



**VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ – TECHNICKÁ
UNIVERZITA OSTRAVA
UNIVERZITNÍ STUDIJNÍ PROGRAMY**

Mikronizace částic glibenclamidu s využitím superkritického CO₂

Micronization of glibenclamide particle using supercritical CO₂

Autor:

Kateřina Zientková

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.

Ostrava

2018

VŠB - Technická univerzita Ostrava
Univerzitní studijní programy
Centrum nanotechnologií

Zadání bakalářské práce

Student: **Kateřina Zientková**
Studijní program: B3942 Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie
Téma: **Mikronizace částic glibenclamidu s využitím superkritického CO₂**
Micronization of glibenclamide particles using supercritical CO₂
Jazyk vypracování: čeština

Zásady pro vypracování:

Bakalářská práce je zaměřena na mikronizaci částic glibenclamidu, léčiva, které se používá pro léčbu diabetu II. typu. Teoretická část bude věnována problematice mikronizace léčiv, vlastnostem glibenclamidu a podmínkám vedoucím ke vzniku částic s nejnižší možnou velikostí v rámci použité metody. V praktické části budou částice glibenclamidu mikronizovány metodou superkritické technologie. Bude provedena optimalizace podmínek použité technologie, vzniklé částice budou charakterizovány pomocí metod XRD, FTIR, PSD, SEM a dále budou testovány rozpustnost a propustnost vzniklých částic.

Seznam doporučené odborné literatury:


- M. Turk. Particle Formation with Supercritical Fluids. 1st Edition, Elsevier, Oxford, 2014, 152p., ISBN 9780444594860.
- R. Campardelli, L. Baldino, E. Reverchon. Supercritical fluids applications in nanomedicine, The Journal of Supercritical Fluids, 2015, 101, 193-214.
- N. Esfandiari. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. The Journal of Supercritical Fluids, 2015, 100, 129-141.
- J. Du, X. Li, H. Zhao, Y. Zhou, L. Wang, S. Tian, Y. Wang. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 495, 2, 738-749.
- M. Perrut, J. Jung, F. Leboeuf. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes: Part I: Micronization of neat particles, International Journal of Pharmaceutics, 2005, 288, 1, 3-10.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.**

Datum zadání: 10.11.2017

Datum odevzdání: 21.05.2018



prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry





Ing. Zdeňka Chmelíková, Ph.D.
prorektorka pro studium

Místopřísežné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem celou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě 21.05.2018

Podpis autora:

.....

Prohlašuji, že:

- Jsem celou bakalářskou prací, včetně příloh, vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu,
- Byla jsem seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a §60 – školní díly,
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užit (§35 odst. 3),
- Souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB – TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěn v příloze mé bakalářské práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO,
- Bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užit dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona,
- Bylo sjednáno, že užit své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnut licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněná v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše),
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě: 21.05.2018

.....

Podpis studenta

Jméno a příjmení autora: Kateřina Zientková

Adresa trvalého pobytu autora práce: Těšínská 269A/889, Ostrava-Radvanice, 71600

Poděkování:

Tato bakalářská práce vznikla za podpory projektu SP 2018/122 (Polymerní kompozitní materiály s antimikrobiálními vlastnostmi vhodné pro biomedicínské aplikace).

Především bych chtěla poděkovat doc. Ing. Daniele Plaché, Ph.D. za poskytnutí konzultací, odborných rad, vedení bakalářské práce a veškerou spolupráci.

Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Ondřejovi Dutkovi za provedení analýz na UPLC, paní Bc. Lucii Bravencové za pomoc v laboratoři, panu Ing. Tomášovi Sosnovi za zaškolení na přístroji pro superkritickou fluidní extrakci a odborníkům CNT, kteří prováděli potřebné analýzy.

Anotace

Bakalářská práce je zaměřena na mikronizaci částic glibenclamidu, léčiva, které se používá pro léčbu diabetu II. typu. Teoretická část je věnována problematice mikronizace léčiv, vlastnostem glibenclamidu a podmínkám vedoucím ke vzniku částic s nejnižší možnou velikostí v rámci použité metody. V praktické části byly částice glibenclamidu mikronizovány metodou superkritické technologie. Byla provedena optimalizace podmínek použité technologie, vzniklé částice byly charakterizovány pomocí metod XRD, FTIR, PSD, SEM a dále byla testována rozpustnost vzniklých částic.

ZIENTKOVÁ, Kateřina. *Mikronizace částic glibenclamidu s využitím superkritického CO₂*. Ostrava, 2018. Bakalářská práce. VŠB – Technická Univerzita Ostrava. Vedoucí práce Doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D., s. 77.

Annotation

The bachelor thesis is focused on the micronization of glibenclamide particles, a drug used for the treatment of diabetes II. type. The theoretical part was devoted to micronization of drugs, properties of glibenclamide and conditions leading to the formation of particles with the lowest possible size within the used method. In the practical part glibenclamide particles were micronised by supercritical fluid technology. Optimization of the conditions of the used technology was carried out, the resulting particles were characterized by the XRD, FTIR, PSD, SEM methods and the solubility of the generated particles was tested.

ZIENTKOVÁ, Kateřina. *Micronization of glibenclamide particles using supercritical CO₂*. Ostrava, 2018. Bachelor thesis. VŠB – Technical University Ostrava. Supervisor Doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D., p. 77.

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Teoretická část	14
2.1. Léčiva.....	14
2.2. Interakce léčiva s organismem	15
2.3. Biofarmaceutický klasifikační systém	18
2.4. Permeabilita (propustnost)	19
2.5. Perorální antidiabetika	19
2.6. Deriváty sulfonylmočoviny.....	20
2.7. Glibenclamid	20
2.8. Zmenšování částic léčivé látky.....	22
2.9. Superkritické tekutiny.....	23
2.10. Superkritická fluidní technologie	26
2.11. Metoda RESS	26
2.12. Metoda GAS.....	27
2.13. Rozpouštědlo pro metodu GAS – Dimethylsulfoxid.....	27
2.14. Excipient pro metodu GAS – Polyvinylpyrrolidon	28
2.15. Excipient pro metodu GAS – Polyethylenglykol	29
3. Praktická část	31
3.1. Chemikálie	31
3.2. Přístroje a vybavení laboratoře.....	31
3.3. Popis přístroje (extraktoru) Spe-ed SFE-4	33
3.4. Popis kovové reakční patrony	34
3.5. Popis značení připravených vzorků glibenclamidu pro metody RESS a GAS	35
3.6. Popis přípravy vzorku (reakční patrony) pro metodu RESS.....	35
3.7. Popis provedení metody RESS.....	36
3.8. Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou RESS	37
3.9. Popis výběru vhodného rozpouštědla pro metodu GAS	38
3.10. Popis přípravy vzorku (reakční patrony) pro metodu GAS	39
3.11. Popis výběru vhodných excipientů pro metodu GAS.....	39
3.12. Popis přípravy excipientu pro metodu GAS	40
3.13. Popis provedení metody GAS	40
3.14. Popis přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou GAS.....	41
3.15. Popis přípravy vzorku a analýzy velikosti a distribuce částic (PSD)	43
3.16. Popis přípravy vzorku a analýzy SEM	44

3.17. Popis přípravy vzorku a analýzy FTIR	44
3.18. Popis přípravy vzorku a analýzy XRD	45
3.19. Popis přípravy vzorku a testu rozpustnosti (UPLC/DAD)	45
3.20. Použité metody charakterizace	47
4. Výsledky a diskuze	50
4.1. Analýza velikosti a distribuce částic (PSD)	50
4.2. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)	55
4.3. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).....	59
4.4. Rentgenová difrakční analýza (XRD).....	65
4.5. Rozpustnost (test rozpustnosti)	67
4.6. Propustnost (test PAMPA)	68
4.7. Souhrn získaných výsledků.....	68
5. Závěr.....	69
6. Literatura	71
Seznam obrázků	75
Seznam tabulek	77

Seznam použitých symbolů a zkratk

ASES – metoda extrakčního systému s rozpouštědlem ve stavu aerosolu

ATP – adenosintrifosfát

BSC – Biofarmaceutický klasifikační systém (Biopharmaceutical Classification systém)

Ca²⁺ – vápenaté kationty

CO₂ – oxid uhličitý

CP – kritický bod

DEMI – demineralizovaná voda

d_{mean} – průměrná velikost částic (mean)

d_{mode} – průměrná velikost částic (mode)

DMSO – dimethylsulfoxid

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

GAS – metoda anti-rozpouštědla v plynném stavu

KH₂PO₄ – dihydrogenfosforečnan draselný

m – hmotnost (navážka)

p – tlak

PAMPA – Parallel Artificial Membrane Permeability Assay

p_c – tlak v kritickém bodě

PEG – polyethylenglykol

PEG (1 hm. % hm.) – roztok demineralizované vody a polyethylenglykolu (1500) o koncentraci 1 % hm.

ppm – part per milion (počet částic na milion, část rozpuštěné látky vztažené na milion dílů roztoku)

PSD – particle size distribution (distribuce velikosti částic)

p_{TP} – trojný bod popsán tlakem

PVP – polyvinylpyrrolidon

PVP (1 % hm.) – roztok demineralizované vody a polyvinylpyrrolidonu (K30) o koncentraci 1 % hm.

RESS – rychlá expanze superkritické směsi

SAS – metoda superkritického anti-rozpouštědla

SCF – supercritical fluids (superkritické tekutiny)

SEDS – metoda roztoku dispergovaného superkritickou kapalinou

SEM – skenovací elektronová mikroskopie

T – trojný bod

T_C – teplota v kritickém bodě

T_p – teplota pece

T_{TP} – trojný bod popsán teplotou

T_v – teplota průtokového ventilu

UPLC/DAD – Ultra Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector
(ultraúčinná kapalinová chromatografie s detektorem diodového pole)

V_{DMSO} – objem rozpouštědla dimethylsulfoxidu

VŠB – TUO – Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

XRD – X-ray diffraction (rentgenová difrakční analýza)

ρ_C – hustota superkritických tekutin

1. Úvod

Tato bakalářská práce je zaměřena na mikronizaci, tedy přípravu submikronových částic, případně nanočástic, léčiva glibenclamidu. Glibenclamid je léčivo, které se používá pro léčbu diabetu II. typu. Jelikož se většina léčiv spolu s glibenclamidem velmi obtížně rozpouští ve vodném prostředí, komplikuje to jejich biologickou dostupnost v lidském organismu. Přípravou submikronových částic, případně nanočástic, je možné tuto nepříznivou vlastnost eliminovat nebo alespoň zlepšit. Glibenclamid byl pro tuto bakalářskou práci vybrán z důvodu jeho častého používání v medicíně a předpokladu, že se jeho využívání bude nadále zvyšovat z důvodu stále častějšího výskytu diabetu II. typu v lidské populaci. Zlepšení jeho biodostupnosti může mít v budoucnosti velký přínos pro léčbu pacientů.

Teoretická část bakalářské práce popisuje léčiva, interakce léčiv s organismem, rozdělení léčiv podle BCS systému a provádění PAMPA testu. Dále jsou popsána perorální antidiabetika, ke kterým patří skupina derivátů sulfonylmočoviny. Do této skupiny patří léčivo glibenclamid, který je v této části podrobně popsán. Dále se zde nachází kapitola věnována metodám zmenšování částic léčiv (léčivých látek) a je zde podrobně popsána superkritická fluidní technologie spolu se superkritickými tekutinami. Nachází se zde také popis metody RESS a metody GAS, které spadají pod superkritické fluidní technologie a byly v této práci použity pro zmenšování částic léčiva Glibenclamidu.

Praktická část bakalářské práce je věnována popisu přípravě submikronových částic, případně nanočástic, glibenclamidu pomocí superkritické fluidní technologie s využitím superkritického oxidu uhličitého (CO₂) metodou RESS a následně metodou GAS. V této části bylo nejdůležitější sledování vlivů parametrů metody GAS (teplota, tlak, doba statické fáze) na velikost a morfologii částic léčivé látky glibenclamidu. Následně byly vybrané vzorky částic glibenclamidu charakterizovány pomocí následujících metod: analýza velikosti a distribuce částic (PSD), elektronovou skenovací mikroskopií (SEM), infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR), rentgenovou difrakční analýzou (XRD) a testem rozpustnosti, který byl vyhodnocen pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie s detekcí v UV oblasti (UPLC/DAD).

Cílem této bakalářské práce je připravit submikronové částice, případně nanočástice, léčiva (léčivé látky) glibenclamidu pomocí superkritické fluidní technologie s využitím superkritického oxidu uhličitého (CO₂). Pro tuto práci je zvolena metoda RESS a metoda

GAS. K provedení superkritické fluidní technologie bude použit komerčně dodaný přístroj Spe-ed SFE-4 firmy Applied Separation (USA). Cílem byla také charakterizace a vyhodnocení připravených částic glibenclamidu s ohledem na zvýšení jeho biodostupnosti v organismu.

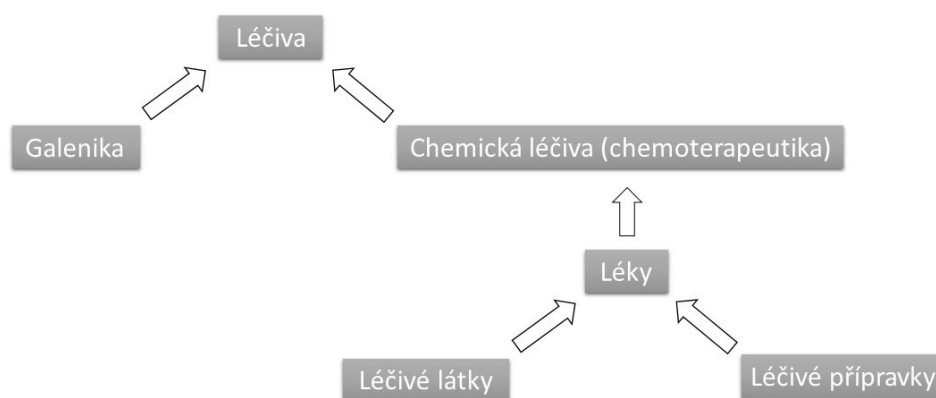
2. Teoretická část

2.1. Léčiva

V České republice jsou léčiva definována Zákonem č. 378/2007 Sb. (Zákon o léčivech) a taktéž Českým lékopisem (farmaceutické dílo normativního charakteru, které platí a je závazné pro celou Českou republiku) [1, 2].

Celou skupinu léčiv je možno rozdělit na dvě hlavní skupiny. Jedná se o galenika a chemická léčiva (chemoterapeutika) (Obrázek 1). Do skupiny galenik spadají léčiva vyráběná nejčastěji z přírodních materiálů pomocí jednoduchých fyzikálních postupů. Druhou skupinou jsou chemická léčiva. Chemické léčivo je definováno Českým lékopisem jako látka, nebo směs látek, které je cíleně podáváno člověku nebo zvířeti za jistým účelem (pro profylaxi, léčbu, stanovení diagnózy) [3, 14].

Chemické léčivo může být distribuováno pomocí různých prostředků. Do těchto prostředků patří léčivé látky, léčivé přípravky a léky. Léčivé látky jsou látky syntetického, živočišného, rostlinného, případně minerálního původu a jsou chemicky homogenní nebo heterogenní. Léčivé přípravky jsou látky, které se skládají z léčivé látky a pomocné látky (excipientů). Pomocné látky jsou látky bez léčebného účinku a slouží pouze pro výrobu vhodné lékové formy, případně pro stabilizaci léčivé látky (procentuální obsah pomocných látek v léku je nejčastěji okolo 90 %). Uvedené látky spolu tvoří lékovou formu (tabletu, dražé). Léky jsou léčivé látky a léčivé přípravky aplikované do vhodné lékové formy, která je aplikována pacientu. Typickým znakem pro léky je jejich zánik po interakci s pacientovým organismem [3, 14, 28].



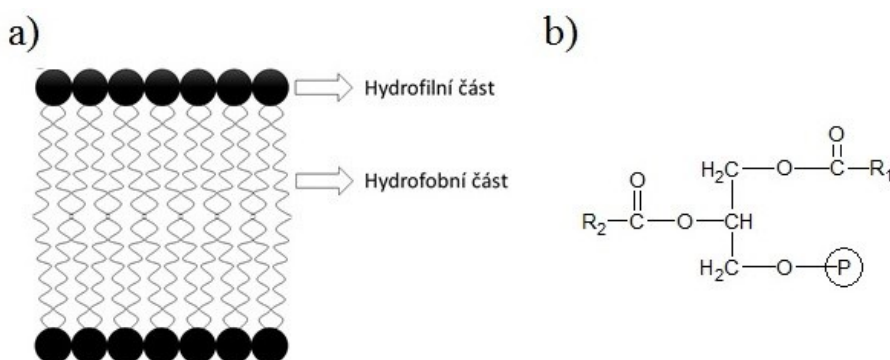
Obrázek 1: Schéma rozdělení léčiv

2.2. Interakce léčiva s organismem

Prvním krokem je aplikace léku. Následuje jeho vstřebání (resorpce) a interakce léčiva s organismem. Proces interakce lze rozdělit na dvě fáze, farmakokinetickou a farmakodynamickou. Farmakokinetika pojednává o působení organismu na léčivo. Farmakodynamika pojednává o působení léčiva na organismus [3, 14].

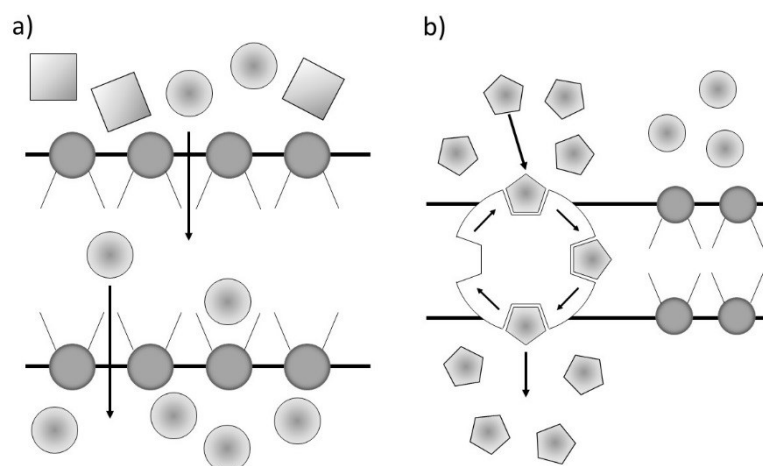
Resorpce léčiva je ovlivněna jeho schopností procházet buněčnou membránou – fosfolipidovou dvojvrstvou (tvořenou dvěma zbytky karboxylových kyselin a zbytkem kyseliny fosforečné). Fosfolipidová vrstva se skládá z hydrofobní části a hydrofilní části. Hydrofobní část se skládá z alkylových řetězců orientovaných do nitra dvojvrstvy. Tato část je nepolární a nesmáčivá. Hydrofilní část se skládá z hlav (zbytků kyseliny fosforečné) orientovaných vně dvojvrstvy. Tato část je polární a smáčivá. V této fosfolipidové dvojvrstvě se taktéž nacházejí různé druhy proteinů, které mají různé vlastnosti (enzymy, pumpy) [3, 14].

Na následujícím obrázku (Obrázek 2) je možné vidět strukturu fosfolipidové dvojvrstvy a její chemické složení.



Obrázek 2: a) fosfolipidová dvojvrstva, b) obecná struktura fosfolipidu [3]

Látka může přes buněčnou membránu procházet dvěma způsoby, pasivním nebo aktivním transportem (Obrázek 3). Pasivní transport nevyžaduje dodání energie, probíhá samovolně ve směru koncentračního gradientu (z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci). Tento děj se nazývá difuze a je dán lipofilitou látky (pokud je látka lipofilní, projde membránou). Aktivní transport je děj, který vyžaduje dodání energie (nejčastěji štěpením makroergních vazeb adenosintrifosfátu – ATP). Tento děj není závislý na lipofilitě látky, ale na afinitě k specializované membránové struktuře (transportní protein). Čím vyšší je afinita dané látky, tím jednodušeji prochází membránou [3, 14].



Obrázek 3: Způsoby průchodu léčiva buněčnou stěnou pomocí a) pasivního transportu (difuzí) a b) aktivního transportu (transportními proteiny) [3]

Předchozí dva děje je možné spojit dohromady a nazvat je jako fázi farmaceutickou [3, 14].

Farmakokinetickou fázi lze zjednodušeně popsat pomocí následujících procesů: podání léku, rozpuštění léku (uvolnění léčivé látky z lékové formy), vstřebání léčivé látky do krevního a lymfatického systému organismu, doputování léčivé látky do vhodného místa organismu, částečná chemická přeměna a nakonec vyloučení z organismu (močí, stolicí) [3, 14].

Ve většině případů dochází během farmakokinetické fáze k přeměně léčivé látky (biotransformaci). O tom, zda dojde k biotransformaci rozhoduje typ léčiva. Hydrofilní léčiva nepodléhají biotransformaci, pouze se částečně vstřebávají a beze změny prochází játry. Naopak hydrofobní (lipofilní) léčiva podléhají biotransformaci (metabolizaci) v játrech a výsledným produktem je hydrofilní produkt. Proces biotransformace probíhá ve dvou stupních. V prvním stupni dochází k přeměně léčivé látky na metabolity. Metabolity mají stejné účinky jako původní léčivá látka, ale jsou polárnější, proto jsou lépe rozpustné v tělních tekutinách (lepší vstřebatelnost). Nejběžnější biotransformací je oxidace, redukce probíhá jen velmi výjimečně. Ve druhém stupni dochází k reakci metabolitů, popřípadě nezměněné léčivé látky s konjugačními činidly. Dochází k různým druhům konjugačních reakcí a produkty těchto reakcí jsou látky ve vodě dobře rozpustné, které jsou z těla vyloučeny pryč (močí, stolicí). Metabolismus může léčivé látky přeměnit na látky neúčinné, účinnější nebo toxické [3, 14].

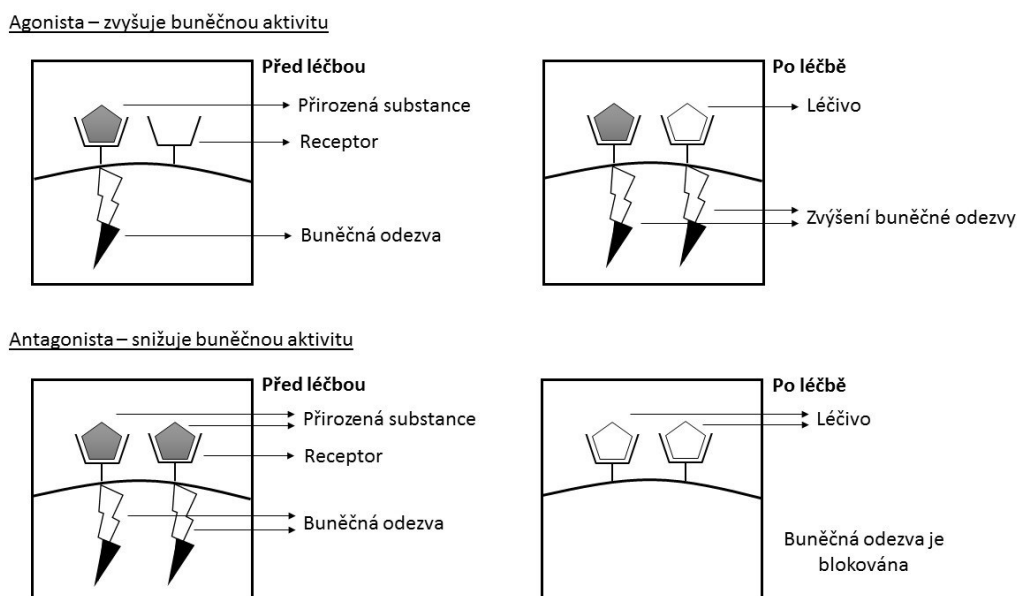
Farmakodynamická fáze ve zjednodušené formě pouze využívá produktu farmakokinetické fáze k interakci těchto produktů s jednotlivými částmi organismu

(receptory). Po této interakci je vyvoláno biologické působení léčivé látky, která tak mění funkci organismu, což je cílem této fáze [3, 14].

