



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**

Laboratorní úloha CHEMPRAX FARM-14

Testování vlivu formulace pevné lékové formy na její disoluční chování

Autoři návodu: Ing. Diem Trang Tran

Vedoucí úlohy: Ing. David Novák, Ing. Lucie Stoupová

Umístění práce: Ústav organické technologie, AS25b, AS27

Úloha byla vytvořena v rámci projektu Chemické vzdělávání pro praxi (reg. č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/18_056/0013354), který byl financován Evropskou unií s využitím přístroje, který byl spolufinancován Evropskou unií v projektu Infrastruktura pro chemické vzdělávání pro praxi (reg. č. CZ.02.2.67/0.0/0.0/18_057/0013355).



Dílo podléhá licenci Creative Commons 4.0 Česko
Uveďte původ - Zachovejte licenci



OBSAH

1. ÚVOD	3
2. ÚKOLY	4
3. POSTUP LABORATORNÍ PRÁCE	5
3.1 Příprava tablet (provádí vedoucí úlohy)	5
3.2.1 Příprava disolučního média a disolučního přístroje	7
3.2.2 Příprava standardů pro tvorbu kalibrační křivky	8
3.2.3 Průběh zkoušky disoluce	8
3.3.1 Vyhledání absorpčního maxima	9
3.3.2 Kalibrační křivka	10
3.3.3 Zjištění koncentrace indometacinu v testovaném vzorku	11
4. NÁLEŽITOSTI PROTOKOLU	12
5. LITERATURA	13



1. ÚVOD

Klíčovým aspektem při vývoji perorální lékové formy je zajištění dostatečné biodostupnosti léčivé látky. Ta může být u pevných lékových forem určena rychlostí uvolňování léčivé látky z lékové formy, která se zkouší in vitro tzv. zkouškou disoluce. Požadavky na zkoušku disoluce, včetně popisu aparatury, provádění a vyhodnocování výsledků, jsou uvedeny v českém, evropském i americkém lékopise. Podle lékopisu se tuhé perorální lékové formy dělí pro potřeby zkoušky disoluce na lékové formy s běžným uvolňováním, lékové formy s prodlouženým uvolňováním a lékové formy se zpožděným uvolňováním. Jednotlivé lékové formy se mezi sebou liší jak v provádění zkoušky disoluce, kdy je či není nutná změna disolučního média v průběhu zkoušky, tak v následném vyhodnocení. První skupina lékových forem musí splnit pouze jednu podmínku, tj. uvolnit minimální předepsané množství léčivé látky v požadovaném časovém intervalu. Lékové formy zbylých dvou skupin musí splnit minimálně 2 limity nebo se u nich hodnotí celá disoluční křivka [1]. Je dobře známo, že povaha, velikost částic, kompozice formulace i způsob lisování tabletoviny do tablet mohou ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti lékového přípravku. Všechny tyto faktory mohou ovlivnit desintegraci tablety a následně disoluci účinné látky [2]. Cílem této práce bude provedení zkoušky disoluce formulací obsahujících indometacin, lišících se ve velikosti částic účinné látky, kompozici formulace a lisovacím tlakem, a posouzení jejich přijatelnosti z pohledu požadavků kladených Českým lékopisem.



2. ÚKOLY

1. Seznamte se s kapitolou Zkouška disoluce pevných lékových forem v Českém lékopise 2023 – Doplněk 2026.¹
2. Od vedoucího úlohy obdržíte 4 sady různě připravených tablet po 3 ks o přibližné hmotnosti 500 mg obsahující účinnou látku indometacin. Přesné složení tablet se dozvíte na začátku laboratorní úlohy. V rámci úlohy budete hodnotit vliv kompozice formulace a lisovací síly na disoluční chování.
3. Provádějte dvě zkoušky disoluce tablet připravených ze čtyř formulací v disolučním médiu o pH 6,8 simulujícím tenké střevo. Provádějte zkoušku paralelně v šesti disolučních nádobách. Pro každou zkoušku použijte vždy dvě trojice tablet z různých formulací.
4. Sledujte vizuálně průběh zkoušky a diskutujte rozdíly v rychlosti rozpadu tablet, ve vzhledu lázně, případně tvorbu bublin.
5. Zkonstruujte disoluční profily (závislost uvolněného množství na čase) všech vzorků. Provádějte statistické zpracování opakovaných měření a vyjádřete je ve formě chybových úseček. Diskutujte dané vlivy na disoluční chování připravených lékových forem. Posuďte jejich přijatelnosti z pohledu požadavků kladených Českým lékopisem.

¹ Český lékopis je k dispozici k prezenčnímu vypůjčení v Národní technické knihovně.



