

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studijní obor : Farmacie

Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 10.

Nanofibremembranes as carriers of drug 10.

Autor práce: Jana Nguyenová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavel Doležal, CSc.

Hradec Králové, září 2014

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

V Hradci Králové dne 8. 9. 2014

Děkuji vedoucímu práce doc. RNDr. Pavlu Doležalovi, CSc. za jeho podporu, rady a připomínky při vypracování této diplomové práce.

Také děkuji Mgr. Janu Honegrovi, Mgr. Pavlu Berkovi a Mgr. Petru Vrbatovi za získání dat HPLC a další poskytovanou pomoc.

Obsah

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1 ÚVOD.....	6
2 ZADÁNÍ PRÁCE.....	7
3 TEORETICKÁ ČÁST	8
3.1 Rozpustnost	8
3.1.1 Biofarmaceutický klasifikační systém	9
3.2 Metody zvýšení rozpustnosti.....	10
3.2.1 Mikronizace.....	10
3.2.2 Nanosuspenze.....	11
3.2.3 Kryogenní techniky	11
3.2.4 Modifikace krystalické struktury	11
3.2.5 Tuhé disperze	12
3.2.6 Extruze z taveniny (hot-melt extruze).....	14
3.2.7 Elektrostatické zvlákňování (elektrospinning).....	16
3.2.8 Acetonitril a methanol.....	18
3.2.9 Polyvinylpyrrolidon	18
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	20
4.1 Použité látky	20
4.2 Přístroje a zařízení	20
4.3 Pracovní postupy a metody	21
4.3.1 Příprava mobilní fáze pro HPLC.....	21
4.3.2 Příprava disolučního media (McIlvaine pH6).....	22
4.4 Testování nanovlákných membrán	22
4.4.1 Disoluce nanovlákných membrán s gatrinem	22
4.4.2 Disoluce laminovaných nanovlákných membrán.....	23
4.4.3 Disoluce hydrofobně laminovaných membrán zalisovaných do tablet.....	23
5 DOKUMENTACE.....	25
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	30
7 ZÁVĚRY.....	35

8	POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY.....	37
9	LITERATURA.....	38

ABSTRAKT

Teoretická část práce podává informace o biofarmaceutickém klasifikačním systému léčiv a jeho kontextu ve výzkumu a vývoji léčiv. Jsou prezentovány metody používané ke zvýšení a zrychlení rozpustnosti včetně elektrospiningu.

Experimentální část je pilotní studií zaměřenou na hodnocení podmínek vhodných pro rozpouštění a testování nově připravených nanovlákených membrán z polyvinylpyrrolidonu s vysokým obsahem (do cca 35 procent) gatrinu jako látky špatně rozpustné ve vodných vehikulech.

Parametry HPLC stanovení gatrinu za použití C18 sorbentu a mobilní fáze acetonitril: fosfátový pufr pH 8 byly předběžně vyhodnoceny jako bezproblémově použitelné pro vehikula typu fosfátového pufru o pH 6,0. Stejně podmínky se ukázaly být ve vážné kolizi s polymerním materiálem nanovlákené membrány v průběhu disolučního hodnocení nebo s acetonitrem v mobilní fázi, přesného stanovení gatrinu nebylo v tomto případě dosaženo.

Tyto závěry vedou k návrhu na změnu formulace nanovlákených membrán použitím polymeru odlišného od polyvinylpyrrolidonu (např. hydroxypropylcelulosa) nebo na záměnu acetonitrilu methanolem v mobilní fázi pro HPLC.

Ve všech případech však bylo všechno analyticky dostupné gatrinu vždy rozpuštěno a stanoven do cca 10 až 12 minut od startu rozpouštěcích testů, což lze považovat za vhodné jak pro perorální, tak také některé formy mukosálního podání.

ABSTRACT

The theoretical part of thesis provides information on the biopharmaceutical classification system of drugs and its context in the research and development of pharmaceuticals. The methods used to increase the solubility and acceleration including electrospinning are presented.

The experimental part is the pilot study on the evaluation of conditions suitable for dissolution testing of newly prepared nanofibers made from polyvinylpyrrolidone membranes with a high content (up to 35 per cent) gatrín as a substance poorly soluble in aqueous vehicles.