Receptory je možné považovat za molekuly, které jsou umístěny do biopolymeru (bílkovin, lipidů). Tyto receptory jsou umístěny jak na povrchu, tak uvnitř buňky a díky nim je buňka schopná vázat různé typy látek. Z chemického hlediska je receptor považován za bílkovinu, které je vložena mezi dvě vrstvy lipidů. Tuto bílkovinu lze rozdělit na dvě části. Jedna z částí vykazuje jistou afinitu k léčivé látce a může s ní tedy reagovat. V druhé části bílkoviny probíhá samotná reakce [3, 14].

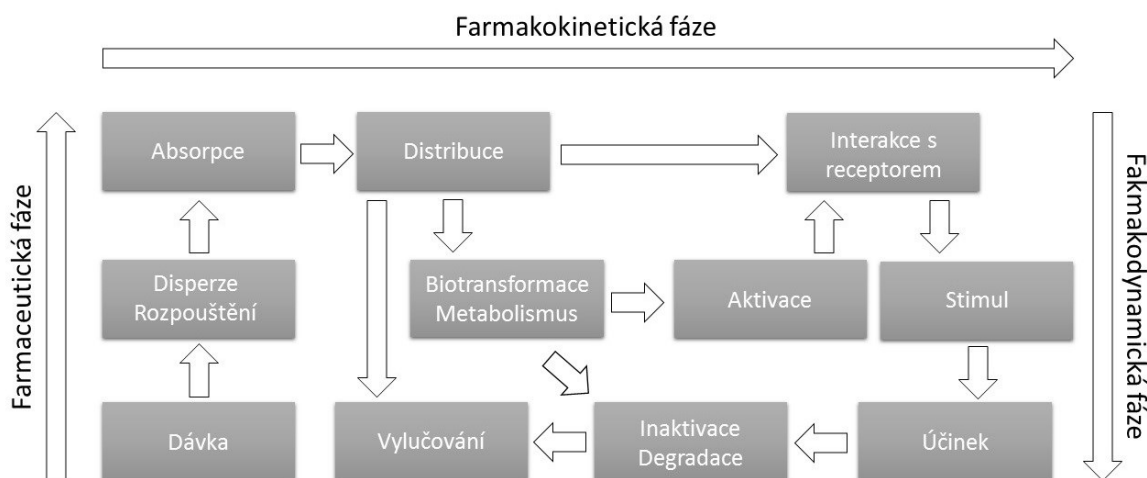
Léčivé látky mají funkci dvojího typu a dělí se do dvou skupin. První skupinou jsou agonisté. Zde patří léčivé látky, které jsou schopné navázat se na receptor a jejich účinek se připočítává k účinkům vlastních látek organismu (látky, které organismus využívá k léčbě). Typickým příkladem této léčivé látky (léčiva) je syntetický inzulín. Pokud má pacient porušenou slinivku břišní a nedochází tak k vylučování inzulínu, je nutné jej injekčně do těla dodávat. Díky inzulínovým receptorům je syntetický inzulín vázán na tyto receptory a dochází tak k regulaci glukosy v krvi. Druhou skupinou jsou antagonisté. Zde patří léčivé látky, které brání navázání vlastních látek organismu (látky, které organismus využívá k léčbě). Zde patří například léčivé látky (léčiva) tlumící bolest (analgetika) [3, 14].

Rozdělení léčivých látek na agonisty a antagonisty a jejich působení je možné vidět na následujícím obrázku (Obrázek 4).



Obrázek 4: Působení agonistů a antagonistů [3]

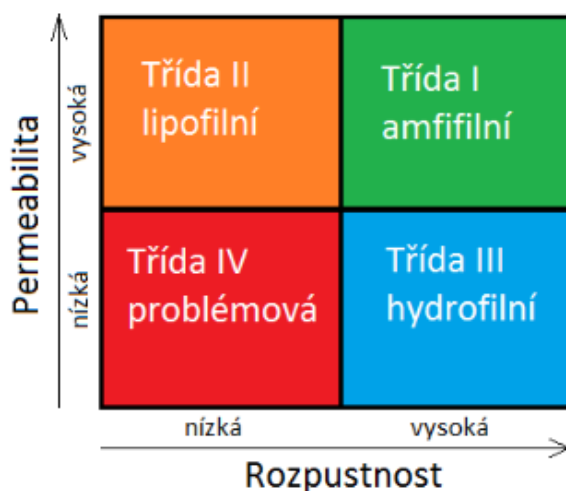
Propojením jednotlivých fází, farmakokinetické, farmakodynamické a farmaceutické, jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obrázek 5).



Obrázek 5: Interakce léčiva s organismem [3]

2.3. Biofarmaceutický klasifikační systém

Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS – Biopharmaceutical Classification System) je systém sloužící k rozdělení léčivých látek do čtyř skupin. Léčivé látky jsou do těchto skupin rozděleny podle jejich rozpustnosti (ve vodném prostředí) a permeability (průchodem biologickými membránami) (Obrázek 6). Rozpustnost a permeabilita jsou nejdůležitější parametry pro léčivé látky, protože tyto parametry předurčují míru a rychlost absorpce do organismu [4, 16].

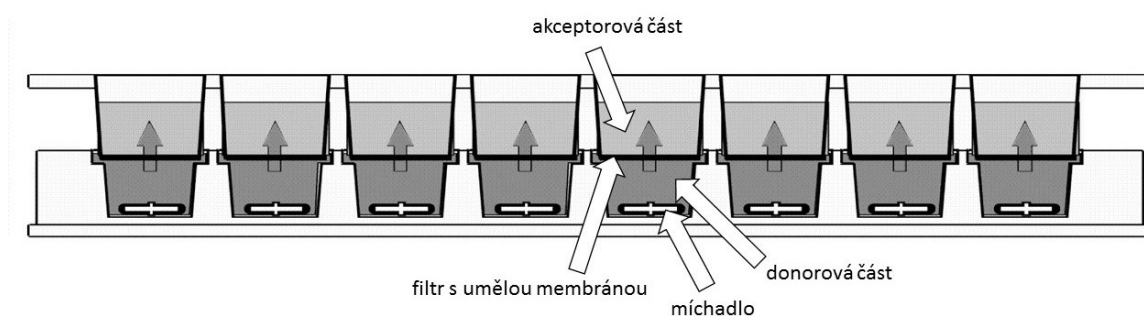


Obrázek 6: Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS) [4]

Léčivá látka může být označena za vysoce rozpustnou, jestliže se její nejvyšší možná léčivá dávka rozpustí ve 250 ml nebo v menším objemu vodného pufru (pH 1-7,5). V případě, že se vstřebá 90 % a více léčivé látky, může být tato léčivá látka označena jako vysoce vstřebatelná (permeabilní). V případě BCS systému se jedná o dvouparametrové zjednodušení složitého procesu vstřebávání léčivé látky v organismu a je nutné nezanedbávat i ostatní důležité parametry, které ovlivňují vstřebávání (stabilita léčivé látky v organismu, vazba na plazmatické bílkoviny) [4, 16].

2.4. Permeabilita (propustnost)

Permeabilitu neboli propustnost léčivé látky lze vyhodnocovat pomocí PAMPA testu (anglicky Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). PAMPA test je *in vitro* modelem pasivní transcelulární propustnosti. PAMPA systém se skládá z umělé membrány, která je umístěna na filtru mezi donorovou a akceptorovou částí PAMPA systému. Na začátku testu je léčivá látka (léčivo) aplikováno do donorové části PAMPA systému. Následně je akceptorová část spolu s umělou membránou na filtru vložena do donorové části PAMPA systému (Obrázek 7). Po uplynutí určité doby (reakční čas) se měří koncentrace léčivé látky (léčiva) jak v donorové, tak akceptorové části PAMPA systému. Nejčastěji se pro měření koncentrace léčivé látky (léčiva) používá kapalinová chromatografie [12].



Obrázek 7: PAMPA test firmy Pion [12]

2.5. Perorální antidiabetika

Perorální antidiabetika jsou látky, které jsou podávány v tabletové podobě a pacientem jsou přijímána ústy (vstřebání nastává v trávicím traktu). Jedná se o látky, které jsou schopny regulovat hladinu glukosy v krvi a moči u osob trpící chorobou diabetes mellitus (úplavice cukrová). Choroba diabetes mellitus se dělí na dvě skupiny: 1) diabetes mellitus

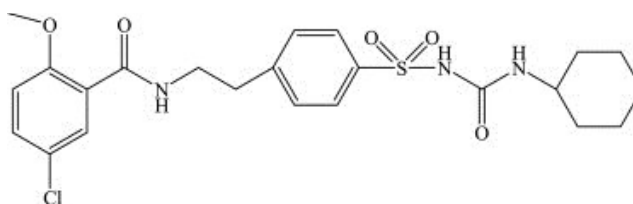
I. typu a 2) diabetes mellitus II. typu. Diabetes mellitus I. typu je skupina, při které úplně ztratí slinivka břišní schopnost produkovat inzulín. Při diabetu tohoto typu je nutné trvale parenterálně (injekčně) aplikovat inzulín. Perorální aplikace inzulínu není možná, jelikož jej žaludeční proteasy štěpí. Diabetes mellitus II. typu je onemocnění, při kterém je pouze snížená produkce inzulínu slinivkou břišní a snížená citlivost pankreatických buněk na inzulín. Tento druh diabetu může být způsobený různými příčinami (špatnou životosprávou, nadváhou), proto se vyskytuje spíše u osob středního a vyššího věku. Pro tento druh diabetu není nutné parenterálně aplikovat inzulín, ale postačuje aplikace perorálních antidiabetik. Větší část perorálních antidiabetik jsou sloučeniny na bázi sulfonfylmočoviny, biguanidu a dalších [5, 15].

2.6. Deriváty sulfonfylmočoviny

Perorální antidiabetika na bázi sulfonfylmočoviny stimulují uvolňování inzulínu z β -buněk Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Tato antidiabetika se dělí na dvě generace. Do první generace derivátů sulfonfylmočoviny patří například karbutamid. Nevýhodou této generace bylo vysoké dávkování léčivé látky (až 2000 mg), aby bylo dosaženo terapeutického výsledku. Druhá generace derivátů sulfonfylmočoviny má mnohem vyšší účinnost, proto není potřeba vysokých dávek léčivé látky. Do této generace patří glibenclamid (synonymum je glyburid, glibenklamid) [5, 15].

2.7. Glibenclamid

Glibenclamid (5-chlor-N-[2-[4-[[[(cyklohexylamino)karbonyl]amino]sulfonyl]fenyl]-ethyl]-2-methoxybenzamid) (Obrázek 8) je perorální antidiabetikum, které se řadí do skupiny druhé generace derivátů sulfonfylmočoviny. Jako perorální antidiabetikum se používá pro léčbu diabetes mellitus II. typu. Taktéž vykazuje pozitivní účinky proti hemoragické cévní mrtvici a cévní mozkové ischemii [5, 8, 10].



Obrázek 8: Strukturní vzorec glibenclamidu [7]

Glibenclamid (Obrázek 8, 9) je bílý, krystalický prášek téměř bez chuti a zápachu. Díky své vysoké permeabilitě buněčnou membránou, ale nízké rozpustnosti ve vodě ($4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) je glibenclamid řazen do II. skupiny BCS [6, 8, 17]. Glibenclamid se rozpouští a vstřebává v žaludku, dvanáctníku a tlustém střevě [25].

V následující tabulce (Tabulka 1) jsou uvedeny vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti o glibenclamidu.

Tabulka 1: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti glibenclamidu [7, 8, 9, 17]

Glibenclamid					
Zařazení do skupiny BCS systému	Molární hmotnost	Teplota tání	Rozpustnost ve vodě	Rozpustnost v acetonitrilu	Rozpustnost v dimethylsulfoxidu
-	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$^{\circ}\text{C}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	$\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$
II. skupina	494,003	169,00	4,00	1,00	99,00

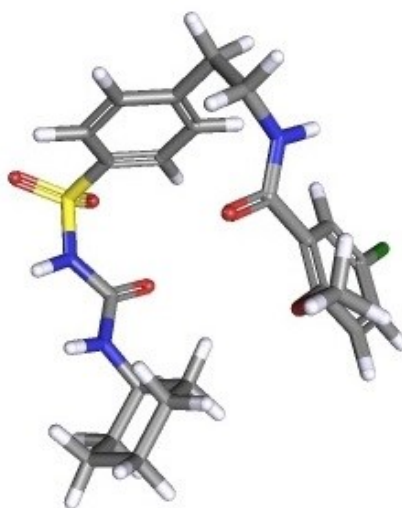
Glibenclamid vykazuje polymorfismus. Polymorfismus je definován jako schopnost dané látky krystalizovat ve více než jedné krystalické formě. Jednotlivé polymorfy (krystalické formy) se mohou lišit svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (rozpustnost, stabilita, teplota tání). Existuje mnoho polymorfních forem glibenclamidu, ale nejznámější je amorfni forma a čtyři polymorfní formy [7].

Amorfni forma glibenclamidu byla získána tavením krystalického léčiva v olejové lázni při teplotě 185°C . Poté byla vzniklá tavenina rychle ochlazena za pomoci kapalného dusíku. Nakonec došlo k mletí ochlazené taveniny pomocí kulového mlýnu. Při tomto procesu bylo 16 % glibenclamidu rozloženo a 0,3 % glibenclamidu degradovalo během mletí. Taktéž byla provedena druhá metoda, při které nedocházelo k žádné degradaci glibenclamidu. Během této metody byl glibenclamid taven při teplotě 174°C a následně byla tavenina ochlazena a mleta pomocí kryomlýnu. Amorfni glibenclamid je stabilní pouze po určitou dobu. Literatura uvádí, že amorfni glibenclamid do dvou měsíců zkrystalizuje (rychlost krystalizace závisí na teplotě a vlhkosti) [7].

Roku 1989 byl objeven nový polymorf glibenclamidu (II. typ), který byl připraven rekrystalizací původního polymorfu glibenclamidu (I. typ) z acetonitrilu. Třetí polymorf

(III. typ) byl připraven rekrytalizací ze směsi chloroformu a etheru. Polymorf III. typu vykazoval vyšší rozpustnost než polymorfy I. a II. typu a taktéž měl nižší bod tání než polymorf I. typu. Autoři, kteří objevili nové formy polymorfů glibenclamidu usoudili, že polymorfy II. a III. typu jsou metastabilní a pro farmaceutický trh je tak vhodný polymorf I. typu, který je stabilní. Roku 2000 byl objeven polymorf IV. typu, který byl získán sublimací amorfní formy glibenclamidu. U tohoto typu polymorfu byla zjištěná vyšší teplota tání, než u polymorfu I. typu. Tento polymorf měl taktéž nejnižší rozpustnost oproti všem předchozím polymorfům [7].

Princip funkce glibenclamidu v organismu je založen na blokaci draslíkových kanálků po reakci se sulfonylmočovinnými receptory, které jsou přítomny v β -buňkách Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní. Následně dochází k depolarizaci buňky a k otevření vápníkových kanálků. Tím, že dochází k pronikání vápenatých kationtů (Ca^{2+}) dovnitř buňky, je okamžitě vyvolána sekrece inzulínu [10, 11].



Obrázek 9: 3D model molekuly glibenclamidu [8]

2.8. Zmenšování částic léčivé látky

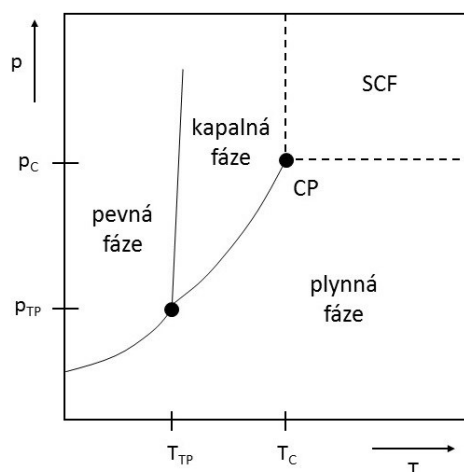
Z důvodů nízké rozpustnosti a permeability léčivých látek je vývoj metod pro zlepšení těchto vlastností v popředí výzkumu farmaceutického průmyslu. Více než 40 % potencionálních léčivých látek je ve vodném prostředí málo rozpustných, což značně omezuje jejich aplikaci. V lékopisu USA je více než jedna třetina léků považována za špatně rozpustnou a další studie ukázaly, že ve 41 % v sedmi společnostech Velké Británie došlo k selhání při vývoji nových léků právě z důvodu nedostatečných biofarmaceutických vlastností (taktéž z důvodu nízké rozpustnosti). Proto se stále více farmaceutických

společností zaměřuje právě na zmenšování částic léčivých látek. Mikročástice a nanočástice špatně rozpustných látek jsou schopny oproti původním částicím tyto nedostatky odstranit [13, 23, 24].

Metody zmenšování částic léčivé látky lze rozdělit do dvou skupin a to top-down a bottom-up. Skupina top-down může být nazvána jako „shora dolů“, dochází tedy k zmenšování větších částic na menší. Skupina bottom-up může být nazvána jako „zdola nahoru“, dochází při ní k zvětšování menších částic na větší (částice se stále nacházejí v rozměrech mikro, případně nano). Do této skupiny je možné zařadit metodu srážení pomocí anti-rozpouštědla [13, 23]. Ve větší míře jsou používány metody ze skupiny top-down, protože výroba léčivých látek těmito metodami je možná jak v laboratorním, tak průmyslovém měřítku. Metody ze skupiny bottom-up jsou využívány jen výjimečně, většinou v laboratorním měřítku. Do skupiny top-down patří například superkritická fluidní extrakce a rychlá expanze superkritických rozpouštědel. Do skupiny bottom-up patří například vysokotlaká homogenizace [13].

2.9. Superkritické tekutiny

Metody, které využívají superkritických tekutin (SCF) a jejich směsí, mohou v budoucnosti hrát velmi významnou roli v nanomedicínských a nanofarmaceutických aplikacích. Důvodem jsou specifické vlastnosti superkritických tekutin jako je velmi rychlý přenos hmoty, téměř nulové povrchové napětí spolu s účinnou eliminací rozpouštědel. Tyto vlastnosti superkritických tekutin umožňují zcela nové zpracování metod, které mohou překonat omezení běžně používaných metod a procesů [19, 20]. Každou čistou chemickou látku lze definovat pomocí p-T fázového diagramu (Obrázek 10).



Obrázek 10: p-T diagram čisté chemické látky [21]

Na diagramu lze sledovat tři křivky, které od sebe v diagramu oddělují plynný, kapalný a pevný stav dané čisté látky. Každá křivka představuje koexistenci mezi dvěma fázemi, které daná křivka odděluje. První křivka je křivka tání, která představuje koexistenci pevné a kapalně fáze při procesu tání (odtud plyne jméno dané křivky). Druhá křivka je křivka sublimační, která představuje koexistenci pevné a plynné fáze. Třetí křivka je křivka vypařování, která představuje koexistenci kapalně a plynné fáze. Tyto tři křivky se setkávají v trojném bodě (T), kde mohou koexistovat všechny tři fáze (kapalná, plynná, pevná). Trojný bod je popsán teplotou (T_{TP}) a tlakem (p_{TP}) trojného bodu (tabelované hodnoty). Křivka vypařování končí kritickým bodem (CP), který je taktéž definován teplotou (T_C) a tlakem (p_C) kritického bodu. Pokud se čistá látka nachází v oblasti nad kritickým bodem (nad kritickou teplotou a tlakem), je čistá látka v superkritickém stavu a je nazývána superkritickou tekutinou (SCF). V následující tabulce (Tabulka 2) jsou uvedeny běžně používané superkritické tekutiny s odpovídajícími kritickými hodnotami. [20, 21, 22].

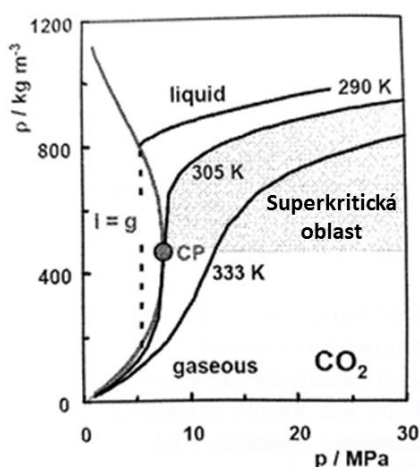
Tabulka 2: Běžně používané superkritické tekutiny s odpovídajícími kritickými hodnotami [21]

Rozpouštědlo	T_C	p_C	T_{TP}	p_C
	K	MPa	K	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
CO_2	304,20	7,38	216,55	10,60
H_2O	647,30	22,10	273,15	17,40
C_2H_6	305,40	4,88	90,07	6,81
CHF_3	299,00	4,80	118,15	7,52

Nejvýhodnější z uvedených, běžně používaných superkritických tekutin, je oxid uhličitý (CO_2), protože se za běžných podmínek vyskytuje v plynném stavu a je netoxický,

nehořlavý, levný, nereaktivní a neznečišťující (jednoduché oddělení od vzorku). Taktéž jeho výhoda spočívá v nízké kritické teplotě a poměrně nízkém kritickém tlaku. Z těchto všech důvodů je velmi používaný ve farmaceutickém průmyslu [20, 21].

Následující obrázek (Obrázek 11) ukazuje graf závislosti hustoty na tlaku pro čistý oxid uhličitý. Graf obsahuje tři křivky nasycení kapalina – plyn pro dané hodnoty teploty. Jedná se o křivku s teplotou v subkritické oblasti (290 K) a křivky s teplotami v superkritické oblasti (305 K) a (333 K). Taktéž se na daném obrázku vyskytuje křivka ($l = g$), která vyznačuje dvoufázovou oblast, kde se nachází jak plynná fáze, tak kapalná fáze oxidu uhličitého. Dále se zde nachází bod CP, při kterém dochází k vymizení rozdílů mezi kapalnou a plynnou fází. Z grafu je patrné, že v tekutině nacházející se nad bodem CP může docházet k stlačování plynu s nízkou hustotou do kapaliny o vysoké hustotě bez fázového přechodu. V oblasti ($1 < \frac{T}{T_C} < 1,1$) je superkritická tekutina vysoce stlačitelná a i malé změny teploty nebo tlaku mohou vést k velkým změnám hustoty tekutiny, což má vliv i na její rozpouštěcí sílu [21].



Obrázek 11: Graf závislosti hustoty na tlaku čistého oxidu uhličitého [21]

V následující tabulce (Tabulka 3) jsou uvedeny parametry plynů, kapalin a superkritických tekutin [21].

Tabulka 3: Parametry plynů, kapalin a superkritických tekutin [21]

	Hustota	Viskozita	Difuzivita	Kinematická viskozita
	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$	$\text{Pa}\cdot\text{s}$	$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$
Plyn	1	10^{-5}	10^{-1}	10^{-5}
Kapalina	10^3	10^{-3}	10^{-6}	1
Superkritická tekutina	$5\cdot 10^2$	$10^{-4} - 10^{-5}$	$10^{-3} - 10^{-4}$	$10^{-7} - 10^{-8}$

2.10. Superkritická fluidní technologie

Superkritická fluidní technologie je metoda využívající výše zmíněné superkritické tekutiny. Na základě využití superkritických tekutin může být tato metoda rozdělena do dvou skupin. První skupina využívá superkritických tekutin jako rozpouštědel a patří zde metoda RESS (rychlá expanze superkritické směsi) a její modifikace. Druhá skupina využívá superkritických tekutin jako anti-rozpouštědel a patří zde metody GAS (metoda anti-rozpouštědla v plynném stavu), SAS (metoda superkritického anti-rozpouštědla), SEDS (metoda roztoku dispergovaného superkritickou kapalinou) a ASES (metoda extrakčního systému s rozpouštědlem ve stavu aerosolu) [18, 20].