3. POSTUP LABORATORNÍ PRÁCE

3.1 Příprava tablet (provádí vedoucí úlohy)

3.1.1 Příprava tabletoviny

Tabletoviny o různém složení připravte homogenizací níže uvedených složek.

Formulace A: 5 % indometacinu + monohydrát laktózy : Avicel® PH102 v poměru 7:3

Formulace B: 5 % indometacinu + monohydrát laktózy : Avicel® PH102 v poměru 1:1

Formulace C: 5 % indometacinu + Avicel® PH102

Pro disoluční zkoušku budete potřebovat 3 tablety z každé formulace a pro celkový počet tablet berte v úvahu i možné ztráty během práce. Množství jednotlivých složek vypočtete, poté je navažujte postupně do plastového kelímku. Vypočítané i skutečné navážky si poznamenejte. Vložte kelímek do mísiče Turbula T2F. Mísení provádějte při rychlosti 50 otáček za minutu po dobu 10 minut.

3.1.2 Přímé lisování

Lisování tablet se bude provádět pomocí hydraulického lisu Specac (obr. 1) při použití následujících lisovacích sil: 8 kN, 10 kN a 14 kN.



Postup lisování [3]:

1. Do navažovací lodičky navažte požadované množství tabletoviny pro 1 tabletu.
2. Uzavřete matici spodním uzávěrem a opatrně do ní převed'te naváženou tabletovinu. Zbytky tabletoviny zachycené na povrchu matrice převed'te dovnitř sklepaním či pomocí štětečku.
3. Dovnitř matrice vsuňte razidlo, matici uchopte za spodní uzávěr a po otevření ochranného skla lisu pohybem vzhůru vložte doprostřed hydraulického lisu.
4. Hlavní šroub lisu přitiskněte na razidlo otáčením horního kohoutu.
5. Uzavřete kohout pro uvolnění tlaku (na pravé straně lisu) jeho otočením ve směru „CLOSE“.
6. Vlastní lisování provádějte pumpováním páky ve směru dopředu a dozadu na pravé straně lisu.
7. Lisování ukončete ve chvíli, kdy ručička dosáhne požadované lisovací síly a této síle tabletovinu vystavte po 20 s.
8. Otevřete kohout pro uvolnění tlaku (na pravé straně lisu) jeho otočením ve směru „RELEASE“.
9. Matici vyndejte uchopením za spodní uzávěr, poté jej nahraďte hliníkovým kolečkem a zatlačením na razidlo vysuňte tabletu. Pokud není vysunutí tablety tímto způsobem možné, vložte doprostřed lisu hliníkové kolečko, na něho umístěte matici s razidlem, na které poté zatlačte působením hlavního šroubu.
10. Jednotlivé tablety zvažte a hmotnosti si poznamenejte.



Obr. 1: Hydraulický lis Specac a příslušenství k výrobě tablet [3]



3.2 Zkouška disoluce

3.2.1 Příprava disolučního média a disolučního přístroje

Zkouška disoluce se v rámci této práce bude provádět v disolučním přístroji Sotax AT7-smart v uspořádání s pádly (obr. 2).

Pozor! - Při práci s přístrojem smí jeho komponenty včetně disolučních nádob přijít do styku pouze s vodou a disolučním médiem. V žádném případě nesmí být vystaven působení organických rozpouštědel, včetně zředěného ethanolu, neboť hrozí znehodnocení polykarbonátových částí.



Obr. 2: Disoluční přístroj Sotax AT7-smart v uspořádání s pádly

Disoluční médium

1. K přípravě disolučního média použijte degasovanou destilovanou vodu. Odplynění vody proveďte jejím převařením na cca 60 °C. Objem disolučního média je 1000 ml.
2. Připravte disoluční médium rozpuštěním 6,8 g KH_2PO_4 a 0,9 g NaOH v příslušném objemu deaerované destilované vody. Výsledný roztok má pH asi 6,8 a značnou iontovou sílu a tlumivou kapacitu.

Disoluční přístroj

1. Do disolučního přístroje vložte disoluční nádobu a zajistěte ji pomocí trojice plastových držáků. Postupně takto umístěte všech sedm disolučních nádob. Přístroj musí být vždy plně obsazen disolučními nádobami.
2. Přidejte potřebné množství KH_2PO_4 či NaOH.
3. Pomocí odměrného válce odměřte potřebný objem demineralizované vody a převed'te do disoluční nádoby. Není-li sedmá nádoba potřeba pro experiment, je možné ji naplnit obyčejnou vodou.
4. Opatrně uzavřete víko disolučního přístroje tak, aby nedošlo k poškození disolučních nádob či teplotního čidla. Vsuňte míchadla a teplotní čidlo do lázně otvorem ve víku.