The parameters of determination of gatrín by HPLC using C18 sorbent and a mobile phase of acetonitrile: phosphate buffer pH 8 were preliminarily evaluated as perfectly applicable to vehicle type-phosphate buffer pH 6.0. The same conditions were found to be in a severe collision with a polymer material of nanofibrous membrane during the dissolution evaluation or with acetonitrile in the mobile phase, an accurate determination of gatrín was not obtained in this case.

These findings lead to the proposal to change the formulation of the nanofiber membranes using polymer different from polyvinylpyrrolidone (eg. hydroxypropylcellulose) or the replacement of acetonitrile for methanol at the mobile phase for HPLC.

However, in all cases, all the analytically available amount of gatrín was always determined within 10 to 12 minutes from the start of the dissolution test. It can be considered suitable for oral as well as some types of mucosal dosage forms.

1 ÚVOD

K novým technologiím úpravy léčiv zaměřeným na zvýšení jejich rozpustnosti, rozšíření a zlepšení možností jejich terapeutického podávání různými aplikačními cestami, patří tvorba nanovlákněných struktur prostřednictvím elektrospinningu. Použitím vhodného polymeru při elektrospinningu lze dále upravovat rychlost uvolňování léčiv, nástup i délku trvání účinku.

Na katedře farmaceutické technologie FaF UK v Hradci Králové probíhá výzkum nanovláken s obsahem léčiv od roku 2007. Tato diplomová práce představuje součást pilotních studií k podání gatrinu jako léčiva ve vodných vehikulech špatně rozpustného.

Realizace diplomové práce zpočátku probíhala pod vedením PharmDr. J. Honegra. Nejprve byla věnována vyhledání a ověření metodiky HPLC stanovení gatrinu, která by byla posléze použitelná i pro stanovení vzorků z in vivo pokusů.

V experimentu se pracuje s látkou, jejíž označení a vlastnosti nejsou dále konkretizovány, neboť pro zpracování pokusů a vyvození závěrů je taková informace nepodstatná.

Doporučení formulovaná v závěrech mají mít význam pro případné pokračování studia nanozvláknění gatrinu a další látek.

2 ZADÁNÍ PRÁCE

1. V teoretické části podat přehled informací zaměřený na biofarmaceutického třídění látek a vztahu tohoto konceptu k formulaci léčivých přípravků

2.2 V experimentální části se zaměřit na pilotní disoluční hodnocení nově formulovaných nanovláčkových membrán s obsahem gatrinu jako látky špatně rozpustné ve vodném prostředí.

Dílčí kroky byly konkretizovány takto:

- a) provést testování zadaných podmínek HPLC stanovení gatrinu při disolučním hodnocení nanovláčkových membrán dodaných externím pracovištěm,
- b) provést orientační disoluční hodnocení intaktních nanomembrán s obsahem gatrinu,
- c) provést disoluční hodnocení nanomembrán pokusně laminovaných hydrofobním excipientem,
- d) provést orientační disoluční hodnocení nanomembrán pokusně zalisovaných do manitolu

Zásady pro vypracování:

- 1) Seznámení s výsledky dosaženými na KFT v předchozích letech a monografiemi na dané téma – zadanými školitelem
- 2) Literární rešerše z on-line zdrojů: Web of Science, Scopus apod.
- 3) Formulace cílů práce
- 4) Vlastní praktické řešení
- 5) Vyhodnocení výsledků a vyvození závěrů ze získaných dat
- 6) Sepsání vlastní práce – průběžné konzultace se školitelem
- 7) Obhajoba práce

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Rozpustnost

Rozpustnost je vlastnost charakterizující schopnost pevných, kapalných a plyných látek rozpustit se v pevných, kapalných nebo plyných za vzniku homogenní soustavy, roztoku. Závisí na fyzikálních a chemických vlastnostech rozpouštěné látky (solutu) a rozpouštědla (solventu), a dále na teplotě, tlaku a pH roztoku. Rozpustnost látky v daném rozpouštědle se vyjadřuje jako nasycená koncentrace, při které přidání solutu nezvýší jeho koncentraci v roztoku a nadbytek solutu precipituje. Rozpouštědlem je nejčastěji kapalina, méně často pevná látka a vzácně plyn.¹

Existuje řada různých klasifikací látek dle jejich rozpustnosti. Lékopisné rozdělení vhodné pro přibližnou praktickou charakterizaci shrnuje následující tabulka 1.

