

## Vliv technologie přípravy na uvolňování theofylinu z pelet s chitosanem

DVOŘÁČKOVÁ K., ŠKRABÁKOVÁ G., RABIŠKOVÁ M.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků

Došlo 27. října 2009 / Přijato 11. listopadu 2009

### SOUHRN

#### Vliv technologie přípravy na uvolňování theofylinu z pelet s chitosanem

Metodou extruze/sferonizace se vlhčením chitosanovým roztokem (1–5%) v 10% kyselině octové připravily pelety obsahující theofylin, mikrokrytalickou celulosu a chitosan. Sledoval se vliv obsahu chitosanu (0,98–4,47 %) na uvolňování theofylinu z připravených pelet a disoluční profily se porovnály s údaji získanými pro pelety bez chitosanu a s 25 % chitosanu připravené vlhčením kyselinou octovou. Zjistilo se zpomalené uvolňování theofylinu (až 5 hodin) při pH 6,8 z pelet vzniklých při použití chitosanového roztoku, které bylo způsobené pravděpodobně interakcí karbonylových skupin mikrokrytalické celulosy a aminoskupin chitosanu za vzniku polyiontového komplexu. Prodloužené uvolňování léčiva zůstalo zachováno i v kyselém prostředí s pH 1,2, kdy se chitosan rozpouští. K interakci s MCC a prodloužení liberace léčiva se ukázalo nutné použít chitosan ve formě roztoku.

**Klíčová slova:** chitosan – mikrokrytalická celulosu – theofylin – pelety – extruze/sferonizace

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 216–224

### SUMMARY

#### Influence of formulation technology on theophylline release from chitosan-based pellets

Pellets containing theophylline, microcrystalline cellulose and chitosan were prepared by wetting with chitosan solution (1–5%) in 10% acetic acid using the extrusion/ spheronization method. The influence of chitosan content (0.98–4.47 %) on theophylline release from pellets was studied and their dissolution profiles were compared with the results obtained in pellets without chitosan and pellets containing 25% of chitosan prepared by wetting with acetic acid. A slower theophylline release (up to 5 hrs) at pH 6.8 from pellets prepared with chitosan solution was found; it was caused probably by the interaction of the carbonyl groups of MCC and the amino groups of chitosan forming a polyionic complex. A prolonged release of the drug was maintained also at pH 1.2, when chitosan dissolves. For the interaction with MCC and prolonged drug liberation it was necessary to use chitosan in the form of a solution.

**Key words:** chitosan – microcrystalline cellulose – theophylline – pellets – extrusion/spheronization

Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 216–224

Má

### Úvod

Pelety jsou stále studovanou perorální lékovou formou, zejména díky svému využití v řízeném uvolňování léčivých látek a dobré toleranci pacienty. Z nosných pomocných látek se při formulaci pelet nejčastěji uplatňují mikrokrytalická celulosu, polyakrylát, zkoumá se

využití karagenu, xanthanové klovatiny a polysacharidů<sup>1)</sup>.

K zajímavým látkám z posledně zmíněné skupiny patří chitosan, který se získává částečnou deacetylací chitinu. Chitosan se skládá z jednotek D-glukosaminu (2-amino-2-deoxy-D-glukosa) a N-acetyl-D-glukosaminu (2-acetamido-2-deoxy-D-glukosa) spojených β-1→4

#### Adresa pro korespondenci:

doc. PharmDr. Miloslava Rabišková, CSc.

Ústav technologie léků FaF VFU

Palackého 1–3, 612 42 Brno

e-mail: rabiskovam@vfu.cz

Tab. 1. Farmaceutické použití chitosanu

Uplatnění chitosanu	
rozvolňovaadlo	v tabletách, v koncentracích nad 5 % <sup>9-13)</sup>
pojivo	pojivě schopnosti ve srovnání s ostatními pomocnými látkami: hypromelosa > chitosan > methylcelulosa > karmelosa sodná sůl <sup>14, 15)</sup>
látko modifikující uvolňování léčivé látky	prodloužené uvolňování je umožněno kationtovým charakterem polymeru, jeho gelotvornými a filmotvornými vlastnostmi, reakcemi s jinými látkami; uplatňuje se například v matricích nebo gelových systémech s řízeným uvolňováním léčivé látky <sup>12, 14, 16)</sup>
urychlovač absorpce	chitosan je schopen zprostředkovat absorpci málo polárních molekul, peptidových nebo proteinových léčiv sliznicemi (kombinace mukoadheze s přechodným otevřením těsných kanálků a následným průchodem léčiva) <sup>12, 14)</sup>
mukoadhezivní vlastnosti	interakce pozitivně nabitého polymeru a negativně nabitého povrchu buněk nebo mucinu na sliznicích <sup>17)</sup>
filmotvorné vlastnosti	filmy i obaly pro částicové systémy <sup>18)</sup>
zlepšení disolučních profilů těžce rozpustných léčiv	např. griseofulvinu, prednisolonu, indomethacinu, zvýšením rozpustnosti a formováním gelu v kyselém prostředí žaludku <sup>12)</sup>
hojení ran	chitosan tvoří husté ochranné filmy umožňující dobrou perspiraci, absorpci vody, s pomalou enzymatickou degradací <sup>12)</sup>
mikročástice	nosič léčivé látky <sup>12)</sup>
vakcíny	nosič očkovací látky <sup>14)</sup>
genová terapie	nosič DNA <sup>14, 16)</sup>
nosný polymer v systémech s místně specifickým uvolňováním	využití pro transport léčiva do tlustého střeva <sup>19)</sup>