5. Zapněte disoluční přístroj hlavním vypínačem, umístěným na zadní straně přístroje v blízkosti síťového kabelu.
6. Do otvorů ve víku disolučního přístroje vsuňte kanyly s PP filtrem a nasadte na ně injekční stříkačky pro odběr vzorků. Filtry jsou umístěny uprostřed mezi hladinou disoluční tekutiny a horní hranou rotujícího míchadla, ne méně než 1 cm od stěny nádoby.
7. Spusťte termostat a míchadlo tlačítky na panelu disolučního přístroje. Lázeň a disoluční nádoby se nyní budou temperovat na teplotu zkoušky (37 °C).
8. Následně specifikujte disoluční metodu: Nastavte teplotu na 37 °C, rychlost otáčení míchadel na 100 otáček za minutu, metodu pádlovou, čas odběrů dle zadání.

3.2.2 Příprava standardů pro tvorbu kalibrační křivky

Připravte 4 kalibrační roztoky ředěním zásobního roztoku tak, aby jejich koncentrace pokrývaly předpokládaný rozsah koncentrace vzorků. Za tímto účelem vypočtete maximální možnou koncentraci indometacinu, která se může vyskytnout při disolučním testu. Tuto zvýšte o hodnotu 5 mg·l⁻¹ a vzniklý interval rozdělte na 4 díly. Vypočtete množství indometacinu potřebné k přípravě zásobního roztoku o koncentraci 100 mg·l⁻¹ a objemy zásobního roztoku potřebné k přípravě kalibračních roztoků.

Postup přípravy kalibračních roztoků

1. Jako rozpouštědlo vzorků připravte 1000 ml disolučního média (tentokrát bez predehřátí!)
2. Navažte množství indometacinu potřebné k přípravě zásobního roztoku do odměrné baňky o objemu 50 ml, naplňte disolučním médiem do cca 2/3, promíchejte krouživými pohyby a vložte na cca 60 minut do ultrazvukové lázně při teplotě 30 °C.
3. Doplněte baňku disolučním médiem po rysku, uzavřete a promíchejte.
4. Ověřte, zda došlo k úplnému rozpuštění látky.
5. Do 50 ml odměrných baněk odpipetujte vypočtené objemy zásobního roztoku, doplňte baňky disolučním médiem po rysku, uzavřete a promíchejte.

3.2.3 Průběh zkoušky disoluce

Samotná disoluční zkouška je velmi náročná na rychlé a správné provedení potřebných úkonů. Zkuste si proto vložení tablet a odběr první série naslepo (bez skutečného vložení tablety).

1. Disoluční zkoušku provádějte ve 6 nádobách najednou. S předstihem vložte dvě trojice tablet z různých formulací do barevně označených dávkovacích otvorů a v určený čas uvolněte tablety stiskem táhla na pravém okraji víka přístroje.
2. Vzorky odebírejte v časech 2, 5, 10, 15, 30, 45 a 60 minut pomocí PP stříkaček.
3. Změřte koncentraci indometacinu ve vzorcích pomocí UV spektrofotometrie.



3.3 Stanovení koncentrace léčivé látky ve vzorcích

Obsah indometacinu ve vzorcích stanovte pomocí dvoupráskového UV/VIS spektrofotometru Analytik Jena SPECORD 200 PLUS. (Obr. 3) V rámci této práce se používá pouze deuteriová lampa.



Obr. 3: UV/VIS spektrofotometr SPECORD 200 PLUS

UV/VIS spektrofotometrie pracuje na principu měření energie pohlcené vzorkem (látkou) při průchodu záření. Měřením jsou získána absorpční spektra, která jsou graficky vyjádřena jako závislost absorbance na vlnové délce.

Uvedení přístroje do provozního režimu trvá několik minut, a proto jej proveďte v předstihu. Před zahájením analýzy vzorků je třeba určit analytické podmínky a vytvořit kalibrační vztah mezi absorbancí a koncentrací. Vzorky je třeba analyzovat v křemenné semi-mikrokyvetě. Kyveta se umísťuje do levé části prostoru vzorku v přístroji po otevření víka. Paprsek při čelním pohledu na přístroj prochází zezadu dopředu, a proto i čirá okénka kyvety musí být orientována v tomto směru. **Orientace kyvety může ovlivnit přesnost a reprodukovatelnost měření, a proto kyveta musí být vždy vložena ve stejném směru.** Po vložení kyvety do prostoru vzorku je třeba vždy víko uzavřít a teprve poté provádět měření. Kyvetu vždy vypláchněte nejméně dvakrát testovaným vzorkem a poté naplňte cca 0,5 cm pod horní okraj.