Tabulka 1: Klasifikace rozpustnosti léčiv²

Klasifikace	Objem rozpouštědla v ml na rozpuštění 1g látky
Velmi snadno rozpustné	<1
Snadno rozpustné	1 až 10
Dobře rozpustné	10 až 30
Mírně rozpustné	30 až 100
Těžce rozpustné	100 až 1000
Velmi těžce rozpustné	1000 až 10000
Prakticky nerozpustné	>10000

Téměř 90 procent léčiv je podáváno perorálně. Následná absorpce takového léčiva, jeho biologická dostupnost a farmakokinetický profil se odvíjí od jeho rozpustnosti ve vodném prostředí.³

Parametr rozpustnosti tedy hraje klíčovou roli v biologické dostupnosti léčiva v organismu, u perorálních lékových forem společně s gastrointestinální permeabilitou,

rychlostí disoluce, efektem prvního průchodu játry, presystémovým metabolismem a vlivem efluxních transportérů. Na základě rozpustnosti ve vodě a permeability perorálně podávaná léčiva rozděluje dnes již dobře zavedená a stále aktualizovaná soustava označovaná jako Biofarmaceutický klasifikační systém.

3.1.1 Biofarmaceutický klasifikační systém

Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS) zavedl Amidon et al.⁴ Ten rozdělil léčiva do čtyř skupin podle jejich rozpustnosti a gastrointestinální propustnosti s cílem předpovědět *in vivo* chování léčiva na základě *in vitro* měření zmíněných dvou parametrů (IVIV korelace). BSC může v níže jmenovaných případech nahradit *in vivo* bioekvivalenční studie (BCS–based biowaivers).

Třída I - vysoká rozpustnost a propustnost

Limitujícími faktory absorpce při perorální aplikační cestě jsou disoluce léčiva a rychlost vyprazdňování žaludku (v případě, že disoluce probíhá rychle). Příkladem léčiv této třídy jsou tramadol a metoprolol.

Třída II – nízká rozpustnost a vysoká propustnost

Absorpce závisí na disoluci *in vivo* a obvykle je pomalejší než u léčiv předchozí skupiny. Biologická dostupnost je omezena. Patří sem například atorvastatin, glibenklamid a ezetimib.

Třída III – vysoká rozpustnost a nízká propustnost

Rozsah a rychlost absorpce může být u léčiv této třídy velmi variabilní, ale probíhá-li disoluce rychle, je tato absorpční variabilita způsobena gastrointestinálním traktem, nikoliv lékovou formou. Zástupci léčiv jsou například gabapentin a cimetidin.

Třída IV – nízká rozpustnost a propustnost

Pro špatnou absorpci a nízkou biologickou dostupnost nejsou léčiva této skupiny vhodná pro perorální podání. Příkladem jsou cyklosporin a hydrochlorothiazid.

Léčivo je považováno za vysoce rozpustné, když se jeho nejvyšší léčebná dávka rozpustí v objemu < 250 ml vodného pufru (pH 1 až 7,5) a je vysoce vstřebatelné (permeabilní), jestliže se vstřebá nejméně 90% této dávky.

Evropská léková agentura (EMA) a americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) udělují zkrácené schvalovací řízení, biowaiver, léčivům náležícím do Třídy I, neboť:

- (a) vysoká rozpustnost zajišťuje, že rozpouštění není limitujícím faktorem pro rychlost disoluce, tudíž pro absorpci,
- (b) vysoká permeabilita zajistí, že léčivo je při průchodem tenkým střevem zcela absorbováno,
- (c) rychlá disoluce zajistí, že limitujícím faktorem absorpce je rychlost průchodu zažívacích traktem.

Evropská léková agentura (EMA) umožňuje zkrácené schvalovací řízení, biowaiver, také některým látkám Třídy II.⁵

V současnosti spadá 60 procent dnes nabízených léčiv do tříd BCS I a BCS III, zatímco 90 procent nových chemických entit (NCE) patří do tříd II a IV. Špatná rozpustnost vede mimo jiné k nízké, nekompletní nebo variabilní biologické dostupnosti, která je výrazně ovlivněna potravou, a také ke gastrointestinální toxicitě.⁶ U látek Třídy II, tedy špatně rozpustných s vysokou permeabilitou, lze jejich biologickou dostupnost významně zlepšit zvýšením rozpustnosti. Využití třídění léčiv podle BCS je každoročně doplňováno novými poznatky. V poslední době nejvýznamnější je navrhovaná podrobnější subklasifikace s biofarmaceutickým a farmakologickým vyústěním.⁷