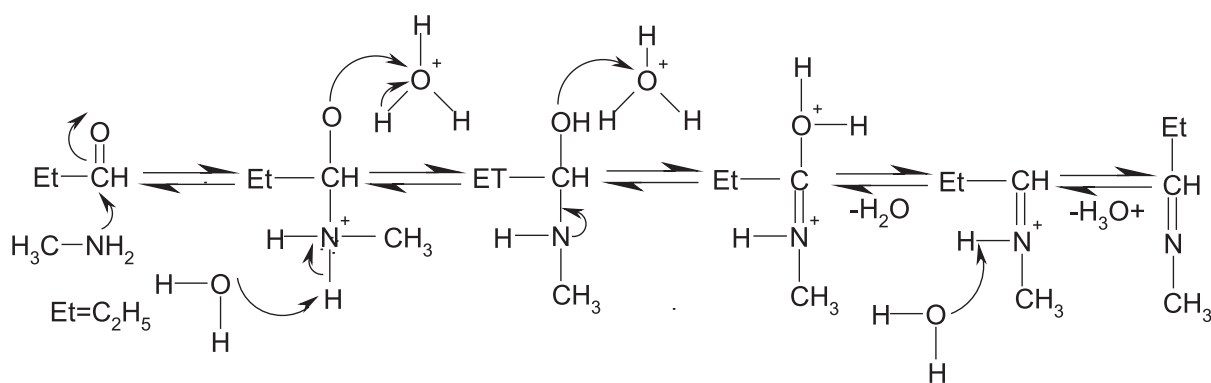
glykosidovými vazbami. O jeho vlastnostech pojednává předchozí článek z našeho pracoviště<sup>2)</sup>. Chitosan se uvádí jako potenciální farmaceutická pomocná látka přibližně od roku 1980<sup>3)</sup>. Zkoumají se jeho možnosti v prodloužení uvolňování léčivých látek<sup>4)</sup>, v lokálně specifickém uvolňování léčiv, např. v žaludku<sup>5)</sup>, mukoadhezivní schopnosti<sup>6)</sup>, ve zvýšení rychlosti rozpouštění těžce rozpustných léčiv<sup>7)</sup>, jako rozvolňovaadla<sup>8)</sup>. Možné farmaceutické využití chitosanu uvádí tabulka 1.

Výzkumy a využití chitosanu v peletách se datují přibližně do roku 1993<sup>3)</sup>. Zveřejněné práce popisují jeho použití jako plniva v jádře pelety i ve funkci obalu řídicího uvolňování. K tomuto využití chitosan předurčují jeho vlastnosti, zejména rozpustnost závislá na pH a biodegradovatelnost<sup>12, 20)</sup>. Rozpustnost v kyselém pH a nerozpustnost v neutrálním až zásaditém prostředí<sup>12)</sup>, stejně jako rozklad působením střevních bakterií z něj dělají ideální pomocnou látku pro transport léčivé látky do kolonu. Léková forma však musí být chráněna před kyselým prostředím žaludku acidorezistentním obalem. Chitosan jako nosnou pomocnou látku v jádře využili někteří autoři pro formování pelet bez nebo s léčivými látkami. Steckel<sup>21)</sup> zveřejnil studii o využití chitosanu bez nebo s přidáním další pomocné látky pro pelety připravené metodou extruze/sferonizace. Získal pelety se 100% zastoupením chitosanu, když použil zředěnou kyselinu octovou jako vlhčivo.

V posledních dvou desetiletích se provedla řada studií s chitosanem jako pomocnou látkou v lékových formách. Odborná literatura obsahuje řadu článků potvrzujících schopnost chitosanu zpomalovat uvolňování léčivých látek, ale také se objevují články, které tuto schopnost vyvracejí. Rychlost uvolňování léčiva zjevně závisí nejen

na samotné přítomnosti chitosanu, ale také na jeho koncentraci v lékové formě, na jeho vlastnostech (stupni deacetylace, molekulové hmotnosti), na použité technologii a na interakcích s dalšími látkami<sup>22)</sup>. Lékové formy založené na chitosanu fungují na principu matrice. V kyselém prostředí, kdy chitosan bobtná a tvoří viskózní gely, se jedná o hydrofilní gelovou matici, ze které se léčivá látka uvolňuje difuzí gelovou vrstvou a erozí matrice<sup>14)</sup>. V zásaditém prostředí chitosan nebobtná ani se nerozpouští, vzniká polymerní nerozpustná matrice (skelet), léčivá látka se uvolňuje vyluhováním a její liberace je výrazně pomalejší<sup>12, 23, 24)</sup>.

Mimo již zmíněných faktorů je uvolňování léčivé látky ovlivněno její rozpustností, molekulovou hmotností a nábojem, přidáním dalších pomocných látek a případnými interakcemi<sup>22)</sup>. Znalost interakcí je důležitá nejen z hlediska kompatibility a stability, ale také z hlediska bezpečnosti hotového léčivého přípravku. Ze studií interakcí chitosanu s pomocnými látkami jsou nejvíce prozkoumané interakce se sacharidy a celulosou. Umemura a Kawai<sup>25)</sup> studovali reakci mezi chitosanem (stupeň deacetylace 88,6 %) a monosacharidem glukosou nebo redukujícím disacharidem celobiosou u filmových preparátů. FTIR (Fourier transform infrared) spektroskopii prokázali, že oba cukry mohou svými karbonylovými skupinami vstupovat do reakce s aminoskupinami chitosanu (Maillardova reakce provázená vznikem hnědého pigmentu). Glukosa reagovala snadněji. Pokles volných aminoskupin ve filmu oproti preparátu bez sacharidů prokázali titrací. Do Maillardovy reakce vstupují také další sacharidy s klesající intenzitou fruktosa ≈ glukosa > arabinoza > ribosa. Ve srovnání s hexosami pentosy vykazují



Obr. 1. Reakce primárních aminů s aldehydy a ketony – nukleofilní kondenzace  
Ke stabilizaci přechodně vzniklých aminoalkoholů dochází eliminací molekuly vody za vzniku nenasycených produktů, adiční i eliminační reakce jsou katalyzovány kyselinami <sup>29)</sup>.

vyšší reaktivitu <sup>26)</sup>. Zatímco interakce mezi chitosanem a monosacharidy, resp. redukcujícími disacharidy jsou dobře popsány, interakce s celulosou jsou složitější. Popisují se elektrostatické interakce obou polymerů v roztoku, kdy je chitosan nositelem kladného a celuloza záporného náboje. Uvádí se adheze kombinace chitosanu a celulosy, která se využívá například v papírenském průmyslu ke zvýšení pevnosti papíru. S rostoucím počtem aminoskupin v molekule chitosanu roste také jeho adhezivita k celuloze <sup>27)</sup>. Hokosawa et al. studovali vlastnosti filmů složených z chitosanu a celulosy. Sledovali, zda mají na tvorbu filmu výraznější vliv karbonylové nebo karboxylové skupiny celulosy a zda je reaktivita ovlivněna aciditou kyseliny použité na přípravu filmu. U preparátů zkoumali množství volných aminoskupin, pevnost za sucha a po bobtnání v kyselém prostředí, stupeň bobtnání a biodegradovatelnost. Zjistili, že ačkoli ve stopovém množství, karbonylové skupiny celulosy na rozdíl od karboxylových skupin výrazně zvyšují zesíťování filmu a pevnost po bobtnání, snižují stupeň bobtnání a biodegradovatelnost. Snižování počtu aminoskupin ve složeném filmu a přítomnost C-H můstků mezi chitosanem a celulosou prokázali IR spektroskopii. Podstatou zesíťování filmu je reakce mezi karbonylovou skupinou a aminoskupinou za tvorby Schiffovy baze <sup>28)</sup> (obr. 1). Ačkoli by mělo v kyselém prostředí dojít k disociaci Schiffovy baze, filmy si zachovaly pevnost i v roztoku kyseliny. Tento výsledek naznačuje, že pravděpodobně nedochází pouze k jednoduché tvorbě Schiffovy baze, ale že z ní dále vzniká složitější komplex <sup>28, 29)</sup>.

