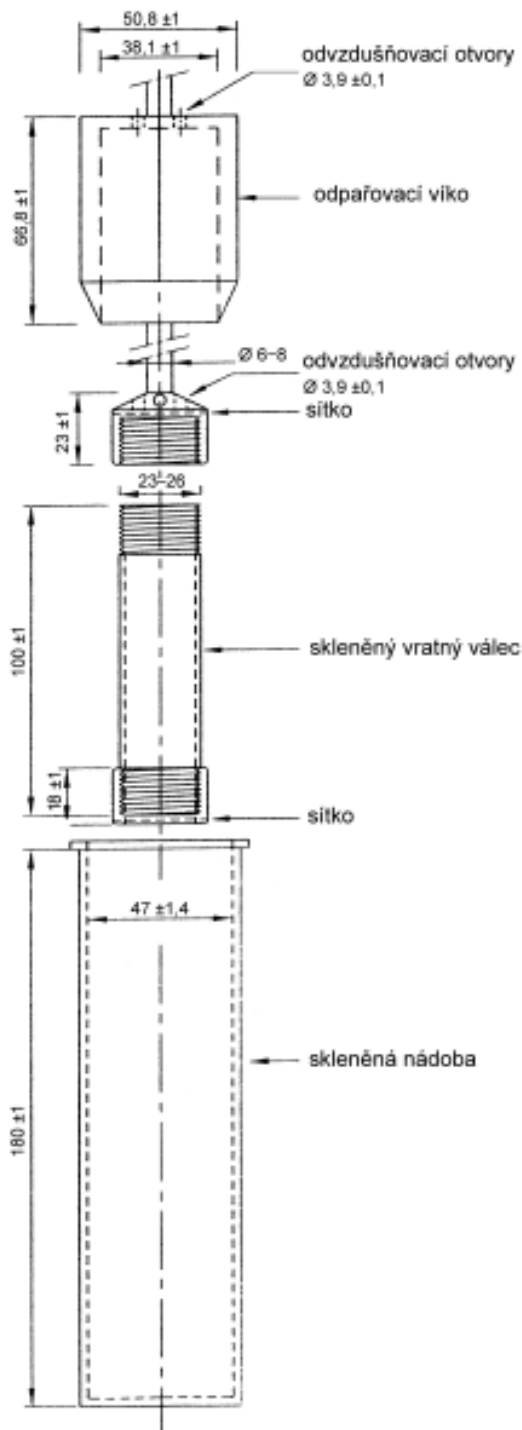
Obrázek 9: Míchadlo (pádlo), ze stránek firmy SOTAX



Obrázek 10: Nádoba s míchadlem (pádlem) (vlastní fotografie)

3. Přístroj s vratným válcem

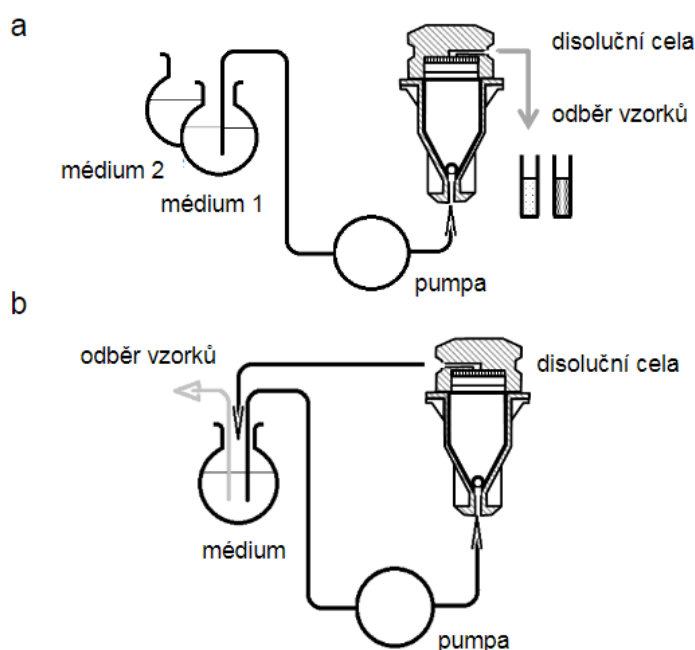
Skládá se ze sady skleněných nádob válcovitého tvaru s plochým dnem, které jsou z části ponořené do vodní lázně, opatřené odpařovacím víkem, sady skleněných vratných válců, inertních úchytek (z nerezové oceli, či jiného vhodného materiálu) (Obrázek 11). K překrytí vratných válců slouží sítka, které musí být z nereaktivního materiálu. Další částí je motor a vratné hnací zařízení. I zde je pro přesné výsledky nutný plynulý pohyb. Dávková jednotka se vkládá do skleněného vratného válce [26].



Obrázek 11: Skleněná nádoba a vratný váleček [26]

4. Přístroj s průtokovou celou

Skládá se ze zásobní nádoby a pumpy na disoluční médium. Další součástí je průtoková cela z inertního průhledného materiálu a opět vodní lázeň (Obrázek 12). Pumpa zmiňované médium vytlačuje přes průtokovou celu při konstantním toku (buďto se sinusoidní pulzací, či s nepulzujícím průtokem). Průtoková cela je spojena svisle s filtračním systémem, který brání úniku nerozpuštěných částic z horní části cely. Součástí jsou ještě malé skleněné kuličky o průměru 1 mm v dolní části cely a jedna kulička s průměrem 5 mm ležící ve špičce kužele, která slouží k úpravě průtoku média a vyloučení turbulentního proudění. Na kuličky se vkládá testovací jednotka. Pro speciální lékové formy se může použít i držák. Vzorky jsou odebírány na výstupu z cely. Tento přístroj se volí přednostně před ostatními, pokud je během disoluce nezbytná změna pH, nebo jestliže je požadováno velké množství disolučního média z důvodu zamezení procesu syčení roztoku léčivy [20, 26].

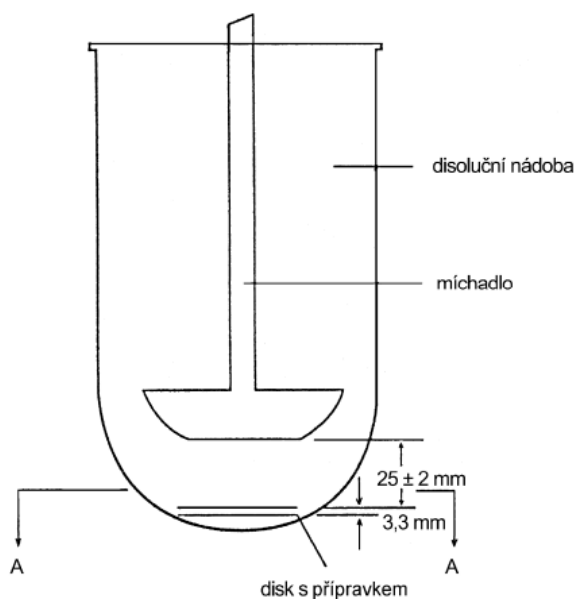


Obrázek 12: Přístroj s průtokovou celou, a-otevřený systém, b-uzavřený systém (popsáno v kapitole 4.3.1) [25]

Zkouška disoluce transdermálních přípravků (náplastí):

5. Disková metoda

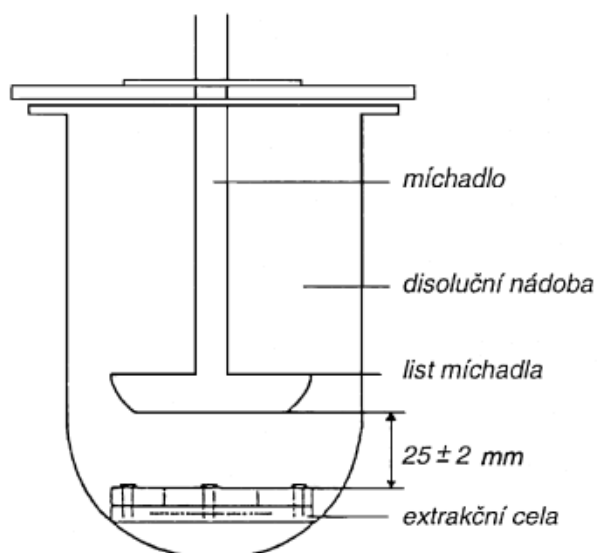
Používá se disoluční přístroj s míchadlem (pádlem), který je popsán v předchozí části (přístroj číslo 2) u disoluce pevných perorálních lékových forem. Má však navíc disk ve formě sítky zhotovený z nerezové oceli (Obrázek 13). Tento disk slouží k udržení zkoušeného přípravku u dna nádoby. Lze jej přilepit na disk oboustrannou lepící páskou, či předepsaným lepidlem. Náplast je díky němu rovná, povrch uvolňování je orientován nahoru rovnoběžně se spodní stranou míchadla. Mezi listem míchadla a diskem je vzdálenost 25 (\pm 2) mm. Aby nedocházelo k vypařování, nádoba je během zkoušky zakrytá [27].



Obrázek 13: Přístroj s míchadlem vybavený diskem [27]

6. Metoda s extrakční celou

I u této metody se používá přístroj s míchadlem popsáný v bodě 2. Tentokrát je však vybavený extrakční celou vyrobenou z inertních materiálů (Obrázek 14). Cella je složena z nosiče, víka a membrány umístěné na náplasti (pokud by bylo třeba oddělit náplast od média, aby nedošlo k ovlivňování jejích fyzikálně-chemických vlastností). Nosič má ve středové části kruhovou dutinu, která slouží k umístění náplasti. Jednotlivé rozměry dutiny jsou popsány v lékopise. Víko, připevněné k nosiči, je vybavené středovým otvorem, díky kterému se vymezení povrch uvolňování. Součástí je také pryžový prstenec sloužící jako těsnění [27].



Obrázek 14: Přístroj s míchadlem vybavený extrakční celou [27]

7. Metoda rotujícího válce

Používá se opět přístroj s míchadlem popsaný v předchozí části. Míchadlo a hřídel se ale nahradí válcem vyrobeným z nerezové oceli (Obrázek 15). Na tento válec se na začátku zkoušky umístí náplast. Po odstranění ochranné krycí vrstvy se náplast přilepí adhezivní vrstvou na vhodnou porézní inertní membránu. Ta musí na všech stranách náplast přesahovat nejméně o 1 cm. Na válec se přilepí buďto pomocí lepidla, či oboustranné lepící pásky. Nádoba se opět zakrývá, aby nedocházelo k vypařování. Množství uvolněné léčivé látky se zde vyjadřuje jako množství na jednotku plochy povrchu náplasti za jednotku času ^[27].



Obrázek 15: Rotační válec, ze stránek firmy SOTAX

Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum:

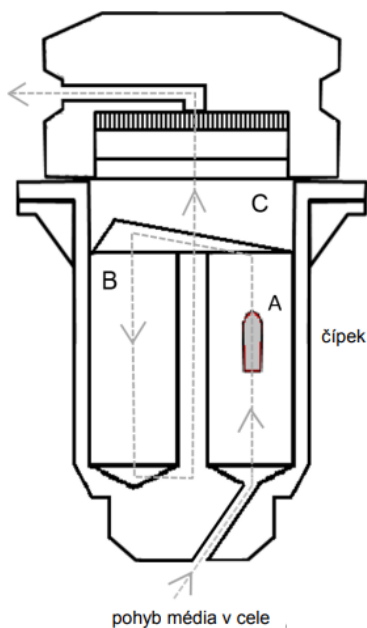
8. Žvýkací přístroj A a B

Žvýkací přístroje se používají ke stanovení rychlosti uvolnění léčivé látky ze žvýkací gumy, které se uskutečňuje mechanickým hnětením gumy v malé komůrce. Dochází tak ke simulaci žvýkání. U přístroje A žvýkání napodobují dva horizontální píсты s O-kroužky a těsníci kroužky a vertikální píst, který slouží ke správnému umístění gumy. Žvýkací komůrka je složena z jedné centrální komůrky, jedné nálevky a dvou pouzder vodící dráhy s vložkou. Přístroj B má jednu žvýkací komůrku, jednu vertikální osu s horní žvýkací plochou a jednu základní komůrku s dolní žvýkací plochou. Dále je přístroj vybaven zařízením pro žvýkací pohyb nahoru a dolů a jedním otočným zařízením kolem vertikální osy. Žvýkání je napodobeno horní a dolní žvýkací plochou. Testovací komůrky mohou být opatřeny vzorkovacími skleněnými trubičkami k zajištění „sink“ podmínek. Guma se vkládá, z důvodu zamezení rozpadu, mezi dvě kruhové plastové sítky. Pro stanovení uvolněného obsahu se odebírá zbytek gumy, nebo vzorek disolučního média ^[28].

Zkouška disoluce lipofilních tuhých lékových forem

9. Přístroj s průtokovou celou pro lipofilní lékové formy

Přístroj je složen ze zásobní nádoby na disoluční médium, pumpy (vytlačuje médium přes průtokovou celou), z průtokové cely tvořené třemi vzájemně spojitelnými, průhlednými částmi (dvě sousední komůrky v dolní části jsou napojené na průtokové zařízení). Na Obrázku 16 je viditelný mechanismus průtoku disolučního média. Protéká přes komůrku A vrchem do komůrky B. Poté stéká do otvoru a z něj opět vzhůru, kde je uložené filtrační zařízení. Lipofilní pomocné látky, které plavou na disolučním médiu, se hromadí ve střední části cely, kde je k tomu určená dutina. Poslední nezbytnou součástí je vodní lázeň. Vzorky se odebírají při výstupu z cely [25, 29].



Obrázek 16: Přístroj s průtokovou celou pro lipofilní tuhé léčivé látky [25]

4.3.3 Využití

Testy disoluce jsou jedním z hlavních charakteristik lékových forem. Největší využití nacházejí u hodnocení kvality léčivých přípravků. Dle jejich výsledků lze odhadnout také biologickou dostupnost léčivých látek in vivo. Déle se uplatňují u bioekvivalenčních studií generických přípravků (stanovení shody s danými požadavky na disoluci, hodnocení na základě faktorů podobnosti a rozdílnosti). Při vývoji nových léčivých přípravků se disoluce také používá k odhadu chování lékové formy v organismu. Předpověď terapeutické účinnosti (na základě korelace výsledů in vitro/ in vivo) ale není jednoduchá, jelikož procesy absorpce a distribuce jsou velmi složité. I tak může poskytnout důležité informace o biologické dostupnosti léčiva. Disoluční zkouška je podstatná zejména tehdy, když je rychlost rozpouštění léčivé látky limitujícím stupněm pro její absorpci. Toto je důvodem, proč se disoluce využívá jako významná lékopisná metoda a je mnohdy nezbytnou součástí registrační dokumentace léku [30].

4.4 UHPLC

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-high performance liquid chromatography) je separační metoda, která pracuje na principu rozdílné distribuce složek směsi mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Jednou z nich je fáze mobilní (pohyblivá), tvořená kapalinou. Druhá fáze je stacionární (nepohyblivá) a tvoří ji pevná látka. V závislosti na charakteru analytů mohou složky vzorku volně interagovat s oběma fázemi. Látky se slabšími interakcemi se stacionární fází (náplní kolony) jsou unášeny proudem mobilní fáze a eluovány dříve než látky, které tvoří se sorbentem v koloně interakce silnější. Tímto způsobem je umožněna separace. Dochází tedy k neustálému ustalování rovnováhy mezi stacionární a mobilní fází. Analyt se během průchodu kolonou vyskytuje ve formě úzkého pásu, který je po vymytí z kolony detekován. Vytvoří se chromatogram, na kterém je viditelný pík (nebo píky), jehož plocha je závislá na koncentraci analytu.

Metoda UHPLC je vyvinutá z vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Pracuje tedy na stejném principu. Z důvodu snahy separovat co nejvíce složek za co nejkratší čas, již dnes UHPLC dominuje (významně zkracuje dobu analýzy). Rozdíl je především v koloně. Používají se částice o rozměru menším než 2 μm , zatímco pro HPLC se využívají částice o velikosti 3-5 μm . Druhou odlišností je tlak, který je odrazem menší velikosti částic (kladou větší odpor při průchodu mobilní fáze). Příklad pracuje při tlaku okolo 100 MPa (140 MPa), zatímco u HPLC přístroje nelze překročit tlak 40 MPa. Mobilní fáze do UHPLC přístroje musí projít filtrací o velikosti pórů 0,22 μm , pro HPLC přístroj byla dostačující velikost 0,45 μm .

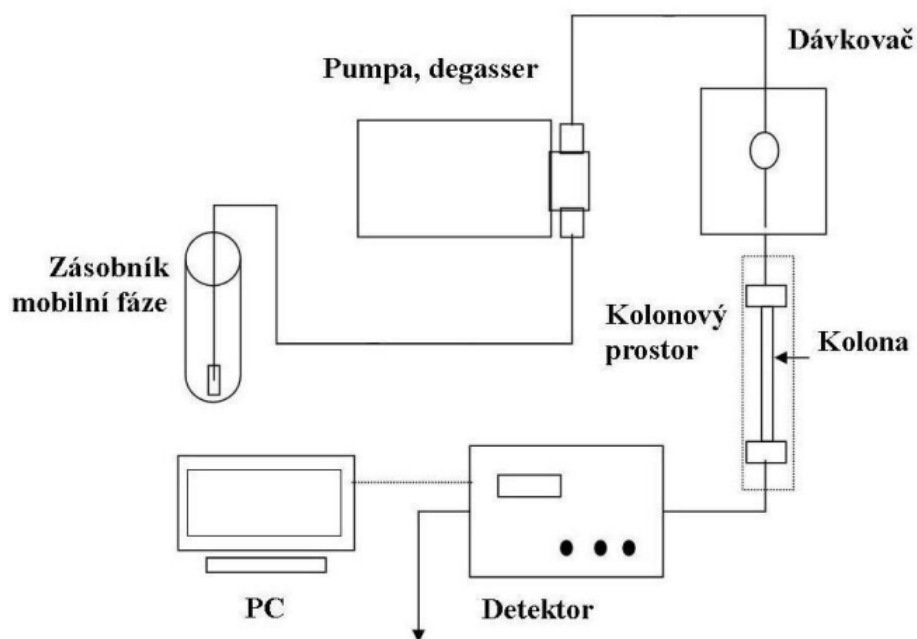
Při samotném procesu analýzy je zvolená mobilní fáze (MF) z rezervoáru pomocí čerpadel distribuována pod vysokým tlakem do celého systému. Do proudu této MF je nastříkovan vzorek pomocí autosampleru (automatického dávkovače). K separaci analytů poté dochází na chromatografické koloně, která je umístěna v kolonovém prostoru opatřeném termostatem. Za kolonou je umístěn detektor, pomocí kterého dochází k detekci jednotlivých složek analyzovaného vzorku. Vše je ovládáno pomocí počítače a chromatografického softwaru v něm.