3.3.1 Vyhledání absorpčního maxima

1. Vložte do prostoru vzorku kyvetu naplněnou cca 0,5 cm pod okraj rozpouštědlem. Pokud se vlhkost nebo nečistoty dostanou na vnější povrch kyvety, je třeba je otřít buničitou vatou a důkladně očistit okénka kyvety.
2. Pro ovládání spektrofotometru Analytik Jena SPECORD 200 PLUS slouží softwarový program WinAspect Plus. Pro spuštění softwarového programu klikněte na ikonu *WinAspect Plus*. Nechte zinicilizovat spektrofotometr se softwarovým programem kliknutím na menu *Measurement/Initialize Device*. Dále je nutné zapnout halogenovou lampu (přístroj se sám na tuto otázku zeptá; potvrdíte tlačítkem *Ne*). Pokud je inicializace správně provedena, v programu se objeví následující informační hláška „Selfcheck – o.k. Device is ready“.



3. Nastavte parametry měření kliknutím na položku *Parameters*, která se objeví v postranním panelu *Measurement*. V položce *Title* pojmenujte metodu: IND-Spektrum. V podokně *Cycle Mode* označte možnost *Manual*. V podokně *Display* označte možnost *Absorbance*. V podokně *Correction* zatrhněte možnost *Reference*.
4. Oblast spektra, ve které se bude měřit, zvolte v záložce *Mode*, kde v *Meas. Mode* vyberte možnost *Spectral scan*. Zvolte rozsah vlnových délek od 190 nm do 320 nm.
5. Po zadání všech potřebných údajů uložte vzniklou metodu výběrem položky *Save as ...* a pojmenujte následovně: *Indometacin-spektrum-x* (x = číslo skupiny). Klikněte na tlačítko OK pro aplikaci stanovené metody.
6. Klikněte na položku *Reference*, a potom na položku *Start measurement* pro stanovení slepého pokusu, který provedete s disolučním médiem. Objeví se dotaz: „Start the next cycle“. Manipulace s kyvetou může ovlivnit přesnost měření. Zkuste si proto vyjmutí a vložení kyvety. Potom klikněte na tlačítko OK.
7. Vložte do prostoru vzorku kyvetu naplněnou kalibračním roztokem o největší koncentraci analytu ve vzorku. Měření spustíte kliknutím na položku *Start Measurement*.
8. Na vlnovém spektru najděte maximum. Pokud je hodnota absorbance tohoto maxima menší než 2, pak pro měření zvolte vlnovou délku tohoto maxima. Pokud je maximum větší nebo nelze ho identifikovat, je roztok příliš koncentrovaný (neplatí Lambert-Beerův zákon) a je nutné provádět měření mimo maximum. Výběrem *Section* omezte oblast, ve které leží hledaná hodnota. Kliknutím na graf vyberte počáteční hodnotu rozsahu, poté pohybem myši doprava a současným podržením levého tlačítka myši vyberte koncovou hodnotu rozsahu. Máte-li vybraný rozsah, uvolněte tlačítko myši. Zobrazí se dialogové okno *Section*. Výběr potvrďte kliknutím na OK. Tím se zobrazuje vybraná část spektra. Klikněte na položku *Values a* vyberte vhodnou vlnovou délku tak, aby absorbance roztoku c_5 byla v rozmezí 1 – 1,5. Tuto vlnovou délku si poznamenejte.
9. Graf a naměřená data uložte výběrem *Print current document*, klikněte na možnost *Print* a zvolte *Software 602*, potom OK.

3.3.2 Kalibrační křivka

1. Navolte vhodné parametry měření v položce *Parametres*. Hodnotu zjištěného absorpčního maxima zadejte v záložce *Mode*, kde upravte režim měření *Meas. Mode* ze *Spectral Scan* na změření vlnové délky *Wavelengths*. Objeví se podokno, jestliže v něm je zadaná hodnota jiná, než je vaše hodnota absorpčního maxima, přepište tuto hodnotu kliknutím na tlačítko *Edit*. Uložte metodu výběrem položky *Save as ...* a pojmenujte následovně: *IND-XXX-Y* (xxx = hodnota absorpčního maxima, y = číslo skupiny). Klikněte na tlačítko OK pro aplikaci stanovené metody.