Interakce chitosanu s negativně nabitými ionty nebo molekulami vede k tvorbě sítě pospojované iontovými můstky a k formování iontově zesíťovaných chitosanových hydrogelů. Při iontovém síťování mají negativně nabití ionty nebo molekuly přesně definovanou molekulovou hmotnost na rozdíl od polyiontové komplexace, kdy chitosan interaguje s negativně nabitými polymery se širokým rozpětím molekulové hmotnosti <sup>30)</sup>. Z iontového síťování jsou popsány reakce s ionty železa <sup>31)</sup>, citráty <sup>32)</sup>, fosfáty, sulfáty a dalšími <sup>33)</sup>. Z polyiontových komplexů lze zmínit interakci chitosanu s natrium-alginátem <sup>34)</sup>, natrium-polyakrylátem <sup>35)</sup>, natrium-hyaluroná-

tem <sup>36)</sup>, natrium-pektinátem <sup>37)</sup>. Posledně zmíněné reakce jsou často závislé na poměru obou polymerů, jejich koncentraci v roztoku a pH prostředí a vedou zpravidla ke zpomalené liberaci léčivé látky.

Interakce s léčivými látkami, např. s kyselinou salicylovou, theofylinem, diklofenakem sodnou solí a inzulinem zkoumali někteří autoři. Puttipipatkachorn et al. <sup>38)</sup> sledovali vliv chitosanu o různé molekulové hmotnosti, stupni deacetylce a viskozitě na rychlost uvolňování kyseliny salicylové a theofylinu. Chitosanové filmové preparáty připravili rozpuštěním léčivé látky v roztoku chitosanu v kyselině octové. NMR spektroskopii zjistili, že mezi kyselinou salicylovou a chitosanem interakce vznikají, zatímco u chitosanu a theofylinu se interakce nezjistily. FTIR spektroskopie potvrdila reakci kyseliny salicylové s aminoskupinami chitosanu za tvorby soli. Interakce se odrazila ve zpomaleném uvolňování léčivé látky, zejména u filmů připravených z chitosanu o vysoké viskozitě. V případě theofylinu nebylo uvolňování pomalejší v žádném z pokusů. Asada et al. <sup>39)</sup> hodnotili pevné disperze theofylinu a chitosanu připravené metodou sprejového sušení FTIR spektroskopii. Posun ve spektru přisoudili tvorbě vodíkových můstků mezi karbonylovou skupinou theofylinu a aminoskupinou chitosanu. Uvolňování léčivé látky z její pevné disperze s pomocnou látkou vzhledem k jejich fyzikální směsi bylo zpomalené v prostředí s pH 6,8 a srovnatelné v pH 1,2. Boonsongrit et al. <sup>40)</sup> sledovali vliv léčivých látek (inzulinu, diklofenaku sodné soli a kyseliny salicylové) na uvolňování z chitosanových mikro- a nanočástic. Ve všech případech byly iontové interakce příliš slabé, aby je bylo možné využít pro řízené uvolňování včleněných léčiv.

V této experimentální práci se sledoval vliv množství a koncentrace roztoku chitosanu v kyselině octové, který se použil jako vlhké pojivo k přípravě matricových pelet tvořených mikrokristalickou celulosou a theofylinem, na vlastnosti pelet a rychlost uvolňování léčiva. Výsledky se porovnály s předchozím experimentálním článkem <sup>2)</sup>. Cílem bylo dosáhnout pelety s prodlouženým uvolňováním modelového léčiva v prostředí fosforečnanového tlumivého roztoku s pH 6,8.

Tab. 2. Rozpustnost theofylinu v různých disolučních médiích

Disoluční prostředí	Rozpustnost theofylinu při 37 °C (mg/ml)
destilovaná voda	11,0
fosforečnanový tlumivý roztok o pH 6,8	14,2
umělá žaludeční šťáva pH 1,2	12,6

Výsledky uvádí tabulka 2.

#### Příprava pelet

Pelety byly připraveny metodou extruze/sferonizace. Složení jednotlivých vzorků uvádí tabulka 3. Prášková směs theofylinu a MCC (100 g) se homogenizovala ve vysokoobrátkovém mixeru (Tefal Kaleo, Francie) a ve

Tab. 3. Složení extrudátů

Vzorek	Theofylin (g)	Avicel PH 101 (g)	Chitosan (g)	Množství vlhčiva (g)	Koncentrace chitosanového roztoku (%)
1	10	90	0	99,0 <sup>a</sup>	–
2	10	90	0,98	98,4 <sup>b</sup>	1
3	10	90	1,91	65,4 <sup>b</sup>	2
4	10	90	2,93	97,8 <sup>b</sup>	3
5	10	90	3,48	87,1 <sup>b</sup>	4
6	10	90	4,47	89,4 <sup>b</sup>	5
A <sup>2)</sup>	20	55	25	110 <sup>c</sup>	–

A – výsledky převzaty z předchozího výzkumu pracoviště

<sup>a</sup> vlhčeno 10% kyselinou octovou, <sup>b</sup> vlhčeno 1-5% roztokem chitosanu v 10% kyselině octové, <sup>c</sup> vlhčeno 0,25% kyselinou octovou

## POKUSNÁ ČÁST

### Materiál

Modelovou léčivou látkou byl theofylin (Lehman & Voss, Německo), plnivem mikrokrytická celuloza (dále MCC, typ Avicel® PH 101, FMC, USA), pojivem roztok chitosanu (stupeň deacetylce 82,6 %, viskozita 1% roztoku chitosanu v 1% kyselině octové 5,2 mPa.s; Zhejiang Jiande Biochemical Industry Plant, China) o různé koncentraci (1–5%) v 10% kyselině octové. Léčivá i pomocné látky měly lékopisnou kvalitu. K hodnocení rozpustnosti a disoluce theofylinu se použila umělá žaludeční šťáva bez přídavku pepsinu (pH 1,2) a fosforečnanový tlumivý roztok (pH 6,8) připravené podle platného Českého lékopisu.