Mezi největší výhody této metody patří vysoká separační účinnost, rychlost analýzy, nižší spotřeba analyzovaného vzorku i rozpouštědel, nižší náklady, vyšší citlivost odezvy a jednoduchý převod metod, které byly vyvinuté pro HPLC [31, 32, 33, 34].

4.4.1 Příklad

UHPLC systém musí být vyroben z vysoce odolného materiálu vůči tlaku a teplotě. Používá se proto například ocel, pozlacená ocel, kombinace ocel a polyetheretherketon, či vysoce odolný polyetheretherketon [31].

Příklad je složen z několika základních částí, mezi které patří: zásobník mobilní fáze, degasser, následuje pumpa (čerpadlo), autosampler, poté chromatografická kolona a termostat nastavující teplotu, detektor, a nakonec počítač s nainstalovaným softwarem pro zpracování dat (Obrázek 17) [32].



Obrázek 17: Základní schéma (U)HPLC přístroje [32]

Zásobník mobilní fáze

Zásobník se využívá z důvodu potřeby zajistit dostatečné množství MF, aby celý systém probíhal kontinuálně. Může se využít pouze jeden zásobník, pokud je zvolená isokratická analýza (konstantní složení mobilní fáze), nebo více v případě gradientové analýzy (proměnné složení MF). V tomto případě může být součástí také směšovač, umístěný buď před čerpadlem, nebo pokud jsou součástí přístroje čerpadla dvě, tak za nimi. Směšovač poté slouží k mísení kapalin ze zásobníků v různém poměru. MF je nasávána přes fritu, aby se zabránilo průniku pevných nečistot do systému.

Nejčastěji se používají nádoby z tlustostěnného skla o daném objemu. Hrdlo je opatřeno víčkem, či překryto parafínem, aby nedocházelo k vypařování MF, či průniku prachových částic.

Než se MF nalije do zásobníku, je nezbytné ji přefiltrovat a tím zbavit pevných nečistot, které by poté mohly ucpat přístroj. Slouží k tomu filtry o velikosti pórů 0,22 μm (pro HPLC 0,45 μm , jak je uvedeno výše). Pokud se používají organická rozpouštědla s čistotou pro UHPLC chromatografii, není další filtrace nutná [32].

Degasser

Zařízení, které se skládá z trubiček umístěných uvnitř evakuovaného prostoru, tvořených membránou propustnou pouze pro plyn. Pomocí vakua tak dochází k odstranění plynů v MF. Ty by mohly působit problémy v udržení kontinuálního průtoku a zvyšovat šum signálu detektoru [32].

Čerpadlo (pumpa)

Základní funkcí čerpadla je zajistit kontinuální průtok mobilní fáze systémem za vysokého tlaku s minimem pulzací. Skládá se z pístu obaleného těsněním, hřídele, hnacího motoru, hlavy (jedné, či dvou) a pojistných ventilů. Většina čerpadel obsahuje i odpadní ventil využívaný při výměně MF [32].

Autosampler

Umožňuje provádět sériové analýzy bez přítomnosti operátora. Musí být vyroben z chemicky inertního materiálu, odolný vůči vysokým tlakům, poskytovat přesné a reprodukovatelné dávkování. Základ tvoří dávkovací smyčka s šesticestným otočným ventilem. Důležitá je i nasávací jehla. Vzorky jsou umístěny ve vialkách uzavřených víčkem se septem. Vialky jsou umístěny v zásobníku v očíslovaných pozicích [32].

Chromatografická kolona, stacionární fáze

Je umístěna v kolonovém prostoru, který zajišťuje konstantní teplotu během analýzy. Dochází v ní ke kontaktu mobilní a stacionární fáze, tedy k separaci samotné. Kolonu je možné chránit předkolonou, která je umístěna před ní, zachytává nečistoty a v případě poškození ji lze snadněji vyměnit.

Kolona je naplněna sorbentem, podle jehož charakteru dělíme kolony na dva typy – náplňové a monolitické. Náplňové kolony jsou vyplněny sférickými částicemi. Rozeznáváme částice plně porézní, či povrchově porézní, které mohou zvýšit účinnost a rychlost separace. Čím jsou částice menší, tím větší odpor vůči mobilní fázi vytvářejí. To je také důvodem vyššího tlaku v UHPLC oproti HPLC. Monolitické kolony jsou vyplněny jedním kusem sorbentu, který obsahuje dva typy pórů (makropóry a mesopóry). Tento typ kolon je ale využíván poměrně málo kvůli omezené dostupnosti komerčně vyráběných fází, rozměru kolon a tendenci ke chvostování píků.

Nejčastěji se využívají stacionární fáze silikagelové (povrch silikagelu lze modifikovat), na bázi organických polymerů, hybridní (kombinace organického a anorganického polymeru), na bázi oxidu zirkoničitého a dalších kovových oxidů, či na bázi porézního grafitového uhlíku [32, 33, 37].

Detektor

Nachází se na výstupu z kolony. Mobilní fáze unáší vzorek do detektoru, kde probíhá samotná detekce analyzovaných látek. MF poté odtéká do odpadu, či dalšího detektoru. Detektory pracují v podstatě jako převodníky. Převádějí fyzikální či chemické vlastnosti analytů, nebo mobilní fáze na elektrický signál, který je úměrný koncentraci analytu.

Na detektory jsou kladeny mimořádné požadavky. Musí být vysoce citlivé (detekce látek v roztoku v malých koncentracích), univerzální, musí zajistit nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci, reprodukovatelnost a linearitu odezvy [35]. K nejběžnějším typům patří detektory spektrofotometrické (UV/VIS), fluorescenční, elektrochemické, hmotnostní, využívané především pro analýzu léčiv v biologickém materiálu, radiometrické, v menší míře refraktometrické, či detektory rozptylu světla a další [32, 36].

Systémy pro ovládání a zpracování dat

Základní úloha kontrolního modulu spočívá v ovládání komponentů sestavy. Je připojen k počítači, na kterém je nainstalovaný chromatografický software. Ten slouží k ulehčení vývoje metody a evidence vzorků, ke kontrole systému, sběru a vyhodnocení dat [32].

4.4.2 Separační módy

Dle charakteru stacionární a mobilní fáze lze rozlišit základní separační módy. Mezi nejstarší se řadí chromatografie na normálních fázích. SF je tvořena čistým silikagelem (případně modifikovaným prostřednictvím polárních funkčních skupin), a jako MF se použijí nevodné směsi organických nepolárních rozpouštědel (např. chloroform, hexan). Retence je poté zprostředkována polárními interakcemi (vodíkové vazby, dipól-dipól). Uplatnění nachází především při analýze látek náchylných k hydrolýze, vysoce hydrofobních, či sacharidů a tuků.

Nejčastěji využívaná je dnes chromatografie na reverzních fázích. SF je nepolární a tvoří ji nejčastěji silikagel s modifikovaným povrchem hydrofobními funkčními skupinami (například C18, C8, nebo fenyl). MF je poté polárnější a je tvořena směsí organické a vodné složky. Nejčastěji se z důvodu dobré viskozity používá acetonitril a methanol. Vodnou složku tvoří často pufrý z důvodu snadné modifikace pH. Všechny složky MF musí být mísitelné, aby nedocházelo k precipitaci v systému. Mechanismem retence jsou v tomto případě hydrofobní interakce, nejčastěji zprostředkovány van der Waalsovými silami.

Dále je známá chromatografie hydrofilních interakcí, která je alternativou k chromatografii na normální fázi. Mechanismus retence je komplexní. Zahrnuje rozdělování analytu mezi mikrovrstvu vody na povrchu SF (silikagel, může být i modifikován) a mezi fází mobilní (acetonitril a vodný roztok pufru), dále iontové i hydrofobní interakce.

Iontově-výměnná chromatografie se využívá k separaci iontů a ionizovatelných analytů. SF obsahuje iontovou, či ionizovatelnou skupinu opačného náboje než separovaný analyt. MF obsahuje ionty se stejným nábojem, jako má analyt. Retence je poté založena na kompetici iontů.

Chirální chromatografie zaujímá velmi důležité postavení. Některá léčiva mají účinek pouze v jedné stereoizomerní formě. V jiné mohou být neúčinná, či dokonce vykazovat nežádoucí účinky. Proto je nutné separovat a hodnotit všechny izomerní formy ^[37].

4.4.3 Využití

UHPLC metoda patří mezi nepoužívanější analytické metody současnosti. Má velmi široké využití. Uplatňuje se například v kontrolně-analytické oblasti. Při vhodně zvolených chromatografických podmínkách je možné ze záznamu určit totožnost léčiva (identifikaci), či pomocí výpočtů stanovit jeho obsah, nebo zjistit přítomnost případných nečistot. To je důvodem, proč se s oblibou využívá u složených lékových přípravků.

Další využití nachází při stabilitních studiích. Lze pozorovat průběh rozkladného procesu. Většinou je patrný hlavní pík léčiva a menší píky rozkladných produktů. Tato metoda tedy umožňuje kvantitativně hodnotit postupný úbytek léčiva a zároveň kvantitativně i kvalitativně hodnotit rozkladné produkty, které vznikají. Na základě toho je možné předpokládat chemickou podstatu rozkladné reakce. Kontrola a jistění jakosti se provádí na úrovni výrobce i kontrolních orgánů.

Třetí uplatnění nalézá při analýze přírodních léčiv v rostlinném materiálu. Lze hodnotit například zastoupení a obsah některých vitamínů, alkaloidů, či glykosidů v příslušných drogách.

Neopomenutelné je také monitorování léčiv a metabolitů v tělních tekutinách. Nejčastěji v moči, krevní plazmě, či séru. Léčivo a metabolity je nutné před analýzou izolovat z tělní tekutiny. Děje se to nejčastěji extrakcí do vhodného organického rozpouštědla. Důležitá oblast využití je při vývoji generických přípravků, kde se uplatňuje například při disolučních studiích a při studiu bioekvivalence.

UHPLC analýza se tedy uplatňuje nejen ve fázi výzkumu, vývoje a výroby léčiv a léčivých přípravků, ale své využití nachází i po zavedení léčivého přípravku na trh. Jelikož se tato metoda oproti HPLC vyznačuje vyšší rychlostí a účinností separace, bývá dnes upřednostňována. Splňuje totiž cíl analýzy co nejvíce vzorků za krátký čas ^[34, 38].

4.5 Rešerše prací založených na disoluci meloxicamu a stanovení tohoto léčiva metodou (U)HPLC a UV/VIS spektrofotometrií.

4.5.1 Disoluce

Tabulka 1 shrnuje informace o disolučním testování meloxicamu. U většiny těchto zkoušek bylo disoluční médium tvořené fosfátovým pufrům o pH 6,8, nebo 7,5. Některé články zmiňují destilovanou vodu, či kyselinu chlorovodíkovou. Teploty všech disolučních médií byly nastaveny na $37 \pm 0,5$ °C. Nejčastěji se pracovalo s objemem média 900 ml při 100 otáčkách za minutu. Jsou ale uvedeny případy s menším objemem (150, 500, 700 ml) i menší frekvencí otáček (50, 75 rpm). Intervaly odběrů i jednotlivé odebírané objemy se v těchto zkouškách liší. Lze vidět intervaly po 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 až 240 minutách. Jednotlivé objemy se pohybují od 2, přes 5 až po 15 ml. Před detekcí prošly některé vzorky filtrací. Detekce byla provedena při vlnových délkách od 350 po 366 nm.

Tabulka 1: Příklady disolučních zkoušek meloxicamu

Metoda – typ přístroje	Disoluční médium (pH; teplota)	Objem média	Otáčky za minutu	Intervaly odběrů	Jeden odběr	Filtrace	Detekce	Odkaz na článek
1.Disoluce – pádlo	Destilovaná voda ($37 \pm 0,5$ °C)	500 ml	50 rpm	10, 20, 30, 40, 50 a 60 min	5 ml (doplňeno disolučním médiem)	Membránový filtr (0,22 μ m)	UV/VIS spektrofotometr při 365 nm	[8]
2.Disoluce – košíček	Fosfátový pufr (pH 6,8; $37 \pm 0,5$ °C)	700 ml	50 rpm	2, 4, 6, 8 a 10 min	5 ml (doplňeno fosfátovým pufrům)	Membránový filtr s velikostí pórů (0,22 μ m)	Detektor fotodiodového pole (Waters 996 UPLC) při vlnové délce 350 nm	[39]
3.Disoluce – pádlo	Fosfátový pufr (pH 7,5; $37 \pm 0,5$ °C)	900 ml	100 rpm	15, 30, 45, 60, 75, 90 a 105 min	15 ml	–	UV/VIS spektrofotometr při 362 nm	[40]
4.Disoluce – pádlo	a) 0,1 N HCl (pH 1,2) b) dest. voda (pH 6,4) $37 \pm 0,5$ °C	900 ml	100 rpm	Celkový interval 60 min	–	Membránový filtr (0,45 μ m, Millipore).	UV/VIS při a) 351 nm b) 360 nm	[41]
5.Disoluce – pádlo	50 mM pufr fosforečnanu sodného (pH 6,8; $37 \pm 0,5$ °C)	150 ml	75 rpm	15, 30, 45, 60, 120, 240 a 480 min	2 ml (doplňeno pufrům)	0,45 μ m PTFE filtr	UV/VIS spektrofotometr LAMBDA 1050 (Waltham, USA) při 366 nm	[42]
6.Disoluce – pádlo	Fosfátový pufr (pH $7,5 \pm 0,1$; $37 \pm 0,5$ °C)	900 ml	100 rpm	5, 10, 20, 30, 60 a 90 min	–	–	UV/VIS spektrofotometr (od 200-800 nm po 4 nm), meloxicam A_{max} při 364 nm.	[43]

4.5.2 (U)HPLC

Tabulka 2 shrnuje experimentální metody, kterých bylo využíváno při stanovení meloxicamu metodou HPLC. V pěti případech byla použita kolona, která obsahovala C18. V dalších dvou poté C6-phenyl, nebo C8. Mobilní fází byl nejčastěji methanol a voda, která v některých experimentech obsahovala kyselinu octovou, či kyselinu mravenčí. K methanolu byl v jednom případě přidán octan amonný. Dále pak sloužila jako mobilní fáze směs dihydrogenfosforečnanu draselného s triethylaminem a acetonitrilem, nebo acetonitril s kyselinou octovou. Průtoková rychlost byla ve třech případech 1,0 ml/min, dále pak 0,20, 0,35, 0,8, a 1,7 ml/min. Detekce probíhala při vlnových délkách od 220 k 364 nm. V jednom případě byla detekce provedena hmotnostním spektrofotometrem. Objem nástřiku byl nejčastěji 20 µl, dále pak 5, či 10 µl. Retenční čas meloxicamu se pohyboval mezi 3,6 a 10,5 minutami, nejčastěji však v rozmezí 6 až 8 minut.

Tabulka 2: Příklady stanovení meloxicamu metodou HPLC

Metoda	Stacionární fáze (rozměr kolony; velikost částic)	Mobilní fáze	Průtoková rychlost	Režim	Detekce	Nástřik	Retenční čas melox.	Odkaz na článek
1.HPLC	C18 (Dr Maisch GmbH (Beim Brueckle, Německo)) (250 x 4,6 mm; 10 µm)	Methanol : voda (70:30)	1,0 ml/min	Isokratický	UV/VIS 360 nm	20 µl	6-8 min	[44]
2.HPLC	Waters C18 (250 x 4,6 mm; 5.0 µm)	Methanol : voda obsahující 0,05 % kyseliny octové (20:80) → (30:70)	1,0 ml/min	Gradientový	UV/VIS 220 nm	20 µl	6-8 min	[45]
3.HPLC	Gemini C6-Phenyl 110Å, (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) (150 x 3 mm; 3 µm)	10 mmol/l octan amonný vodní roztok : methanol (73:27), (45:55), (30:70), (20:80), (5:95), (73:27)	0,35 ml/min	Gradientový	UV/VIS 222-360 nm	10 µl	10,5 min	[46]
4.HPLC	Kromasil® C18 (250 x 4,60 mm; 5 µm)	Methanol : voda (8:2), orthofosforečná kyselina k úpravě pH na 3,0	0,8 ml/min	Isokratický	UV/VIS 228 nm	20 µl	6,960 min	[47]
5.HPLC	C8 Eclipse XDB (150 x 4,6 mm; 5 µm, Agilent)	Dihydrogenfosforečnan draselný (50 mM, 77 %) : triethylamin (0,3 % V/V) : acetonitril 23 %.	1,7 ml/min	Isokratický	UV/VIS 364 nm		<5 min	[48]
6.HPLC	Venusil ASB-C18 (2,1 x 100 mm; 3 µm)	Methanol : voda (obsahující 0,1% kyseliny mravenčí) (75:25)	0,20 ml/min	Isokratický	MS (Micromass® Quattro micro™), ionizace elektrospoj	5 µl	3,6 min	[49]
7.HPLC	RP-C18 (LiChrospher, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) (250 x 4,6 mm; 5 µm) 30 ± 0.5°C	Octová kyselina (1 % V/V) : acetonitril (50:50), pH 2.8	1,0 ml/min	Isokratický	UV/VIS 360 nm	20 µl	Cca 10 min	[50]

4.5.3 UV/VIS spektrofotometrie

Tabulka 3 shrnuje UV/VIS spektrofotometrické metody, které byly používány při stanovení meloxikamu v jednotlivých studiích. Nejčastěji bylo měřeno při vlnových délkách okolo 360 nm.