2.11. Metoda RESS

Metoda RESS (rychlá expanze superkritické směsi) slouží pro výrobu částic o rozměrech mikro- a nano-. Při této metodě dochází k rozpuštění léčivé látky v superkritické tekutině, která slouží jako rozpouštědlo. Tento typ metody je velmi zajímavý, protože není nutné použití organických rozpouštědel. Metoda je však omezena, a to rozpustností dané léčivé látky v superkritickém oxidu uhličitém, přesněji řečeno na malé molekuly a sloučeniny obsahující několik polárních vazeb. Rozpustnost léčivé látky v superkritické tekutině (rozpouštědle), v tomto případě v superkritickém oxidu uhličitém, by měla činit 10^{-4} molárního zlomku. Výsledná morfologie pevné léčivé látky je ovlivněna jak výchozí materiálovou strukturou (krystalická, nebo amorfní), tak parametry procesu metody (teplota, tlak, délka procesu a rozměry trysky) [19, 20, 21, 24].

Metoda RESS se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je rozpuštění léčivé látky ve vhodné superkritické tekutině (rozpouštědle). Nejčastěji bývá použit oxid uhličitý. Druhým krokem je náhlý pokles tlaku, kdy dochází k odpouštění superkritické směsi přes trysku do sběrné nádoby, díky čemuž dochází k vysrážení částic léčivé látky s úzkou distribucí

částic. První krok je možné nazvat jako statický mód a druhý krok jako mód dynamický [21].

2.12. Metoda GAS

Metoda GAS (metoda anti-rozpouštědla v plynném stavu) slouží pro výrobu částic o rozměrech mikro- a nano- a je zvláště vhodná pro léčiva a biologické produkty z důvodu použití nízkých teplot (pod 45 °C) a tlaků (pod 10 MPa). Tato metoda se používá v případě, kdy léčivá látka není rozpustná v superkritické tekutině (rozpuštědle), kterým je nejčastěji oxid uhličitý. Při této metodě dochází k rozpuštění léčivé látky ve zvoleném organickém rozpouštědle a roztok je následně nalit do reakční patrony. Poté je do patrony přivedena superkritická tekutina, která slouží jako anti-rozpouštědlo. V tomto případě je nejčastěji jako anti-rozpouštědlo použit oxid uhličitý v superkritickém stavu. Následně se superkritický oxid uhličitý rozpouští v organickém rozpouštědle a tím snižuje rozpustnost léčivé látky v organickém rozpouštědle. Díky tomuto postupu nakonec dojde po odpuštění roztoku přes trysku a k vysrážení částic léčivé látky. Nevýhodou této metody je možnost znečištění výsledné léčivé látky použitým organickým rozpouštědlem [18, 20, 21].

V této bakalářské práci byla využita metoda GAS pro zmenšování částic léčivé látky glibenclamidu. Jako organické rozpouštědlo byl použit dimethylsulfoxid a jako antirozpuštědlo oxid uhličitý v superkritickém stavu. Po ukončení statického módu nastal mód dynamický, kdy byl obsah reakční patrony odpuštěn do skleněné vialky s excipientem. Pro tuto metodu byly využity 3 druhy excipientů (demineralizovaná voda, roztok polyvinylpyrrolidonu a demineralizované vody (1 % hm.) a roztok polyethylenglykolu a demineralizované vody (1 % hm.).

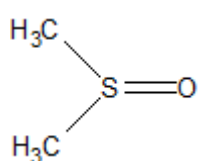
V následujících kapitolách jsou nejdůležitější informace jak o organickém rozpouštědle (dimethylsulfoxidu), tak o použitých excipientech (demineralizované vodě, polyvinylpyrrolidonu a polyethylenglykolu), které byly využity pro metodu GAS v této bakalářské práci.

2.13. Rozpouštědlo pro metodu GAS – Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Obrázek 12) je čirá hygroskopická kapalina chutnající po ústřících nebo česneku. Výroba DMSO je levná, jelikož se jedná o vedlejší produkt papírenského průmyslu. DMSO je dipolární aprotické rozpouštědlo. Používá se jako

rozpouštědlo pro mnohé chemické reakce, příkladem je alkylace SN2 (umožňuje alkylaci indolu). DMSO se velmi snadno mísí s řadou organických rozpouštědel a rovněž s vodou [26].

DMSO je schopný velmi snadno pronikat do pokožky. Z tohoto důvodu se dimethylsulfoxid používá jako nosič pro léky, jelikož zvyšuje jejich vstřebatelnost. DMSO je kapalina s mnoha farmakologickými účinky (průnik přes membrány, protizánětlivé účinky, lokální anestetikum, bakteriostáze) [27]. Ve své deuteriové formě se používá jako rozpouštědlo pro metodu NMR díky své schopnosti rozpouštět široký rozsah chemických látek (sloučenin) a minimální interferenci se signály vzorku [26].



Obrázek 12: Strukturní vzorek dimethylsulfoxidu (DMSO) [26]

V následující tabulce (Tabulka 4) jsou uvedeny vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti dimethylsulfoxidu.

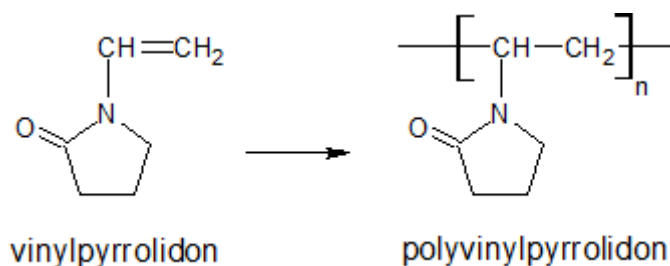
Tabulka 4: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti dimethylsulfoxidu [26]

Dimethylsulfoxid (DMSO)				
Molární hmotnost	Bod varu	Bod tání	Bod vzplanutí	Rozpustnost ve vodě
$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
78,129	189,0	18,5	87 (uzavřená soustava) 95 (otevřená soustava)	1000

2.14. Excipient pro metodu GAS – Polyvinylpyrrolidon

Polyvinylpyrrolidon (PVP) (Obrázek 13) je taktéž znám pod názvem povidon nebo polyvidon. PVP je syntetický, ve vodě rozpustný polymer vyrobený z monomeru N-vinylpyrrolidonu. PVP je bílý, lehce nažloutlý prášek bez zápachu, který se používá ve farmaceutickém průmyslu jako pojivo při výrobě tablet. V případě, že je PVP rozpuštěn ve vodě, je tento roztok lehce nažloutlé barvy. PVP se vyskytuje v některých očních kapkách jako lubrikant. PVP se taktéž používá k výrobě dezinfekčního prostředku Betadine (Povidon-jód je roztok obsahující ve vodě rozpustný komplex jódu a

polyvinylpyrrolidonu). Taktéž se PVP používá jako lepidlo nebo emulgátor (emulgační činidlo – chemická látka zmenšující povrchové napětí) [28].



Obrázek 13: Strukturální vzorce vinylpyrrolidonu a polyvinylpyrrolidonu (PVP, K30), [29]

V následující tabulce (Tabulka 5) jsou uvedeny fyzikálně-chemické vlastnosti polyvinylpyrrolidonu (PVP).

Tabulka 5: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti polyvinylpyrrolidonu [28]

Polyvinylpyrrolidon (PVP, K30)				
Molární hmotnost	Bod varu	Bod tání	Bod vzplanutí	Rozpustnost ve vodě
$\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
111,144	148,0	13,0	98,0	cca 100,0

2.15. Excipient pro metodu GAS – Polyethylenglykol

Polyethylenglykol (PEG) (Obrázek 14) je polyetherová sloučenina, která je využívána v mnoha průmyslových odvětvích (potravinářský, farmaceutický). PEG je taktéž znám jako polyethylenoxid (PEO) nebo polyoxyethylen (POE) a to v závislosti na molekulární (molární) hmotnosti. Polyethylenglykol se používá jako laxativum a excipient (pomocná látka) ve farmaceutickém průmyslu. Polyethylenglykoly s nižší molekulární (molární) hmotností se používají jako rozpouštědla v perorálních tekutinách a jako pomocné látky v měkkých kapslích. Polyethylenglykoly v pevné fázi se používají jako masťové základy, pojivo pevných tablet, tenké filmy na povrch tablet a lubrikanty [30].



Obrázek 14: Strukturální vzorce ethylenglykolu a polyethylenglykolu (PEG), [30]

V následující tabulce (Tabulka 6) jsou uvedeny fyzikálně-chemické vlastnosti polyethylenglykolu (PEG).

Tabulka 6: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti polyethylenglykolu [31]

Polyethylenglykol (PEG, 1500)				
Molární hmotnost	Bod varu	Bod tání	Bod vzplanutí	Rozpustnost ve vodě
$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$^{\circ}\text{C}$	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
1500	> 200,0	43,0 – 49,0	260,0	100,0 (okolo)

3. Praktická část

3.1. Chemikálie

- Glibenclamid (Sigma Aldrich, ≥ 99 %)
- Dimethylsulfoxid (Merck, p. a.)
- Polyvinylpyrrolidon (K30) (Acros Organics, p. a.)
- Polyethylenglykol (1500) (VWR, p. a.)
- Oxid uhličitý 4,8 (CO₂, SIAD, Czech spol s.r.o)
- Methanol (Sigma Aldrich, p. a.)
- Demineralizovaná voda (Milli Q, Merck Millipore)
- Difosforečnan draselný (KH₂PO₄, Lachema a.s., p. a.)
- Hydroxid sodný (NaOH, připravený roztok $c = 1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
- Acetonitril (Sigma Aldrich, $\geq 99,9$ %)

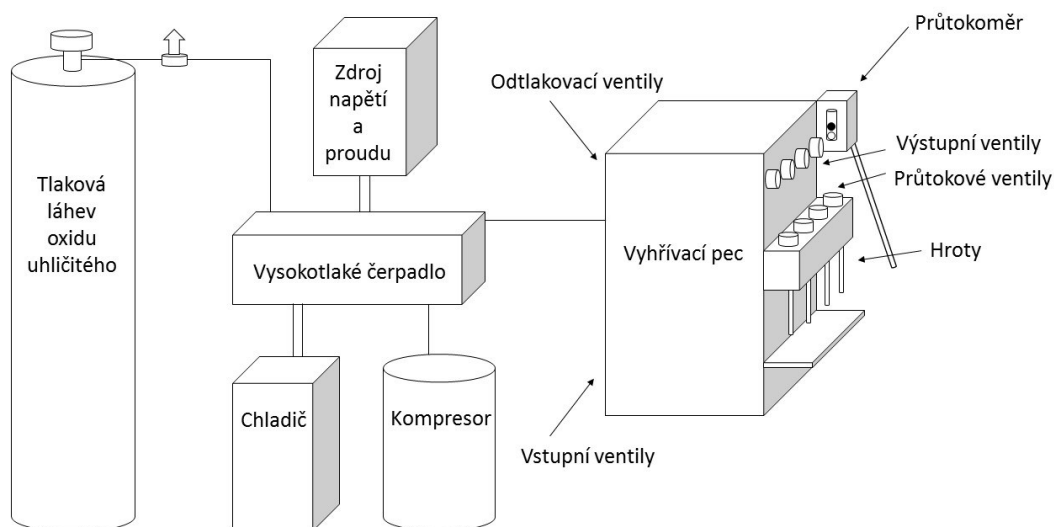
3.2. Přístroje a vybavení laboratoře

- Spe-ed SFE-4 – Applied Separation, USA
- Kompresor – Silent C240/24, Gentilin, ITA
- Chladič – LM6, Polyscience
- Analytické váhy – Tecator, 6110 balance
- Sušárna – MLW, WSU 200
- Elektronické pipety – Biohit (5-5000 μl)
- Laboratorní topná deska – VITRUM, wisestir, MSH – 20D
- PSD – HORIBA Nanopartica SZ-100

- SEM – Quanta 450
- FTIR spektrometr – Thermo Scientific (USA), Nicolet 6700 FT-IR
- XRD – Rigaku Ultima IV, Cu lampa, energie 8,04 keV, vlnová délka 15,406 nm
- Biologický termostat – WTW, TS 606 CZ/3-VAR
- UPLC – Waters, Acquity I-Class, (kolona C18, 1,7 μm ACQUITY UPLC BEH CLB, délka kolony: 10 cm)
- Soustava pro filtraci pufru a mobilní fáze (UPLC) – filtrační soustava Glassco, Kompresor Millipore, Filtr Millipore (velikost pórů: 0,45 μm , materiál: nitrocelulóza)

3.3. Popis přístroje (extraktoru) Spe-ed SFE-4

Pro zmenšování částic léčivé látky glibenclamidu byl použit přístroj (extraktor) Spe-ed SFE-4, Applied Separation. Přístroj je primárně určen pro extrakce organických látek z pevných matric, výrobce však deklaruje i možnost využití pro přípravu submikronových částic některých látek. V tomto extraktoru může být použit pouze oxid uhličitý jako superkritická tekutina. Extraktor se skládá z následujících částí: kompresor, vysokotlaké čerpadlo, zdroj proudu a napětí pro vysokotlaké čerpadlo, tlaková láhev s oxidem uhličitým, chladič, vyhřívací pec s výstupními tryskami, průtokoměr (Obrázek 15).



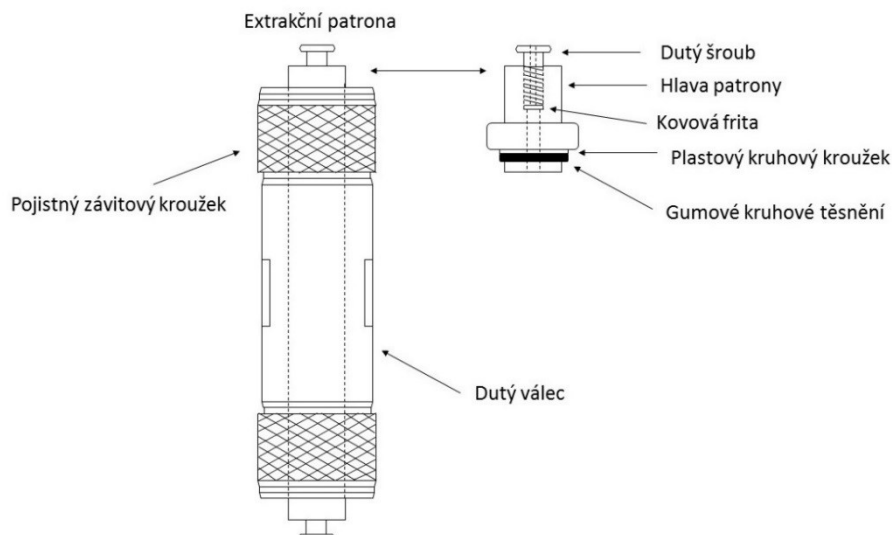
Obrázek 15: Schéma extraktoru

Extraktor využívá pro svůj provoz kompresor (tlak nastavení 8 barů), který je připojen k vysokotlakému čerpadlu a vhání do něj stlačený vzduch. Stlačený vzduch zajišťuje provoz vysokotlakého čerpadla, které pumpuje oxid uhličitý z tlakové lahve pod určitým tlakem do reakčních patron, které jsou umístěny ve vyhřívací peci. Požadovaný tlak, pod kterým je oxid uhličitý pumpován z tlakové lahve, je možno nastavit na zdroji proudu a napětí pro vysokotlaké čerpadlo. Maximální možná nastavitelná hodnota tlaku činí 690 barů. Na vysokotlaké čerpadlo je připojen chladič s chladicí kapalinou (roztok vody a ethylenglykolu), který zajišťuje chlazení stlačeného oxidu uhličitého a tím je možné dosáhnout jeho ještě většího stlačení. Optimální teplota pro chladič byla 3,5 °C. Vysokotlaké čerpadlo je připojeno na vyhřívací pec s reakčními patronami, do kterých je pumpován oxid uhličitý za předem nastaveného tlaku. Na vyhřívací peci je nastavována teplota pece a průtokových ventilů. Maximální možná nastavitelná teplota pece a

průtokových ventilů činí 240 °C. Do vyhřívací pece je možné vložit čtyři reakční patrony. Každá patrona má svou vlastní cestu (vstupní, odtakovací, výstupní a průtokový ventil). Uvnitř vyhřívací pece je kovový teploměr, který snímá aktuální teplotu reakční patrony. Po dosažení potřebného tlaku oxidu uhličitého a následně po dosažení potřebné teploty reakčních patron naplněných vzorky, jsou otevřeny vstupní ventily a je tak zahájen statický mód procesu. Statický mód procesu byl nastaven na 20 nebo 40 minut. Po uplynutí statického módu nastává mód dynamický, při kterém dochází k vypuštění daného vzorku z reakční patrony do sběrné nádoby (skleněné vialky). Dynamický mód procesu byl nastaven na 5 nebo 10 minut. Nejdříve jsou otevřeny výstupní ventily a následně průtokové ventily tvořeny tryskami, které byly předem umístěny do skleněných vialek. Na skleněnou vialku je taktéž připojen průtokoměr pomocí kovového hrotu, který sloužil pro kontrolu průtoku oxidu uhličitého.

3.4. Popis kovové reakční patrony

Kovová reakční patrona se skládá z dutého válce, který má na obou vnějších stranách závit. Taktéž se na každé straně nachází hlava patrony. Každá hlava patrony je opatřena dutým šroubem, pod kterým se nachází kovová frit. Kovová frit slouží jako filtr pro odpuštěnou léčivou látku. Z druhé strany každé hlavy patrony se nasouvá nejdříve plastová kruhová podložka, na kterou se nasouvá gumové kruhové těsnění. Následně byly takto sestavené hlavy patrony zkontrolovány, zda došlo ke správnému vložení kovových frit, dotáhnutí dutých šroubů pomocí otevřených klíčů, správnému nasunutí plastových podložek a gumových těsnění. Poté došlo k vložení jedné z hlavy patrony do vnitřního průměru dutého válce patrony. Nasunutá hlava patrony byla zajištěna pomocí pojistného závitového kroužku, který byl řádně dotažen. Takto připravená reakční patrona mohla být naplněna. Náplň reakční patrony se odvíjela od druhu použité metody superkritické fluidní technologie. Po naplnění se reakční patrona uzavřela pomocí druhé hlavy patrony a opět se zajistila pomocí pojistného závitového kroužku, který byl opět řádně dotažen. Nakonec se takto připravená patrona vložila do vyhřívací pece. Složení patrony je znázorněno na následujícím obrázku (Obrázek 16).



Obrázek 16: Popis extrakční patrony

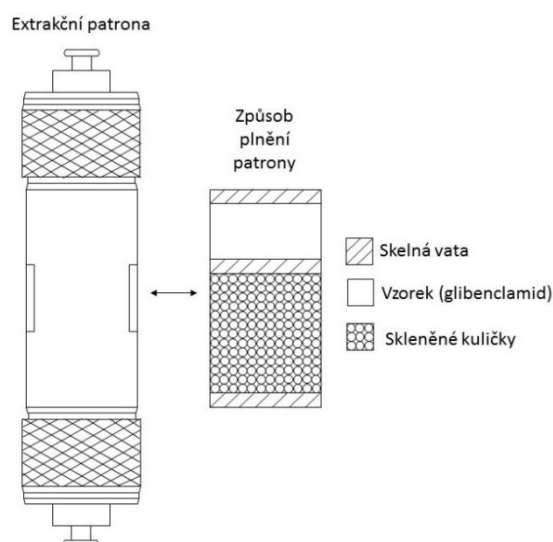
3.5. Popis značení připravených vzorků glibenclamidu pro metody RESS a GAS

Připravené vzorky byly značeny vždy stejným způsobem. Nejdříve byla uvedena zkratka GLYB, která byla zkratkou pro léčivou látku glibenclamid. Následovalo pořadové číslo vzorku. Konečný popis vzorku vypadal takto: GLYB01. Výjimkou byly vzorky, které byly získány louhováním analytické skelné vaty z reakční patrony v demineralizované vodě. Tyto vzorky byly značeny následujícím způsobem: G.ZB.13. První písmeno bylo zkratkou pro léčivou látku glibenclamid. Další dvě písmena za tečkou byly zkratkou pro zbytkové částice, které zůstaly uvnitř patrony po odpuštění vzorku glibenclamidu spolu s rozpouštědlem. Nakonec opět následovalo pořadové číslo vzorku, které bylo shodné s číslem odpuštěného vzorku glibenclamidu.

3.6. Popis přípravy vzorku (reakční patrony) pro metodu RESS

Nejdříve bylo naváženo 0,1700 g léčivé látky glibenclamidu pomocí skleněné lodičky na analytických vahách. Následně byla připravena reakční patrona. Nejdříve byla do hlavy patrony umístěna kovová fritá, která byla zajištěna pomocí dutého šroubu. Dutý šroub byl pořádně utažen pomocí plochých klíčů. Poté byla na opačnou stranu hlavy nasunuta plastová kruhová podložka, na kterou bylo déle vloženo gumové kruhové těsnění. Poté došlo k vsunutí jedné z hlav patrony do vnitřního průměru dutého válce patrony. Hlava patrony byla zajištěna pomocí pojistného závitového kroužku, který byl řádně dotažen.

Takto připravený konec patrony byl pomocí lihového fixu označen. Označení bylo provedeno z toho důvodu, že patrona byla vždy do pece vkládána tak, aby se vzorek nacházel v horní části reakční patrony. Do takto připravené patrony byl vložen malý kruhový chomáč analytické skelné vaty, který byl upěchován pomocí kovové pýchovací tyče. Následně byl do reakční patrony vsypán předem navážený vzorek glibenclamidu. Poté byl opět do reakční patrony vložen malý kruhový chomáč analytické skelné vaty, který byl taktéž upěchován pomocí kovové pýchovací tyče. Zbytek volného místa reakční patrony byl vyplněn skleněnými kuličkami tak, aby zbylo místo na poslední kruhový chomáč analytické skelné vaty. Po vpravení posledního chomáče skelné vaty byla reakční patrona uzavřena hlavou patrony, která byla zajištěná pomocí pojistného závitového kroužku. Pojistný závitový kroužek byl opět řádně utažen. Nakonec byla patrona vložena do vyhřívací pece. Způsob plnění patrony je znázorněn na následujícím obrázku (Obrázek 17).



Obrázek 17: Popis plnění patrony, metoda RESS (takto byla extrakční patrona umístována do vyhřívací pece)

3.7. Popis provedení metody RESS

Nejdříve byly zkontrolovány veškeré ventily na vyhřívací peci (vstupní, odtlakovací, výstupní a průtokové ventily). Následně byl povolen hlavní a vedlejší ventil tlakové lahve oxidu uhličitého. Poté byl zapnut kompresor. Následně bylo zapnuto vysokotlaké čerpadlo. Poté byl zapnut chladič a bylo nutné vyčkat na ochlazení na teplotu 3,5 °C. Předem připravená patrona byla vložena do vyhřívací pece (příšroubována k dané cestě a vše bylo řádně dotaženo). Následně byl zapnut ohřev a bylo vyčkáno na dosažení potřebné teploty

jak vyhřívací pece (35 °C), tak průtokového ventilu (80 °C). Po dosažení nastavených teplot bylo pomocí zdroje proudu a napětí pro vysokotlaké čerpadlo nastaven požadovaný tlak oxidu uhličitého (300 barů), který byl následně pomocí vstupního ventilu vpuštěn do reakční patrony. Doba, po kterou působil oxid uhličitý na vzorek v reakční patroně se nazýval statický mód. Po uplynutí nastaveného času byla na trysku průtokového ventilu připevněna sběrná nádoba (skleněná vialka) a připevněn hrot od průtokoměru. Následně byl otevřen nejdříve výstupní ventil a poté průtokový ventil, kdy došlo k vypuštění oxidu uhličitého spolu s vzorkem glibenclamidu do sběrné nádoby (skleněné vialky). Doba, po kterou byl vypouštěn oxid uhličitý a vzorek glibenclamidu, se nazývala dynamický mód. Po uplynutí nastaveného času byl ukončen daný proces a přístroj bezpečně vypnut spolu se všemi svými částmi.

3.8. Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou RESS

Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu byla nastaveny dle následující tabulky (Tabulka 7). Byly měněny tyto parametry: tlak oxidu uhličitého a teplota pece (reakční patrony). Teplota průtokového ventilu nebyla měněna, protože tento parametr nemá vliv na výsledek dané metody. Taktéž byla nastavena teplota průtokového ventilu na 80 °C, protože při této teplotě nedocházelo k zamrznání výstupní trysky.