### Stanovení rozpustnosti theofylinu

Rozpustnost theofylinu se stanovila v destilované vodě, umělé žaludeční šťávě (pH 1,2) a fosforečnanovém tlumivém roztoku (pH 6,8). Do disolučních lázní s příslušným disolučním prostředím (1000 ml; Sotax AT 7 Smart, Donaulab, Švýcarsko) vytemperovaných na teplotu 37 °C se vložilo 30 g léčivé látky tak, aby byla po celou dobu disoluce (48 hodin) trvale v nadbytku. Rychlost míchadla byla 100 ot./min. Po uplynutí 48 hodin se odebraly vzorky z jednotlivých disolučních nádob a ihned se filtrovaly přes membránový filtr o velikosti pórů 0,22 µm. Koncentrace nasyceného roztoku se stanovila spektrofotometricky (spektrofotometr – UV/VIS, Perkin Elmer Instruments, USA) při 273 nm proti příslušnému disolučnímu médiu metodou kalibrační křivky.

stejném zařízení se postupně vlhčila rychlostí 25 ml/min po dobu 5 minut. Zvlhčená plastická hmota se přenesla do extruderu Pharmex 35T (Wyss & Probst Eng., Švýcarsko) a protlačila extruzní přepážkou tloušťky 1,0 mm s axiálním umístěním a otvory o průměru 1,25 mm. Extrudát se vložil na rotující talíř sferonizatoru Pharmex 35T (Wyss & Probst Eng., Švýcarsko). Talíř se šrafovaným povrchem a průměrem 23 cm měl rychlost 640 ot./min. Doba sferonizace byla 15 minut. Vlhké pelety se vysušily v horkovzdušné sušárně Horo (Dr. Ing. Hofman, Německo) při teplotě 60 °C po dobu 3 hodin.

### Hodnocení pelet

Z připravených pelet se oddělila frakce o velikosti částic 1,0–1,25 mm (Retsch GmbH & Co. KG, Německo). Stanovily se pevnost částic, oděr, tvar (sfericitu), obsah a uvolňování léčivé látky.

Pevnost pelet se měřila v čelistovém přístroji (C5 Pellet Hardness and Compression Tester, Engineering System, Velká Británie). Zjišťovala se hodnota destrukční síly, která jednotlivé pelety rozdrtila. Hodnotilo se 10 ks pelet, zaznamenala se průměrná pevnost se směrodatnou odchylkou <sup>41)</sup>.

Mechanická odolnost pelet v oděru se stanovila v přístroji ERWEKA (typ TAR 10, ERWEKA GmbH, Německo) s upraveným bubínkem z nerezové oceli pro vyloučení vlivu statické elektřiny na výsledky zkoušky. Hodnotilo se 10,0 g pelet zbavených prachových částic, přesně odvážených, spolu s 25 skleněnými kuličkami o průměru 4 mm po dobu 10 minut při 20 ot./min. Za oděr se považovaly částice menší než 250 µm. Hodnota oděru, hmotnostního úbytku, se vyjádřila v % <sup>41)</sup>.

Sfericitu pelet *S*, jako parametr tvaru částic, se vypočítala z povrchu *A* (mm<sup>2</sup>) a obvodu *p* (mm) stanoveného

obrazovou analýzou 100 ks pelet (Leco IA 32, Leco Instruments, USA) podle vzorce <sup>42)</sup>:

$$S = \frac{4\pi A}{P^2} \quad [1]$$

Ke stanovení obsahu theofylinu se použily rozdrčené pelety, vzorek se 24 hodin míchal v čištěné vodě a po filtraci se množství rozpuštěného léčiva hodnotilo spektrofotometricky při vlnové délce 273 nm.

Zkouška disoluce se stanovilo množství uvolněného theofylinu v disolučních prostředích s pH 1,2 (umělá žaludeční šťáva) a 6,8 (fosforečnanový tlumivý roztok). Disoluce se prováděla míchadlovou metodou v přístroji Sotax AT 7 Smart on-line, množství média bylo 1000 ml, teplota 37 °C, rychlost míchadel 50 ot./min. Odběr se prováděl zpočátku disoluce v kratších časových intervalech (15, resp. 30 min), později po jedné hodině po dobu 300 minut. Uvolněné množství theofylinu se měřilo spektrofotometricky při vlnové délce 273 nm.

#### Faktor podobnosti

Výsledky disoluce jednotlivých vzorků se porovnály s disolučním profilem vzorku bez obsahu chitosanu (vzorek 1) na základě faktoru podobnosti  $f_2$  <sup>43)</sup>:

$$f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[ 1 + (1/n) \sum_{i=1}^n |R_i - T_i|^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\} \quad [2]$$

kde  $n$  je počet časových bodů a  $R_i$  a  $T_i$  množství uvolněné léčivé látky srovnávacího (R) a hodnoceného (T) vzorku v daném čase.

Faktor podobnosti  $f_2$  nabývá hodnot 0–100. Jestliže je jeho hodnota rovna 100, disoluční profily jsou shodné. Nabývá-li  $f_2$  hodnot 50–100, disoluční profily jsou si navzájem podobné. Nabývá-li  $f_2$  hodnot 0–50, disoluční profily jsou považovány za nepodobné a nelze je považovat za ekvivalentní <sup>44)</sup>.

#### Mechanismus uvolňování léčivé látky z matric

Mechanismus uvolňování léčivé látky z matricových systémů lze popsat řadou teoretických kinetických modelů:

**Kinetika nultého řádu** – uvolňování kinetikou nultého řádu, nebo jí kinetikou blízkou, představuje ideální variantu uvolňování léčivé látky z matrice pro zajištění konstantní hladiny léčiva v biofázi po delší časový interval.

Při zmíněném modelu uvolňování platí, že se za stejný časový úsek uvolní vždy stejné množství léčivé látky. Uvolňování kinetikou nultého řádu lze dosáhnout například u transdermálních systémů, u lékových forem obalovaných či osmoticky řízených, v případě matric například u tablet s léčivou látkou s nízkou rozpustností. Zjednodušeně pro daný model platí <sup>45, 46)</sup>:

$$M_t / M_\infty = K_0 t, \quad [3]$$

kde  $M_t$  je množství léčiva uvolněné v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je celkové množství léčiva v matrici a  $K_0$  je rychlostní konstanta uvolňování kinetikou 0. řádu.