Tabulka 3: Příklady stanovení meloxikamu UV/VIS spektrofotometrií

Metoda	Přístroj	Vlnová délka	Kyveta	Odkaz na článek
1.UV/VIS	PG UV-VIS spectrophotometer model T80 ⁺ (PG, Anglie)	286 nm	–	[51]
2.UV/VIS	Agilent 8453 UV/VIS spectrometer (Hewlett-Packard, CA, USA)	363 nm	10 mm	[52]
3.UV/VIS	UV-VIS spectrophotometer (UV3600, Shimadzu, Japan)	185-360 nm	Křemenná (10 mm)	[53]
4.UV/VIS	Jasco V-650 spectrophotometer (Japan)	360	Křemenná (10 mm)	[54]
5.UV/VIS	JASCO 7580 UV-Vis-NIR doublebeam spectrophotometer	230-365 nm	Křemenná (10 mm)	[55]

V poslední uvedené studii (Tabulka 4) ^[56] se experiment zabýval disolucí meloxikamu a stanovením obsahu léčivé látky ve vzorcích UV/VIS spektrofotometrií a HPLC metodou najednou. Po porovnání se došlo k závěru, že disoluční křivky získané z vypočítaných hodnot po proměření vzorků UV/VIS spektrofotometrií nevykazovaly rozdíl oproti křivkám získaným podobným způsobem, ale za pomoci HPLC metody.

Tabulka 4: Studie zabývající se disolucí meloxikamu a měřením vzorků UV/VIS spektrofotometrií a metodou HPLC současně

Disoluce	Přístroj s pádlem Disoluční médium: 50 mmol/l fosfátový pufr, pH 7,5, teplota 37 °C Objem média: 900 ml Otáčky za minutu: 75 rpm. Intervaly odběrů: 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 a 90 minut Jeden odběr: 3 ml Filtrace přes membránový filtr 0.47 μm
UV/VIS	Dvojitý paprskový spektrofotometr Shimadzu UV-1601PC (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) Spektra byla získávána v 1 nm intervalech v rozsahu 200-500 nm.
HPLC	Stacionární fáze: Kolona Silia Chrom XDB1 C18 (250 x 4,6 mm; velikost částic 5μm) Mobilní fáze: 30 °C, 51% methanol, 9% isopropanol a 40% roztok fosfátového pufru (50 mmol/l, pH 5.9) Průtoková rychlost 1,0 ml/min Detekce: 225 nm Nástřik: 20 μl Přibližný retenční čas meloxikamu: 3,2 min

5 Experimentální část

5.1 Použité suroviny a chemikálie

DISOLUCE

- Hydroxid sodný (p.a.)
 - PENTA s.r.o., Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný (p.a.)
 - VWR International, LLC, Česká republika
- Ultračistá voda
 - Čištěná systémem Milli-Q RG, Millipore, USA
- Meloxicam tobolky (15 mg léčiva)
 - Připraveny na Katedře farmaceutické technologie FaF UK
 - Meloxicam – Cadila Healthcare Ltd., India
 - Chitosan – JBICHEM International trading Co., Ltd., China
- Methanol gradient grade
 - Honeywell, Německo
- Pufr pH 4,01 a 7,00
 - Používané ke kalibraci pH metru
 - Xylem Analytics Germany GmbH WTW, Německo

UHPLC

- Meloxicam
 - Cadila Healthcare Ltd., India
- Methanol
 - CHROMASOLV™ for HPLC, gradient grade, ≥99.9%, Francie
- Hydroxid sodný 1 mol/l RS
 - PENTA s.r.o., Česká republika
- Ultračistá voda
 - čišťená systémem Milli-Q RG, Millipore, USA
- Acetonitril
 - CHROMASOLV™ Gradient, for HPLC, gradient grade, ≥99.9%, Německo
- Kyselina octová ledová
 - PENTA s.r.o., Česká republika
- Isopropanol (2-Propanol)
 - LiChrosolv, Francie
- Dihydrogenfosforečnan draselný
 - VWR International, LLC
- Hydroxid sodný (p.a.)
 - PENTA s.r.o., Česká republika
- 5-methylthiazol-2-amin, nečistota B
 - European Pharmacopoeia Reference Standard, Štrasburk, Francie

5.2 Použité přístrojové vybavení a pomůcky

DISOLUCE

- Digitální váhy KERN 150 – 3M
 - KERN & Sohn GmbH, Německo
- Analytické váhy Sartorius Weighting Technology GmbH, Německo
- pH metr SCHOTT
 - Fisher Scientific, spol. s.r.o., Česká republika
- Ultrazvuková lázeň BANDELIN
 - Sonorex digitec, Německo
- Disoluční přístroj SOTAX AT Xtend, Německo
- Spektrofotometr LIBRA S12
 - Fisher Scientific, Česká republika
- Automatické pipety
 - Transferpette S, Německo
- 5 ml injekční stříkačka
 - Chirana T.injecta, Slovensko

UHPLC

- UHPLC systém Liquid Chromatograph
 - Nexera X2, Shimadzu Corporation, Japonsko
- Chromatografická kolona
 - LiChrospher® 5 µm C18 100 Å (LC Column 125 X 4 mm), Phenomenex, USA
- Digitální váhy KERN 150 – 3M
 - KERN & Sohn GmbH, Německo
- Analytické váhy
 - Sartorius Weighting Technology GmbH, Německo
- pH metr SCHOTT
 - Fisher Scientific, spol. s.r.o., Česká republika
- Automatické pipety
 - Transferpette S, Německo
- Filtry 0,22 µm
 - nylon, Chromservis, Česká republika
- Injekční stříkačky 2 ml
 - Chirana T. Injecta, Slovensko

5.3 Příprava disolučního média

Disolučním médiem byl fosfátový pufr o pH 6,8, jehož příprava probíhala dle lékopisu ^[20] (5.17.1. Doporučení pro zkoušku disoluce, Tab. 5.17.1-3 Tlumivé roztoky fosforečnanové). Zahrnovala před každou disolucí následující kroky: Výpočet navážky hydroxidu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného dle vzorce (1) uvedeného níže, poté rozpuštění naváženého množství ve vodě. Následovalo postupné přilévání roztoku hydroxidu sodného do roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného za současného měření pH na pH metru SCHOTT až do dosažení pH 6,8. Poté se vzniklá směs doplnila vodou do dvoulitrové odměrné baňky. Celý postup se opakoval dvakrát (byly tedy celkem připraveny čtyři litry disolučního média před začátkem každého testování).

Výpočty navážek:

Hydroxid sodný 0,2 mol/l

$$\begin{aligned} m &= c \times V \times M && (1) \\ &= 0,2 \times 0,5 \times 40 = 4g \end{aligned}$$

4 gramy NaOH rozpustit v 500 ml vody

m znázorňuje potřebnou hmotnost látky [g]

c je molární koncentrace [mol/l]

V je celkový objem roztoku [l]

M je molární hmotnost dané látky [g/mol]

Dihydrogenfosforečnan draselný

$$\begin{aligned} m &= c \times V \times M = 0,2 \times 0,5 \times 136 = 13,6g \\ &13,6 \text{ gramů } \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ rozpustit v 500 ml vody} \end{aligned}$$

Poté směs doplnit vodou na 2000 ml.

5.4 Příprava roztoků

5.4.1 Zásobní roztoky standardu a nečistoty B

Zásobní roztok meloxicamu byl připraven dle lékopisu ^[57] následujícím způsobem: 40 mg meloxicamu se rozpustilo ve směsi 5 ml methanolu a 0,3 ml hydroxidu sodného 1 mol/l RS a zředilo se methanolem R na 20,0 ml.

Zásobní roztok nečistoty B (= 5-methylthiazol-2-amin) byl připraven taktéž dle lékopisu ^[57]. Pouze s tím rozdílem, že bylo zhotoveno menší množství. Postupovalo se takto: 0,8 mg nečistoty B se rozpustilo ve směsi 2 ml methanolu R a 0,12 ml hydroxidu sodného 1 mol/l RS a zředilo se methanolem R na 10 ml.

Zmiňované roztoky byly použity při vývoji metody. Uchovávaly se v lednici při 4°C.

5.4.2 Mobilní fáze

V tomto výzkumu se pracovalo celkem se třemi mobilními fázemi různého složení. První mobilní fáze se skládala pouze z vody a methanolu, jejichž poměr se různě měnil (kapitola 6.2 Vývoj metody UHPLC, 6.2.3 Mobilní fáze).

Druhá mobilní fáze obsahovala 1 % kyselinu octovou a acetonitril opět v různém poměru. Kyselina octová byla připravena smísením 5 ml kyseliny octové ledové a 495 ml vody ultračisté.

Poslední zkoušenou mobilní fází byla směs methanolu, isopropanolu a roztoku fosfátového pufru (50 mmol/l, pH 5.9). Fosfátový pufr byl připraven následovně: První krok zahrnoval výpočet navážky dihydrogenfosforečnanu draselného dle vzorce (1), navážené množství se poté rozpustilo v 500 ml ultračisté vody. Následovala úprava pH tohoto roztoku. Bylo sledováno pomocí přístroje pH metr SCHOTT. Výsledného pH 5,9 bylo docíleno kapkou roztoku hydroxidu sodného.

Výpočet navážky dihydrogenfosforečnanu draselného:

$$m = c \times V \times M = 0,05 \times 0,5 \times 136 = 3,4 \text{ g}$$

Veškeré zmiňované mobilní fáze byly před vložením do UHPLC filtrovány pomocí vakua přes 0,22 µm filtr. Skladovány v lednici při 4 °C.

6 Výsledky a diskuze

Postup práce

Prvním krokem celého experimentu byla příprava disolučního média. Důležitým bodem (nezbytným pro výpočty) bylo stanovení kalibrační křivky meloxicamu. Následovala samotná disoluce. Odebrané vzorky byly poté proměřeny ve spektrofotometru LIBRA S12 při vlnové délce 363 nm. Získané hodnoty absorbance sloužily k výpočtu koncentrace uvolněného léčiva. V druhé části se diplomová práce zabývá vývojem UHPLC metody. Pomocí této metody se zkoušely stanovovat i vzorky získané z disoluce a nečistota B. Metodu pro toto stanovení bude třeba ještě dále vyvinout a validovat.

6.1 Disoluce

Zkouška disoluce slouží ke stanovení množství uvolněné látky z pevné lékové formy (v našem případě se jedná o tobolku) v předepsaném čase a daném médiu. Tento děj je ovlivňován mnoha faktory. Některé z nich budou předmětem následující diskuze.

6.1.1 Složení tobolek

Tato experimentální práce se zabývá disolucí léčivé látky ze čtyř formulací tobolek F1 až F4, které se liší ve způsobu přípravy. Tobolky F1, F2 a F3 tvoří směs léčiva (meloxicamu) a pomocné látky (chitosanu) připravená mísením anebo mletím ve hmotnostním poměru 1:8. Pro zjištění vlivu pomocné látky na disoluci léčiva byly pro porovnání připraveny ještě tobolky F4 obsahující pouze samotné léčivo. Veškeré informace jsou shrnuty v Tabulce 5. Zmiňované tobolky byly připraveny na Katedře farmaceutické technologie FaF UK.

Tabulka 5: Složení a příprava tobolek

Formulace	Směs	Příprava
F1	Meloxicam:Chitosan (1:8)	Mísená směs (3D mísič Turbula)
F2	Meloxicam:Chitosan (1:8)	Mletá směs (planetární kulový mlýn Retsch), doba mletí 5 minut
F3	Meloxicam:Chitosan (1:8)	Mletá směs (planetární kulový mlýn Retsch), doba mletí 30 minut
F4	Meloxicam	

6.1.2 Kalibrační křivka

Důležitým bodem pro výpočet koncentrace rozpuštěného léčiva bylo sestavení kalibrační přímky. Nejprve byly připraveny do tří 10 ml odměrných baněk zásobní roztoky (A, B, C), ve kterých bylo 2,56 mg meloxicamu v methanolu. Protože se meloxicam hůře rozpouští, byly banky vloženy na půl hodiny do ultrazvukové lázně BANDELIN. Následovalo pipetování zmiňovaných roztoků do dalších odměrných baněk po 100 až 600 μ l a naředění pufrem do 10 ml (Tabulka 6).

Tabulka 6: Složení kalibračních roztoků

Kalibrační roztok	Koncentrace léčiva [g/l]	Množství ZR [ml]	Množství pufru [ml]
1	0,00256	0,1	9,9
2	0,00512	0,2	9,8
3	0,00768	0,3	9,7
4	0,01024	0,4	9,6
5	0,01280	0,5	9,5
6	0,01536	0,6	9,4

Po dokončení přípravy byly roztoky změřeny pomocí Spektrofotometru LIBRA S12. Měření probíhalo při vlnové délce 363 nm proti slepému roztoku pufru, stejně jako u odebraných vzorků z disoluce. Bylo proměřeno všech 18 připravených roztoků (ze tří zásobních) třikrát. Po získání hodnot absorbance byla sestavena kalibrační křivka, což je závislost absorbance na koncentraci meloxicamu (Tabulka 7, Tabulka 8, Obrázek 18).

Tabulka 7: Absorbance kalibračních roztoků 1-6 připravených z jednotlivých zásobních roztoků A, B, C

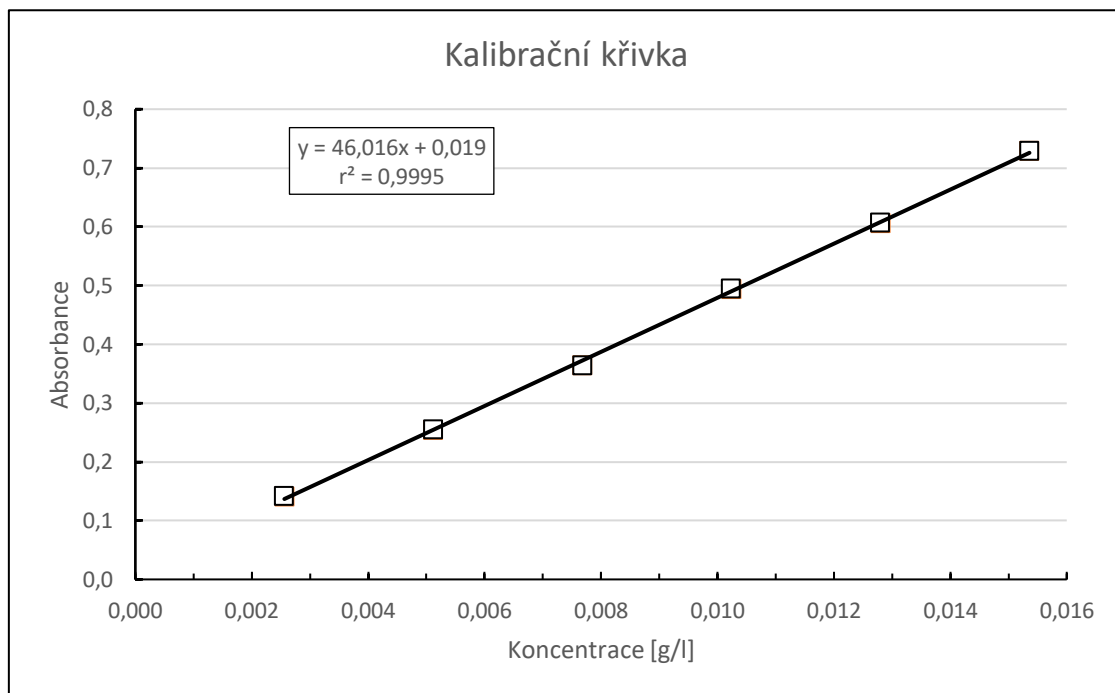
	1.	2.	3.	\bar{A}
A1	0,119	0,118	0,117	0,118
A2	0,267	0,265	0,261	0,264
A3	0,360	0,359	0,364	0,361
A4	0,480	0,479	0,475	0,478
A5	0,573	0,579	0,580	0,577
A6	0,737	0,737	0,736	0,737

	1.	2.	3.	\bar{A}
B1	0,176	0,173	0,175	0,175
B2	0,239	0,235	0,234	0,236
B3	0,358	0,359	0,360	0,359
B4	0,494	0,494	0,494	0,494
B5	0,615	0,614	0,616	0,615
B6	0,692	0,693	0,697	0,694

	1.	2.	3.	\bar{A}
C1	0,129	0,131	0,131	0,130
C2	0,263	0,263	0,262	0,263
C3	0,370	0,371	0,373	0,371
C4	0,509	0,510	0,510	0,510
C5	0,626	0,627	0,626	0,626
C6	0,754	0,754	0,756	0,755

Tabulka 8: Absorbance kalibračních roztoků

Koncentrace [g/l]	Absorbance průměr
0,0026	0,141
0,0051	0,254
0,0077	0,364
0,0102	0,494
0,0128	0,606
0,0154	0,728



Obrázek 18: Kalibrační křivka meloxicamu

V tomto momentu byla získána kalibrační rovnice (2), která popisuje zmiňovanou závislost.

$$A = 46,016c' + 0,019 \quad (2)$$
$$r^2 = 0,9995$$

A je absorbance

c' značí koncentraci meloxicamu v g/l

r^2 je koeficient determinace

6.1.3 Disoluce a její hodnocení

Pro stanovení disoluce tobolek meloxikamu byl zvolen přístroj s pádlem^[26] (ČL – Zkouška disoluce pevných lékových forem) (Obrázek 19). K měření bylo využito zařízení od firmy SOTAX, typ AT Xtend. Po zapnutí a sestavení přístroje (vlození disolučních nádob, namontování pádel a sacích tyčí) bylo do čtyř jeho nádob nalito pokaždé 900 ml disolučního média, jehož příprava je uvedena v kapitole 5.3 Příprava disolučního média. Následovalo vytemperování média na $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$, což odpovídá teplotě lidského těla. Po dosažení cílové teploty mohl začít test disoluce.