Tabulka 7: Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou RESS

Označení vzorku	Navážka	Teplota pece	Teplota průtokového ventilu	Tlak oxidu uhličitého	Dynamický mód	Statický mód
-	m	t_p	t_v	p	-	-
-	g	°C	°C	bar	min	min
GLYB001	0,1788	35	80	300	40	5
GLYB002	0,1766	35	80	400	40	5
GLYB003	0,1793	40	80	300	40	5
GLYB004	0,1775	40	80	400	40	5

Při provedených pokusech bylo zjištěno, že metoda RESS není vhodná pro zamýšlenou činnost z důvodu velmi malých výtěžností vzorku glibenclamidu. Připravený materiál nebylo možné žádným způsobem charakterizovat a vyhodnotit tak danou metodu (Obrázek 18).



Obrázek 18: Vzorky částic glibenclamidu získané metodou RESS

Z tohoto důvodu lze usoudit, že vzorek glibenclamidu nebyl dostatečně rozpustný, nebo byl přímo nerozpustný v oxidu uhličitém. Bylo nutné zvolit novou účinnější metodu. Nově zvolená metoda byla metoda GAS.

3.9. Popis výběru vhodného rozpouštědla pro metodu GAS

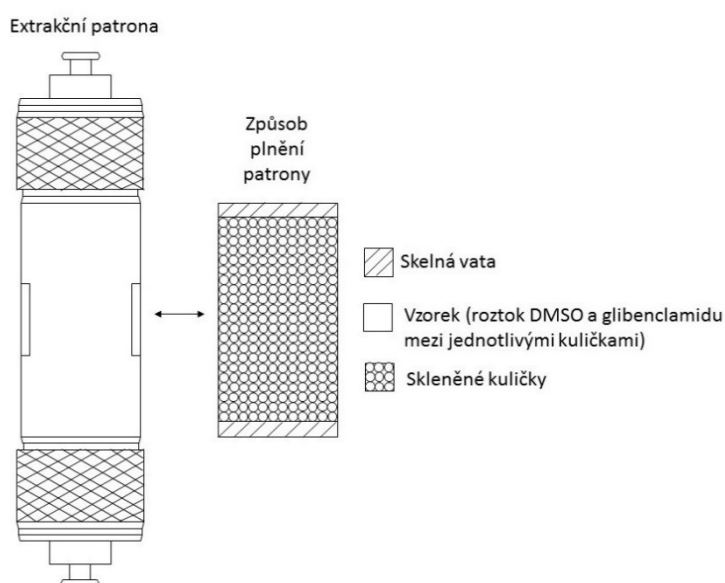
Pro novou metodu GAS byly vyzkoušeny 3 rozpouštědla léčivé látky glibenclamidu: dimethylsulfoxid (rozpustnost glibenclamidu činí $99 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) [9], methanol a aceton. Všechny následující vzorky byly naváženy do skleněné vialky pomocí analytických vah. Následně k takto připraveným vzorkům byl přidán vypočtený objem vybraného rozpouštědla.

Vzorek GLYB005 o navážce 0,0481 g byl úspěšně rozpuštěn v 500 μl dimethylsulfoxidu a byl podroben metodě GAS. Vzorek GLYB006 o navážce 0,0812 g nebyl rozpuštěn v methanolu (použité množství methanolu nebylo vyhovující pro tuto metodu). Vzorek GLYB007 o navážce 0,0805 g nebyl rozpuštěn v acetonu (množství acetonu by muselo být mnohonásobně vyšší, což nebylo vyhovující pro tuto metodu z důvodu objemu reakční patrony).

I přesto, že rozpouštědlo dimethylsulfoxid způsobovalo bobtnání gumových kruhových těsnění extrakční patrony, bylo po testech zvoleno jako jediné možné rozpouštědlo pro metodu GAS. Jiné vhodné rozpouštědlo (dichlormethan) nebylo možné aplikovat do přístroje z důvodu jeho možného poškození (dichlormethan má korozivní účinky).

3.10. Popis přípravy vzorku (reakční patrony) pro metodu GAS

Nejdříve bylo naváženo 0,1000 g léčivé látky glibenclamidu pomocí skleněné vialky na analytických vahách. Poté bylo k navážce vzorku glibenclamidu přidáno pomocí elektronické pipety 1000 μ l dimethylsulfoxidu. Po úplném rozpuštění veškerého vzorku glibenclamidu byla připravena reakční patrona. Reakční patrona byla připravena podle kapitoly 3.5. Popis přípravy vzorku (reakční patrony) pro metodu RESS. Způsob plnění nebyl zcela totožný a změny jsou viditelné na následujícím obrázku (Obrázek 19). Jelikož docházelo k drobnému úniku roztoku přes dolní dutý šroub, bylo nutné jej precizně osušit, aby nedocházelo po upevnění do vyhřívací pece k netěsnostem.



Obrázek 19: Popis plnění patrony, metoda GAS (takto byla extrakční patrona umíst'ována do vyhřívací pece)

3.11. Popis výběru vhodných excipientů pro metodu GAS

Dané excipienty byly vybrány z důvodu jejich možného použití ve farmaceutickém průmyslu, přesněji při přípravě léčiv. Jako první excipient byla vybrána demineralizovaná voda, protože po odpuštění obsahu reakční patrony (dimethylsulfoxidu a rozpuštěného glibenclamidu) dojde k okamžitému vysrážení částic glibenclamidu (proběhne srážení), [25]. Nevýhodou tohoto excipientu je skutečnost, že dochází k aglomeraci nově vzniklých částic glibenclamidu. Na základě této nevýhody byl zvolen druhý excipient, roztok demineralizované vody a polyvinylpyrrolidonu (K30). Tento excipient zabraňuje aglomeraci nově vzniklých částic glibenclamidu. Polyvinylpyrrolidon se velmi často

používá ve farmaceutickém průmyslu jako pojivo pro výrobu lékových forem. Jako poslední excipient byl zvolen polyethylenglykol (1500), který je taktéž využíván ve farmaceutickém průmyslu (potahování tablet).

3.12. Popis přípravy excipientu pro metodu GAS

V případě prvního excipientu, který tvořila demineralizovaná voda, bylo pomocí odměrného válce odměřeno 10 ml. Těchto 10 ml bylo následně přelito do skleněné vialky.

V případě druhého excipientu, roztoku demineralizované vody a polyvinylpyrrolidonu (K30), došlo k výpočtu potřebné navážky polyvinylpyrrolidonu pro přípravu roztoku o hmotnostní koncentraci 1 %. Hmotnost polyvinylpyrrolidon činila 0,1000 g. Navážka 0,1000 g polyvinylpyrrolidonu byla navážena do skleněné vialky pomocí analytických vah. Následně bylo potřeba pomocí odměrného válce odměřit 9,9 ml demineralizované vody, která byla následně vlita do skleněné vialky s navážkou polyvinylpyrrolidonu. Poté byla skleněná vialka s roztokem umístěna asi na 5 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k dokonalému rozpuštění polyvinylpyrrolidonu. Takto byl připraven excipient, roztok demineralizované vody a polyvinylpyrrolidonu o hmotnostní koncentraci 1 %.

V případě třetího excipientu, roztoku demineralizované vody a polyethylenglykolu (1500), došlo k výpočtu potřebné navážky polyethylenglykolu pro přípravu roztoku o hmotnostní koncentraci 1 %. Hmotnost polyethylenglykolu činila 0,1000 g. Navážka 0,1000 g polyethylenglykolu byla navážena do skleněné vialky pomocí analytických vah. Pomocí odměrného válce bylo odměřeno 9,9 ml demineralizované vody, která byla následně vlita do skleněné vialky s navážkou polyethylenglykolu. Poté byla skleněná vialka s roztokem umístěna asi na 5 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k dokonalému rozpuštění polyethylenglykolu. Takto byl připraven excipient, roztok demineralizované vody a polyethylenglykolu o hmotnostní koncentraci 1 %.

3.13. Popis provedení metody GAS

Nejdříve byly zkontrolovány veškeré ventily na vyhřívací peci (vstupní, odtlakovací, výstupní a průtokový ventil). Následně byl povolen hlavní a vedlejší ventil tlakové lahve oxidu uhličitého. Poté byl zapnut kompresor. Následně bylo zapnuto vysokotlaké čerpadlo. Poté byl zapnut chladič a bylo nutné vyčkat na teplotu 3,5 °C. Předem připravená patrona byla vložena do vyhřívací pece. Následně byl zapnut ohřev a bylo vyčkáno na dosažení

potřebné teploty jak vyhřívací pece (35 °C) tak průtokového ventilu (80 °C). Po dosažení nastavených teplot bylo pomocí zdroje proudu a napětí pro vysokotlaké čerpadlo nastaven požadovaný tlak oxidu uhličitého (150 barů), který byl následně pomocí vstupního ventilu vpuštěn do reakční patrony. Doba, po kterou působil oxid uhličitý na vzorek v reakční patroně, se nazýval statický mód. Po uplynutí nastaveného času byla na trysku průtokového ventilu připevněna sběrná nádoba (skleněná vialka spolu s excipientem, nebo bez excipientu) a byl připraven hrot od průtokoměru. Následně byl otevřen nejdříve výstupní ventil a poté průtokový ventil, kdy došlo k vypuštění oxidu uhličitého spolu s roztokem glibenclamidu a dimethylsulfoxidu do sběrné nádoby (skleněné vialky spolu s excipientem, nebo bez excipientu). Doba, po kterou byl vypouštěn oxid uhličitý a vzorek glibenclamidu, se nazývala dynamický mód. Po uplynutí nastaveného času byl ukončen daný proces a přístroj bezpečně vypnut spolu se všemi svými částmi. Poté byla extrakční patrona demontována a rozšroubována. Jelikož docházelo vždy k nedokonalému odpuštění veškerého roztoku, docházelo k vysrážení částic léčivé látky i uvnitř patrony. Z tohoto důvodu byla analytická skelná vata, na které docházelo k největšímu záchytu vysrážených částic glibenclamidu některých vzorků, vylouhována v demineralizované vodě, aby bylo možné i částice léčivé látky glibenclamidu uvízlých v reakční patroně analyzovat.

3.14. Popis přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou GAS

Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu byly nastaveny dle následující tabulky (Tabulka 8). Podmínky (teplota a tlak) byly vybrány na základě experimentů v předchozí bakalářské práci [18]. Byly měněny tyto parametry: tlak oxidu uhličitého, teplota pece (extrakční patrony) a excipienty. Taktéž byla nastavena teplota průtokového ventilu na 80 °C (pro všechna měření), protože tato teplota byla ideální a nedocházelo tak k zamrznání trysky. U všech vzorků glibenclamidu byl jako rozpouštědlo zvolen dimethylsulfoxid (DMSO). Jako excipienty byly použity: DEMI – demineralizovaná voda, PVP (1 % hm.) – roztok demineralizované vody a polyvinylpyrrolidonu o hmotnostní koncentraci 1 %, PEG (1 % hm.) – roztok demineralizované vody a polyethylenglykolu o hmotnostní koncentraci 1 %.

Tabulka 8: Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou GAS

Označení vzorku	Objem DMSO	Navážka	Teplota pece	Teplota ventilu	Tlak	Dyn. mód	Stat. mód	Excipient
	V _{DMSO}	m	t _p	t _v	p	-	-	
	μl	g	°C	°C	bar	min	min	
GLYB05	500	0,0481	35	80	150	40	5	-
GLYB06	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYB07	-	-	-	-	-	-	-	-
GLYB08	1000	0,1001	35	80	150	40	5	DEMI
GLYB09	1000	0,1010	35	80	150	40	5	-
GLYB10	1000	0,1007	35	80	150	40	5	PVP (1 % hm.)
GLYB11	1000	0,1015	35	80	200	40	5	PVP (1 % hm.)
GLYB12	1000	0,1008	35	80	200	40	5	DEMI
GLYB13	1000	0,1011	35	80	200	40	5	-
GLYB14	1000	0,1006	40	80	150	40	5	DEMI
GLYB15	1000	0,1018	40	80	150	40	5	PVP (1 % hm.)
GLYB16	1000	0,1002	35	80	150	40	5	PEG (1 % hm.)
GLYB17	1000	0,1011	35	80	200	40	5	PEG (1 % hm.)
GLYB18	1000	0,1000	40	80	200	40	5	DEMI
GLYB19	1000	0,1000	40	80	200	40	5	PVP (1 % hm.)
GLYB20	1000	0,1003	40	80	150	40	5	PEG (1 % hm.)
GLYB21	1000	0,1000	40	80	200	40	5	PEG (1 % hm.)

Vzorky GLYB05, GLYB09 a GLYB013 nebyly odpuštěny do skleněné vialky s excipientem, ale došlo pouze k odpuštění roztoku z reakční patry (roztok dimethylsulfoxidu a léčivé látky glibenclamidu) do skleněné vialky. Následně byl vzorek přelit na Petriho misku, aby došlo k odpaření přebytečného organického rozpouštědla DMSO. Po odpaření DMSO nebylo vykrytalizovaných částic léčivé látky glibenclamidu dostatek, aby bylo možné dané částice analyzovat jakoukoliv metodou. Z tohoto důvodu již nedocházelo k přípravě dalších vzorků tímto způsobem. Taktéž v tabulce nejsou přítomny vzorky GLYB06 a GLYB07, protože tyto vzorky byly použity pouze pro testování rozpouštědel vhodných pro tuto metodu (zmněno v kapitole 3.8. Popis výběru vhodného rozpouštědla pro metodu GAS).

V následující tabulce (Tabulka 9) jsou uvedeny vzorky částic glibenclamidu vylouhovaných z analytické skelné vaty z extrakční patry. Číslo vzorků vylouhovaných částic léčivé látky glibenclamidu souhlasí s čísly odpuštěných vzorků částic léčivé látky glibenclamidu. Všechny vzorky částic léčiva (léčivé látky) glibenclamidu získané metodou GAS jsou znázorněny na obrázku 20.

Tabulka 9: Vzorky částic léčivé látky glibenclamidu vylouhovaných z analytické skelné vaty z extrakční patrony

Označení vzorku	Excipient
-	-
G.ZB.13	DEMI
G.ZB.14	DEMI
G.ZB.15	DEMI
G.ZB.16	DEMI
G.ZB.17	DEMI
G.ZB.18	DEMI
G.ZB.19	DEMI
G.ZB.20	DEMI
G.ZB.21	DEMI



Obrázek 20: Vzorky částic glibenclamidu získaných metodou GAS

3.15. Popis přípravy vzorku a analýzy velikosti a distribuce částic (PSD)

Analýza původního vzorku částic glibenclamidu probíhala mokrou cestou, tedy částice glibenclamidu byly rozptýleny v demineralizované vodě. Jelikož rozpustnost částic glibenclamidu v demineralizované vodě je velmi nízká ($4,00 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), neovlivňovala demineralizovaná voda výsledek dané analýzy.

Analýza připravených vzorků částic léčivé látky glibenclamidu metodou GAS, probíhala ve skleněné kyvetě, jelikož tyto vzorky byly ve svých excipientech (nebyly v práškovém stavu). Každý z vzorků byl připraven stejným způsobem. Vzorek byl

manuálně třepán po dobu 5 s, dále 5 až 10 s byl ponechán ve stabilní poloze a následně bylo odebráno 5 ml suspenze připraveného vzorku ze středu skleněné vialky. Odebrání vzorku bylo provedeno pomocí sterilizované injekční stříkačky. Následovalo provedení analýzy.

3.16. Popis přípravy vzorku a analýzy SEM

Všechny vzorky pro metodu SEM byly připraveny stejným postupem. Nejdříve byl uříznut potřebný kousek alobalu (cca 4 x 3 cm). Alobal byl použit z důvodu vodivosti, která je pro metodu SEM nezbytná. Poté byl kousek alobalu umístěn na laboratorní topnou desku, která byla nastavena na 80 °C. Tento kousek alobalu byl pomocí buničiny namočené v methanolu očištěn a připraven pro nanesení vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS.

Vzorek ve skleněné vialce byl manuálně třepán po dobu 5 sekund. Následně bylo ze středu vialky pomocí plastové injekční stříkačky s kovovým hrotem odebráno 0,5 ml vzorku. Poté byl vzorek postupně po kapkách nakapán na předem připravený kus alobalu. Vzorek glibenclamidu na kousku alobalu byl ponechán na laboratorní topné desce do okamžiku, dokud nedošlo k odpaření veškeré demineralizované vody.

Původní vzorek glibenclamidu byl v práškové podobě, proto bylo nutné jej připravit jako ostatní vzorky glibenclamidu, které byly získány metodou GAS. Do skleněné vialky bylo pomocí kovové lžičky umístěno potřebné množství původního vzorku glibenclamidu. Následně bylo do této vialky přidáno potřebné množství demineralizované vody. Poté byl vzorek připraven jako předchozí vzorky.

Takto připravené vzorky byly uzavřeny v Petriho misce, která byla zabalena do alobalu, aby vzorky nebyly vystaveny slunečnímu záření. Poslední úpravou před samotným měřením vzorků bylo jejich naprášení zlatem, aby se zvýšila vodivost daných vzorků, která je pro tuto metodu nezbytná.

3.17. Popis přípravy vzorku a analýzy FTIR

Všechny vzorky pro metodu FTIR byly připraveny stejným postupem. Ze skleněné vialky byl odebrán příslušný objem vzorku, který byl nakápnut na diamantový ATR nástavec (technika zeslabené úplné reflektance). Výsledky byly upraveny pomocí

počítačového softwaru OMNIC. Spektra byly měřeny v rozsahu 400 až 4000 cm^{-1} (vlnočty) a byly upraveny pomocí ATR korekce (automaticky srovnána baseline = pozadí a odstranění pásů odpovídajících přítomnosti CO_2). Spektrum původního vzorku glibenclamidu bylo naměřeno s pozadím vzduchu. Následující spektra vzorků částic léčiva glibenclamidu, připravených metodou GAS, byly měřeny s pozadím vzduchu a následně s pozadím jednotlivých excipientů.

3.18. Popis přípravy vzorku a analýzy XRD

Vzorek částic původního glibenclamidu (GLYBP) byl nanesen na speciální sklíčko pro metodu XRD. Vzorek částic glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB12) byl nakápnut na speciální sklíčko pro metodu XRD a následně došlo k vysušení veškerého excipientu (demineralizované vody).

Měření vzorku probíhalo v rozmezí úhlu 2θ od 2° do 50° . Rentgenová energie mědi (K- α) je velmi často používána v laboratorních podmínkách.

3.19. Popis přípravy vzorku a testu rozpustnosti (UPLC/DAD)

Pro test rozpustnosti bylo potřebné dosáhnout podmínek, které odpovídaly podmínkám v organismu. Jednalo se o pH a teplotu trávicího traktu, kde dochází k rozpouštění a vstřebávání léčivé látky glibenclamidu. Z tohoto důvodu byl připraven fosfátový pufr (pH = 6,5).

Nejdříve bylo naváženo na analytických vahách pomocí keramické lodičky 1,75 g difosforečnanu draselného. Následně bylo pomocí odměrného válce do kádinky o objemu 1 l odměřeno 800 ml demineralizované vody. Pomocí 100 ml demineralizované vody bylo 1,75 g difosforečnanu draselného kvantitativně převedeno do kádinky. Následně došlo k dokonalému promíchání roztoku pomocí skleněné tyčinky. Poté byla upravena hodnota pH roztoku pomocí roztoku hydroxidu draselného ($c = 1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) na hodnotu pH 6,5 (hodnota pH byla měřena pomocí pH metru). Upravený roztok byl přelit do odměrné baňky o objemu 1 l a odměrná baňka byla dolita po rysku. Roztok byl homogenizován a přefiltrován pomocí zařízení na vakuovou filtraci (filtr Millipore s velikostí pórů 0,45 μm). Takto upravený pufr byl připraven pro test rozpustnosti.

Následně byla připravena mobilní fáze pro vysoce výkonnou kapalinovou chromatografii. Příprava mobilní fáze byla provedena stejně jako příprava fosfátového pufru. Po stejné přípravě fosfátového pufru bylo odměřeno pomocí odměrného válce (objem 500 ml) 650 ml tohoto pufru. Následně byl tento objem fosfátového pufru přelit do reagenční lahve. Poté bylo k tomuto pufru přidáno pomocí odměrného válce (objem 500 ml) 350 ml acetonitrilu. Roztok byl dokonale homogenizován a umístěn do lednice.

Nejdříve bylo připraveno 7 skleněných vialek. Do každé vialky bylo odměřeno pomocí odměrného válce (objem 10 ml) 10 ml fosfátového pufru. Následně byly vialky řádně označeny a vloženy do vodní lázně. Tato vodní lázeň s vialkami byla vložena do biologického termostatu, jehož teplota byla nastavena na 36 °C. Následně bylo vyčkáno 45 minut, aby došlo k ohřátí připravených vialek s fosfátovým pufrům. Poté byly vialky vyjmuty z termostatu a proběhla příprava vzorků glibenclamidu pro test rozpustnosti dle následující tabulky (Tabulka 10). Vzorek GLYBP je vzorek původní vzorku glibenclamidu, který byl připraven jinak, než ostatní vzorku glibenclamidu získané metodou GAS. Potřebné množství glibenclamidu bylo pomocí kovové lžičky přidáno k 10 ml fosfátového pufru. Ostatní vzorky glibenclamidu byly vždy před odebráním mechanicky třepány po dobu 1 sekundy a až poté bylo odebráno 5 µl tohoto vzorku (vzorek byl přidáván postupně, aby bylo možné zjistit, kdy již nedochází k rozpouštění částic glibenclamidu ve fosfátovém pufru). Po přípravě všech vzorků byly opět vzorky ve vodní lázni vloženy do biologického termostatu, kde byly při teplotě 36 °C ponechány 24 hodin.

Tabulka 10: Tabulka přípravy vzorku glibenclamidu pro test rozpustnosti

Označení vzorku	Objem fosfátového pufru	Objem přidaného vzorku	Teplota hotových vzorků
-	ml	µl	°C
GLYBP	10	-	36
GLYB12	10	20	36
GLYB15	10	20	36
GLYB17	10	20	36
GLYB19	10	20	36
G.ZB.13	10	20	36
G.ZB.15	10	20	36

Po uplynutí 24 hodin byly postupně všechny vzorky přefiltrovány přes filtry firmy Labicom (velikost pórů byla 0,22 µm). Následně bylo postupně z každého vzorku

odebráno 650 μl přefiltrovaného vzorku do nové skleněné vialky o objem 2 ml. Poté bylo do každé vialky přidáno 350 μl acetonitrilu.

Takto připravené vzorky byly následně změřeny pomocí UPLC (vysoce výkonné kapalinové chromatografie) s detektorem diodového pole. Analýza byla provedena na přístroji Acquity I-Class firmy Waters, byla použita kolona C18, 1,7 μm ACQUITY UPLC BEH CLB (délka kolony: 100 mm, průměr kolony: 2,1 mm). Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml za minutu v isokratickém režimu s délkou analýzy 4 minuty. Teplota systému byla udržována při konstantní teplotě 40 °C. Detekce byla provedena v rozpětí vlnových délek 190 nm až 700 nm. Maximum pro glibenclamid bylo nalezeno při 198 nm. Standard pro tuto metodu byl připraven z původního glibenclamidu a jeho koncentrace byla 79 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (ppm).

3.20. Použité metody charakterizace

V následujícím odstavci jsou vyjmenovány metody charakterizace, které byly použity pro popis připravených částic léčivé látky glibenclamidu superkritickou technologií, přesněji řečeno metodou GAS.

Analýza velikosti a distribuce částic (PSD – particle size distribution) byla provedena pomocí přístroje HORIBA Nanopartica SZ-100. Výsledky z této metody byly využity pro výběr vhodných (o nejmenší velikosti) vzorků připravených částic glibenclamidu pro následující metody.

Metoda SEM (skenovací elektronová mikroskopie) je metoda, která umožňuje charakterizovat velikost a morfologii připravených částic vzorků glibenclamidu. Metoda byla provedena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Quanta 450. Metoda byla provedena jako druhá v pořadí a díky jejím výsledkům je možné vyhodnotit, jak přesné bylo stanovení velikostí a distribuce částic vzorků glibenclamidu pomocí PSD.