**Kinetika prvního řádu** – pro systémy, které vykazují vysokou míru korelace s tímto modelem, platí, že rychlost uvolňování léčiva je závislá na jeho koncentraci v lékové formě <sup>46)</sup>:

$$M_t / M_\infty = 1 - e^{-K_1 t}, \quad [4]$$

kde  $M_t$  je množství léčiva uvolněné v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je celkové množství léčiva v matrici a  $K_1$  je rychlostní konstanta uvolňování kinetikou prvního řádu.

**Higuchi model** – tento teoretický model popisuje kinetiku uvolňování léčivých látek z matric procesem difuze <sup>45)</sup>. Plně se shoduje s uvolňováním léčiva ze skeletové (nerozpustné) matrice, který probíhá výhradně procesem difuze. Může se použít k popisu uvolňování léčivé látky z transdermálních systémů nebo z matricových tablet s obsahem dobře rozpustného léčiva. Lze ho vyjádřit následujícím vztahem <sup>46)</sup>:

$$M_t / M_\infty = K_H \sqrt{t}, \quad [5]$$

kde  $M_t$  je množství léčiva uvolněné v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je celkové množství léčiva v matrici a  $K_H$  je rychlostní konstanta Higuchiho kinetického modelu.

**Korsmeyer-Peppas model** – tato jednoduchá empirická rovnice popisuje uvolňování léčiva z matricových tablet <sup>47)</sup>. Používá se k analýze uvolňování, jehož mechanismus není přesně znám, nebo je kombinací více typů uvolňování léčiva <sup>48)</sup>. Zmíněný model předpokládá zpracování dosažených výsledků pouze do uvolnění 60 % celkového množství léčivé látky z matrice. Lze ho vyjádřit následujícím vztahem <sup>46)</sup>:

$$M_t / M_\infty = K_{KP} t^n, \quad [6]$$

kde  $M_t$  je množství léčiva uvolněné v čase  $t$ ,  $M_\infty$  je celkové množství léčiva v matrici,  $K_{KP}$  je rychlostní kon-

Tab. 4. Mechanismy uvolňování léčiva z matric dle hodnoty exponentu  $n$

Hodnota exponentu $n$	Mechanismus uvolňování léčiva
0,5	Fickova difuze
$0,5 < n < 1,0$	anomální transport – kombinace difuze a eroze matrice
1,0	eroze matrice – kinetika 0. řádu (nezávislá na koncentraci)
vyšší než 1,0	konstantní rychlost pohyblivých front a lineární váhový přírůstek matrice

stanta Korsmeyer-Peppasova kinetického modelu a  $n$  je exponent, který charakterizuje mechanismus uvolňování léčiva (tab. 4).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Z práškových směsí theofylinu a MCC vznikaly vlhčením přibližně stejného množství vlhčiva nebo vlhkého pojiva, tj. 87,1–99,0 g na 100 g směsi, kvalitní extrudáty (tab. 3), z nichž se sferonizací formovaly pelety kulatého tvaru; hodnoty sfericity se pohybovaly v rozmezí od 0,8238 do 0,8651 (tab. 5), tj. hodnoty nad 0,80<sup>49)</sup>. Na rozdíl od práce Tapii et al.<sup>3)</sup>, kterým se nepodařilo sferonizovat extrudát připravený vlhčením 3% roztokem chitosanu pro jeho gelovitý charakter, v našem případě sférické pelety vznikaly i při použití 5% roztoku chitosanu. Průběh extruze i sferonizace byl hladký, bez problémů.

Roztoky vyšších koncentrací byly viskóznější, ale z hlediska vlhčení, přípravy plastické hmoty ani její následné sferonizace nepředstavovaly problém. Příčinou může být rozdílná kvalita chitosanu v jejich experimentu, která však není v práci blíže specifikována.

Výtěžky většinové frakce pelet o průměru 1,0–1,25 mm se pohybovaly od 40,60 do 81,74 % (tab. 6). Nejnižší výtěžek se stanovil u pelet vzorku 6 (40,60 %), který se připravoval s nejkonzentrovanejším 5% roztokem chitosanu. U vzorků 5 a 6 se zjistila poměrně výrazná frakce pelet větší velikosti, tj. 1,25–2,00 mm (38,58 % a 54,70 %), což je s největší pravděpodobností zapříčiněnou vysokou viskozitou 4%, resp. 5% roztoku chitosanu 333,40 mPa.s, resp. 347,72 mPa.s ve srovnání s 14,83 mPa.s u 1% roztoku) a jeho zvýšenou pojivovou schopností.

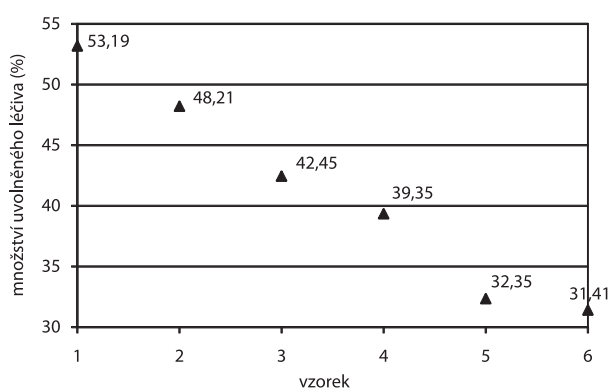
Pelety s chitosanem měly vysokou pevnost (tab. 5), tj. 11,71–15,50 N, a nízký oděr 0,08–0,19 %, zatímco pelety vzorku 1 bez obsahu chitosanu měly pevnost nižší

Tab. 5. Jakostní parametry pelet

Vzorek	Obsah theofylinu (%)	Pevnost (N)	Oděr (%)	Sfericita
1	9,77 ± 0,03	5,41 ± 0,84	1,48 ± 0,14	0,8489
2	9,92 ± 0,19	11,71 ± 1,84	0,09 ± 0,04	0,8405
3	10,21 ± 0,08	12,49 ± 2,00	0,19 ± 0,05	0,8464
4	10,12 ± 0,08	15,50 ± 3,04	0,11 ± 0,01	0,8238
5	10,11 ± 0,08	14,59 ± 2,17	0,10 ± 0,04	0,8651
6	9,96 ± 0,07	12,93 ± 2,84	0,08 ± 0,02	0,8540
A <sup>2)</sup>	18,16 ± 0,12	15,76 ± 2,85	0,02 ± 0,01	0,8850

Tab. 6. Distribuce velikosti peletových vzorků

Vzorek	Distribuce velikosti (mm)						Střední průměr (mm)
	< 0,25 (%)	0,25–0,50 (%)	0,50–0,80 (%)	0,80–1,00 (%)	1,00–1,25 (%)	1,25–2,00 (%)	
1	0,00	1,44	7,20	47,84	43,22	0,31	0,97
2	0,00	0,36	2,89	16,02	78,07	2,60	1,09
3	0,00	0,50	2,10	9,00	75,10	4,40	1,11
4	0,00	0,22	1,45	7,46	81,74	9,10	1,14
5	0,00	0,12	1,62	4,99	54,68	38,58	1,30
6	0,00	0,20	1,10	3,40	40,60	54,70	1,38



Obr. 2. Množství uvolněného theofylinu po 15 minutách v prostředí tlumivého roztoku o pH 6,8

(5,41 N) a vyšší hodnotu oděru (1,48 %), která však stále byla pod hranicí limitu 1,7 %<sup>50)</sup>. Obsah theofylinu se stanovil v rozmezí 9,77–10,21 mg, tj. 97,7–102,1 % teoretického obsahu léčiva. Vznikly tak kvalitní pelety s výbornou mechanickou odolností.