Obrázek 19: Disoluční nádoba s vloženým pádlem naplněná disolučním médiem

Při zkušebním pokusu disolučního testu tobolek po vložení do média plavaly na hladině, což není správné. Bylo tedy nutné použít „sinker“, který dopomohl tobolek klesnout na dno nádoby. „Sinker“ je znázorněn na Obrázku 20. Další problém nastal po zjištění, že se tři tobolek po celkovém testu nerozpustily. Řešením bylo zvýšit rychlost otáček ze 75 na 100 otáček za minutu (toto zvýšení je stále v souladu s lékopisem^[20]). Nyní byla metoda připravena pro testování.



Obrázek 20: „Sikner“ s vloženou tobolkou

Disoluce začala vložením tobolek do vytemperovaného média. Bylo provedeno testování čtyř tobolek od každé formulace (nejprve od formulace F4, poté F1, dále F2 a nakonec F3). Během disolučního testování byly postupně z každé nádoby odebírány 4 ml vzorku v časech 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 a 60 minut. Celkem bylo získáno osm vzorků z každé tobolky. Dohromady tedy 32 vzorků z jedné formulace. Obsah meloxikamu v těchto vzorcích byl poté měřen pomocí spektrofotometru LIBRA S12 při vlnové délce 363 nm proti slepému vzorku, kterým byl samotný pufr. Po naměření všech čtyř formulací se celý proces opakoval ještě jednou pro ověření. Veškeré změřené či vypočítané hodnoty jsou uvedeny dále v tabulkách a grafech.

Vzorce pro výpočty

Výsledky byly zpracovány pomocí programu Excel. Při výpočtu byly použity následující vzorce:

$$c' = \frac{A-0,019}{46,016} \quad (3)$$

c' znázorňuje koncentraci léčiva [mg/ml]

A je absorbance

$$m_{celk.} = m_{nádoba} + m_{vzorek} = c' \times V_{nádoba} + \sum c' \times 4 \quad (4)$$

$m_{celk.}$ značí celkové množství uvolněného léčiva [mg]

$m_{nádoba}$ je hmotnost rozpuštěného léčiva v nádobě [mg]

m_{vzorek} je hmotnost uvolněného léčiva v odebraných vzorcích [mg]

c' je koncentrace [mg/ml]

$V_{nádoba}$ je objem disolučního média v nádobě [ml]

násobené 4 jelikož se z disoluce odebíraly 4 ml

$$m_{rel.} = \frac{m_{celk.}}{15} \times 100 \quad (5)$$

$m_{rel.}$ znázorňuje relativní množství uvolněného léčiva v % (uvedená hmotnost v tobolkách je 15 mg)

$m_{celk.}$ je hmotnost celkově uvolněného léčiva v nádobě i vzorcích [mg]

6.1.3.1 Formulace F4

Tabulka 9: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F4.01

F4.01	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,005	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A2	10	892	0,010	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A3	15	888	0,009	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A4	20	884	0,018	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A5	25	880	0,027	0,0002	0,15	0,00	0,00	0,15	1,0
A6	30	876	0,060	0,0009	0,78	0,00	0,00	0,78	5,2
A7	45	872	0,091	0,0016	1,36	0,01	0,01	1,37	9,2
A8	60	868	0,131	0,0024	2,11	0,01	0,02	2,13	14,2

B1	5	896	0,009	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B2	10	892	0,009	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B3	15	888	0,012	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B4	20	884	0,025	0,0001	0,12	0,00	0,00	0,12	0,8
B5	25	880	0,031	0,0003	0,23	0,00	0,00	0,23	1,5
B6	30	876	0,043	0,0005	0,46	0,00	0,00	0,46	3,1
B7	45	872	0,105	0,0019	1,63	0,01	0,01	1,64	10,9
B8	60	868	0,135	0,0025	2,19	0,01	0,02	2,21	14,7

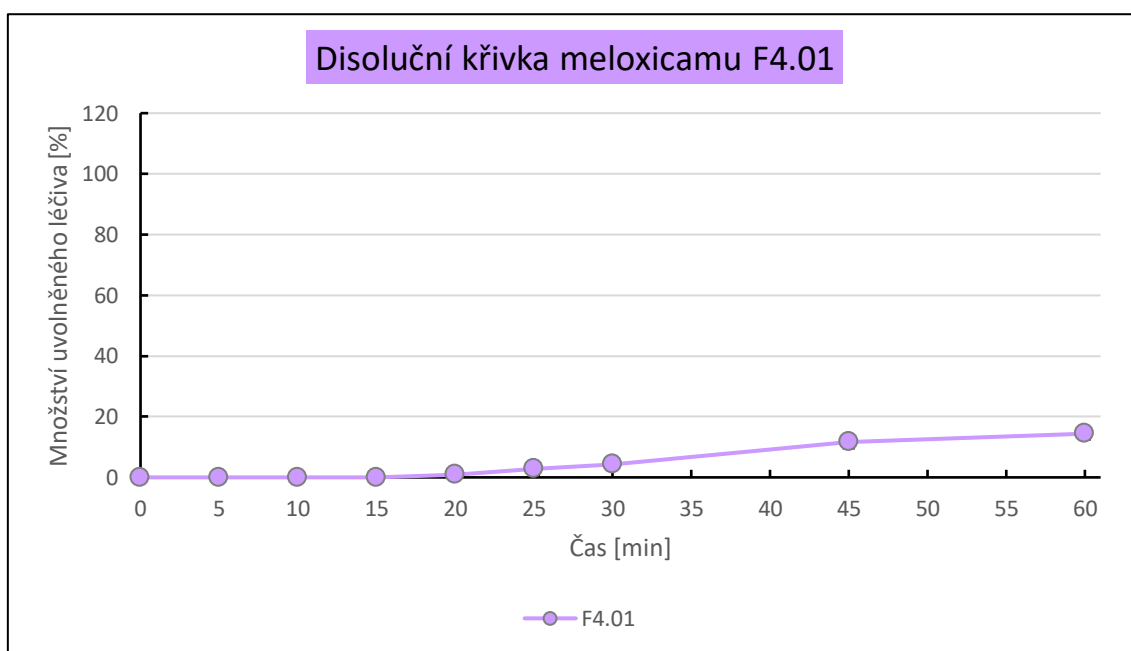
C1	5	896	0,003	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
C2	10	892	0,002	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
C3	15	888	0,011	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
C4	20	884	0,033	0,0003	0,27	0,00	0,00	0,27	1,8
C5	25	880	0,065	0,0010	0,88	0,00	0,01	0,88	5,9
C6	30	876	0,055	0,0008	0,69	0,00	0,01	0,69	4,6
C7	45	872	0,132	0,0025	2,14	0,01	0,02	2,16	14,4
C8	60	868	0,150	0,0028	2,47	0,01	0,03	2,50	16,7

D1	5	896	0,009	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D2	10	892	0,013	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D3	15	888	0,017	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D4	20	884	0,029	0,0002	0,19	0,00	0,00	0,19	1,3
D5	25	880	0,040	0,0005	0,40	0,00	0,00	0,40	2,7
D6	30	876	0,052	0,0007	0,63	0,00	0,01	0,63	4,2
D7	45	872	0,117	0,0021	1,86	0,01	0,01	1,87	12,5
D8	60	868	0,113	0,0020	1,77	0,01	0,02	1,80	12,0

K měření byly použity čtyři tobolky, výsledky v následující Tabulce 10 a na Obrázku 21 jsou tudíž průměrem ze čtyř měření. (Stejně je to i u dalších formulací).

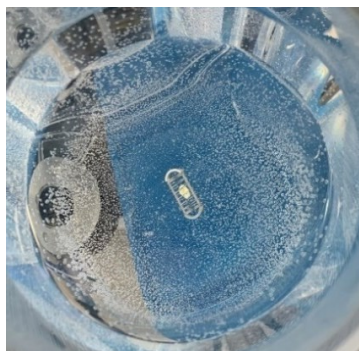
Tabulka 10: Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a procentech, směrodatná odchylka formulace F4.01

F4.01	čas [min]	c' [mg/ml]	m _{celk.} [mg]	m [%]	SD
	0			0,0	
1	5	0,0000	0,00	0,0	0,0
2	10	0,0000	0,00	0,0	0,0
3	15	0,0000	0,00	0,0	0,0
4	20	0,0002	0,14	1,0	0,8
5	25	0,0005	0,42	2,8	2,2
6	30	0,0007	0,64	4,3	0,9
7	45	0,0020	1,76	11,7	2,2
8	60	0,0025	2,16	14,4	1,9



Obrázek 21: Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F4.01

V tomto se případě se jedná o disoluci samotného léčiva, bez pomocné látky. Dle výsledků (Tabulka 9 a 10, Obrázek 21) je patrné, že množství uvolněného meloxicamu bylo u této formulace velmi nízké (pouhých 14,4 %). První hodnoty byly naměřeny až po 20 minutách testování. Na konci disoluce zůstaly na dně nádoby okem viditelné nerozpuštěné části léčiva (Obrázek 22).



Obrázek 22: Nerozpuštěná formulace F4 po skončení prvního testu disoluce

6.1.3.2 Formulace F1

6.1.3.2.1 První test disoluce F1.01

Tabulka 11: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F1.01

F1.01	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,553	0,0116	10,40	0,05	0,05	10,44	69,6
A2	10	892	0,686	0,0145	12,93	0,06	0,10	13,03	86,9
A3	15	888	0,747	0,0158	14,05	0,06	0,17	14,22	94,8
A4	20	884	0,814	0,0173	15,27	0,07	0,24	15,51	103,4
A5	25	880	0,830	0,0176	15,51	0,07	0,31	15,82	105,4
A6	30	876	0,811	0,0172	15,08	0,07	0,38	15,45	103,0
A7	45	872	0,885	0,0188	16,41	0,08	0,45	16,86	112,4
A8	60	868	0,864	0,0184	15,94	0,07	0,52	16,46	109,8

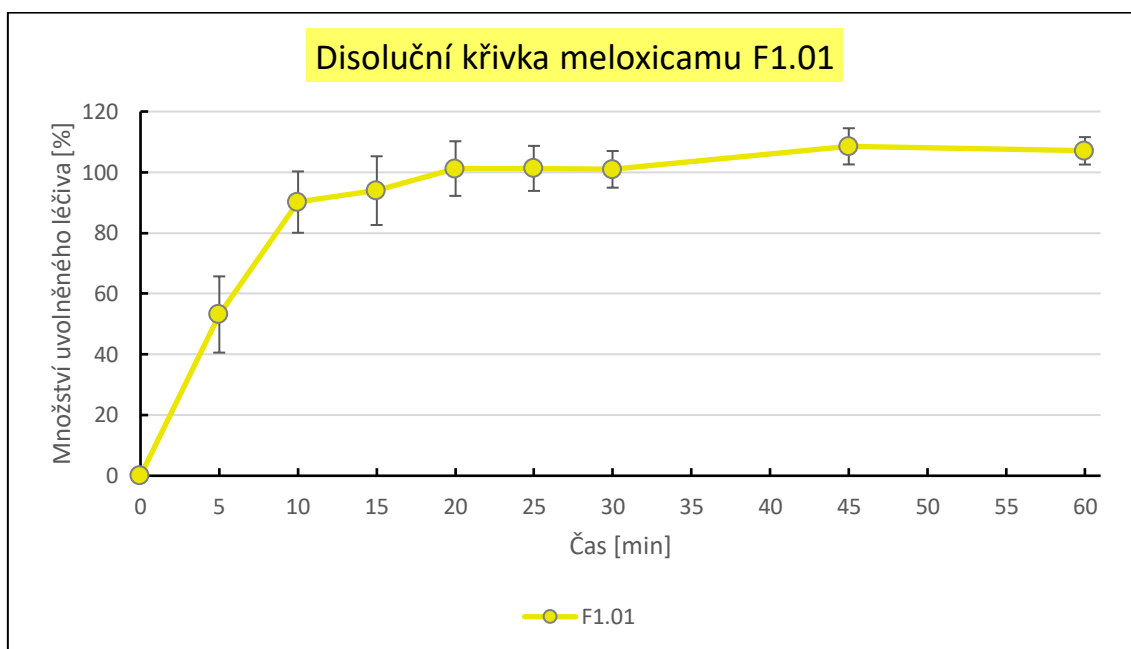
B1	5	896	0,440	0,0091	8,20	0,04	0,04	8,23	54,9
B2	10	892	0,631	0,0133	11,86	0,05	0,09	11,95	79,7
B3	15	888	0,620	0,0131	11,60	0,05	0,14	11,74	78,3
B4	20	884	0,696	0,0147	13,01	0,06	0,20	13,21	88,0
B5	25	880	0,718	0,0152	13,37	0,06	0,26	13,63	90,9
B6	30	876	0,730	0,0155	13,54	0,06	0,32	13,86	92,4
B7	45	872	0,790	0,0168	14,61	0,07	0,39	15,00	100,0
B8	60	868	0,796	0,0169	14,66	0,07	0,46	15,11	100,8

C1	5	896	0,387	0,0080	7,17	0,03	0,03	7,20	48,0
C2	10	892	0,817	0,0173	15,47	0,07	0,10	15,57	103,8
C3	15	888	0,827	0,0176	15,59	0,07	0,17	15,76	105,1
C4	20	884	0,851	0,0181	15,98	0,07	0,24	16,23	108,2
C5	25	880	0,846	0,0180	15,82	0,07	0,32	16,13	107,5
C6	30	876	0,838	0,0178	15,59	0,07	0,39	15,98	106,5
C7	45	872	0,888	0,0189	16,47	0,08	0,46	16,93	112,9
C8	60	868	0,872	0,0185	16,09	0,07	0,54	16,63	110,8

D1	5	896	0,326	0,0067	5,98	0,03	0,03	6,00	40,0
D2	10	892	0,713	0,0151	13,45	0,06	0,09	13,54	90,3
D3	15	888	0,770	0,0163	14,49	0,07	0,15	14,64	97,6
D4	20	884	0,829	0,0176	15,56	0,07	0,22	15,78	105,2
D5	25	880	0,798	0,0169	14,90	0,07	0,29	15,19	101,3
D6	30	876	0,803	0,0170	14,92	0,07	0,36	15,28	101,9
D7	45	872	0,858	0,0182	15,90	0,07	0,43	16,33	108,9
D8	60	868	0,842	0,0179	15,52	0,07	0,50	16,03	106,8

Tabulka 12: Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a v procentech, směrodatná odchylka formulace F1.01

F1.01	čas [min]	c' [mg/ml]	m _{celk.} [mg]	m [%]	SD
	0			0,0	
1	5	0,0089	7,97	53,1	12,6
2	10	0,0151	13,52	90,2	10,1
3	15	0,0157	14,09	93,9	11,3
4	20	0,0169	15,18	101,2	9,0
5	25	0,0169	15,19	101,3	7,4
6	30	0,0169	15,14	101,0	6,0
7	45	0,0182	16,28	108,5	6,0
8	60	0,0179	16,06	107,1	4,5



Obrázek 23: Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F1.01

Tobolky formulace F1 byly plněné směsí meloxicamu s pomocnou látkou chitosanem v poměru 1:8 (MX-CH). Tato směs byla připravena mísením. Naměřené a vypočítané hodnoty (Tabulka 11, 12, Obrázek 23) ukazují, že na konci disoluce došlo k úplnému uvolnění meloxicamu z tobolek. Dále je viditelné, že uvolňování léčiva začalo ihned po vložení do disolučního média. Při prvním odběru (po 5 minutách) bylo naměřeno průměrně přes 50 % uvolněného léčiva. 100 % bylo poté naměřeno již při čtvrtém odběru, tedy po 20 minutách.