Metoda FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) je metoda, která umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu (identifikace anorganických a organických látek). Metoda je založena na absorpci infračerveného záření molekulami látek. Energie infračerveného záření nestačí na změny elektronových stavů, proto způsobuje pouze změny vibračních a rotačních stavů molekul.

Metoda XRD (XRD – X-Ray diffraction, rentgenová difrakční analýza) slouží pro určení krystalových rozměrů a tvarů. Metoda se především pro určení krystalové mřížky. Základem metody je sledování difrakce na vzorcích, pomocí které lze vyhodnotit, zda se jedná o krystalickou nebo amorfni látku.

Metoda rozpustnosti (test rozpustnosti) je metoda, která napodobuje prostředí trávicího traktu (teplotou, pH), kde dochází k největšímu rozpouštění a vstřebání dané léčivé látky. Následně dochází k vyhodnocení daných hodnot rozpustnosti pomocí kapalinové chromatografie (naměření koncentrací rozpustnosti dané léčivé látky).

Test PAMPA je metoda, která je založená na laboratorní simulaci permeability léčivé látky přes umělou biologickou membránu. Podmínky testu (teplota, pH) jsou nastaveny jako podmínky části organismu, kde dochází k vstřebání dané léčivé látky. Poté dochází k vyhodnocení daných hodnot permeability pomocí kapalinové chromatografie.

Následující tabulka (Tabulka 11) ukazuje rozpis vzorků částic glibenclamidu, které byly testovány a jakými metodami byly testovány.

Tabulka 11: Tabulka vzorků částic léčivé látky glibenclamidu, které byly analyzovány příslušnými metodami

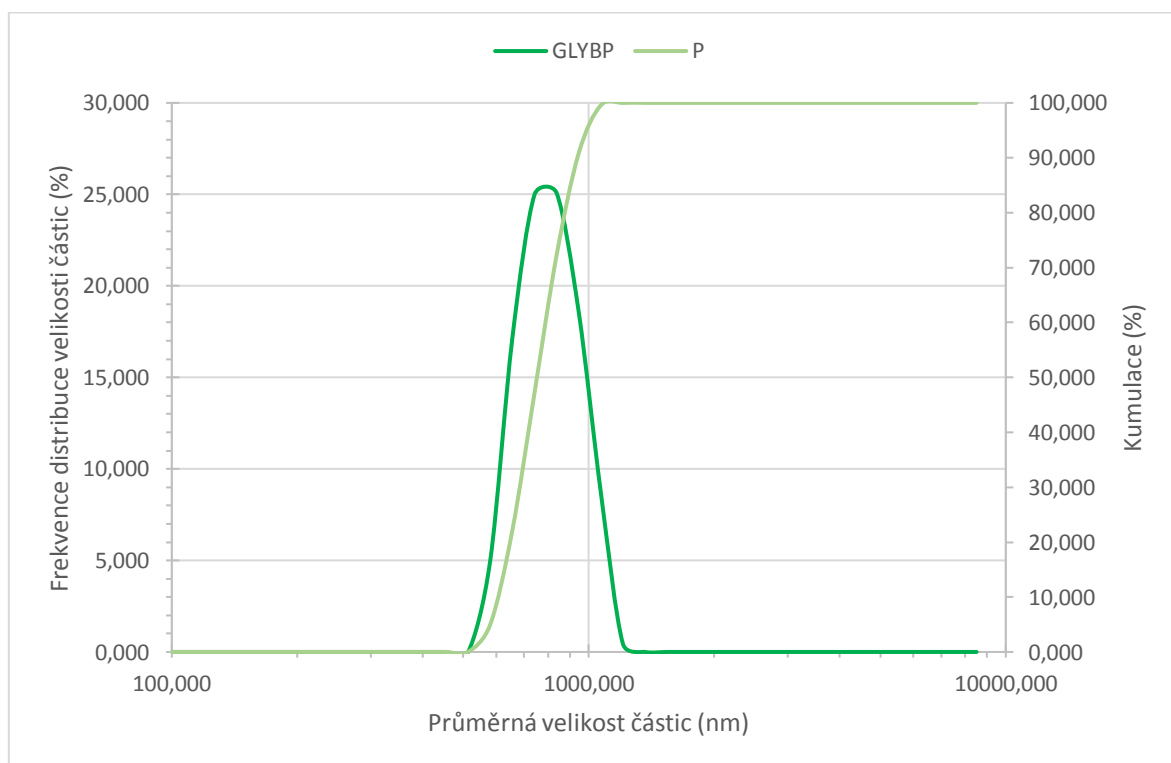
Označení vzorku	Metody charakterizace					
	PSD	SEM	FTIR	XRD	Rozpustnost	Propustnost
-						
GLYBP	ano	ano	ano	ano	ano	-
GLYB05	ne	ne	ne	ne	ne	-
GLYB08	ne	ne	ne	ne	ne	-
GLYB09	ne	ne	ne	ne	ne	-
GLYB10	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB11	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB12	ano	ano	ano	ano	ano	-
GLYB13	ne	ne	ne	ne	ne	-
G.ZB.13	ano	ano	ano	ne	ano	-
GLYB14	ne	ne	ne	ne	ne	-
G.ZB.14	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB15	ano	ano	ano	ne	ano	-
G.ZB.15	ano	ano	ano	ne	ano	-
GLYB16	ne	ne	ne	ne	ne	-
G.ZB.16	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB17	ano	ano	ano	ne	ano	-
G.ZB.17	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB18	ne	ne	ne	ne	ne	-
G.ZB.18	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB19	ano	ano	ano	ne	ano	-
G.ZB.19	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB20	ano	ne	ne	ne	ne	-
G.ZB.20	ano	ne	ne	ne	ne	-
GLYB21	ano	ne	ne	ne	ne	-
G.ZB.21	ano	ne	ne	ne	ne	-

4. Výsledky a diskuze

V této části bakalářské práce jsou uvedeny veškeré výsledky všech metod, které byly získány v rámci bakalářské práce pro popis připravených částic glibenclamidu metodou GAS.

4.1. Analýza velikosti a distribuce částic (PSD)

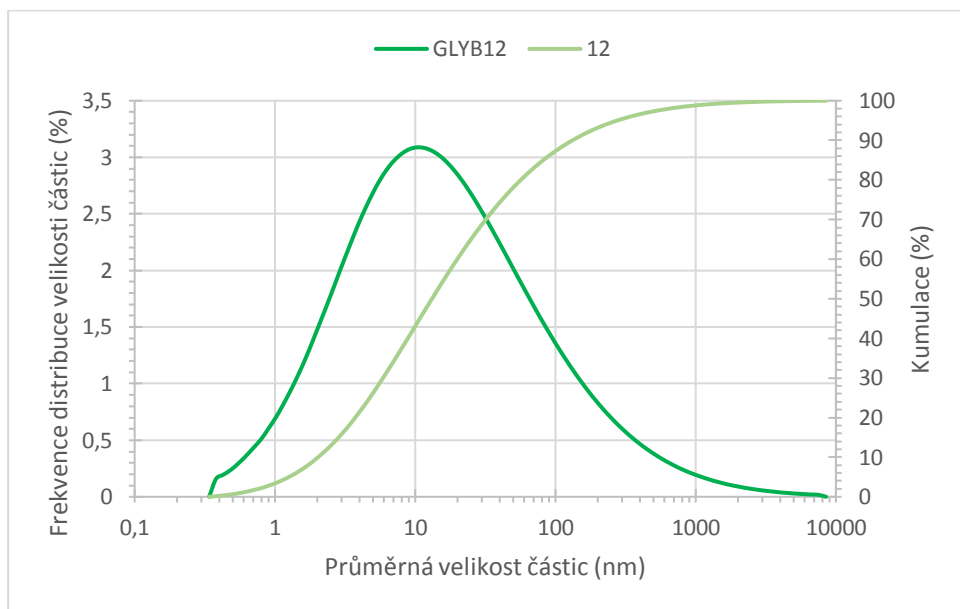
Výsledky měření velikosti částic vzorků glibenclamidu byly vyhodnoceny z hlediska číselných hodnot pomocí dvou velikostních parametrů d_{mean} a d_{mode} (Tabulka 12) a pomocí grafického vyjádření distribuce velikosti částic (Obrázek 21 až 29). Hodnota d_{mean} vyjadřuje průměrnou velikost částic původního vzorku glibenclamidu, která je vztažená na celý objem vzorku. Hodnota d_{mode} vyjadřuje nejčastěji se vyskytující průměrnou velikost částic vzorku glibenclamidu. Výsledky měření distribuce částic vzorků glibenclamidu jsou vyobrazeny pomocí frekvenční a kumulativní křivky.



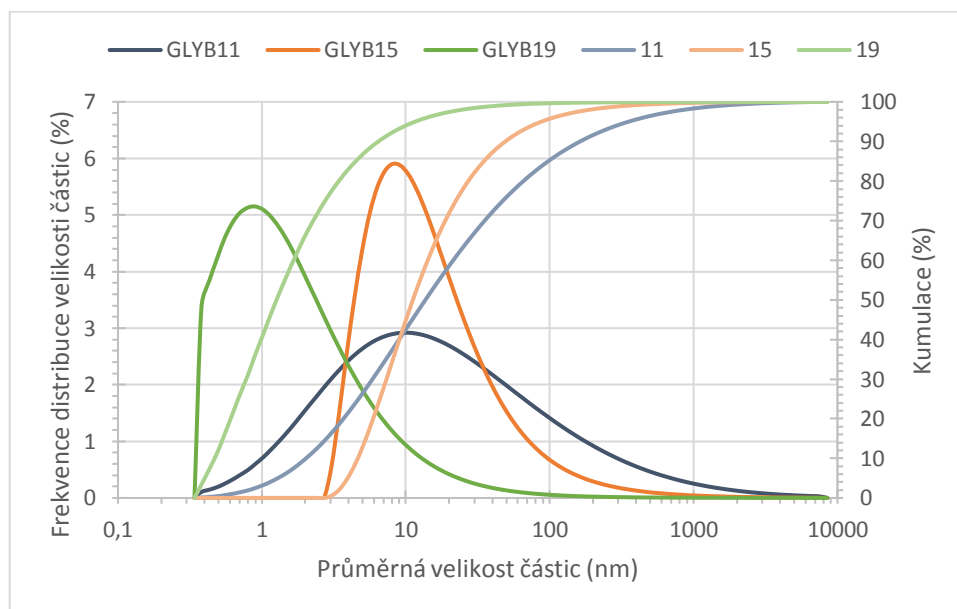
Obrázek 21: Logaritmičká distribuce velikosti částic (DVC) původního (výchozího) vzorku glibenclamidu

Obrázek 21 znázorňuje distribuci částic původního (výchozího) vzorku glibenclamidu, vykazující monomodální charakter s částicemi v intervalu hodnot 580,41 až 1068,52 nm. Původní vzorek vykazoval průměrné hodnoty d_{mean} (763,1 nm) a d_{mode} (775,3 nm).

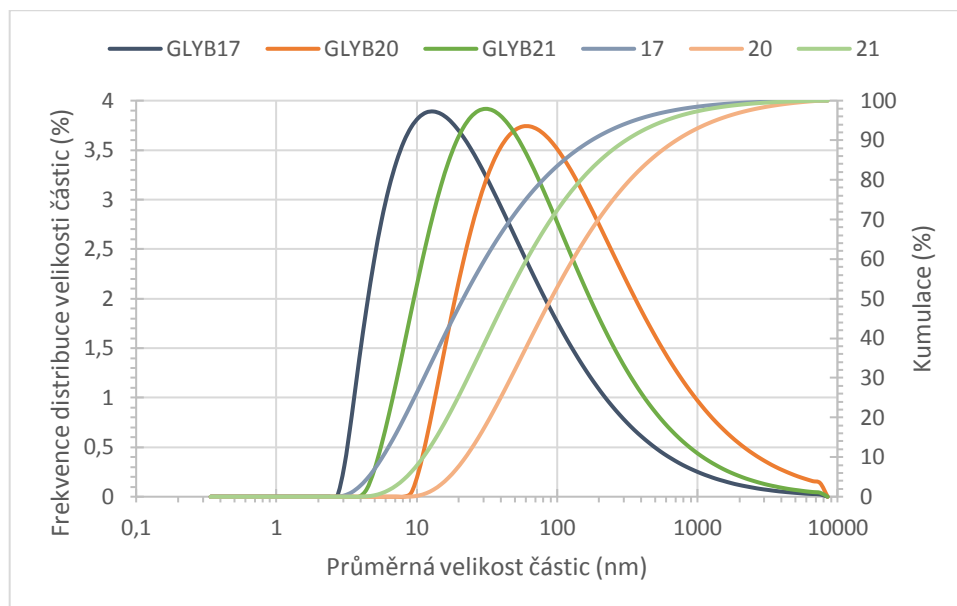
Následující obrázky (22-29) jsou výsledky připravených vzorků částic léčivé látky glibenclamidu metodou GAS. U některých vzorků částic glibenclamidu (Obrázek 25 křivky G.ZB.13 a G.ZB.14, Obrázek 26 křivka G.ZB.18) je patrné, že došlo k vytvoření bimodální křivky a z tohoto důvodu jsou v tabulce (Tabulka 12) uvedeny dvě hodnoty d_{mode} a d_{mean} pro jeden vzorek částic glibenclamidu.



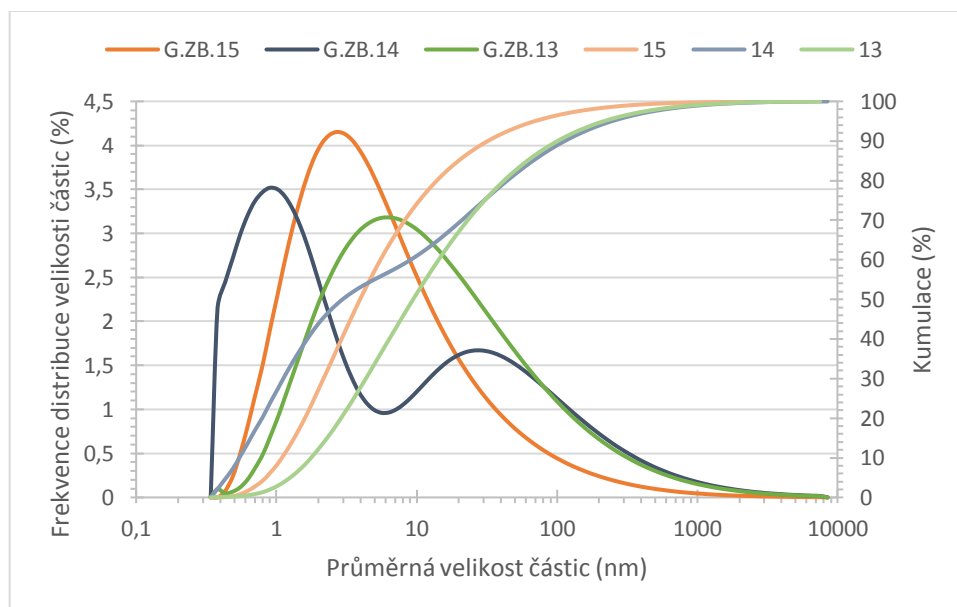
Obrázek 22: Logaritmičká distribuce velikosti částic vzorku GLYB12



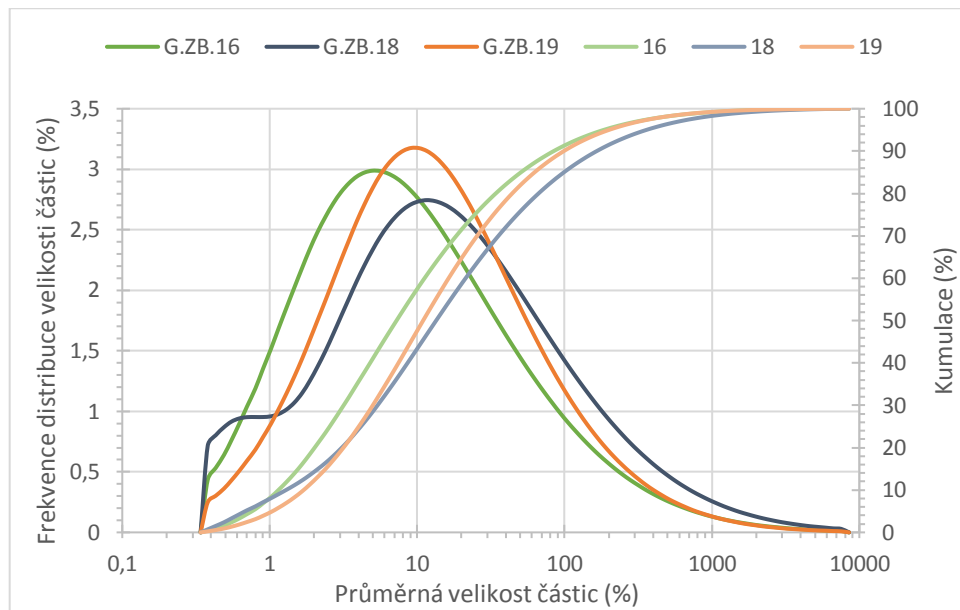
Obrázek 23: Logaritmičká distribuce velikosti částic vzorků GLYB11, GLYB15, GLYB19 (PVP 1 % hm.)



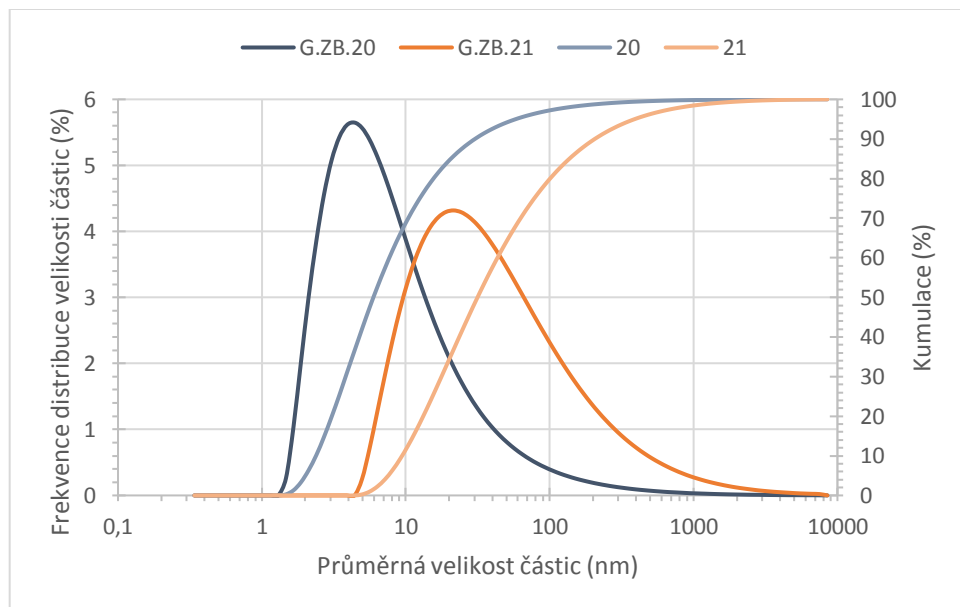
Obrázek 24: Logaritmičká distribuce velikosti částic vzorků GLYB17, GLYB20, GLYB21 (PEG 1 % hm.)



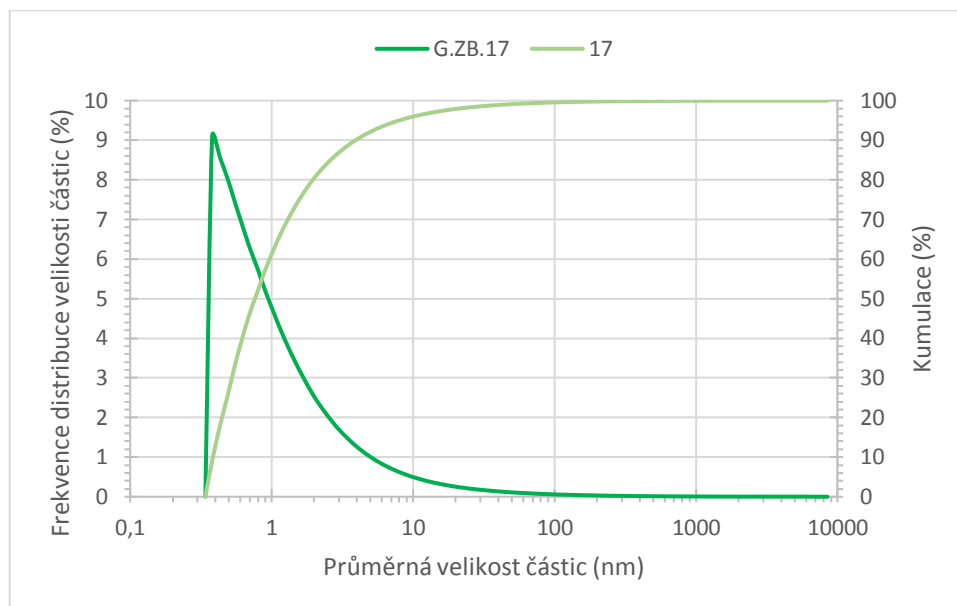
Obrázek 25: Logaritmičká distribuce velikosti částic vzorků GLYB13, GLYB14, GLYB15 (DEMI)



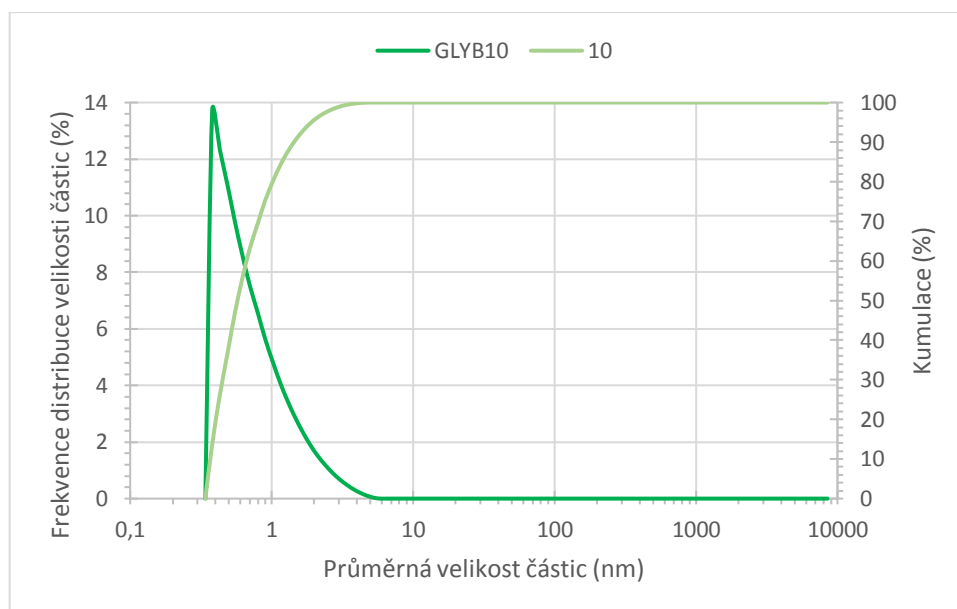
Obrázek 26: Logaritmičká distribuce velikosti částic vzorků G.LYB16, G.LYB18, G.LYB19 (DEMI)



Obrázek 27: Logaritmičká distribuce velikosti částic vzorků G.LYB20, G.LYB21 (DEMI)



Obrázek 28: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorku G.ZB.17 (DEMI)



Obrázek 29: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorku GLYB10 (PVP 1 % hm.)

Grafy na Obrázcích 28 a 29 mají zcela odlišný průběh křivek než grafy předchozí (Obrázek 21 až 27). Jelikož tento průběh není typický pro tuto metodu, nebyly tyto výsledky považovány za zcela přesné a nebyly dále hodnoceny.