Množství uvolněného množství theofylinu v disolučním prostředí o pH 6,8 se zvyšujícím se množstvím chitosanu v matici klesalo, což svědčí o zpevnování matrice, možné interakci rozpuštěného chitosanu s mikrokystalickou celulosou a vzniku nerozpustné matrice<sup>28,29)</sup>. Pelety se během pětihodinového disolučního testu nerozpadly. Pelety s vyšším obsahem chitosanu (vzorky 5 a 6) byly schopné zpomalit uvolňování theofylinu po celou dobu disoluce (tj. 5 hodin) (tab. 7). Z obrázku 2 je patrný rovnoměrný, téměř lineární pokles

Tab. 7. Množství uvolněného theofylinu ve fosforečnanovém tlumivém roztoku o pH 6,8

čas (min)	Množství uvolněného theofylinu (%)						
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6	vzorek A
30	66,05 ± 0,41	61,54 ± 0,28	55,10 ± 0,47	52,59 ± 0,76	42,09 ± 0,32	42,34 ± 0,56	52,71 ± 0,91
60	80,50 ± 0,36	76,74 ± 0,33	70,16 ± 0,55	67,87 ± 0,93	55,36 ± 0,61	56,20 ± 0,41	71,24 ± 0,15
90	88,81 ± 0,31	85,93 ± 0,32	80,15 ± 0,58	77,23 ± 0,98	64,60 ± 0,56	65,79 ± 0,34	82,72 ± 1,14
120	93,24 ± 0,32	92,13 ± 0,31	87,28 ± 0,58	83,92 ± 1,02	71,98 ± 0,51	72,71 ± 0,30	90,63 ± 1,17
180	95,76 ± 0,13	98,13 ± 0,19	95,80 ± 0,63	93,64 ± 0,90	83,82 ± 0,51	82,69 ± 0,29	95,62 ± 1,09
240	95,78 ± 0,39	100,00 ± 0,18	99,20 ± 0,35	97,56 ± 0,57	91,36 ± 0,49	88,93 ± 0,29	95,62 ± 1,09
300	95,94 ± 0,43	100,30 ± 0,15	99,86 ± 0,13	98,57 ± 0,38	95,21 ± 0,80	92,39 ± 0,44	98,44 ± 1,09
360	95,98 ± 0,48	100,30 ± 0,15	99,86 ± 0,13	99,21 ± 0,36	97,57 ± 0,40	94,69 ± 1,48	-
420	96,16 ± 0,56	100,30 ± 0,15	99,86 ± 0,13	99,56 ± 0,47	98,38 ± 0,28	95,34 ± 0,54	-

uvolněného množství léčivé látky po 15 minutách disoluce u vzorků 2–5 se stoupajícím množstvím chitosanu v peletách. Ze srovnání faktorů podobnosti v tabulce 8 je vidět, že pouze disoluční profil vzorku 2 a vzorku 3 je podobný peletám vzorku 1 bez obsahu chitosanu s faktory podobnosti 68,86 a 50,59. Ostatní vzorky 4, 5 a 6 uvolňovaly theofylin pomaleji a jejich disoluční profily byly odlišné. Při srovnání dosažených výsledků s předchozí prací našeho pracoviště<sup>2)</sup>, kde se sledovaly pelety stejné velikosti a vlastností (tab. 5) avšak s vyšším obsahem chitosanu (25 %) (tab. 3) a připravených pouze vlh-

Tab. 8. Faktory podobnosti disolučních profilů

Referenční/ testovaný vzorek	Disoluční prostředí	
	tlumivý roztok o pH 6,8	žaludeční šťáva
1–2	68,86	44,06
1–3	50,59	40,74
1–4	46,87	56,81
1–5	34,09	42,85
1–6	34,28	42,87
1–A	58,66	56,74

Tab. 9. Množství uvolněného theofylinu v umělé žaludeční šťávě pH 1,2

čas (min)	Množství uvolněného theofylinu (%)						
	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5	vzorek 6	vzorek A
30	65,63 ± 0,26	48,77 ± 1,92	46,53 ± 2,49	56,42 ± 0,80	48,09 ± 0,28	48,48 ± 0,17	67,29 ± 1,73
60	79,36 ± 0,31	63,01 ± 2,13	60,05 ± 2,87	72,12 ± 0,40	62,96 ± 0,44	63,36 ± 0,20	88,81 ± 0,94
90	85,26 ± 0,47	72,33 ± 2,11	69,23 ± 3,06	81,62 ± 0,53	73,18 ± 0,54	72,82 ± 0,27	91,99 ± 0,79
120	87,58 ± 0,46	78,61 ± 2,26	75,72 ± 3,10	87,39 ± 0,46	80,61 ± 0,61	80,15 ± 0,31	91,64 ± 0,69
180	88,31 ± 0,48	84,50 ± 2,16	83,00 ± 3,35	92,21 ± 0,47	89,67 ± 0,49	87,32 ± 0,11	91,30 ± 0,55
240	87,66 ± 0,96	85,55 ± 2,24	84,67 ± 3,64	92,35 ± 0,07	91,68 ± 0,35	89,16 ± 0,19	91,06 ± 0,62
300	87,66 ± 0,96	85,55 ± 2,24	84,67 ± 3,64	92,38 ± 0,17	91,75 ± 0,31	89,16 ± 0,19	