6.1.3.3 Formulace F2

6.1.3.3.1 První test disoluce

Tabulka 13: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F2.01

F2.01	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,038	0,0004	0,37	0,00	0,00	0,37	2,5
A2	10	892	0,465	0,0097	8,65	0,04	0,04	8,69	57,9
A3	15	888	0,702	0,0148	13,18	0,06	0,10	13,28	88,5
A4	20	884	0,810	0,0172	15,20	0,07	0,17	15,36	102,4
A5	25	880	0,822	0,0175	15,36	0,07	0,24	15,59	104,0
A6	30	876	0,836	0,0178	15,55	0,07	0,31	15,86	105,7
A7	45	872	0,871	0,0185	16,15	0,07	0,38	16,53	110,2
A8	60	868	0,913	0,0194	16,86	0,08	0,46	17,32	115,5

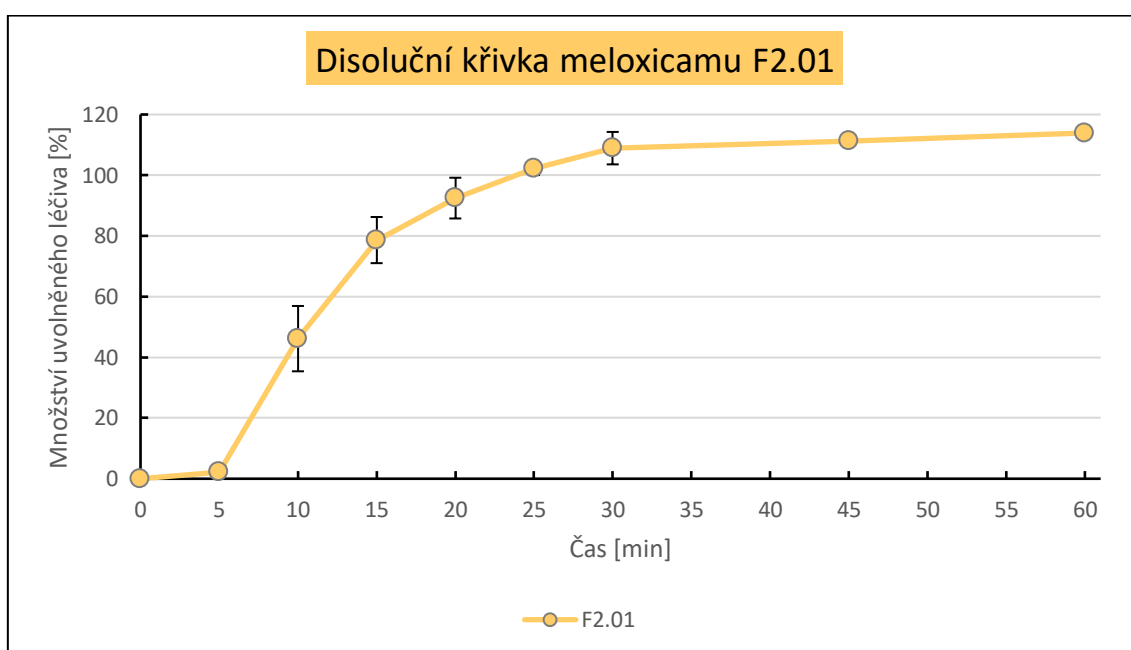
B1	5	896	0,013	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B2	10	892	0,265	0,0053	4,77	0,02	0,02	4,79	31,9
B3	15	888	0,572	0,0120	10,67	0,05	0,07	10,74	71,6
B4	20	884	0,700	0,0148	13,08	0,06	0,13	13,21	88,1
B5	25	880	0,786	0,0167	14,67	0,07	0,20	14,86	99,1
B6	30	876	0,837	0,0178	15,57	0,07	0,27	15,84	105,6
B7	45	872	0,886	0,0188	16,43	0,08	0,34	16,77	111,8
B8	60	868	0,896	0,0191	16,54	0,08	0,42	16,96	113,1

C1	5	896	0,045	0,0006	0,51	0,00	0,00	0,51	3,4
C2	10	892	0,373	0,0077	6,86	0,03	0,03	6,90	46,0
C3	15	888	0,589	0,0124	11,00	0,05	0,08	11,08	73,9
C4	20	884	0,717	0,0152	13,41	0,06	0,14	13,55	90,3
C5	25	880	0,813	0,0173	15,18	0,07	0,21	15,40	102,6
C6	30	876	0,851	0,0181	15,84	0,07	0,28	16,12	107,5
C7	45	872	0,896	0,0191	16,62	0,08	0,36	16,98	113,2
C8	60	868	0,895	0,0190	16,52	0,08	0,44	16,96	113,1

D1	5	896	0,042	0,0005	0,45	0,00	0,00	0,45	3,0
D2	10	892	0,395	0,0082	7,29	0,03	0,03	7,32	48,8
D3	15	888	0,640	0,0135	11,98	0,05	0,09	12,07	80,5
D4	20	884	0,706	0,0149	13,20	0,06	0,15	13,35	89,0
D5	25	880	0,816	0,0173	15,24	0,07	0,22	15,46	103,1
D6	30	876	0,924	0,0197	17,23	0,08	0,30	17,52	116,8
D7	45	872	0,868	0,0185	16,09	0,07	0,37	16,46	109,7
D8	60	868	0,902	0,0192	16,66	0,08	0,45	17,10	114,0

Tabulka 14: Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a v procentech, směrodatná odchylka formulace F2.01

F2.01	čas [min]	c' [mg/ml]	m _{celk.} [mg]	m [%] průměr	SD
	0			0,0	
1	5	0,0004	0,33	2,2	1,5
2	10	0,0077	6,92	46,2	10,8
3	15	0,0132	11,79	78,6	7,6
4	20	0,0155	13,87	92,5	6,7
5	25	0,0172	15,33	102,2	2,1
6	30	0,0183	16,34	108,9	5,3
7	45	0,0187	16,68	111,2	1,6
8	60	0,0192	17,09	113,9	1,1



Obrázek 24: Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F2.01

Tobolky F2 také obsahovaly směs s chitosanem (MX-CH 1:8), který i zde pomohl ke kompletnímu uvolnění meloxicamu z lékové formy. 100 % množství léčiva bylo naměřeno po 25 minutách testování. Oproti F1 se tato formulace liší způsobem přípravy směsi, která byla zhotovena mletím po dobu 5 minut. Dle Tabulky 13, 14 a Obrázku 24 je zřejmá prodleva začátku uvolňování prvních pět minut (uvolnilo se průměrně pouze 2,2 %).

6.1.3.4 Formulace F3

6.1.3.4.1 První test disoluce F3

Tabulka 15: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F3.01

F3.01	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,010	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A2	10	892	0,236	0,0047	4,21	0,02	0,02	4,23	28,2
A3	15	888	0,363	0,0075	6,64	0,03	0,05	6,69	44,6
A4	20	884	0,494	0,0103	9,13	0,04	0,09	9,22	61,4
A5	25	880	0,599	0,0126	11,09	0,05	0,14	11,23	74,9
A6	30	876	0,688	0,0145	12,74	0,06	0,20	12,93	86,2
A7	45	872	0,850	0,0181	15,75	0,07	0,27	16,02	106,8
A8	60	868	0,910	0,0194	16,81	0,08	0,35	17,16	114,4

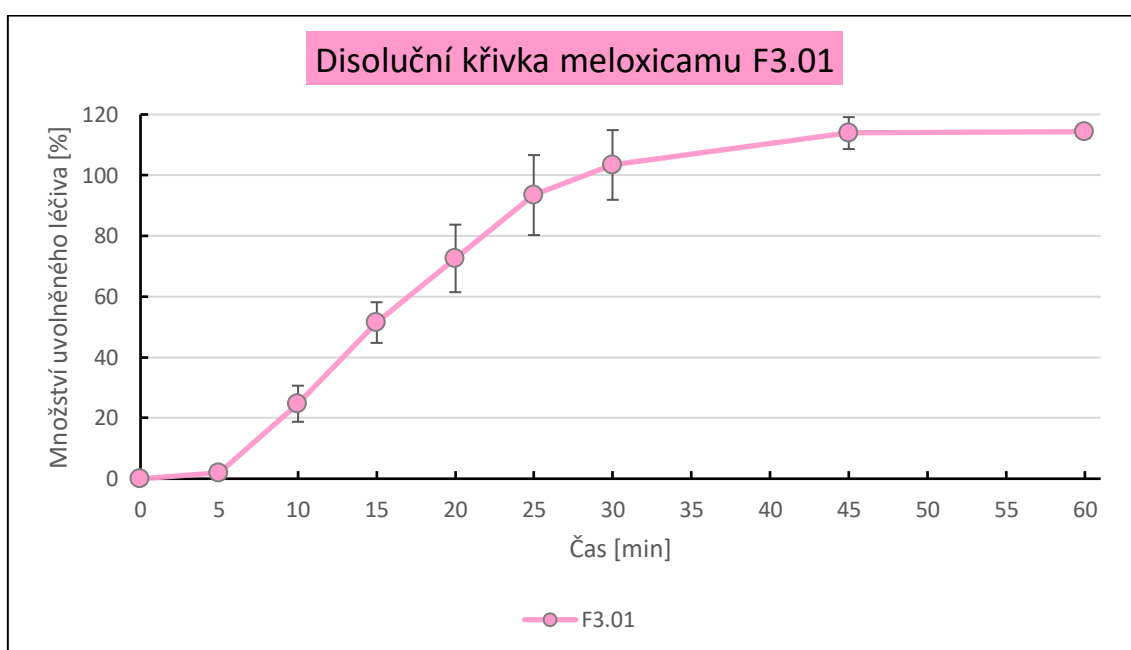
B1	5	896	0,025	0,0001	0,12	0,00	0,00	0,12	0,8
B2	10	892	0,185	0,0036	3,22	0,01	0,01	3,23	21,6
B3	15	888	0,430	0,0089	7,93	0,04	0,05	7,98	53,2
B4	20	884	0,623	0,0131	11,60	0,05	0,10	11,71	78,0
B5	25	880	0,743	0,0157	13,85	0,06	0,17	14,01	93,4
B6	30	876	0,855	0,0182	15,91	0,07	0,24	16,15	107,7
B7	45	872	0,948	0,0202	17,60	0,08	0,32	17,92	119,5
B8	60	868	0,930	0,0198	17,18	0,08	0,40	17,58	117,2

C1	5	896	0,043	0,0005	0,47	0,00	0,00	0,47	3,1
C2	10	892	0,158	0,0030	2,69	0,01	0,01	2,71	18,1
C3	15	888	0,390	0,0081	7,16	0,03	0,05	7,21	48,0
C4	20	884	0,525	0,0110	9,72	0,04	0,09	9,81	65,4
C5	25	880	0,825	0,0175	15,41	0,07	0,16	15,57	103,8
C6	30	876	0,877	0,0186	16,33	0,07	0,24	16,57	110,5
C7	45	872	0,910	0,0194	16,88	0,08	0,31	17,20	114,6
C8	60	868	0,893	0,0190	16,49	0,08	0,39	16,87	112,5

D1	5	896	0,048	0,0006	0,56	0,00	0,00	0,57	3,8
D2	10	892	0,258	0,0052	4,63	0,02	0,02	4,66	31,0
D3	15	888	0,482	0,0101	8,93	0,04	0,06	9,00	60,0
D4	20	884	0,680	0,0144	12,70	0,06	0,12	12,82	85,5
D5	25	880	0,807	0,0171	15,07	0,07	0,19	15,26	101,7
D6	30	876	0,865	0,0184	16,11	0,07	0,26	16,37	109,1
D7	45	872	0,908	0,0193	16,85	0,08	0,34	17,19	114,6
D8	60	868	0,898	0,0191	16,58	0,08	0,42	17,00	113,3

Tabulka 16: Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a procentech, směrodatná odchylka formulace F3.01

F3.01	čas [min]	c' [mg/ml]	m _{celk.} [mg]	m [%] průměr	SD
	0			0,0	
1	5	0,0003	0,29	1,9	1,8
2	10	0,0041	3,71	24,7	6,0
3	15	0,0086	7,72	51,5	6,7
4	20	0,0122	10,89	72,6	11,1
5	25	0,0157	14,02	93,5	13,2
6	30	0,0174	15,51	103,4	11,5
7	45	0,0192	17,08	113,9	5,3
8	60,0	0,0193	17,15	114,4	2,1



Obrázek 25: Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F3.01

Formulace F3 obsahovala opět zmiňovanou směs MX-CH (1:8). Zde se také uvolnilo veškeré množství meloxicamu do konce disolučního testu. První 100 % hodnoty byly naměřeny průměrně po 30 minutách testování. Směs byla připravena shodně se směsí formulace F2 pouze s tím rozdílem, že byla mletá déle (30 minut). Dle výsledků (Tabulka 15, 16, Obrázek 25) je patrné pomalejší a také rovnoměrnější uvolňování oproti formulaci F2. Vzniklá disoluční křivka je mezi 5 a 30 minutami mnohem přímější v porovnání se stejnou částí na Obrázku 24. Pětiminutové zpoždění uvolňování léčiva je zachováno (po prvním odběru bylo naměřeno průměrně pouhých 1,9 % uvolněného léčiva).

6.1.3.5 Kontrolní měření

Jelikož jsou výsledky kontrolního měření velmi podobné prvnímu testování, nebudou zde již uvedeny tabulky průměrných výsledků a grafy. Veškeré disoluční křivky druhého měření lze vidět v porovnání křivek (Obrázek 28).

Tabulka 17: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F4.02 (druhý disoluční test)

F4.02	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,008	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A2	10	892	0,019	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A3	15	888	0,030	0,0002	0,21	0,00	0,00	0,21	1,4
A4	20	884	0,045	0,0006	0,50	0,00	0,00	0,50	3,4
A5	25	880	0,072	0,0012	1,01	0,00	0,01	1,02	6,8
A6	30	876	0,085	0,0014	1,26	0,01	0,01	1,27	8,5
A7	45	872	0,137	0,0026	2,24	0,01	0,02	2,26	15,1
A8	60	868	0,149	0,0028	2,45	0,01	0,04	2,49	16,6

B1	5	896	0,004	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B2	10	892	0,011	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B3	15	888	0,016	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B4	20	884	0,027	0,0002	0,15	0,00	0,00	0,15	1,0
B5	25	880	0,064	0,0010	0,86	0,00	0,00	0,87	5,8
B6	30	876	0,086	0,0015	1,28	0,01	0,01	1,29	8,6
B7	45	872	0,119	0,0022	1,89	0,01	0,02	1,91	12,8
B8	60	868	0,167	0,0032	2,79	0,01	0,03	2,82	18,8

C1	5	896	0,005	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
C2	10	892	0,024	0,0001	0,10	0,00	0,00	0,10	0,6
C3	15	888	0,050	0,0007	0,60	0,00	0,00	0,60	4,0
C4	20	884	0,069	0,0011	0,96	0,00	0,01	0,97	6,5
C5	25	880	0,090	0,0015	1,36	0,01	0,01	1,37	9,1
C6	30	876	0,106	0,0019	1,66	0,01	0,02	1,68	11,2
C7	45	872	0,147	0,0028	2,43	0,01	0,03	2,46	16,4
C8	60	868	0,177	0,0034	2,98	0,01	0,05	3,03	20,2

D1	5	896	0,004	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D2	10	892	0,010	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D3	15	888	0,016	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D4	20	884	0,032	0,0003	0,25	0,00	0,00	0,25	1,7
D5	25	880	0,053	0,0007	0,65	0,00	0,00	0,65	4,4
D6	30	876	0,051	0,0007	0,61	0,00	0,01	0,62	4,1
D7	45	872	0,076	0,0012	1,08	0,00	0,01	1,09	7,3
D8	60	868	0,098	0,0017	1,49	0,01	0,02	1,51	10,1



Obrázek 26: Nerozpuštěné léčivo meloxicamu na konci druhého testu disoluce

Na Obrázcích 26 lze opět vidět části nerozpuštěného léčiva, které byly zpozorovány i po druhém testu disoluce formulace F4. Samotný meloxicam má také špatnou smáčivost, proto nerozpuštěné léčivo plavalo na hladině.

Tabulka 18: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F1.02 (druhý disoluční test)

F1.02	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,518	0,0108	9,72	0,04	0,04	9,76	65,1
A2	10	892	0,737	0,0156	13,92	0,06	0,11	14,02	93,5
A3	15	888	0,773	0,0164	14,55	0,07	0,17	14,72	98,1
A4	20	884	0,812	0,0172	15,23	0,07	0,24	15,47	103,2
A5	25	880	0,829	0,0176	15,49	0,07	0,31	15,80	105,3
A6	30	876	0,832	0,0177	15,48	0,07	0,38	15,86	105,7
A7	45	872	0,852	0,0181	15,79	0,07	0,45	16,24	108,3
A8	60	868	0,865	0,0184	15,96	0,07	0,53	16,49	109,9

B1	5	896	0,317	0,0065	5,80	0,03	0,03	5,83	38,9
B2	10	892	0,709	0,0150	13,38	0,06	0,09	13,46	89,7
B3	15	888	0,751	0,0159	14,13	0,06	0,15	14,28	95,2
B4	20	884	0,764	0,0162	14,31	0,06	0,21	14,53	96,8
B5	25	880	0,819	0,0174	15,30	0,07	0,28	15,58	103,9
B6	30	876	0,826	0,0175	15,36	0,07	0,35	15,72	104,8
B7	45	872	0,856	0,0182	15,86	0,07	0,43	16,29	108,6
B8	60	868	0,869	0,0185	16,03	0,07	0,50	16,53	110,2

C1	5	896	0,287	0,0058	5,22	0,02	0,02	5,24	34,9
C2	10	892	0,479	0,0100	8,92	0,04	0,06	8,98	59,9
C3	15	888	0,760	0,0161	14,30	0,06	0,13	14,43	96,2
C4	20	884	0,794	0,0168	14,89	0,07	0,20	15,08	100,6
C5	25	880	0,805	0,0171	15,03	0,07	0,26	15,29	102,0
C6	30	876	0,816	0,0173	15,17	0,07	0,33	15,51	103,4
C7	45	872	0,847	0,0180	15,69	0,07	0,40	16,10	107,3
C8	60	868	0,859	0,0183	15,84	0,07	0,48	16,32	108,8

D1	5	896	0,406	0,0084	7,54	0,03	0,03	7,57	50,5
D2	10	892	0,715	0,0151	13,49	0,06	0,09	13,59	90,6
D3	15	888	0,766	0,0162	14,42	0,06	0,16	14,57	97,2
D4	20	884	0,767	0,0163	14,37	0,07	0,22	14,59	97,3
D5	25	880	0,774	0,0164	14,44	0,07	0,29	14,73	98,2
D6	30	876	0,789	0,0167	14,66	0,07	0,36	15,02	100,1
D7	45	872	0,820	0,0174	15,18	0,07	0,43	15,61	104,0
D8	60	868	0,835	0,0177	15,39	0,07	0,50	15,89	105,9

Tabulka 19: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F2.02 (druhý disoluční test)

F2.02	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{celk.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,035	0,0003	0,31	0,00	0,00	0,31	2,1
A2	10	892	0,450	0,0094	8,35	0,04	0,04	8,39	56,0
A3	15	888	0,678	0,0143	12,72	0,06	0,10	12,81	85,4
A4	20	884	0,755	0,0160	14,14	0,06	0,16	14,30	95,3
A5	25	880	0,818	0,0174	15,28	0,07	0,23	15,51	103,4
A6	30	876	0,827	0,0176	15,38	0,07	0,30	15,68	104,5
A7	45	872	0,874	0,0186	16,20	0,07	0,37	16,58	110,5
A8	60	868	0,867	0,0184	16,00	0,07	0,45	16,44	109,6

B1	5	896	0,038	0,0004	0,37	0,00	0,00	0,37	2,5
B2	10	892	0,381	0,0079	7,02	0,03	0,03	7,05	47,0
B3	15	888	0,621	0,0131	11,62	0,05	0,09	11,70	78,0
B4	20	884	0,780	0,0165	14,62	0,07	0,15	14,77	98,5
B5	25	880	0,841	0,0179	15,72	0,07	0,22	15,94	106,3
B6	30	876	0,863	0,0183	16,07	0,07	0,30	16,36	109,1
B7	45	872	0,881	0,0187	16,33	0,07	0,37	16,71	111,4
B8	60	868	0,885	0,0188	16,34	0,08	0,45	16,78	111,9