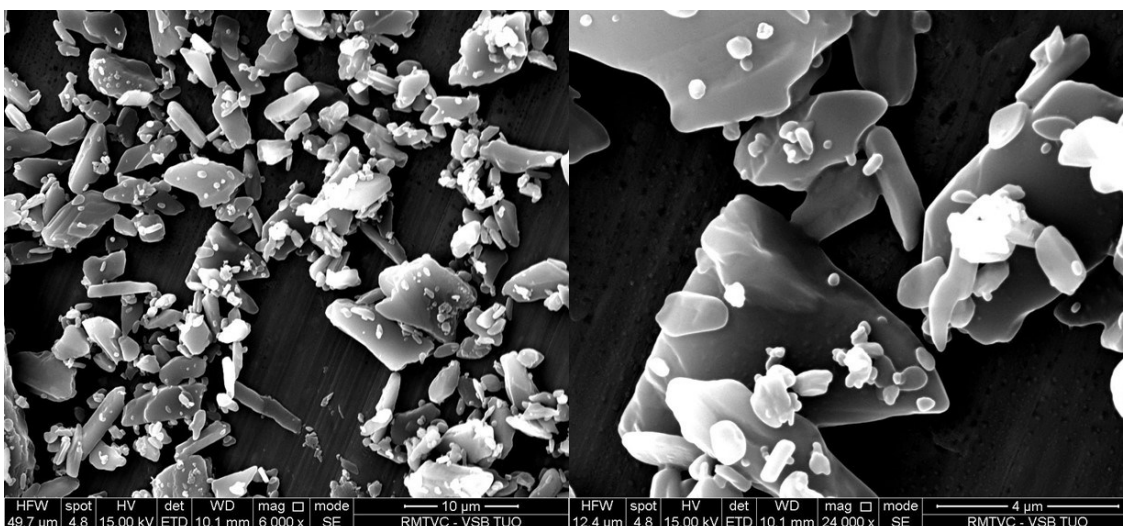
Tabulka 12: Naměřené hodnoty velikostí částic (d_{mean} , d_{mode}) připravených vzorků částic glibenclamidu připravených metodou GAS a původní vzorek glibenclamidu

Označení vzorku	d_{mean}	d_{mode}	Charakter křivky DVC
-	nm	nm	-
GLYBP	763,1	775,3	monomodální
GLYB10	0,8	0,4	monomodální
GLYB11	91,2	9,7	monomodální
GLYB12	74	9,7	monomodální
G.ZB.13	0,4 59,8	0,4 6,0	bimodální
G.ZB.14	1,4 139,9	0,8 25,8	bimodální
GLYB15	31,1	7,6	monomodální
G.ZB.15	22,7	2,5	monomodální
G.ZB.16	51,8	4,7	monomodální
GLYB17	93,5	12,4	monomodální
G.ZB.17	-	-	-
G.ZB.18	0,5 98,1	0,7 11,0	bimodální
GLYB19	4,4	0,8	monomodální
G.ZB.19	55,5	8,6	monomodální
GLYB20	312,7	60,6	monomodální
G.ZB.20	20,7	4,1	monomodální
GLYB21	154,2	29,2	monomodální
G.ZB.21	107,0	20,2	monomodální

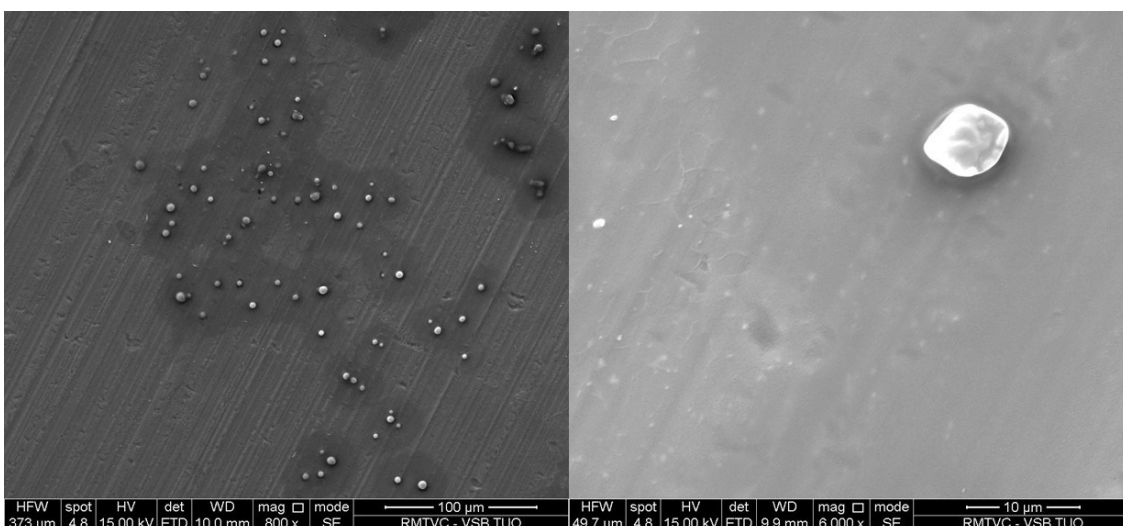
Z výsledků uvedených v tabulce 12 lze vyhodnotit, že oproti původnímu vzorku částic léčiva glibenclamidu došlo ke zmenšení částic všech vzorků glibenclamidu získaných metodou GAS. Velmi dobrých výsledků průměrných velikostí bylo dosaženo u vzorků částic glibenclamidu (GLYB10, GLYB11, GLYB15 a GLYB19), které byly v excipientu PVP (1 % hm.). Naopak u vzorků částic glibenclamidu (GLYB16, GLYB17, GLYB20 a GLYB21), které byly v excipientu PEG (1 % hm.) bylo dosaženo horších výsledků průměrných velikostí částic. Excipient PVP (1 % hm.) se ukázal jako vhodný excipient pro analýzu distribuce a velikosti částic glibenclamidu.

4.2. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

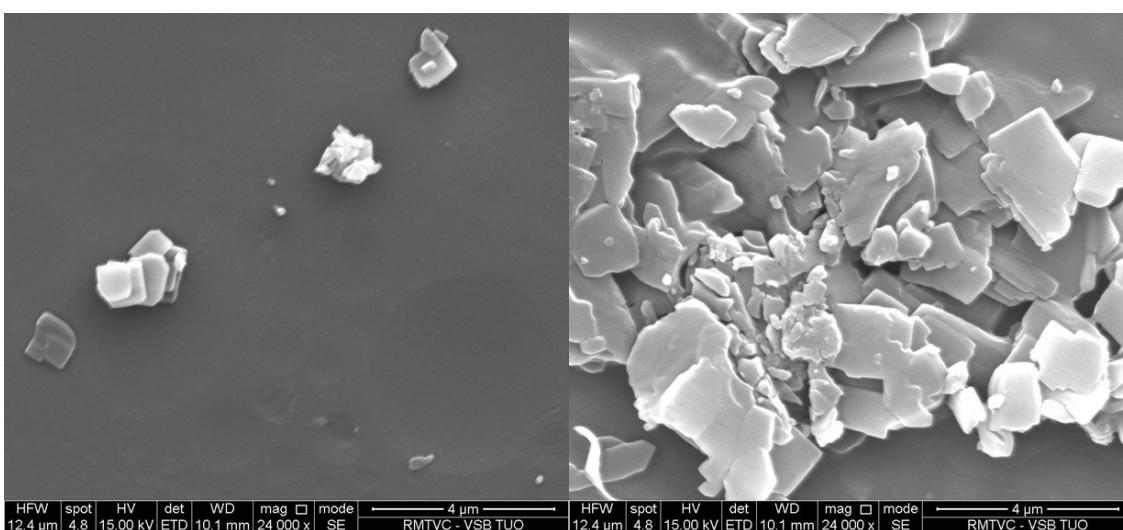
Na následujících snímcích (Obrázek 30 až 36) lze vidět částice původního vzorku a dále připravených vzorků glibenclamidu metodou GAS. Na snímcích je viditelná morfologie, tvar ale i velikost částic glibenclamidu.



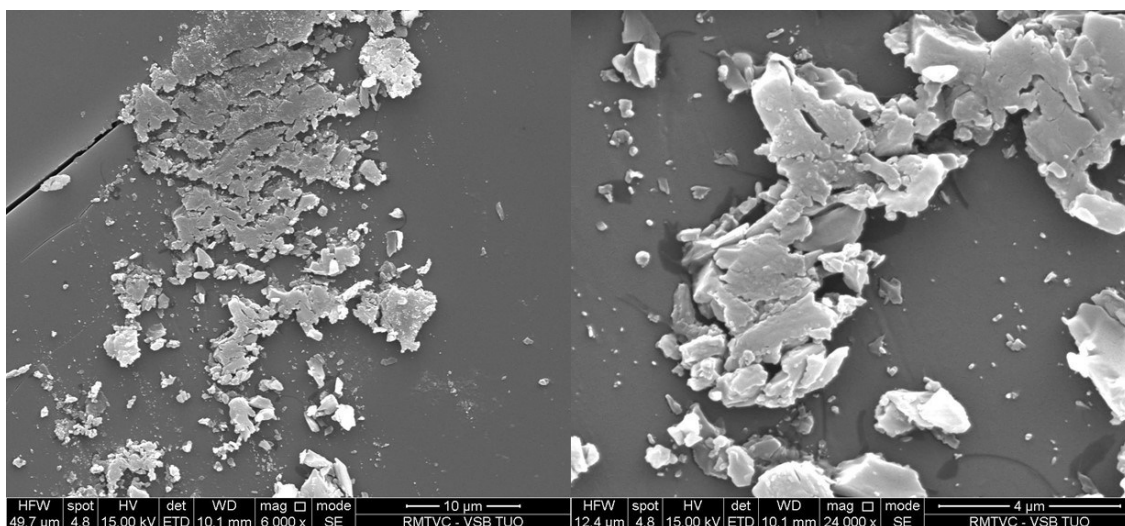
Obrázek 30: Snímky původního vzorku glibenclamidu (GLYBP)



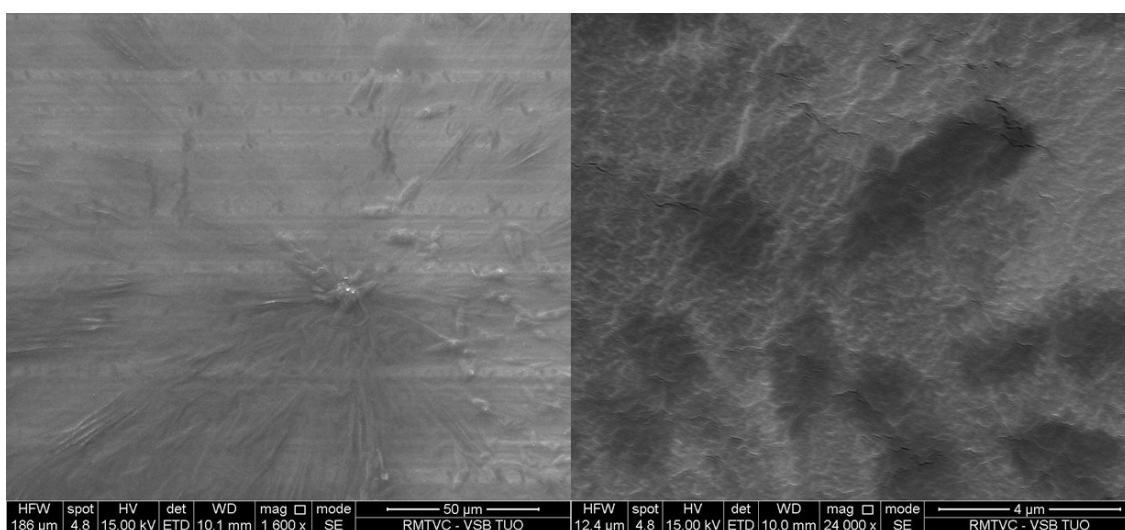
Obrázek 31: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB12)



Obrázek 32: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB15)

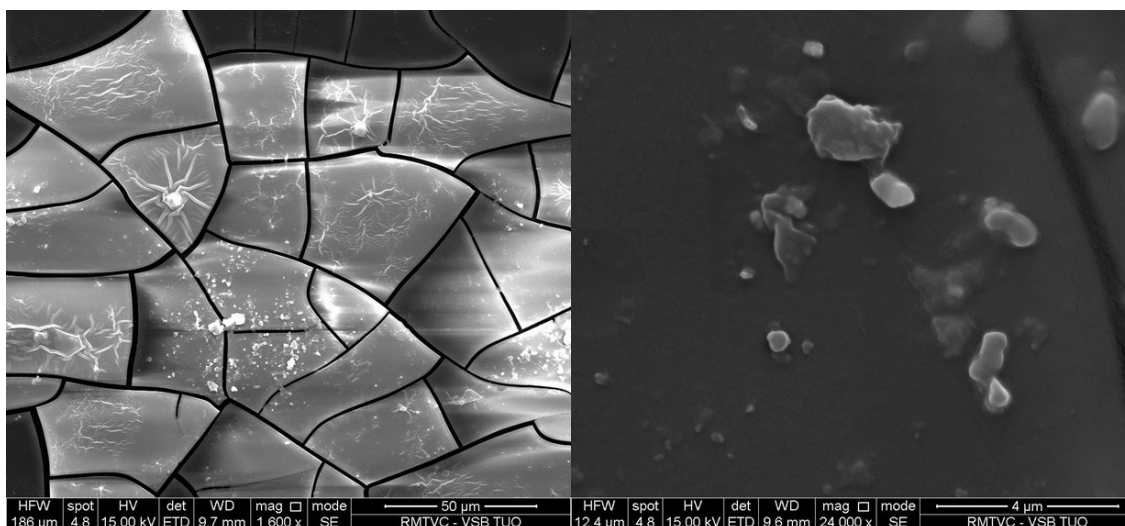


Obrázek 33: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (G.ZB.15)

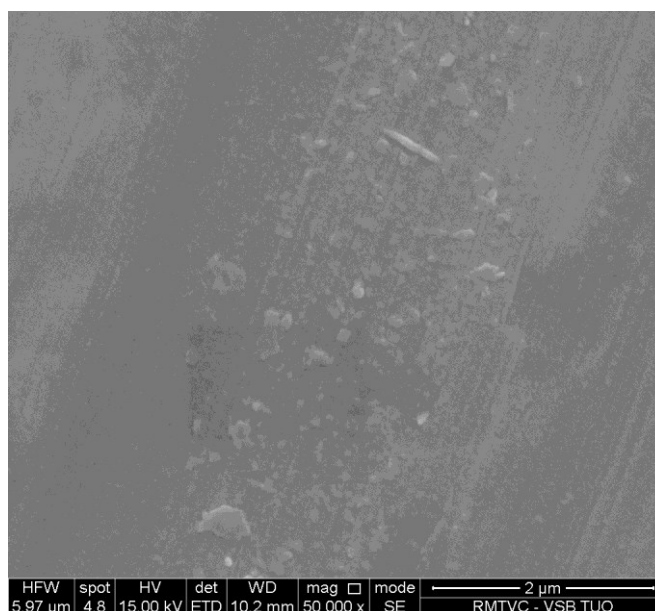


Obrázek 34: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB17)

Na obrázku 34 vzorku GLYB17 je viditelná vrstva excipientu PEG (1 % hm.) s určitými poruchami. Po zvětšení snímku však nejsou viditelné žádné ohraničené částice léčivé látky glibenclamidu.



Obrázek 35: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB19)



Obrázek 36: Snímek vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (G.ZB.13)

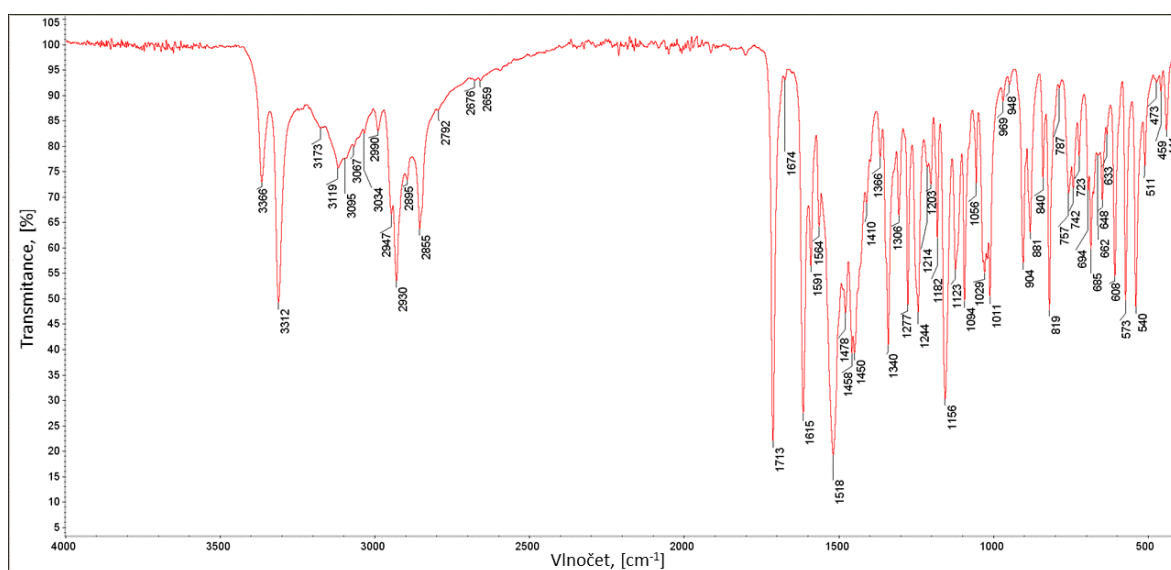
Obrázek 36 vzorku G.ZB.13 je prezentován pouze jedním snímkem, protože na ostatních pořízených snímcích nebyly částice léčivé látky glibenclamidu viditelné. Z předchozích snímků (Obrázek 30 až 36) je patrné, že velikosti částic zcela neodpovídají hodnotám zjištěným v předchozí PSD analýze. Rozdíly mohly být způsobeny jiným objemem, který byl použit k analýze (nemuselo dojít k odebrání nejmenších částic vzorku) a rovněž rozdílnou přípravou vzorků, kdy pro analýzu SEM byly vzorky vysušeny.

Částice původního vzorku glibenclamidu vykazovaly velikost v rozpětí od 0,5 µm do 10 µm. Tyto parametry jsou odhadovány pomocí měřítka na daném obrázku (Obrázek 30). Z obrázku je taktéž patrné, že velikosti částic dosahují různých rozměrů a je možné, že se zde nacházejí i částice odpovídající výsledkům analýzy PSD. Obrázky 31 až 36 znázorňují částice glibenclamidu získané metodou GAS. Uvedené obrázky potvrdily, že došlo ke

snížení velikosti částic glibenclamidu oproti původnímu vzorku. Z obrázků rovněž vyplynulo, že morfologie částic se příliš neměnila, vznikaly převážně částice ve tvaru tenkých destiček s nepravidelnými okraji.

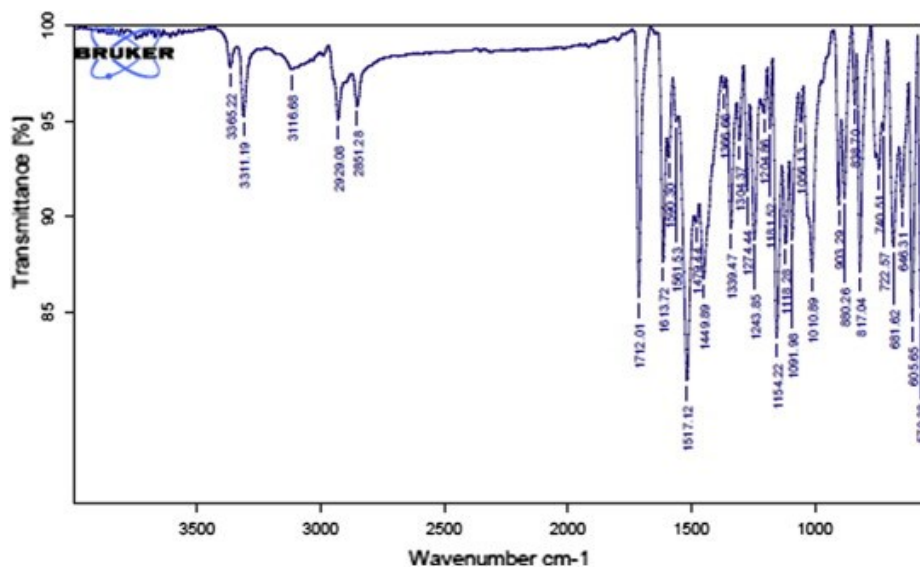
4.3. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)

Spektrum původního vzorku glibenclamidu (Obrázek 37) bylo naměřeno s pozadím vzduchu. Následující spektra (Obrázek 39 až 48) byla měřena s pozadím vzduchu a následně s pozadím jednotlivých excipientů.

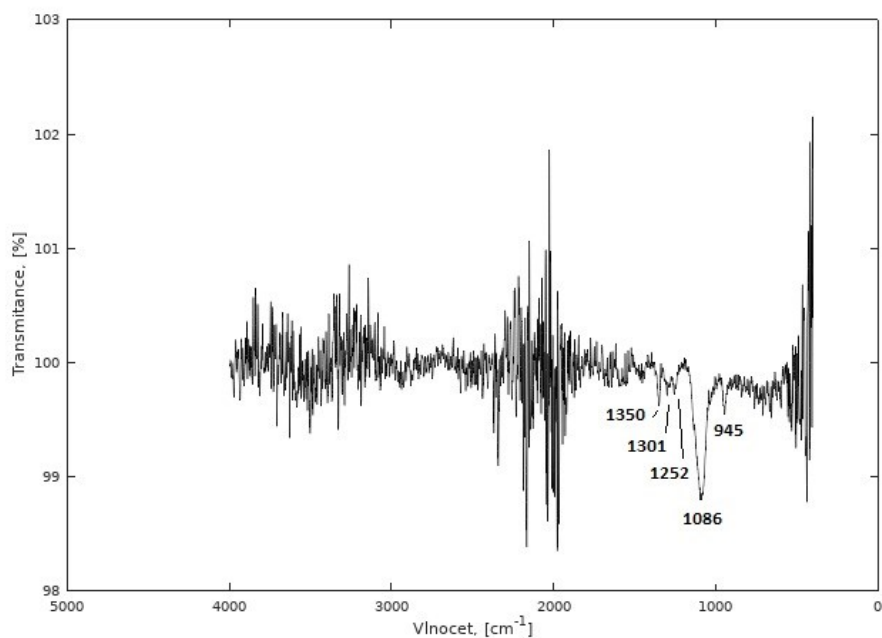


Obrázek 37: Spektrum původního vzorku glibenclamidu (GLYBP)

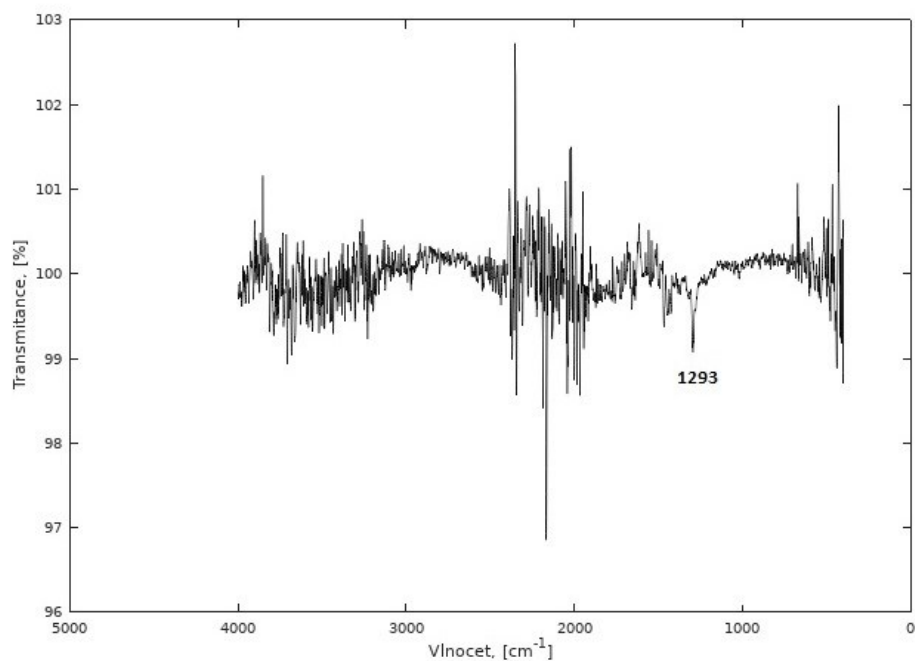
Na záznamu FTIR spektra původního vzorku glibenclamidu (GLYBP) (Obrázek 37) lze identifikovat nejdůležitější absorpční pásy: 3312 cm^{-1} (N-H), 2930 cm^{-1} (C-H), 2855 cm^{-1} (O-H), 1450 cm^{-1} a 1518 cm^{-1} (N=O), 1156 cm^{-1} (C-N) a 1011 cm^{-1} (C-O) [32]. Tyto pásy jsou taktéž patrné, pouze s drobnými odchylkami, na následujícím spektru (Obrázek 38) převzatého z odborné literatury týkající se částic léčivé látky glibenclamidu [32].