Tab. 10. Mechanismus uvolňování theofylinu z pelet

Kinetický model vzorek	pH	0. řád	1. řád	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	
		R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	n
1	1,2	0,8561	0,8038	0,9410	0,9758	0,249
	6,8	0,9021	0,8506	0,9696	0,9907	0,305
2	1,2	0,9449	0,8805	0,9913	0,9973	0,364
	6,8	0,9235	0,8639	0,9814	0,9941	0,312
3	1,2	0,9025	0,8208	0,9774	0,9930	0,353
	6,8	0,9038	0,8219	0,9782	0,9934	0,334
4	1,2	0,9314	0,8757	0,9848	0,9959	0,335
	6,8	0,9046	0,8160	0,9791	0,9913	0,351
5	1,2	0,9640	0,9258	0,9977	0,9998	0,379
	6,8	0,9509	0,8696	0,9966	0,9994	0,389
6	1,2	0,9583	0,9045	0,9947	0,9984	0,396
	6,8	0,9296	0,8399	0,9898	0,9995	0,399
A	1,2	0,9006	0,8502	0,9650	0,9845	0,341
	6,8	0,8657	0,8110	0,9406	0,9695	0,343

čením práškové směsi 0,25% kyselinou octovou, se zjistilo, že disoluční profil theofylinu je rychlejší než větší na vzorku s podstatně nižším obsahem chitosanu avšak připravených za použití chitosanového roztoku. Disoluční profil vzorku A byl podobný profilu pelet bez obsahu chitosanu (faktor podobnosti 58,66. To potvrzuje předpoklad nutnosti použití při přípravě matric chitosanový roztok, ve kterém chitosan bobtná, tvoří viskózní gely, a který umožňuje interakci jeho aminoskupin s karbonylovými skupinami celulosy za tvorby Schiffovy báze<sup>14, 28, 29)</sup>. Rychlé uvolnění léčivých látek z pelet s obsahem chitosanu formovaných bez použití chitosanového roztoku zveřejnili také další autoři, ať již se jako vlhčivo použila voda<sup>34)</sup>, směs vody a ethanolu<sup>51)</sup> nebo kyselina octová o různé koncentraci<sup>2)</sup>.

Vzhledem k rozpustnosti chitosanu v kyselém prostředí a jeho nízkému obsahu v připravených peletových vzorcích se nepředpokládaly rozdíly v disoluci v umělé žaludeční šťávě s pH 1,2. I v tomto případě však byla disoluce theofylinu zpomalená (tab. 9) a disoluční profily vzorků 2–6 nebyly až na jednu výjimku podobné vzorku 1 bez obsahu chitosanu (tab. 8). Při srovnání dosažených výsledků s peletami z předchozího výzkumu<sup>2)</sup> i zde zjistíme, že disoluce léčiva ze vzorku A byla rychlá. Disoluční profil byl podobný vzorku 1 bez obsahu chitosanu. Poukazuje to na publikaci Hokusawy et al.<sup>28)</sup> o vzniku složitějšího komplexu mezi chitosanem a celulosou, než je Schiffova báze, který se na rozdíl od ní v kyselém prostředí nerozpouští. I v tomto případě se potvrzuje důležitost použití roztoku chitosanu při vlhčení práškové směsi a přípravě plastické hmoty pro umožnění interakce obou polymerů. Ani v tomto disolučním prostředí se pelety při disoluci nerozpadly. Otázkou zůstává neúplné uvolnění theofylinu z pelet při jeho podobné rozpustnosti v obou disolučních prostředích (tab. 2). V žádném experimentálním článku se nepopisují problémy s uvolněním tohoto léčiva v kyselém prostředí<sup>38–40)</sup>, možné interakce theofylinu s chitosanem neměly na jeho uvolňování v kyselém prostředí žádný vliv<sup>38, 39)</sup> a adsorpce theofylinu na MCC nebyla též zveřejněna<sup>52–54)</sup>.

Mechanismus uvolňování theofylinu z pelet naznačuje tabulka 10. Hodnoty determinačního koeficientu  $R^2$  pro nultý řád se pohybují mezi 0,86–0,96, pro první řád jsou nižší než 0,92. Ani jedna z uvedených kinetik tedy neodpovídá mechanismu uvolňování theofylinu z pelet. Hodnoty  $R^2$  u vzorků 2–6 pro Higuchiho model jsou vysoké (0,98–0,99), pro Korsmeyer-Peppasův model jsou ještě vyšší než 0,99. Hodnoty  $R^2$  u vzorků 1 a A jsou v obou případech nižší (0,94–0,97 pro Higuchiho model; 0,97–0,99 pro Korsmeyer-Peppasův model). Pro vysokou shodu disolučních dat vzorků 2–6 s uvedenými modely lze konstatovat, že se theofylin uvolňoval z pelet difúzí z nerozpustné matrice. Vzhledem k nízkému exponentu  $n$ , který byl nižší než 0,399, nelze vyloučit určitý podíl eroze matric při disoluci. Popsaný mechanismus platí jak pro disoluci v prostředí pH 1,2, tak i pro pH 6,8. Podobné výsledky získali Sung-Hyun et al.<sup>55)</sup> u theofylinových matricových tablet založených na kombinaci interagujících polymerů chitosanu a karbomeru. Také v jejich případě nebylo

uvolňování theofylinu závislé na pH při použití stejných disolučních médií s pH 1,2 a 6,8.

## ZÁVĚR

Metodou extruze/sferonizace se připravily pelety s 0,98–4,47 % chitosanu. K formování plastické hmoty se použil 1–5% chitosanový roztok v kyselině octové. Vznikly tak matricové pelety, které uvolňovaly theofylin pomaleji než pelety bez chitosanu nebo pelety s 25 % chitosanu vlhčené pouze samotnou kyselinou. Potvrdila se nezbytnost použití chitosanu v roztoku pro možnou interakci s vhodnou pomocnou látkou, v našem případě mikrokrytalickou celulosou, k prodlouženému uvolňování theofylinu z pelet.

Experimentální práce byla uskutečněna s finanční podporou Ministerstva zdravotnictví České republiky, číslo projektu NS10222-2/2009.