2. Vyberte příkazy *Quant/ Lab/ Calibration* pro vytvoření kalibrační křivky.
3. Po kliknutí na položku *Calibration* se otevře okno, kde navolíte parametry kalibrace. Zvolte regresní model *Regression Model: A+B*x*, a počet standardů *No. of Standards: 5* (rozpuštědlo + 4 standardy). Po zkontrolování údajů použijte tlačítko *Standards*.
4. Objeví se další okno, kde do sloupce *Conc.* vepíšete koncentrace standardů. Nejprve proved'te slepý pokus, tj. změřte absorbanci čistého rozpuštědla, bez přítomnosti analytu. Poté změřte kalibrační roztoky postupně od nejnižší koncentrace k největší. Klikněte na položku *Reference* (měření kyvety s disolučním médiem), než začnete měřit standardy. Zvolte vzorek a začněte měření kliknutím na panel *Start* a výběrem *Sel. Standard*.
5. Po skončení měření se ukáží naměřené hodnoty absorbance standardů a teprve po kliknutí na panel *OK*, program WinAspect vytvoří z naměřených údajů a zadaných koncentrací kalibrační křivku. Vzniklou kalibrační křivku uložte (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Save as...*) a pojmenujte následovně: *IND-kalibrace-x* (x = číslo skupiny).
6. Zhodnoťte její linearitu pomocí koeficientu determinace R^2 a zapište kalibrační rovnici ve tvaru $c = k_1A + k_2$

3.3.3 Zjištění koncentrace indometacinu v testovaném vzorku

1. Vložte do prostoru vzorku kyvetu naplněnou vzorkem odebraným při disoluční zkoušce.
2. Klikněte na *To Conc.* Zobrazí se dialogové okno *Concentration*. Kliknutím na *Start (Meas.)* zahajete měření koncentrace vzorků. V položce *Designation* pojmenujte testovaný vzorek a potvrďte tlačítkem *OK*.
3. Po změření vzorku přístrojem se objeví tabulka, kde je na základě závislosti absorbance na koncentraci ukázaná naměřená koncentrace. Zapište zjištěnou koncentraci indometacinu ve vzorcích, kterou pak vyneste do grafu jako časovou závislost.
4. Výsledky uložte (kliknutím na panel *File* a výběrem položky *Save as...*) a pojmenujte následovně: *IND-x* (x = číslo skupiny).
5. Chcete-li zkopírovat naměřená data do aplikace Excel, vyberte všechny výsledky, klikněte na *File*, zvolte *Copy to clipboard* a poté je vložte do aplikace Excel.
Pozor! Excel někdy automaticky převádí textové nebo číselné hodnoty na data. Chcete-li Excelu zabránit v jeho změně na kalendářní data, naformátujte celý list jako text před vložením dat do Excelu.

**Po dokončení měření kyvety opatrně, ale důkladně opláchněte
destilovanou vodou a nechte vyschnout.**



4. NÁLEŽITOSTI PROTOKOLU

- Hlavičku, stručně uvedené cíle práce, postup práce.
- Skutečné navážky tablet, maximální teoretickou hmotnost účinné látky v jednotlivé tabletě.
- Výpočty pro přípravu zásobního roztoku a kalibračních roztoků, zvolenou vlnovou délku, kalibrační závislost, kalibrační rovnici, hodnocení linearitu závislosti.
- Popis vizuálního pozorování průběhu zkoušky.
- Grafy průměrných disolučních profilů jednotlivých formulací (závislost % uvolněného množství účinné látky na čase). Diskusi opakovatelnosti stanovení profilu podle zvolené statistické charakteristiky variability.

Např. odhad směrodatné odchylky s pro rozsah souboru menší než 7 ($n < 7$) je dán vztahy (1) a (2)

$$s = R \cdot k_n \quad (1)$$

$$R = x_{\max} - x_{\min} \quad (2)$$

kde k_n je koeficient, $k_n = 0,591$ pro $n = 3$, a R je variační rozpětí.

- Diskusi vlivu složení, lisovacího tlaku nebo velikosti částic účinné látky dle zadání na disoluční chování vytvořených lékových přípravků na základě disolučních profilů, číselných parametrů disoluce a vizuálního pozorování.
- Hodnocení přijatelnosti vytvořených formulací z pohledu lékopisných kritérií.



5. LITERATURA

1. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Český lékopis 2023 – *Doplněk 2026*, 1st ed.; Grada Publishing a.s.: Praha, 2026.
2. Dressman, J., Kramer, J., Eds. *Pharmaceutical Dissolution Testing*, 1st ed.; Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, 2005.
3. Testování pevných lékových forem: rozpadavost, oděr a pevnost tablet. Ústav organické technologie, VŠCHT Praha. <https://uot.vscht.cz/studium/magisterske/laborator-oboru>