C1	5	896	0,014	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
C2	10	892	0,242	0,0048	4,32	0,02	0,02	4,34	28,9
C3	15	888	0,524	0,0110	9,75	0,04	0,06	9,81	65,4
C4	20	884	0,742	0,0157	13,89	0,06	0,13	14,02	93,4
C5	25	880	0,819	0,0174	15,30	0,07	0,20	15,49	103,3
C6	30	876	0,873	0,0186	16,26	0,07	0,27	16,53	110,2
C7	45	872	0,885	0,0188	16,41	0,08	0,35	16,76	111,7
C8	60	868	0,888	0,0189	16,39	0,08	0,42	16,81	112,1

D1	5	896	0,010	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D2	10	892	0,315	0,0064	5,74	0,03	0,03	5,76	38,4
D3	15	888	0,604	0,0127	11,29	0,05	0,08	11,37	75,8
D4	20	884	0,735	0,0156	13,75	0,06	0,14	13,89	92,6
D5	25	880	0,785	0,0166	14,65	0,07	0,21	14,85	99,0
D6	30	876	0,838	0,0178	15,59	0,07	0,28	15,87	105,8
D7	45	872	0,861	0,0183	15,96	0,07	0,35	16,31	108,7
D8	60	868	0,869	0,0185	16,03	0,07	0,42	16,46	109,7

Tabulka 20: Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F3.02 (druhý disoluční test)

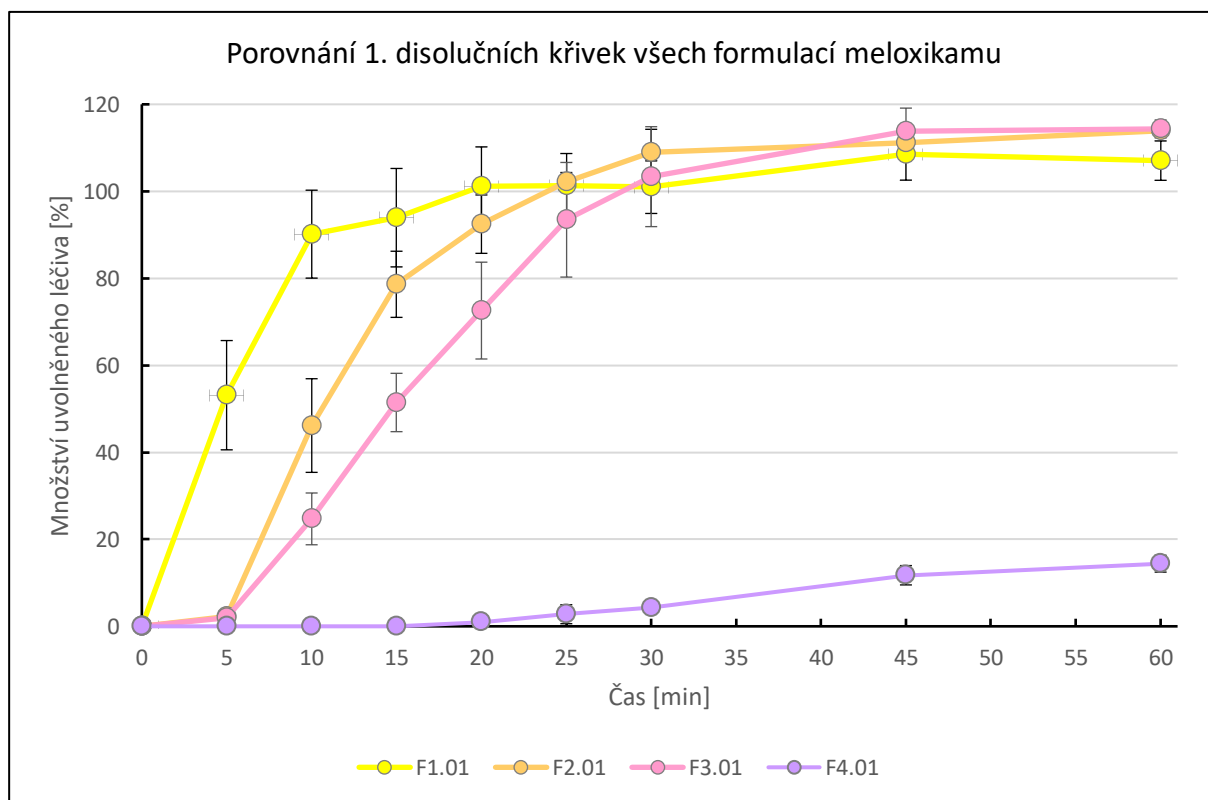
F3.02	t [min]	V _{nádoba} [ml]	A	c' [mg/ml]	m _{nádoba} [mg]	m _{vzorek} [mg]	m _{vzorek.celk.} [mg]	m _{korr.} [mg]	m [%]
	0	900							
A1	5	896	0,004	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
A2	10	892	0,163	0,0031	2,79	0,01	0,01	2,80	18,7
A3	15	888	0,373	0,0077	6,83	0,03	0,04	6,87	45,8
A4	20	884	0,509	0,0106	9,41	0,04	0,09	9,50	63,3
A5	25	880	0,626	0,0132	11,61	0,05	0,14	11,75	78,3
A6	30	876	0,701	0,0148	12,98	0,06	0,20	13,18	87,9
A7	45	872	0,862	0,0183	15,97	0,07	0,27	16,25	108,3
A8	60	868	0,895	0,0190	16,52	0,08	0,35	16,87	112,5

B1	5	896	0,017	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
B2	10	892	0,182	0,0035	3,16	0,01	0,01	3,17	21,2
B3	15	888	0,377	0,0078	6,91	0,03	0,05	6,95	46,4
B4	20	884	0,521	0,0109	9,64	0,04	0,09	9,73	64,9
B5	25	880	0,626	0,0132	11,61	0,05	0,14	11,75	78,3
B6	30	876	0,706	0,0149	13,08	0,06	0,20	13,28	88,5
B7	45	872	0,857	0,0182	15,88	0,07	0,27	16,15	107,7
B8	60	868	0,919	0,0196	16,98	0,08	0,35	17,33	115,5

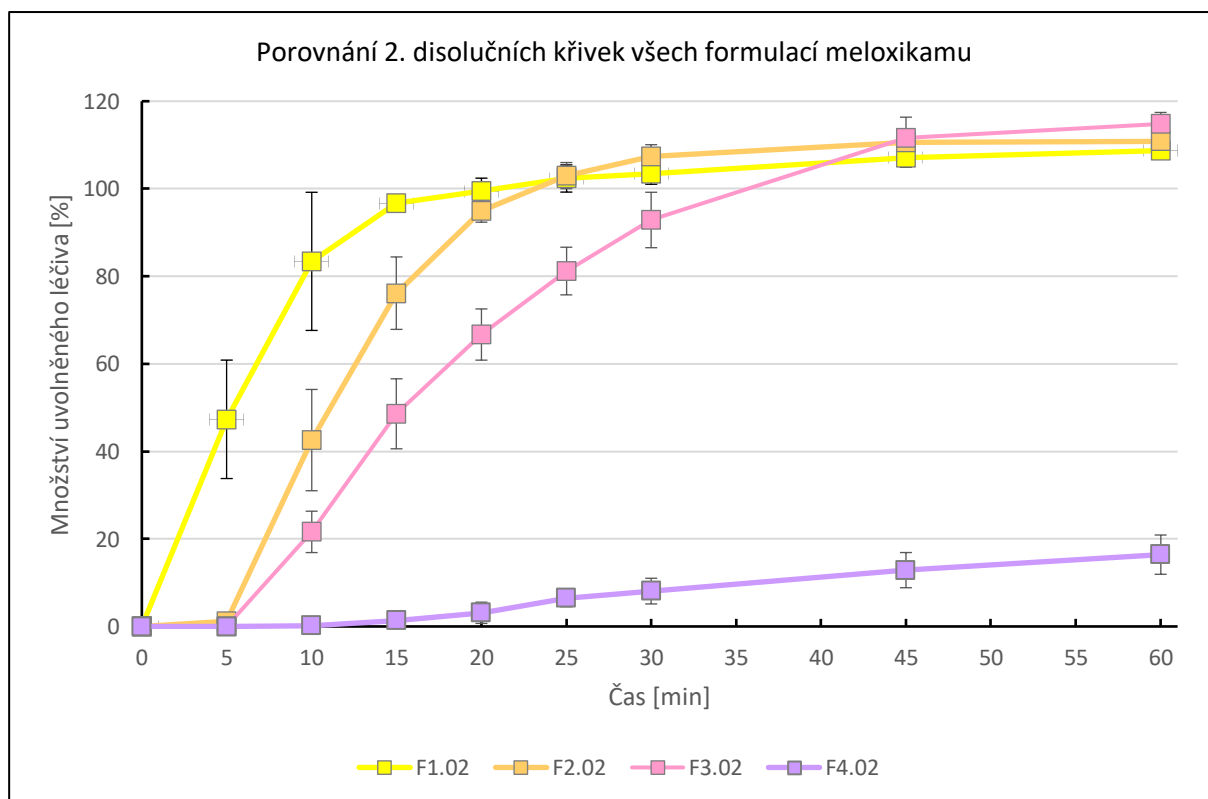
C1	5	896	0,008	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
C2	10	892	0,159	0,0030	2,71	0,01	0,01	2,73	18,2
C3	15	888	0,343	0,0070	6,25	0,03	0,04	6,29	42,0
C4	20	884	0,508	0,0106	9,39	0,04	0,08	9,48	63,2
C5	25	880	0,630	0,0133	11,68	0,05	0,14	11,82	78,8
C6	30	876	0,745	0,0158	13,82	0,06	0,20	14,02	93,5
C7	45	872	0,938	0,0200	17,41	0,08	0,28	17,69	118,0
C8	60	868	0,940	0,0200	17,37	0,08	0,36	17,73	118,2

D1	5	896	0,017	0,0000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
D2	10	892	0,238	0,0048	4,25	0,02	0,02	4,26	28,4
D3	15	888	0,484	0,0101	8,97	0,04	0,06	9,03	60,2
D4	20	884	0,602	0,0127	11,20	0,05	0,11	11,31	75,4
D5	25	880	0,711	0,0150	13,23	0,06	0,17	13,40	89,4
D6	30	876	0,807	0,0171	15,00	0,07	0,24	15,24	101,6
D7	45	872	0,893	0,0190	16,56	0,08	0,31	16,88	112,5
D8	60	868	0,897	0,0191	16,56	0,08	0,39	16,95	113,0

6.1.3.6 Porovnání disolučních křivek



Obrázek 27: Porovnání disolučních křivek meloxicamu po prvním měření



Obrázek 28: Porovnání disolučních křivek meloxicamu po druhém měření

6.1.4 Diskuze shrnutí

Cílem této práce bylo zjistit vliv pomocné látky chitosanu a způsobu přípravy směsi na disoluci meloxicamu, který je ve vodném prostředí velmi těžce rozpustný. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách a grafech v předchozí části.

6.1.4.1 Vliv pomocné látky chitosanu

Tobolky F1, F2 a F3 obsahovaly pomocnou látku chitosan. Jedná se o polysacharid se strukturou lineárního kopolymeru N-glykosaminu a N-acetylglukosaminu. Pro zjištění vlivu této látky na disoluci byly připraveny tobolky F4, které obsahovaly pouze samotné léčivo. Na Obrázcích 27 a 28 lze vidět porovnání disolučních křivek všech formulací meloxicamu. Dle těchto grafů lze jednoznačně tvrdit, že přidáním chitosanu do tobolek se docílilo mnohem lepšího a rychlejšího rozpouštění. Na konci testování samotného léčiva F4 nebylo naměřeno ani 20 % uvolněného množství léčivé látky, zatímco ostatní formulace se rozpustily úplně. Konkrétně se při prvním pokusu disoluce z tobolek F4 uvolnilo pouze 14,4 % léčiva, přičemž první naměřené hodnoty byly až po 20 minutách testování. U druhého pokusu se uvolnilo celkem 16,4 % a první hodnoty (velmi nízké) byly změřeny průměrně po 10 minutách testování.

6.1.4.2 Vliv způsobu přípravy směsi

Tobolky F1 až F3 se liší způsobem přípravy. Formulace F1 byla připravena mísením v přístroji Turbula, formulace F2 a F3 mletím prostřednictvím planetárního kulového mlýna. Tobolky F2 a F3 se lišily dobou mletí, která činila 5 minut u formulace F2 a 30 minut u formulace F3.

Dle tabulek a grafů je viditelné, že z tobolek F1, připravených mísením, se začíná léčivo uvolňovat rovnoměrně ihned po vložení do disolučního média a po prvních 5 minutách je uvolněno téměř 50 %, zatímco u tobolek F2 a F3, připravených mletím, se léčivo prvních 5 minut uvolňuje velmi pomalu (největší naměřená hodnota po 5 minutách veškerého testování formulací F2 a F3 byla 2,2 %). Lze také tvrdit, že ze zmiňovaných tří formulací se ze směsi F1 (mísená) uvolňuje léčivo nejrychleji a ze směsi F3 (mletá 30 minut) nejpomaleji. Dokladem toho je, že u formulace F1 se naměřilo 100 % uvolněného léčiva průměrně již po 20 minutách při prvním a po 25 minutách při druhém testování. Formulace F2 těchto hodnot dosáhla po 25 minutách v obou případech a formulace F3 po 30 a 45 minutách.

6.2 Vývoj metody UHPLC

Dalším cílem experimentální práce bylo najít vhodné podmínky pro stanovení léčiva meloxicamu metodou UHPLC. Čerpalo se z nalezených vědeckých článků [44 až 50, 56], které se touto problematikou zabírají a jsou uvedeny v kapitole 4.5.2 (Rešerše prací – (U)HPLC). Dalším zdrojem byl Český lékopis 2017.

Ve vyvinuté metodě se dále zkoušelo stanovení nečistoty meloxicamu. Jedná se o 5-methylthiatol-2-amin, dle Českého lékopisu nečistota B. Zkoumalo se také stanovení množství uvolněného léčiva z odebíraných vzorků během disoluce. Metoda však při tomto stanovení neposkytovala správné výsledky a je proto potřeba další výzkum.

6.2.1 Analytická kolona

Jako nejvhodnější byla vybrána kolona LiChrospher® 5 µm RP-18 100 Å (125X4mm), Phenomenex, USA. Tato volba vyplývala ze zmiňovaných článků v kapitole 4.5.2.

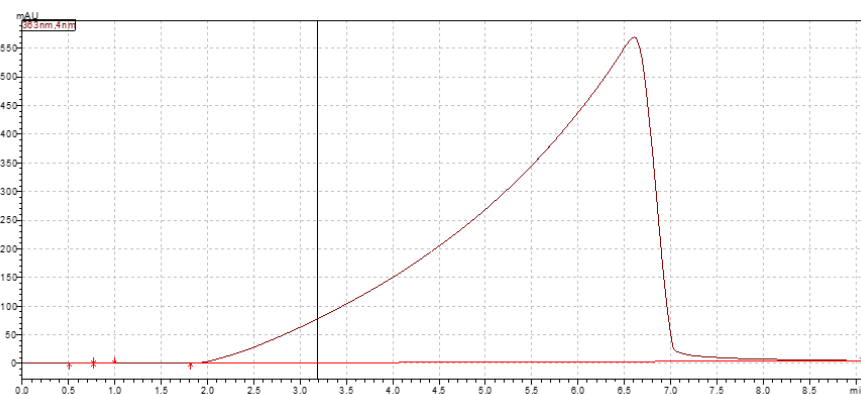
6.2.2 Vlnová délka

Při detekci se zkoumalo několik vlnových délek. Výběr vycházel z Českého lékopisu, kde jsou uvedeny hodnoty 260 a 350 nm. Dále z odborných článků, ve kterých bylo rozmezí nanometrů poměrně široké, avšak nejčastěji se opakovala hodnota 360 nm. Hlavní slovo však nakonec mělo experimentálně proměřené absorpční spektrum meloxicamu, které poskytla k nahlédnutí Katedra farmaceutické technologie. Dle jejich experimentálního stanovení se ukázala dvě maxima při vlnových délkách 270 a 363 nm. Jelikož i měření absorbance odebraných vzorků z disoluce probíhalo při 363 nm, byla zvolena stejná vlnová délka detekce i zde.

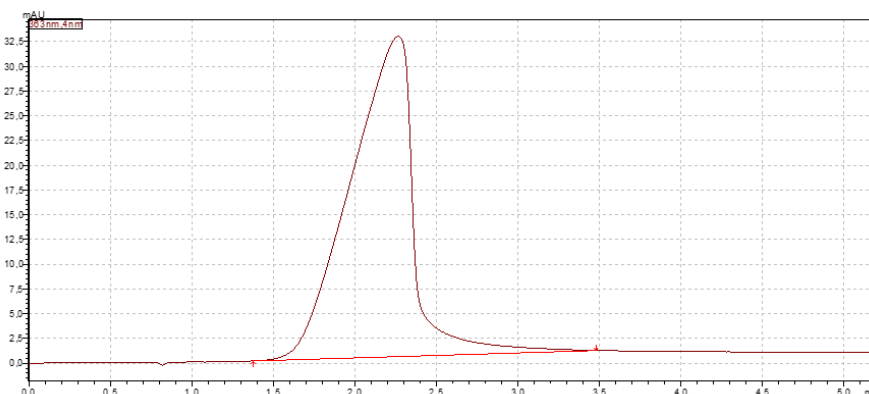
6.2.3 Mobilní fáze

Vědecké články zabývající se stanovením meloxicamu metodou HPLC a Český lékopis 2017 poskytly užitečné informace při hledání vhodné mobilní fáze, průtokové rychlosti a teploty.