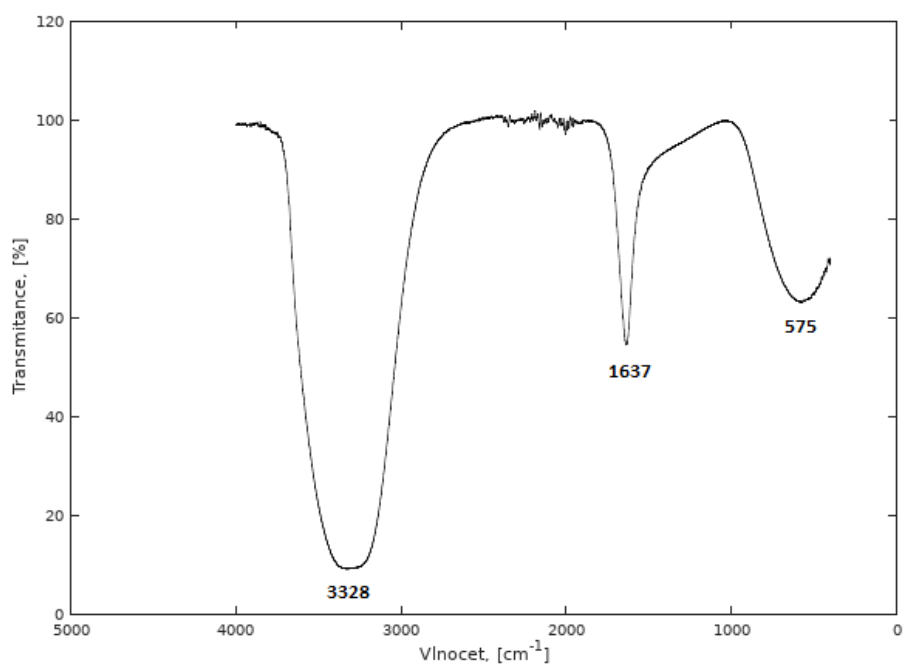
Obrázek 38: Spektrum částic léčivé látky glibenclamidu [32]



Obrázek 39: Spektrum roztoku polyethylenglykolu a demineralizované vody (1 % hm.) (pozadí: demineralizovaná voda)

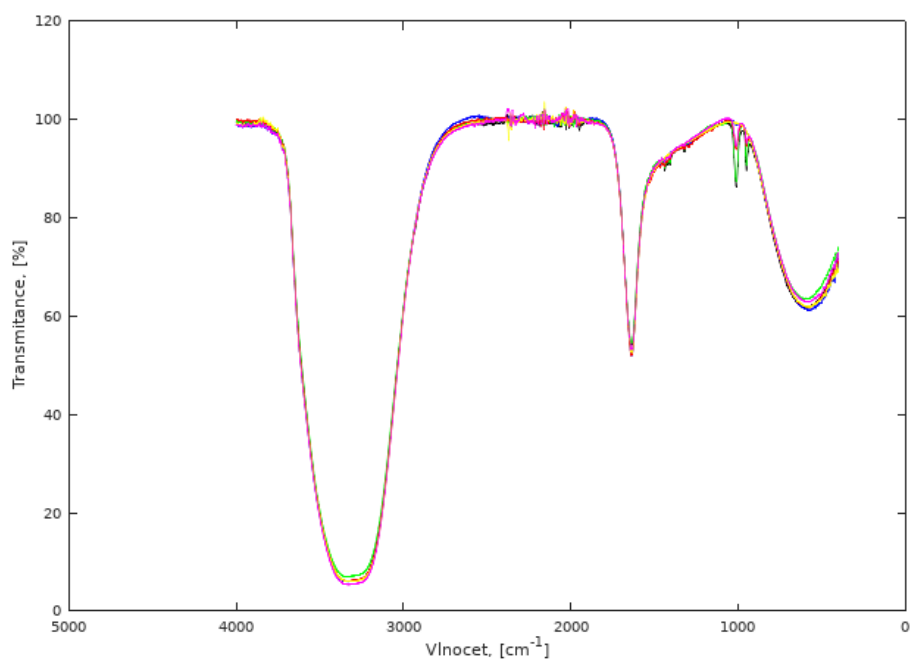


Obrázek 40: Spektrum roztoku polyvinylpyrrolidonu a demineralizované vody (1 % hm.) (pozadí: demineralizovaná voda)



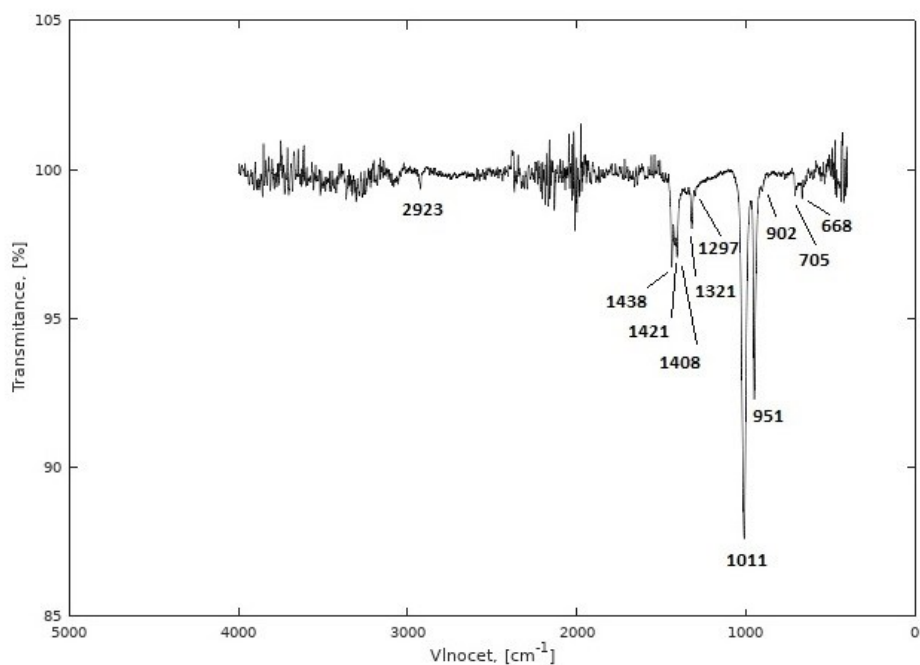
Obrázek 41: Spektrum demineralizované vody (DEMI) (pozadí: vzduch)

Předchozí záznamy FTIR spekter (Obrázek 39 až 41) jsou spektra excipientů, které byly v této práci použity. Tato spektra byla následně použita pro odečet pozadí pro měřené vzorky.

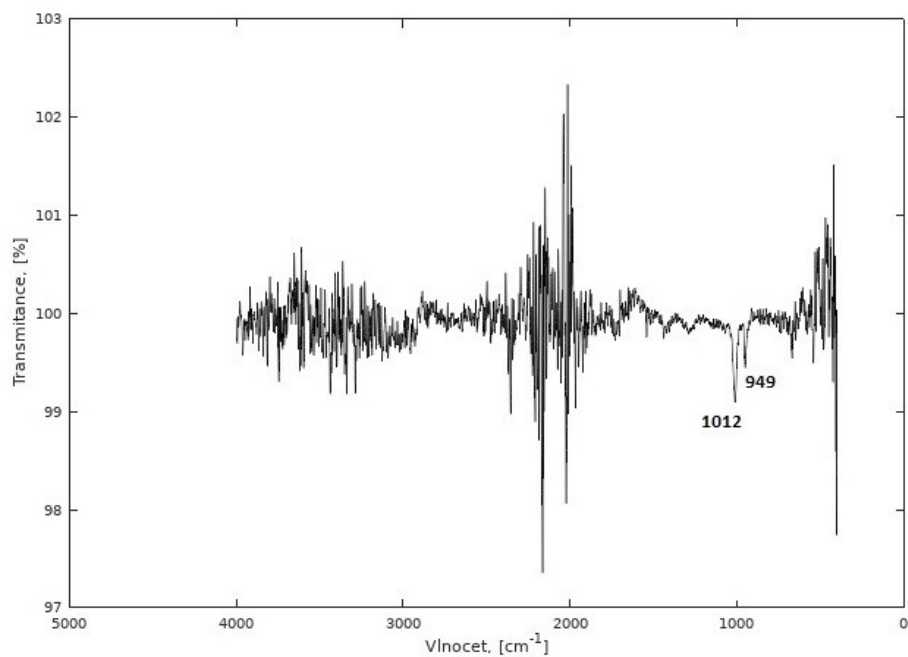


Obrázek 42: Spektrum vzorků glibenclamidu získaných metodou GAS (GLYB12, GLYB15, GLYB17, GLYB19, GZB13, GZB15) (pozadí: vzduch)

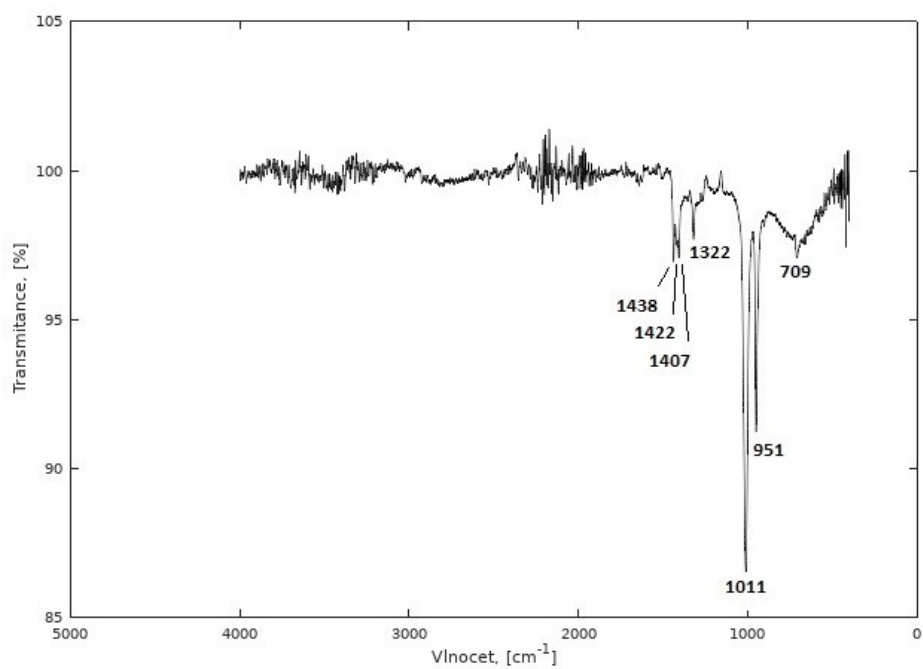
Předchozí spektrum (Obrázek 42) znázorňuje všechny vzorky získané metodou GAS. Z obrázku je zřejmé, že všechny vzorky mají velmi podobná FTIR spektra, až na odchylky v okolí vlnočtu 1000 cm^{-1} .



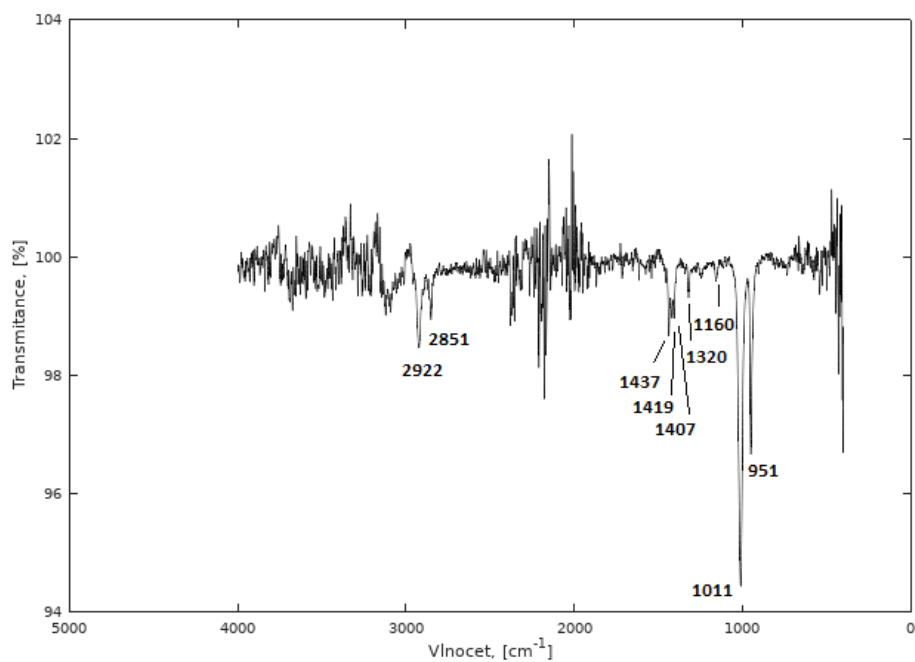
Obrázek 43: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB12 (pozadí: demineralizovaná voda)



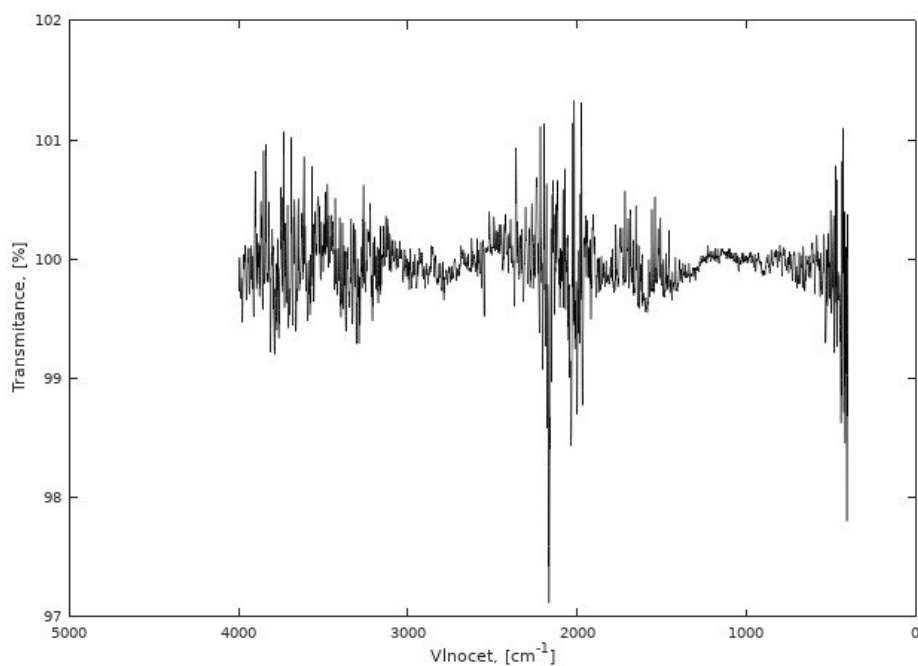
Obrázek 44: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB15 (pozadí: PVP (1 % hm.))



Obrázek 45: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB17 (pozadí: PEG (1 % hm.))

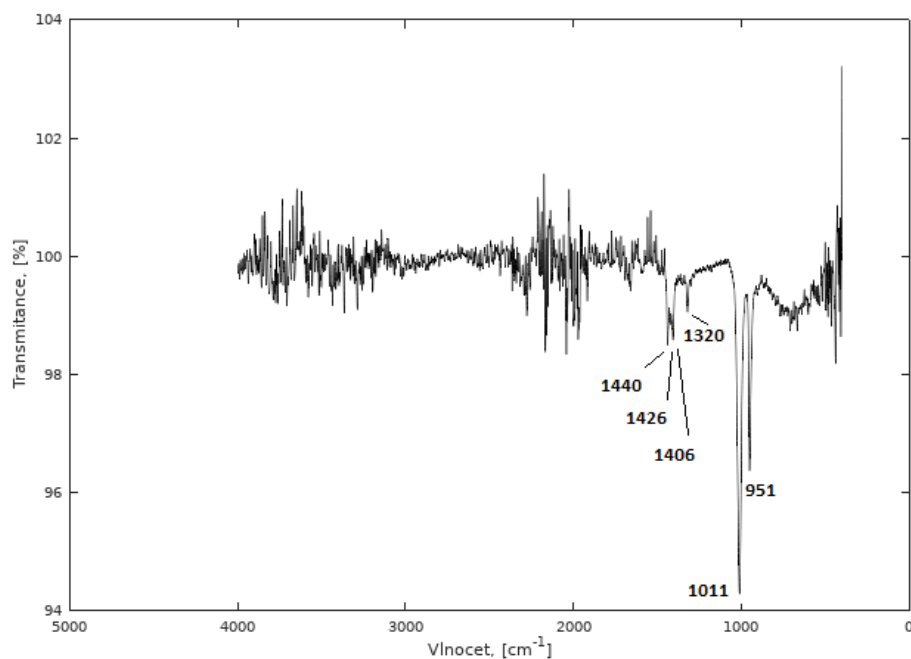


Obrázek 46: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB19 (pozadí: PVP (1 % hm.))



Obrázek 47: Spektrum vzorku glibenclamidu G.ZB.13 (pozadí: demineralizovaná voda)

Na Obrázku 47 je znázorněno spektrum vzorku G.ZB.13, které neobsahuje žádný absorpční pás odpovídající spektru glibenclamidu. Z tohoto důvodu je možné se domnívat, že množství analyzovaného vzorku se nacházelo pod mezí detekce (v objemu vzorku se nenacházelo dostatečné množství částic).

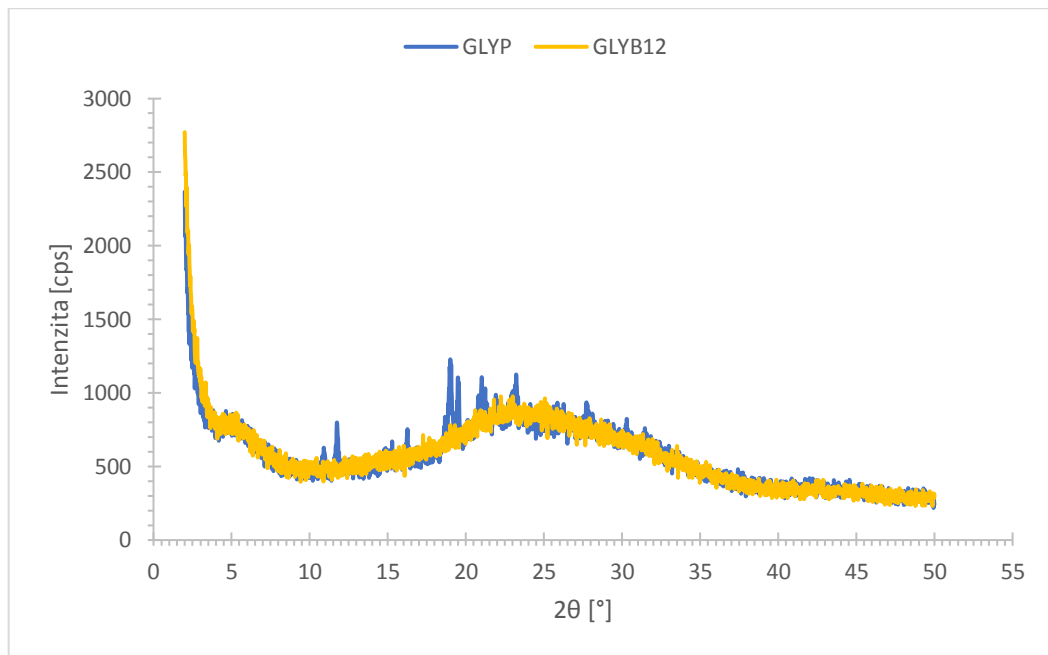


Obrázek 48: Spektrum vzorku glibenclamidu G.ZB.15 (pozadí: demineralizovaná voda)

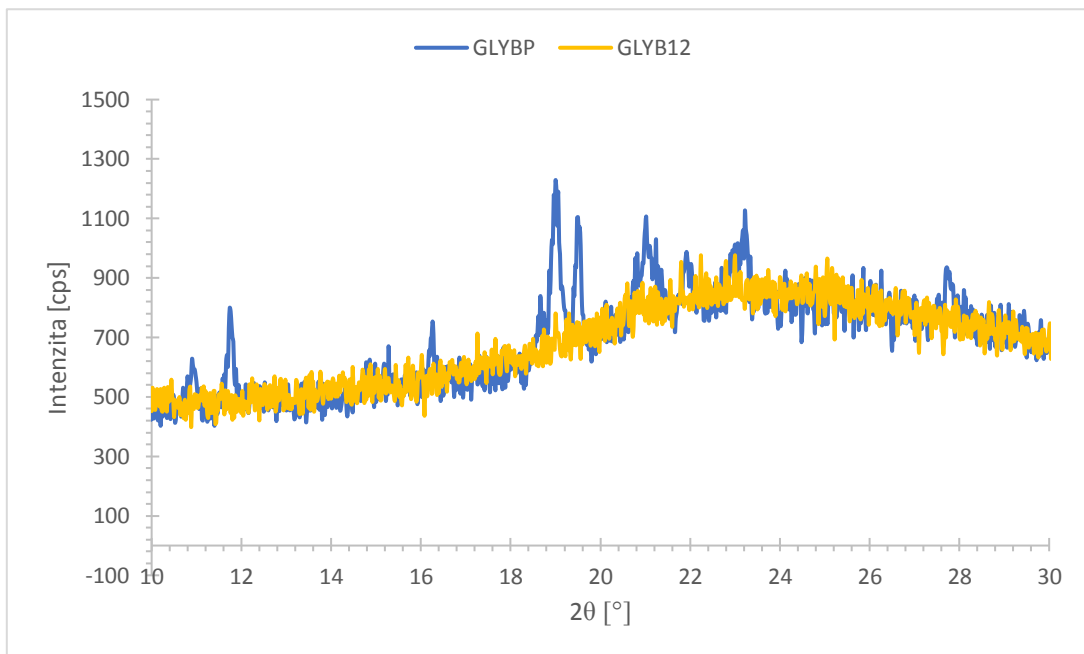
FTIR spektra na Obrázcích 43 až 46 a 48 obsahují charakteristické absorpční pásy vyskytující se v rozmezí vlnočtů 600 cm^{-1} až 1500 cm^{-1} . Pás, který se vyskytuje ve všech spektrech (1011 cm^{-1}) odpovídá vazbě C-O v glibenclamidu (Obrázek 37). Všechny záznamy mají podobný průběh a je tedy možné se domnívat, že mezi jednotlivými vzorky nejsou velké rozdíly. Absence některých pásů může být způsobená neúplným odstraněním pozadí (nedošlo k dokonalému odfiltrování a dochází tak ke stínění).