## LITERATURA

1. **Dukić-Ott, A., Thommes, M., Remon, J. P. et al.:** Eur. J. Pharm. Biopharm., 2009; 71, 38–46.
2. **Janovská, L., Škrabáková, G., Vetchý, D. et al.:** Čes. a slov. Farm., 2009; 58, 21–27.
3. **Tapia, C., Buckton, G., Newton, J. M.:** Int. J. Pharm., 1993; 92, 211–218.
4. **Miyazaki, S., Ishii, K., Nadai, T.:** Chem. Pharm. Bull., 1981; 29, 3067–3069.
5. **Miyazaki, S., Yamaguchi, H., Yokouchi, C. et al.:** Chem. Pharm. Bull., 1988; 36, 4033–4038.
6. **Takayama, K., Hirata, M., Machida, Y. et al.:** Chem. Pharm. Bull., 1990; 38, 1993–1997.
7. **Shiraishi, S., Arahira, M., Imai T. et al.:** Chem. Pharm. Bull., 1990; 38, 185–187.
8. **Knapczyk, J.:** Int. J. Pharm. 1993; 89, 1–7.
9. **Kumar, M. N. V. R.:** Reactive & functional polymers, 2000; 46, 1–27.
10. **Sawayangi, Y., Nambu, N., Nagai, T.:** Chem. Pharm. Bull., 1982; 30, 4464–4467.
11. **Shirashi, S., Arahira, M., Imai, T. et al.:** Chem. Pharm. Bull., 1990; 38, 185–187.
12. **Illum, L.:** Pharm. Res., 1998; 15, 1326–1331.
13. **Ritthidej, G. C., Chomto, S., Pummangura, S. et al.:** Drug Dev. Ind. Pharm., 1994; 20, 2109–2134.
14. **Säkkinen, M.:** Biopharmaceutical Evaluation of Microcrystalline Chitosan as Release-Rate-Controlling Hydrophilic Polymer in Granules for Gastro-Retentive Drug Delivery, Academic Disertation, Helsinki 2003.
15. **Upadrashta, S. M., Katikaneni, P. R., Nuessle, N. O.:** Drug Dev. Ind. Pharm. 1990; 18, 1701–1708.
16. **Dodane, V., Vilivalam, V. D.:** Pharm. Sci. Technol. Today, 1998; 4, 246–253.
17. **Henriksen, I., Green, K. L., Smart, J. D. et al.:** Int. J. Pharm., 1996; 145, 231–240.
18. **Takeuchi, H., Yamamoto, H., Niwa, T. et al.:** Pharm. Res., 1996; 13, 896–901.
19. **Shimono, N., Takatori, T., Ueda, M. et al.:** Int. J. Pharm., 2002; 254, 45–54.



20. **Muzzarelli, R. A. A.:** Cell Mol. Life Sci., 1997; 53, 131–140.
21. **Steckel, H., Minderman-Nogly, F.:** Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004; 57, 107–114.
22. **Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S. et al.:** Int. J. Pharm., 2004; 247, 1–33.
23. **Nunthanid, J., Laungtana-anan, M., Srimornsak, P. et al.:** J. Controlled Rel., 2004; 99, 15–26.
24. **Chandy, T., Sharma, Ch. P.:** Biomaterials, 1993; 14, 939–944.
25. **Umemura, K., Kawai, S.:** Carbohydrate Polymers, 2007; 68, 242–248.
26. **Chung, Y., Kuo, Ch., Chen, Ch.:** Bioresource Technology, 2005; 96, 1473–1482.
27. **Gällstedt, M.:** Films and composites based on chitosan, wheat gluten or wheat proteins – their packaging related to mechanical and barrier properties. Stockholm: KTH Royal Institut of Technology, Academic dissertation 2004.
28. **Hokosawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K. et al.:** Industrial & Engeneering Chemistry Research, 1991; 30, 788–792.
29. **Svoboda, J.:** Organická chemie I. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická 2005; 226–227.
30. **Mi, F. L., Shyu, S. S., Wong, S. F. et al.:** J. Controlled Release, 1997; 44, 19–32.
31. **Ruel-Gariepy, E., Chenite, A., Chaput, C. et al.:** Int. J. Pharm., 2000; 203, 89–98.
32. **Shu, X. Y., Zhu, K. J., Song, W.:** Int. J. Pharm, 2001; 212, 19–28.
33. **Berger, J., Reist, R., Mayer, J. M. et al.:** Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004; 57, 19–34.
34. **Charoenthai, N., Kleinebudde, P., Puttipipatkachorn, S.:** AAPS PharmSciTech, 2007; 8, 64.
35. **Takahashi, T., Takayama, K., Machida, Y. et al.:** Int. J. Pharm., 1990; 61, 35–41.
36. **Surini, S., Akiyama, H., Morishita, M. et al.:** J. Controlled Rel., 2003; 90, 291–301.
37. **Hiorth, M., Versland, T., Heikkil, J. et al.:** Int. J. Pharm., 2005; 308, 25–32.
38. **Puttipipatkachorn, S., Nunthanid, J., Yamamoto, K. et al.:** J. Controlled Rel., 2001; 75, 143–151.
39. **Asada, M., Takahashi, H., Okamoto, H. et al.:** Int. J. Pharm., 2004; 270, 167–174.
40. **Boonsogrit, Y., Mitrejev, A., Mueller, B. W.:** Eur. J. Pharm. Biopharm., 2006; 62, 267–274.
41. **Gryczová, E., Dvořáčková, K., Rabišková, M.:** Čes. a slov. Farm. 2009; 58, 9–13.
42. **Rabišková, M., Häring, A., Minczingerová, K. et al.:** Chem. Listy, 2007; 101, 70–77.
43. **Moore, J. W., Flanner, H. H.:** Pharm. Tech., 1996; 20, 64–74.
44. **Lu, Ch., Lu, Y., Chen, J. et. al.:** Eur. J. Pharm. Biopharm., 2007; 66, 210–219.
45. **Costa, P., Lobo, J. M. S.:** Eur. J. Pharm. Sci., 2001; 13, 123–133.
46. **Avachat A., Kotwal, V.:** AAPS PharmSciTech, 2007; 8, 88.
47. **Colombo, P., Bettini, R., Peppas, N. A.:** J. Controlled Release, 1999; 61, 83–91.
48. **Hayashi, T., Kanbe, H., Okada, M. et al.:** Int. J. Pharm., 2005; 304, 91–101.
49. **Deasy, P. B., Law, M. F. L.:** Int. J. Pharm., 1997; 148, 201–209.
50. **Vertommen J., Kinget R.:** Drug Dev. Ind. Pharm., 1997; 23, 39–46.
51. **Santos, H., Veiga, F., Pina, M. et al.:** Int. J. Pharm., 2002; 246, 153–169.
52. **Okada, S., Nahahara, H., Isaka, H.:** Chem. Pharm. Bull., 1987; 35, 761–768.
53. **Rivera, S. L., Ghodbane, S.:** Int. J. Pharm., 1994; 108, 31–38.
54. **Al-Nimry, S. S., Assaf, S. M., Jalal, I. M. et al.:** Int. J. Pharm., 1997; 149, 115–121.
55. **Sung-Hyun, P., Myung-Kwan, Ch., Hoo-Kyun, Ch.:** Int. J. Pharm., 2008; 347, 39–44.