Jak je uvedeno v kapitole 5.4 Příprava roztoků, první mobilní fází (MF) byla voda a methanol nejprve v poměru 50:50 při průtoku 1 ml/min, teplotě 25 °C a nástřiku 10 µl (Obrázek 29). Poté byly testovány různé objemy nástřiků (viz kapitola „Nástřik standardu“). V dalším kroku došlo k zvýšení poměru vody vůči methanolu na 60:40 při nástřiku 2 µl desetinásobně zředěného roztoku standardu. Následovalo zvýšení průtoku z 1 na 1,2 ml/min a poté na 1,4 ml/min (Obrázek 30). Tato MF se však přesto ukázala jako nevhodná pro stanovení léčiva meloxicamu.

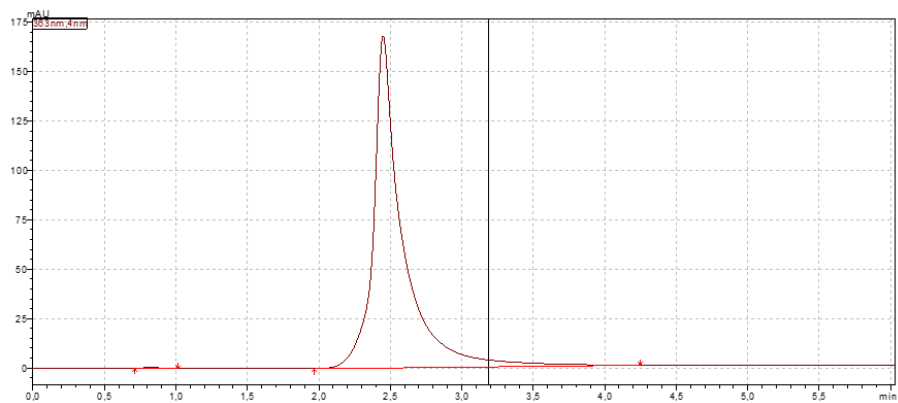


Obrázek 29: Voda:methanol 50:50, průtok 1 ml/min, nástřik 10 μ l, 25 $^{\circ}$ C

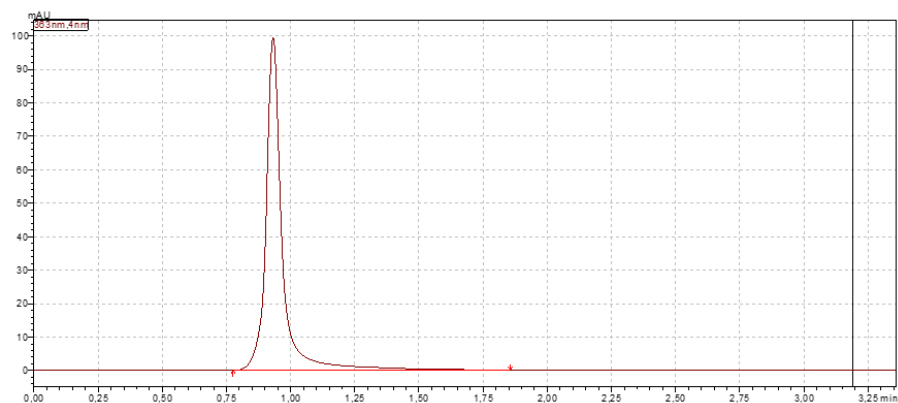


Obrázek 30: Voda:methanol 60:40, průtok 1,4 ml/min, nástřik 2 μ l 10x zředěného roztoku standardu, 25 $^{\circ}$ C

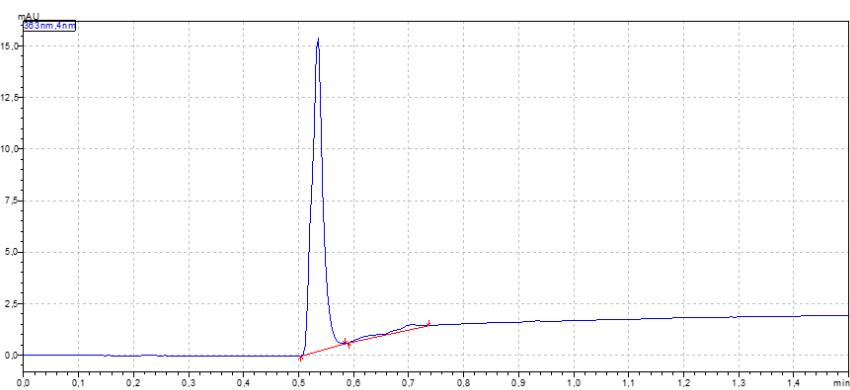
Druhou testovanou MF byla 1 % octová kyselina společně s acetonitrilem. Zkoušení započalo opět poměrem 50:50. Teplota 25 $^{\circ}$ C a průtok 1,4 ml/min zůstali shodné s posledním pokusem (Obrázek 31). Nástřik se změnil z počátečních 5 μ l desetkrát zředěného roztoku standardu na 2 μ l a poté na 1 μ l, což se ukázalo jako nejvhodnější. Další změnou bylo zvýšení průtoku na 1,5 ml/min. Poté se postupilo k úpravám poměrů 1 % octové kyseliny s acetonitrilem na 60:40, což nevykazovalo lepší výsledky, proto se přikročilo k opačnému směru, tedy k poměru 40:60, dále 30:70, následovalo 25:75 a nakonec byl vybrán poměr 20:80 (Obrázek 32). Tato metoda se jevila jako vhodná k detekci léčiva meloxicamu. Nebyla však ideální pro stanovení odebraných vzorků z disoluce, jelikož po několika pokusech došlo k zjištění, že nástřik samotného pufu a odebraného vzorku z disoluce vyobrazoval naprosto shodné chromatogramy (Obrázek 33, 34). Nebylo tudíž možné stanovit množství uvolněného léčiva. Proto po nahlédnutí do vědeckého článku zabývajícího se stanovením vzorků získaných disolucí meloxicamu metodou HPLC ^[56] přišla na řadu mobilní fáze číslo tři.



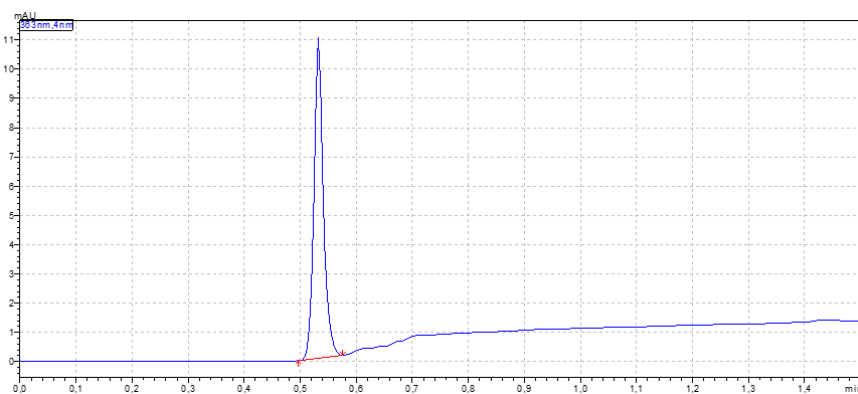
Obrázek 31: 1% kyselina octová:acetonitril 50:50, průtok 1,4 ml/min, nástřik 5 μ l 10x zř. roztoku, 25 °C



Obrázek 32: 1% kyselina octová:acetonitril 20:80, průtok 1,5 ml/min, nástřik 1 μ l 10x zř. roztoku, 25 °C

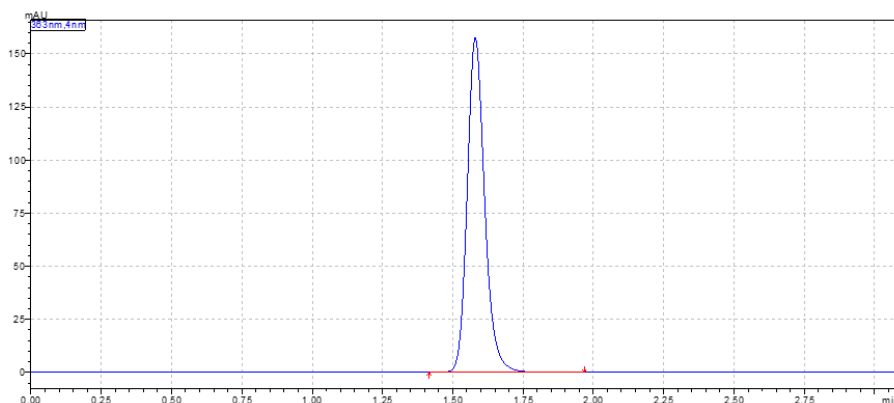


Obrázek 33: Chromatogram samotného pufru (1% kyselina octová:acetonitril 20:80, průtok 1,5 ml/min, nástřik 20 μ l, 25 °C)

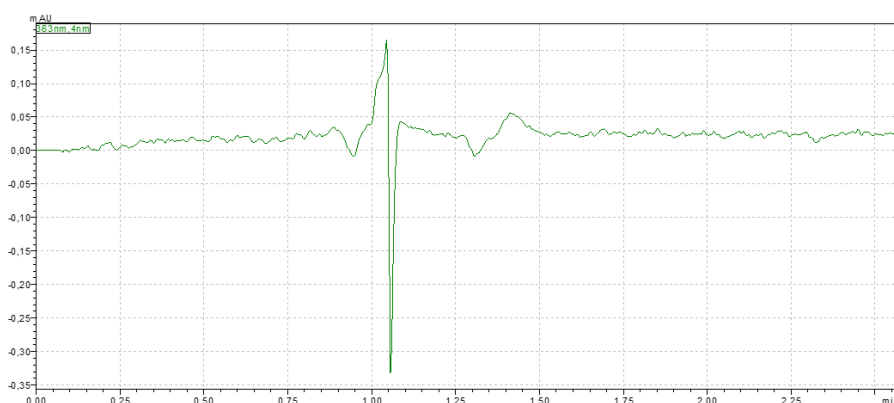


Obrázek 34: Chromatogram vzorku získaného z disoluce (1% kyselina octová:acetonitril 20:80, průtok 1,5 ml/min, nástřik 20 μ l, 25 °C)

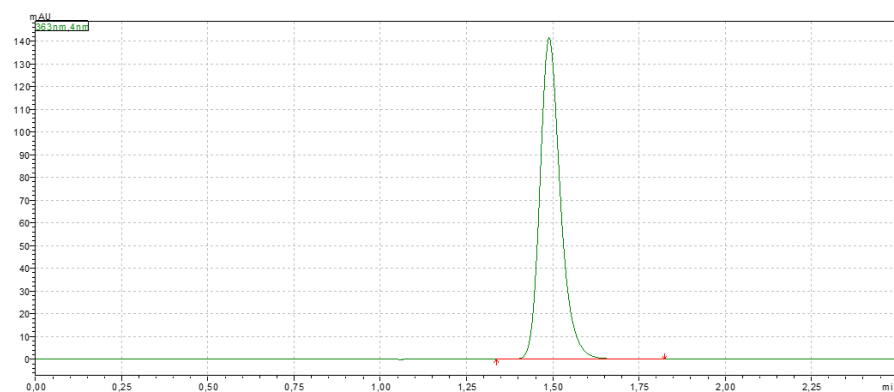
Třetí MF se skládala z 51 % methanolu, 9 % isopropanolu a 40 % fosfátového pufru (50 mmol/l, pH 5.9), při teplotě 30 °C a průtoku 1 ml/min ^[56] (Obrázek 35). Tato MF byla opět dostačující pro stanovení léčiva meloxicamu. Po srovnání chromatogramu samotného pufru a odebraného vzorku z disoluce vypadlo měření nadějně (Obrázek 36, 37). Podařilo se takto stanovit i nečistotu B (Obrázek 38). Avšak nakonec metoda neposkytovala pro vzorky z disoluce správné výsledky, a proto bude nutné ji v budoucnu dovyvinout.



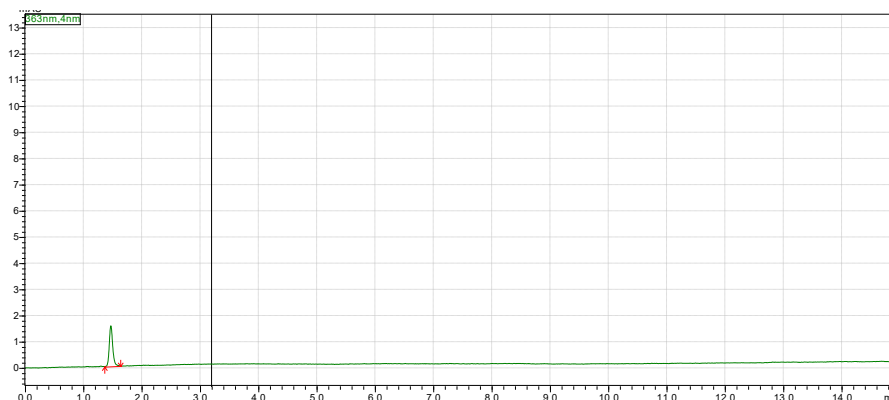
Obrázek 35: Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, 1 μ l 10x zř. roztoku, 30 °C



Obrázek 36: Chromatogram samotného pufru (Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, nástřik 20 μ l, 30 °C)



Obrázek 37: Chromatogram vzorku získaného z disoluce (Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, nástřik 20 μ l, 30 °C)



Obrázek 38: Nečistota B, (Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, nástřik 1 μ l, 30 °C)

6.2.4 Nástřik standardu

Dle Českého lékopisu 2017 se jako první zkoušený nástřik použil objem 10 μ l roztoku standardu. Dávkované množství však bylo příliš vysoké, proto došlo k postupnému snižování nastřikovaného objemu na 5 μ l a dále na 2 μ l. Jelikož byl roztok stále příliš koncentrovaný, řešením se jeví jeho desetnásobné zředění. Byly tedy odebrány 2 ml roztoku standardu a doplněny methanolem do 20 ml odměrné baňky. Finální nastřikovaný objem byl 1 μ l desetkrát zředěného standardu.

Tabulka 21: Shrnutí MF a nástřiků

Složení MF	Poměr složek	Průtok [ml/min]	Teplota	Nástřik standardu
voda:methanol	50:50 → 60:40	1,0 → 1,2 → 1,4	25 °C	10 μ l → 5 μ l → 2 μ l → 2 μ l 10x zř. st.
1 % kyselina octová:acetonitril	50:50 → 60:40 → 40:60 → 30:70 → 25:75 → 20:80	1,4 → 1,5	25 °C	5 μ l 10x zř. st. → 2 μ l zř. → 1 μ l zř.
methanol:isopropanol :fosfátový pufr (50 mmol/l, pH 5.9)	51:9:40	1,0	30 °C	1 μ l 10x zř.st.

7 Závěr

Podařilo se úspěšně vyvinout disoluční metodu pro hodnocení uvolňování meloxikamu z tobolek. Pomocí disolučního testu bylo množství uvolněného léčiva bez využití pomocné látky stanoveno po konci testování na 14,4 % při prvním testu disoluce a 16,4 % při testu kontrolním. Přidáním pomocné látky chitosanu do formulace se disoluce meloxikamu zvýšila na 100 %. Uvolňování lze ovlivnit i způsobem přípravy směsi. Tobolky, plněné směsí meloxikamu s chitosanem (MX-CH 1:8) připravenou mísením, se rozpouštěly rovnoměrně ihned po vložení do disolučního média, zatímco tobolky tvořené směsí mletou měly nástup uvolňování léčiva zpožděn o 5 minut. Dle testování je také patrné, že delší dobou mletí se docílilo pomalejšího, ale rovnoměrnějšího uvolňování léčiva. Lze tedy konstatovat, že nejlepšího a nejrychlejšího rozpouštění meloxikamu je možné dosáhnout přidáním pomocné látky chitosanu v poměru 1:8 a mísením této směsi v přístroji Turbula.

Další část této práce se zabývala vývojem UHPLC metody pro stanovení meloxikamu. Během výzkumu se podařilo najít dvě pravděpodobně vhodné metody, které by bylo třeba v budoucnu dovyvinout a validovat. První z nich tvoří mobilní fáze ve složení 1% kyselina octová a acetonitril v poměru 20:80, s průtokem 1,5 ml/min, při teplotě 25 °C a nástřiku 1 µl 10x zředěného standardu. Druhá metoda se skládá z MF obsahující methanol, isopropanol a fosfátový pufr v poměru 51:9:40 s průtokem 1 ml/min, při teplotě 30 °C a nástřiku 1 µl 10x zředěného standardu. Touto metodou lze také pravděpodobně stanovit nečistotu B. Ani jednu metodu se však z časových důvodů nepodařilo aplikovat na roztoky získané z disoluce. Může to být náplní další práce.