4.4. Rentgenová difrakční analýza (XRD)

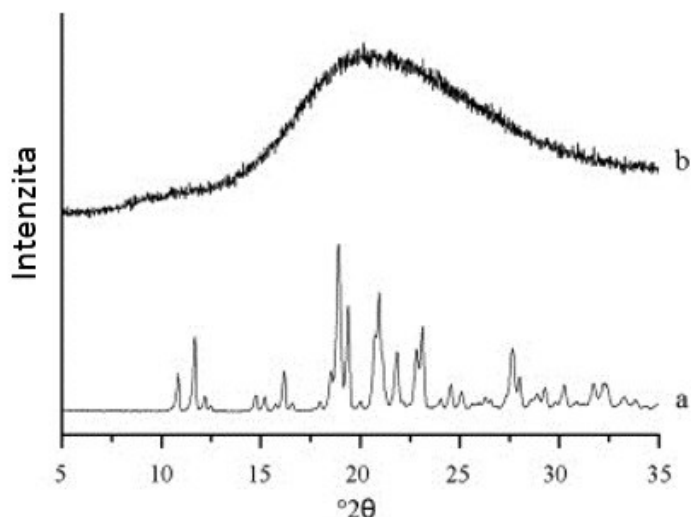
Na následujících obrázcích (Obrázek 49 a 50) jsou viděny patrné změny mezi původním vzorkem částic glibenclamidu (GLYBP) a vzorkem částic glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB12). Tyto změny se nacházejí v úhlovém rozsahu 2θ od 10° až 30° . Vzorek původních částic glibenclamidu má zřetelné píky v uvedeném úhlovém rozpětí a je možné konstatovat, že daný vzorek je krystalický. Při porovnání obrázků 50 a 51 je možné dále konstatovat, že píky vzorku GLYBP a píky křivky a) obrázku 51 se nacházejí ve stejných místech. Vzorek GLYB12 nemá v tomto úhlovém rozpětí žádné píky a je možné předpokládat, že vzniklé částice mají amorfní charakter. Druhou možností je, že vzorek GLYB12 neměl dostatek částic glibenclamidu a nacházel se tedy pod mezí detekce. Toto vyhodnocení bylo provedeno na základě obrázku 51, který je převzat z odborné literatury [7].



Obrázek 49: XRD záznam částic původního vzorku glibenclamidu a vzorku připraveného metodou GAS (GLYB12)



Obrázek 50: Výřez předchozí XRD záznamu (Obrázek 48)



Obrázek 51: XRD záznamy: a) krystalické formy glibenclamidu, b) amorfní formy glibenclamidu [7]

4.5. Rozpustnost (test rozpustnosti)

Z naměřených výsledků (Tabulka 13) je patrné, že nejvyšší rozpustnost částic glibenclamidu vykazoval původní vzorek glibenclamidu (GLYBP) a vzorky (GLYB15, GLYB17 a GLYB19), které byly v excipientech PVP (1 % hm.) nebo PEG (1 % hm.). Tímto testem se potvrdil předpoklad, že použité excipienty zvyšují rozpustnost samotného léčiva. Naopak nejmenší rozpustnost vykazovaly vzorky (GLYB12, G.ZB.13 a G.ZB.15), které byly v excipientu demineralizované vody. Vzorek G.ZB.15 má poměrně vysokou rozpustnost oproti ostatním vzorkům v demineralizované vodě. Zvýšená rozpustnost tohoto vzorku mohla být způsobena nedokonalým oduštěním rozpuštěného glibenclamidu v DMSO z reakční patry (analytická skelná vata obsahovala roztok DMSO s částicemi glibenclamidu, proto byla jejich koncentrace vyšší a DMSO podpořil rozpustnost částic glibenclamidu). Naopak vzorek GLYB19, který je v excipientu PVP (1 % hm.), vykazuje oproti vzorku GLYB15, který je také v tomto excipientu, rozpustnost nižší. Tento výkyv mohl být opět způsoben nedokonalým oduštěním vzorku a nižší koncentrací částic v excipientu. Nejvyšší rozpustnost vykazoval vzorek GLYB17, který byl v excipientu PEG (1 % hm.).

Tabulka 13: Tabulka naměřených a vypočtených hodnot koncentrací glibenclamidu pro test rozpustnosti

Označení vzorku	Naměřená koncentrace glibenclamidu	Koncentrace glibenclamidu ve fosfátovém pufru	Koncentrace glibenclamidu ve vzorku
-	mg·l ⁻¹	mg·l ⁻¹	mg·l ⁻¹
GLYBP	0,457	0,703	352,242
GLYB12	0,052	0,080	40,080
G.ZB.13	0,045	0,069	34,685
GLYB15	0,636	0,978	490,209
G.ZB.15	0,145	0,223	111,762
GLYB17	0,813	1,251	626,635
GLYB19	0,196	0,302	151,071

4.6. Propustnost (test PAMPA)

Test propustnosti (test PAMPA) nebyl v této bakalářské práci proveden z důvodu klasifikace léčivé látky glibenclamidu pomocí BCS (Biofarmaceutický Klasifikační Systém). Léčivá látka glibenclamid je zařazena do II. skupiny (vysoká permeabilita, nízká rozpustnost). Z tohoto důvodu je možné se domnívat, že z hlediska průchodnosti přes membránu by nebyly nalezeny významné rozdíly.

4.7. Souhrn získaných výsledků

Na základě všech provedených analýz lze vyhodnotit, že nejlepších výsledků u částic léčivé látky glibenclamidu připravených metodou GAS, bylo dosaženo v případě, že tyto částice byly jímány do excipientů PVP (1 % hm.) a PEG (1 % hm.). Demineralizovaná voda byla taktéž vhodným excipientem, ale na rozdíl od PVP (1 % hm.) a PEG (1 % hm.) nezvyšovala rozpustnost částic léčivé látky glibenclamidu v organismu, protože vzniklé částice měly větší velikost. Teploty (35 °C a 40 °C), které byly zvoleny pro metodu GAS, byly vyhovující. V případě tlaků (150 bar a 200 bar) se vyšší tlak ukázal jako vhodnější pro zmenšování částic léčiva glibenclamidu. Na základě provedených analýz byly jako nejlepší vzorky splňující parametry pro požadovaný účel vybrány GLYB15, GLYB17 a GLYB19. Z těchto tří vzorků nejvíce vyhovoval požadavkům GLYB17 a to hlavně z důvodu výsledků testu rozpustnosti. Rozpustnost tohoto vzorku ve fosfátovém pufru činila 1,251 mg·l⁻¹. Tato hodnota značně převyšovala hodnoty rozpustnosti ostatních vzorků, ale především vzorku původního (0,703 mg·l⁻¹). Z hlediska biodostupnosti byl parametr rozpustnosti vzorku vyhodnocen jako nejdůležitější.

5. Závěr

Bakalářská práce je zaměřena na mikronizaci částic léčiva (léčivé látky) glibenclamidu, které se používá pro léčbu diabetu II. typu. Na základě vyhodnocení získaných výsledků a následných závěrů může být konstatováno, že cíle bakalářské práce byly splněny.

Teoretická část práce obsahuje popis léčiv, interakce léčiv s organismem, zařazení léčiv do BCS systému a provádění PAMPA testu. Tato část taktéž zahrnuje popis léčiv, tzv. antidiabetik spolu se skupinou derivátů sulfonylmočoviny. Do této skupiny derivátů patří právě glibenclamid, kterému je v této práci věnována hlavní pozornost. Teoretická část rovněž zahrnuje popis metod zmenšování částic léčiv (léčivých látek), které jsou zaměřeny na využití superkritické fluidní technologie s využitím superkritického oxidu uhličitého (CO₂), přesněji na metodu RESS a metodu GAS.

V praktické části byly připraveny částice glibenclamidu pomocí superkritické fluidní technologie. Pro tuto technologii byl použit komerčně dodaný přístroj Spe-ed SFE-4 firmy Applied Separation. Nejdříve byla provedena metoda RESS s využitím superkritického CO₂, která se ukázala jako nevyhovující z důvodu malé výtěžnosti produktu. Následně byla aplikována metoda GAS s využitím superkritického CO₂, která se ukázala pro mikronizaci částic léčiva glibenclamidu jako vyhovující. V metodě GAS byly částice mikronizovány za různých podmínek (tlak, teplota, doba statické fáze). Vliv různých podmínek na velikost a morfologii částic léčiva glibenclamidu byl vyhodnocen pomocí uvedených metod: PSD, SEM, FTIR, XRD a testu rozpustnosti. Testy propustnosti (PAMPA test) nebyly provedeny z důvodu zařazení léčivé látky do II. skupiny BCS systému (vysoká propustnost, nízká rozpustnost), to znamená, že látka je vysoce permeabilní i v původním stavu.

V případě analýzy a distribuce velikosti částic (PSD) léčivé látky glibenclamidu měl původní vzorek průměrnou velikost okolo 775,3 nm (d_{mode}). Všechny ostatní vzorky částic léčiva glibenclamidu získané metodou GAS byly zmenšeny pod tuto průměrnou hodnotu. Na základě zjištěných velikostí částic bylo vybráno 6 vzorků (GLYB12, G.ZB.13, GLYB15, G.ZB.15, GLYB17 a GLYB19), které byly dále testovány.

Snížení velikosti částic připravených vzorků ve srovnání s původním vzorkem bylo potvrzeno i pomocí metody SEM.

Záznamy FTIR ukázaly, že vzorky částic glibenclamidu získané metodou GAS, měly až na drobné odchylky podobná spektra. Lze tedy vyhodnotit, že tyto vzorky byly podobné a že nedocházelo při zpracování k chemické reakci mezi excipientem a glibenclamidem.

Na základě metody XRD bylo zjištěno, že původní vzorek částic léčiva (léčivé látky) glibenclamidu byl krystalické formy. Vzorky částic léčiva glibenclamidu získané metodou GAS byly pravděpodobně v amorfni formě.

Test rozpustnosti potvrdil předpoklad, že získané částice glibenclamidu metodou GAS, které byly v excipientech PVP (1 % hm.) a PEG (1 % hm.), měly vyšší hodnotu rozpustnosti oproti původnímu vzorku částic léčivé látky glibenclamidu. Excipienty tedy zvyšovaly rozpustnost léčiva (léčivé látky) glibenclamidu spolu se zmenšenými rozměry částic. Naopak demineralizovaná voda není dobrým excipientem, protože velikost vzniklých částic byla větší a tím se snižovala rozpustnost léčiva v organismu. Touto metodou byl vyhodnocen jako nejlepší excipient PEG (1 % hm.), protože nejlepší rozpustnosti bylo dosaženo u vzorku GLYB17.

Na základě provedených analýz je možné vyhodnotit, že nejlepší výsledků bylo dosaženo u metody GAS při obou použitých teplotách 35 °C i 40 °C. V případě použitých tlaků bylo dosaženo lepších výsledků při tlaku 200 barů. Jako nejlepší výsledky byly vyhodnoceny vzorky částic glibenclamidu GLYB15, GLYB17 a GLYB19. Jednalo se o vzorky v excipientech PEG (1 % hm.) a PVP (1 % hm.). Rozdíly mezi částicemi vzorku glibenclamidu v excipientech a částicemi zbytkovými z patrony nebyly příliš výrazné. Je však zřejmé, že přítomnost excipientu brání shlukování připravených částic a má tak významný vliv na stabilitu submikronových částic.

Na základě výsledků této bakalářské práce lze považovat využití navržené superkritické fluidní technologie pro přípravu submikronových částic i nanočástic glibenclamidu za vhodnou metodu. Jako vhodnější se ukázala metoda GAS s využitím superkritického oxidu uhličitého jako antirozpouštědla a dimethylsulfoxidu jako původního rozpouštědla.

6. Literatura

- [1] Legislativa České republiky (Zákon č. 378/2007 Sb. - zákon o léčivech). *SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv)* [online]. Praha, 2010 [cit. 2018-01-17]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/sukl/legislativa-ceske-republiky>
- [2] Český lékopis. *SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv)* [online]. Praha, 2010 [cit. 2018-01-17]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/farmaceuticky-prumysl/cesky-lekopis>
- [3] VAŇKOVÁ, Dana. *Chemie léčiv*. Ostrava: Pavko, 2012. ISBN 978-80-86369-15-0.
- [4] KRATOCHVÍL, Bohumil, Lenka SEILEROVÁ, Veronika SLÁDKOVÁ a Michal ŠIMEK. *Chemie a fyzika pevných léčiv*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN 978-80-7080-917-4.
- [5] HAMPL, František a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2002. ISBN 80-7080-495-5.
- [6] TAKLA, Pamela Girgis. Glibenclamide [online]. Elsevier, 1981, 1981, s. 337-355 [cit. 2018-01-18]. *Analytical Profiles of Drug Substances*. DOI: 10.1016/S0099-5428(08)60644-9. ISBN 9780122608100. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099542808606449>
- [7] REHDER, Sönke, Albrecht SAKMANN, Thomas RADES a Claudia S. LEOPOLD. Thermal degradation of amorphous glibenclamide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2012, **80**(1), 203-208 [cit. 2018-01-18]. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.07.009. ISSN 09396411. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641111002153>
- [8] Glibenclamid. *PubChem - open chemistry database* [online]. Bethesda (USA), 2004 [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glyburide#section=Top>
- [9] Glyburide (Glibenclamide). *Selleckchem.com* [online]. [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: [http://www.selleckchem.com/products/Glyburide\(Diabeto\).html](http://www.selleckchem.com/products/Glyburide(Diabeto).html)

- [10] LUCIO, David, Juan Manuel IRACHE, María FONT a María Cristina MARTÍNEZ-OHÁRRIZ. Supramolecular structure of glibenclamide and β -cyclodextrins complexes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2017, **530**(1-2), 377-386 [cit. 2018-01-19]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.002. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037851731730710X>
- [11] YURIEV, Elizabeth, David C.M. KONG a Magdy N. ISKANDER. Investigation of structure–activity relationships in a series of glibenclamide analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2004, **39**(10), 835-847 [cit. 2018-01-21]. DOI: 10.1016/j.ejmech.2004.06.004. ISSN 02235234. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523404001205>
- [12] Permeability. *Pion* [online]. [cit. 2018-01-21]. Dostupné z: <https://www.pion-inc.com/Instrumentation/Permeability/en>
- [13] AL-KASSAS, Raida, Mahima BANSAL a John SHAW. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *Journal of Controlled Release* [online]. 2017, **260**, 202-212 [cit. 2018-01-21]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.06.003. ISSN 01683659. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365917306430>
- [14] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-875-7.
- [15] HAMPL, František, Stanislav RÁDL a Jaroslav PALEČEK. *Farmakochemie*. 2., rozš. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-639-5.
- [16] *Biopharmaceutical Classification System and Formulation Development: Particle Sciences - Technical Brief* [online]. 2011, (9) [cit. 2018-02-24]. Dostupné z: <http://www.particlesciences.com/news/technical-briefs/2011/biopharmaceutical-classification-system.html>
- [17] NAHA, Anup. *Preparation and evaluation of self emulsifying drug delivery system of gliclazide and glibenclamide*. Manipal, Karnataka, India, 2012. Diplomová práce. Manipal University. Vedoucí práce M. Sreenivasa Reddy; N. Udupa.

- [18] LUKÁŠOVÁ, Tereza. *Příprava submikronových částic a nanočástic vybraných léčiv: Preparation of submicron particles and nanoparticles selected pharmaceuticals*. Ostrava, 2016. Bakalářská práce. Vysoká škola Báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Doc. Ing. Daniela Plachá, Ph.D.
- [19] CAMPARDELLI, R., L. BALDINO a E. REVERCHON. Supercritical fluids applications in nanomedicine. *The Journal of Supercritical Fluids*[online]. 2015, **101**, 193-214 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.supflu.2015.01.030. ISSN 08968446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844615001102>
- [20] ESFANDIARI, Nadia. Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2015, **100**, 129-141 [cit. 2018-03-19]. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.12.028. ISSN 08968446. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844615000364>
- [21] TÜRK, Michael. *PARTICLE FORMATION WITH SUPERCRITICAL FLUIDS: Challenges and Limitations*. 1. USA: ELSEVIER, 2014. ISBN 978-0-444-59486-0
- [22] KLOUDA, Pavel. *Fyzikální chemie*. 2., upr.a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2002. ISBN 80-86369-06-4.
- [23] DU, Juan, Xiaoguang LI, Huanxin ZHAO, Yuqi ZHOU, Lulu WANG, Shushu TIAN a Yancai WANG. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2015, **495**(2), 738-749 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2015.09.021. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517315302192>
- [24] PERRUT, M., J. JUNG a F. LEBOEUF. Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by supercritical fluid processes. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2005, **288**(1), 3-10 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.09.007. ISSN 03785173. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517304005411>
- [25] VACULÍKOVÁ, Eliška, Aneta CERNIKOVA, Daniela PLACHÁ, Martin PISARCIK, Katerina DEDKOVA, Pavlina PEIKERTOVA, Ferdinand DEVINSKY a Josef JAMPILEK. *Improvement of glibenclamide water solubility by nanoparticle preparation*. , 1-10.

- [26] Dimethylsulfoxide. *PubChem - open chemistry database* [online]. Bethesda (USA), 2004 [cit. 2018-04-13]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dimethyl_sulfoxide#section=Top
- [27] Dimethylsulfoxide. *Meyler's Side Effects of Drugs* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 992-993 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1016/B978-0-444-53717-1.00633-8. ISBN 9780444537164. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444537171006338>
- [28] N-Vinylpyrrolidinone. *PubChem - open chemistry database* [online]. Bethesda (USA), 2004 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6917#section=Top>
- [29] Příspěvatelé Wikipedie, *Polyvinylpyrrolidon* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, c2018, Datum poslední revize 5. 02. 2018, 13:19 UTC, [citováno 16. 04. 2018]
<<https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Polyvinylpyrrolidon&oldid=15827064>>
- [30] Undecaethylene Glycol. *PubChem - open chemistry database* [online]. Bethesda (USA), 2004 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/81260#section=Top>
- [31] Polyethylene glycol 1500. *Merck* [online]. Darmstadt, Germany, 2018 [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Polyethylene-glycol-1500,MDA_CHEM-807489
- [32] CHANDIRAN IRISAPPAN, Sarath, Balagani PAVAN KUMAR a Korlakanti NARASIMHA JAYAVEERA. Characterization of Glibenclamide loaded cellulose acetate microparticles prepared by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of Pharmacy Research* [online]. 2013, 7(8), 766-773 [cit. 2018-05-19]. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.08.015. ISSN 09746943. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S097469431300337X>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma rozdělení léčiv	14
Obrázek 2: a) fosfolipidová dvojvrstva, b) obecná struktura fosfolipidu [3]	15
Obrázek 3: Způsoby průchodu léčiva buněčnou stěnou pomocí a) pasivního transportu (difuzí) a b) aktivního transportu (transportními proteiny) [3]	16
Obrázek 4: Působení agonistů a antagonistů [3]	17
Obrázek 5: Interakce léčiva s organismem [3]	18
Obrázek 6: Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS) [4]	18
Obrázek 7: PAMPA test firmy Pion [12]	19
Obrázek 8: Strukturní vzorec glibenclamidu [7]	20
Obrázek 9: 3D model molekuly glibenclamidu [8]	22
Obrázek 10: p-T diagram čisté chemické látky [21]	24
Obrázek 11: Graf závislosti hustoty na tlaku čistého oxidu uhličitého [21]	25
Obrázek 12: Strukturní vzorek dimethylsulfoxidu (DMSO) [26]	28
Obrázek 13: Strukturní vzorce vinylpyrrolidonu a polyvinylpyrrolidonu (PVP, K30), [29]	29
Obrázek 14: Strukturní vzorce ethylenglykolu a polyethylenglykolu (PEG), [30]	29
Obrázek 15: Schéma extraktoru	33
Obrázek 16: Popis extrakční patryny	35
Obrázek 17: Popis plnění patryny, metoda RESS (takto byla extrakční patryna umístěována do vyhřívací pece)	36
Obrázek 18: Vzorky částic glibenclamidu získané metodou RESS	38
Obrázek 19: Popis plnění patryny, metoda GAS (takto byla extrakční patryna umístěována do vyhřívací pece)	39
Obrázek 20: Vzorky částic glibenclamidu získaných metodou GAS	43
Obrázek 21: Logaritmická distribuce velikosti částic (DVC) původního (výchozího) vzorku glibenclamidu	50
Obrázek 22: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorku GLYB12	51
Obrázek 23: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorků GLYB11, GLYB15, GLYB19 (PVP 1 % hm.)	51
Obrázek 24: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorků GLYB17, GLYB20, GLYB21 (PEG 1 % hm.)	52
Obrázek 25: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorků GLYB13, GLYB14, GLYB15 (DEMI)	52
Obrázek 26: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorků GLYB16, GLYB18, GLYB19 (DEMI)	53
Obrázek 27: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorků GLYB20, GLYB21 (DEMI)	53
Obrázek 28: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorku G.ZB.17 (DEMI)	54

Obrázek 29: Logaritmická distribuce velikosti částic vzorku GLYB10 (PVP 1 % hm.)	54
Obrázek 30: Snímky původního vzorku glibenclamidu (GLYBP)	56
Obrázek 31: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB12).....	56
Obrázek 32: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB15).....	56
Obrázek 33: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (G.ZB.15).....	57
Obrázek 34: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB17).....	57
Obrázek 35: Snímky vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (GLYB19).....	58
Obrázek 36: Snímek vzorku glibenclamidu získaného metodou GAS (G.ZB.13).....	58
Obrázek 37: Spektrum původního vzorku glibenclamidu (GLYBP)	59
Obrázek 38: Spektrum částic léčivé látky glibenclamidu [32].....	60
Obrázek 39: Spektrum roztoku polyethylenglykolu a demineralizované vody (1 % hm.) (pozadí: demineralizovaná voda)	60
Obrázek 40: Spektrum roztoku polyvinylpyrrolidonu a demineralizované vody (1 % hm.) (pozadí: demineralizovaná voda)	61
Obrázek 41: Spektrum demineralizované vody (DEMI) (pozadí: vzduch)	61
Obrázek 42: Spektrum vzorků glibenclamidu získaných metodou GAS (GLYB12, GLYB15, GLYB17, GLYB19, GZB13, GZB15) (pozadí: vzduch).....	62
Obrázek 43: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB12 (pozadí: demineralizovaná voda)	62
Obrázek 44: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB15 (pozadí: PVP (1 % hm.))	63
Obrázek 45: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB17 (pozadí: PEG (1 % hm.))	63
Obrázek 46: Spektrum vzorku glibenclamidu GLYB19 (pozadí: PVP (1 % hm.))	64
Obrázek 47: Spektrum vzorku glibenclamidu G.ZB.13 (pozadí: demineralizovaná voda)	64
Obrázek 48: Spektrum vzorku glibenclamidu G.ZB.15 (pozadí: demineralizovaná voda)	65
Obrázek 49: XRD záznam částic původního vzorku glibenclamidu a vzorku připraveného metodou GAS (GLYB12)	66
Obrázek 50: Výřez předchozí XRD záznamu (Obrázek 48).....	66
Obrázek 51: XRD záznamy: a) krystalické formy glibenclamidu, b) amorfní formy glibenclamidu [7].....	67

Seznam tabulek

Tabulka 1: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti glibenclamidu [7, 8, 9, 17].....	21
Tabulka 2: Běžně používané superkritické tekutiny s odpovídajícími kritickými hodnotami [21].	24
Tabulka 3: Parametry plynů, kapalin a superkritických tekutin [21]	26
Tabulka 4: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti dimethylsulfoxidu [26]	28
Tabulka 5: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti polyvinylpyrrolidonu [28]	29
Tabulka 6: Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti polyethylenglykolu [31]	30
Tabulka 7: Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou RESS.....	37
Tabulka 8: Podmínky přípravy (mikronizace) částic vzorku glibenclamidu metodou GAS	42
Tabulka 9: Vzorky částic léčivé látky glibenclamidu vylouhovaných z analytické skelné vaty z extrakční patrony.....	43
Tabulka 10: Tabulka přípravy vzorku glibenclamidu pro test rozpustnosti.....	46
Tabulka 11: Tabulka vzorků částic léčivé látky glibenclamidu, které byly analyzovány příslušnými metodami.....	49
Tabulka 12: Naměřené hodnoty velikostí částic (d_{mean} , d_{mode}) připravených vzorků částic glibenclamidu připravených metodou GAS a původní vzorek glibenclamidu	55
Tabulka 13: Tabulka naměřených a vypočtených hodnot koncentrací glibenclamidu pro test rozpustnosti	68