8 Literatura

- [1] Český Lékopis 2017 – Doplněk 2020, Meloxicamum. Grada Publishing, a.s., Praha, 2020, 2765-2766.
- [2] MUDr. Štefánek J. Medicína, nemoci, studium na 1 LF. UK: Meloxicam [online]. 2011 [cit. 2022-02-14]. Dostupné z: https://www.stefajir.cz/meloxicam#google_vignette
- [3] University of Illinois. Medical News Today: Meloxicam, oral tablet [online]. 2021 [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/meloxicam-oral-tablet>
- [4] Fleischmann R., Iqbal I., Slobodin G. Meloxicam, Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2002, 3(10), 1501-1512. DOI: 10.1517/14656566.3.10.1501
- [5] Yocum D., MD, Fleischmann R., MD, Dalgin P., MD, Caldwell J., MD, Hall D., PhD, Roszko P., RPh. Safety and Efficacy of Meloxicam in the Treatment of Osteoarthritis: A 12-Week, Double-blind, Multiple-Dose, Placebo-Controlled Trial. Arch Intern Med. 2000, 160(19), 2947-2954. DOI: 10.1001/archinte.160.19.2947
- [6] Databáze Micromedex, Meloxicam.
- [7] MUDr. Mlčoch Z. a MUDr. Hejda V. Vliv nesteroidních antirevmatik na žaludek, žaludeční sliznici [online]. Oddělení gastroenterologie a hepatologie I. Interní klinika FN Plzeň, 2014. Dostupné z: <https://www.zbynekmlcoch.cz/medicina/nemoci-lecba/vliv-nesteroidnich-antirevmatika-na-zaludek-zaludecni-sliznici>
- [8] Zaman M., Hanif M., Saeed UL Hassan S., Iqbal J., Ahmad Shehzad M. Beta-Cyclodextrin and Maltodextrin Based Solid Dispersion of Meloxicam to Enhance the Solubility of Meloxicam; Formulation and In-vitro Evaluation. Journal of the Chemical Society of Pakistan [online]. 2019, 41(1), 133-142 [cit. 2021-03-18].
- [9] Starek M., Krzek J. TLC determination of meloxicam in tablets and after acidic and alkaline hydrolysis. Acta Pol Pharm. 2012, 69(2), 225-35. PMID: 22568036.
- [10] Zawilla NH., Abdul-Azim Mohammad M., El kousy NM., El-Moghazy Aly SM. Determination of meloxicam in bulk and pharmaceutical formulations. J Pharm Biomed Anal. 2003, 32(6), 1135-44. DOI: 10.1016/s0731-7085(03)00232-2. PMID: 12907256.
- [11] Bandarkar Farzana S., Vavia Pradeep R. A Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Meloxicam in Bulk and Commercial Formulations. Tropical Journal of Pharmaceutical Research [online]. India, 2009, 8(3), 257-264 [cit. 2021-03-26]. Dostupné z: <http://www.tjpr.org>
- [12] Wali A. F., Masoodi M., Akbar M., Mushtaq A. Method development and validation of a stabilityindicating rp-hplc method for analysis of meloxicam using dad detector. Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development: (An International Peer-Reviewed Journal of Pharmaceutical Research and Development) [online]. 2013, 1(5), 33-39 [cit. 2021-03-28]. ISSN 2320-4850. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/263894364>
- [13] Dr. Paraskevopoulos G. Polymerní pomocné látky I. 25.03.2021

- [14] Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., de la Caba K., Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105(2), 1358-1368. ISSN 0141-8130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087.
- [15] Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug Des Devel Ther.* 2016, 28(10), 483-507. DOI: 10.2147/DDDT.S99651. PMID: 26869768. PMCID: PMC4734734.
- [16] Prabakaran M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. *J Biomater Appl.* 2008, 23(1), 5-36. DOI: 10.1177/0885328208091562. PMID: 18593819.
- [17] Dutttagupta DS., Jadhav VM., Kadam VJ. Chitosan: a propitious biopolymer for drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 2015, 12(4), 369-81. DOI: 10.2174/1567201812666150310151657. PMID: 25761010.
- [18] Brokešová J., Slámová M., Zámotný P., Kuentz M., Koktan J., Krejčík L., Vraníková B., Svačinová P., Šklubalová Z., Mechanistic study of dissolution enhancement by interactive mixtures of chitosan with meloxicam as model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 169, 106087. ISSN 0928-0987. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106087.
- [19] Hagen E., Sandberg Løding F., Mattsson S., Tho I. Use of interactive mixtures to obtain mini-tablets with high dose homogeneity for paediatric drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016, 34, 51-59. ISSN 1773-2247, DOI: 10.1016/j.jddst.2016.03.006.
- [20] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 5.17 Doporučení pro zkoušky lékových forem, 5.17.1 Doporučení pro zkoušku disoluce. Grada Publishing, a. s., Praha, 2020
- [21] PharmDr. Šnejdrová E., Ph.D. Disoluce léčivých látek. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, 2020.
- [22] PharmDr. Vraníková B., Ph.D. Biologická dostupnost, bioekvivalence, in vitro/in vivo korelace. 2021.
- [23] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 2.9.29 Pravá disoluce. Grada Publishing, a. s., Praha, 2020.
- [24] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 2.9.43 Zdánlivá disoluce. Grada Publishing, a. s., Praha, 2020.
- [25] Jirásková J., Ondrejček P., Wolaschka T., Řehula M., Rabišková M. Aplikační možnosti disoluční metody s průtokovou celou. *Chem. listy* 109. 2015, 34-40.
- [26] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 2.9.3 Zkouška disoluce pevných lékových forem. Grada Publishing, a. s., Praha, 2020.
- [27] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 2.9.4 Zkouška disoluce náplastí (Zkouška disoluce transdermálních přípravků). Grada Publishing, a. s., Praha, 2020.
- [28] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 2.9.25 Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum. Grada Publishing, a. s., Praha, 2020.

- [29] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, 2.9.42 Zkouška disoluce lipofilních tuhých lékových forem. Grada Publishing, a. s., Praha, 2020.
- [30] Dvořáčková K., Bautzová T., Rabišková M. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. Chem. Listy. 105, Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita, 2011, 50-54.
- [31] PharmDr. Matysová L., Ph.D. Rychlá chromatografie – UHPLC. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy.
- [32] Kovaříková P., Stariat J. HPLC – popis základního hardwaru. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy.
- [33] Nováková L., Douša M. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [34] Kovaříková P., Stariat J. HPLC – historie a základní principy. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
- [35] prof. RNDr. Karlíček R., DrSc. Analytická chemie pro farmaceuty. Nakladatelství Karolinum, Praha 1, 2013, 4, 276-281. ISBN 978-80-246-2202-6.
- [36] Kovaříková P., Stariat J. HPLC – detektory. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
- [37] Kovaříková P., Stariat J. HPLC – stacionární fáze a separační módy. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy.
- [38] Klimeš J. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. Hradec Králové: RNDr. Skopec F., CSc. Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.
- [39] Draksiene G., Kopustinskiene D.M., Lazauskas R., Bernatoniene J. Psyllium (*Plantago Ovata* Forsk) Husk Powder as a Natural Superdisintegrant for Orodispersible Formulations: A Study on Meloxicam Tablets. *Molecules* [online]. 2019, 24(18) [cit. 2021-03-18]. ISSN 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules24183255
- [40] De Fátima Silva Oliveira É., De Cássia Pimentel Azevedo R., Bonfilio R., Borges de Oliveira D., Pereira Ribeiro G., Benjamim de Araújo M. Dissolution test optimization for meloxicam in the tablet pharmaceutical form. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2009, 45(1) [cit. 2021-03-18].
- [41] Emam M.F., Taha N.F., Mursi N.M., Emara. L.H. Preparation, characterization and in-Vitro/in-Vivo evaluation of meloxicam extruded pellets with enhanced bioavailability and stability. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2021, 47(1), 163-175 [cit. 2021-03-18]. ISSN 0363-9045. DOI: 10.1080/03639045.2020.1862175
- [42] Fernandes R.P., De Carvalho A.C.S., Ekawa B., Do Nascimento A.L.S.C., Pironi A.M., Chorilli M., Caires F.J. Synthesis and characterization of meloxicam eutectics with mandelic acid and saccharin for enhanced solubility. *Drug Development and Industrial Pharmacy* [online]. 2020, 46(7), 1092-1099 [cit. 2021-03-18]. ISSN 0363-9045. DOI: 10.1080/03639045.2020.1775633
- [43] Rajkó R., Nassab P.R., Szabó-Révész P. Self-modeling curve resolution method applied for the evaluation of dissolution testing data: A case study of meloxicam–mannitol binary

systems. *Talanta* [online]. 2009, 79(2), 268-274 [cit. 2021-03-18]. ISSN 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.03.068

[44] Rastboud S., Hadjmohammadi M.R., Majidi S.M. Development of a magnetic dispersive micro-solid-phase extraction method based on a deep eutectic solvent as a carrier for the rapid determination of meloxicam in biological samples. *Analytical Methods* [online]. 2020, 12(18), 2331-2337 [cit. 2021-03-18]. ISSN 1759-9660. DOI: 10.1039/D0AY00095G

[45] Ghani M. Nanocrystalline cellulose as a biotemplate for preparation of porous titania thin film as a sorbent for thin film microextraction of ketorolac, meloxicam, diclofenac and mefenamic acid. *Journal of Chromatography B* [online]. 2020, 1142 [cit. 2021-03-18]. ISSN 15700232. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122039

[46] Takada M., Ohba Y., Kabashima T., Nakashima K., Wada M. Simple Simultaneous Assay of Methotrexate and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs by HPLC. *CHROMATOGRAPHY* [online]. 2020, 41(2), 79-84 [cit. 2021-03-18]. ISSN 1342-8284. DOI: 10.15583/jpchrom.2020.009

[47] Zaman M., Hanif M., Khan N. UL H., Mahmood A., Qaisar M.N., Ali H. Development and validation of stability-indicating RP-HPLC method for the simultaneous determination of tizanidine HCL and meloxicam in rabbit's plasma. *Acta Chromatographica* [online]. 2019, 31(3), 173-178 [cit. 2021-03-18]. ISSN 2083-5736. DOI: 10.1556/1326.2018.00408

[48] Imre S., Tero-Vescan A., Dogaru M.T., Kelemen L., Muntean D.-L., Curticăpean A., Szegedi N., Vari C.-E. With or Without Internal Standard in HPLC Bioanalysis. A Case Study. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2019, 57(3), 243-248 [cit. 2021-03-18]. ISSN 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/bmy106

[49] Tian Y., Wu X., Zhang M., Zhao L., Xiong Z., Qin F. Quantitative determination of meloxicam in dog plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* [online]. 2018, 32(7) [cit. 2021-03-18]. ISSN 02693879. DOI: 10.1002/bmc.4228

[50] Zeeb M., Farahani H., Mirza B., Papan M.K. Quantification of Meloxicam in Human Plasma Using Ionic Liquid-Based Ultrasound-Assisted In Situ Solvent Formation Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 2018, 56(5), 443-451 [cit. 2021-03-18]. ISSN 0021-9665. DOI: 10.1093/chromsci/bmy012

[51] Rahmati E., Rafiee Z. A biocompatible high surface area ZnO-based molecularly imprinted polymer for the determination of meloxicam in water media and plasma. *New Journal of Chemistry* [online]. 2019, 43(22), 8492-8501 [cit. 2021-03-18]. ISSN 1144-0546. DOI: 10.1039/C9NJ01386E

[52] Mészáros L.A., Galata D.L., Madarász L., et al. Digital UV/VIS imaging: A rapid PAT tool for crushing strength, drug content and particle size distribution determination in tablets. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2020, 578 [cit. 2021-03-19]. ISSN 03785173. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119174

- [53] Liu B.-S., Cheng X., Zhang H.-C., Ma L.-H., Wang Ch.-D. Spectroscopic study and application of the interaction mechanism of meloxicam with trypsin. *Spectroscopy Letters* [online]. 2019, 52(6), 321-329 [cit. 2021-03-19]. ISSN 0038-7010. DOI: 10.1080/00387010.2019.1635162
- [54] Chakraborty S., Bose M., Sarkar M. Spectroscopic studies of the binding of Cu(II) complexes of oxicam NSAIDs to alternating G-C and homopolymeric G-C sequences. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2014, 122, 690-697 [cit. 2021-03-19]. ISSN 13861425. DOI: 10.1016/j.saa.2013.11.078
- [55] Sanatkar T.H., Hadadzadeh H., Simpson J., Jannesari Z. The meloxicam complexes of Co(II) and Zn(II): Synthesis, crystal structures, photocleavage and in vitro DNA-binding. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2013, 1049, 336-344 [cit. 2021-03-19]. ISSN 00222860. DOI: 10.1016/j.molstruc.2013.06.070
- [56] Salazar-Rojas D., Intilangelo A., Vignaduzzo S.E., Maggio R.M. Development and validation of a green method for dissolution monitoring of pharmaceutical combinations. Meloxicam and pridinol. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, 170, 228-233 [cit. 2021-03-18]. ISSN 07317085. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.03.038
- [57] Český lékopis 2017 – Doplněk 2020, Meloxicamum, Zkoušky na čistotu. Grada Publishing, a.s., Praha, 2020, 2765.

9 Seznam tabulek

- Tabulka 1:** Příklady disolučních zkoušek meloxicamu (str. 31)
- Tabulka 2:** Příklady stanovení meloxicamu metodou HPLC (str. 32)
- Tabulka 3:** Příklady stanovení meloxicamu UV/VIS spektrofotometrií (str. 33)
- Tabulka 4:** Studie zabývající se disolucí meloxicamu a měřením vzorků UV/VIS spektrofotometrií a metodou HPLC současně (str. 33)
- Tabulka 5:** Složení a příprava tobolek (str. 38)
- Tabulka 6:** Složení kalibračních roztoků (str. 39)
- Tabulka 7:** Absorbance kalibračních roztoků 1-6 připravených z jednotlivých zásobních roztoků A, B, C (str. 39)
- Tabulka 8:** Absorbance kalibračních roztoků (str. 40)
- Tabulka 9:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F4.01 (str. 44)
- Tabulka 10:** Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a procentech, směrodatná odchylka formulace F4.01 (str. 45)
- Tabulka 11:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F1.01 (str. 46)
- Tabulka 12:** Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a v procentech, směrodatná odchylka formulace F1.01 (str. 47)
- Tabulka 13:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F2.01 (str. 48)
- Tabulka 14:** Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a v procentech, směrodatná odchylka formulace F2.01 (str. 49)
- Tabulka 15:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F3.01 (str. 50)
- Tabulka 16:** Průměrná koncentrace a hmotnost uvolněného léčiva v mg a procentech, směrodatná odchylka formulace F3.01 (str. 51)
- Tabulka 17:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F4.02 (druhý disoluční test) (str. 52)
- Tabulka 18:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F1.02 (druhý disoluční test) (str. 54)
- Tabulka 19:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F2.02 (druhý disoluční test) (str. 55)
- Tabulka 20:** Naměřené a vypočítané hodnoty formulace F3.02 (druhý disoluční test) (str. 56)
- Tabulka 21:** Shrnutí MF a nástřiků (str. 60)

10 Seznam obrázků

- Obrázek 1:** Strukturní vzorec meloxicamu (str. 11)
- Obrázek 2:** Nečistota B (str. 12)
- Obrázek 3:** Chitin (str. 13)
- Obrázek 4:** Chitosan (str. 13)
- Obrázek 5:** Příklad s průtokovou celou (str. 18)
- Obrázek 6:** Průtoková cela (str. 18)
- Obrázek 7:** Košíček (str. 19)
- Obrázek 8:** Nádoba s košíčkem ^[a] Performance Verification Test (PVT). U.S. Pharmacopeia [online]. [cit. 2022-02-15]. Dostupné z: <https://th.bing.com/th/id/OIP.TLifmPWisngJc-A2sGnl9gHaDt?pid=ImgDet&w=164&h=82.27424749163879&c=7&dpr=1.5> (str. 19)
- Obrázek 9:** Míchadlo (pádlo) (str. 19)
- Obrázek 10:** Nádoba s míchadlem (pádlem) (str. 19)
- Obrázek 11:** Skleněná nádoba a vratný válec (str. 20)
- Obrázek 12:** Příklad s průtokovou celou (str. 21)
- Obrázek 13:** Příklad s míchadlem vybavený diskem (str. 22)
- Obrázek 14:** Příklad s míchadlem vybavený extrakční celou (str. 22)
- Obrázek 15:** Rotační válec (str. 23)
- Obrázek 16:** Příklad s průtokovou celou pro lipofilní tuhé léčivé látky (str. 24)
- Obrázek 17:** Základní schéma (U)HPLC přístroje (str. 27)
- Obrázek 18:** Kalibrační křivka meloxicamu (str. 40)
- Obrázek 19:** Disoluční nádoba s vloženým pádlem naplněná disolučním médiem (str. 41)
- Obrázek 20:** „Sinker“ s vloženou tobolkou (str. 42)
- Obrázek 21:** Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F4.01 (str. 45)
- Obrázek 22:** Nerozpuštěná formulace F4 po skončení prvního testu disoluce (str. 45)
- Obrázek 23:** Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F1.01 (str. 47)
- Obrázek 24:** Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F2.01 (str. 49)
- Obrázek 25:** Graf závislosti množství uvolněného léčiva v čase u formulace F3.01 (str. 51)
- Obrázek 26:** Nerozpuštěné léčivo meloxicamu na konci druhého testu disoluce (str. 53)
- Obrázek 27:** Porovnání disolučních křivek meloxicamu po prvním měření (str. 57)
- Obrázek 28:** Porovnání disolučních křivek meloxicamu po druhém měření (str. 57)
- Obrázek 29:** Voda:methanol 50:50, průtok 1 ml/min, nástřik 10 µl, teplota 25 °C (str. 60)
- Obrázek 30:** Voda:methanol 60:40, průtok 1,4 ml/min, nástřik 2 µl 10x zředěného roztoku standardu, 25 °C (str. 60)
- Obrázek 31:** 1% kyselina octová:acetonitril 50:50, průtok 1,4 ml/min, nástřik 5 µl 10x zř. roztoku, 25 °C (str. 61)

Obrázek 32: 1% kyselina octová:acetonitril 20:80, průtok 1,5 ml/min, nástřik 1 μ l 10x zř. roztoku, 25 °C (str. 61)

Obrázek 33: Chromatogram samotného pufru (1% kyselina octová:acetonitril 20:80, průtok 1,5 ml/min, nástřik 20 μ l, 25 °C) (str. 61)

Obrázek 34: Chromatogram vzorku získaného z disoluce (1% kyselina octová:acetonitril 20:80, průtok 1,5 ml/min, nástřik 20 μ l, 25 °C) (str. 61)

Obrázek 35: Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, 1 μ l 10x zř. roztoku, 30 °C (str. 62)

Obrázek 36: Chromatogram samotného pufru (Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, nástřik 20 μ l, 30 °C) (str. 62)

Obrázek 37: Chromatogram vzorku získaného z disoluce (Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, nástřik 20 μ l, 30 °C) (str. 62)

Obrázek 38: Nečistota B, (Methanol:isopropanol:fosfátový pufr 51:9:40, průtok 1 ml/min, nástřik 1 μ l, 30 °C) (str. 63)