3.2 Metody zvýšení rozpustnosti

Tyto metody lze rozdělit do tří kategorií – chemické, fyzikální a další. Mezi chemické metody patří například změna pH, tvorba solí, použití pufrů, a derivatizace. K fyzikálním se řadí zmenšování velikosti částic (mikronizace, nanosuspendace), modifikace krystalické struktury, eutektické směsi, tuhé disperze, tuhé roztoky a kryogenní techniky. Z dalších můžeme vyjmenovat využití komplexů s cyklodextrinem, solubilizátorů, surfaktantů (tenzidů) a kosolventů.⁸

3.2.1 Mikronizace

Disoluci u špatně rozpustných léčiv můžeme urychlit jejich mikronizací, při které dojde ke zvětšení povrchu látky. Jedná se o proces zmenšování velikosti částic léčiva pod

10 mikrometrů, kterého lze docílit mechanickým mletím či drcením větších částic. Tento postup je nevýhodný, protože je energeticky náročný a vznikají částice nepravidelného tvaru i velikosti. Uniformní částice lze vyrobit s využitím superkritických kapalin (SCF), tj. sloučenin nad jejich kritickým tlakem i teplotou s vlastnostmi plynů i kapalin. Nejčastěji používaný je oxid uhličitý. Metodou využívající SCF je procedura označovaná jako rychlá expanze superkritických roztoků (RESS), při které je léčivo rozpuštěno v superkritické kapalině za vysokého tlaku a teploty a následně protlačováno tryskou. Při tomto procesu dojde k precipitaci rozpuštěného léčiva z roztoku následkem snížení tlaku a vzniku velmi malých částic. Dalšími metodami založenými na SCF jsou SAS („Supercritical Anti-Solvent“) a PGSS („Particles from Gas Saturated Solutions“).⁹

3.2.2 Nanosuspenze

Nanosuspenze jsou koloidní disperze částic léčiva velikosti menší než 1 mikrometr, obvykle stabilizované surfaktantem. Mohou být využity pro zvýšení rozpustnosti látek špatně rozpustných ve vodném i nevodném prostředí. Jejich výroba je možná konvenčními metodami řízené precipitace („bottom up“), kdy je léčivo rozpuštěno v solventu a přidáním antisolventu dojde k precipitaci jemných krystalů. Surfaktant zabrání růstu krystalů nad žádoucí velikost. „Top down“ metody jsou založeny na mletí, vysokotlaké homogenizaci ve vodném či nevodném prostředí nebo kombinaci precipitace a vysokotlaké homogenizace.¹⁰

3.2.3 Kryogenní techniky

Kryogenní techniky zvyšují rychlost disoluce léčiva vytvořením nanostrukturované amorfní částice s vysokou porozitou. Po tomto procesu probíhající za velmi nízké teploty lze následně různými způsoby sušení získat suchý prášek. Mezi kryogenní techniky patří

- (a) sprejové mrazení na kryogenní kapalině,
- (b) sprejové mrazení do kryogenních kapalin (SFL),
- (c) sprejové mrazení do par nad kapalinou (SFV/L),
- (d) ultrarychlé (ultra-rapid) mrazení.

3.2.4 Modifikace krystalické struktury

Na řadě příkladů byl demonstrován vliv změny krystalické struktury na in vitro disoluční rychlost, s potenciálem pro zlepšení biologické dostupnosti. Do popředí zájmu se proto

dostaly metody řízené krystalizace léčiv, jejichž cílem je vyrobit vysoce čisté prášky s dobře definovanou distribucí velikosti částic. Patří sem krystalizace s využitím různých rozpouštědel, pomocných látek nebo krystalizačních podmínek, již zmíněné metody s využitím superkritických kapalin a metoda ko-krystalizace, tedy tvorba molekulárních komplexů, kdy jsou krystaly tvořeny elektricky neutrálními molekulami dvou nebo více látek, které jsou vázány nekovalentními vazbami.

Vliv krystalické struktury je předmětem zájmu farmaceutického výzkumu a vývoje od šedesátých let minulého století. Na příkladu chloramfenikol palmitátu bylo prokázáno, že u aktivních farmaceutických ingrediencí (API) schopných krystalovat ve více krystalických strukturách existují rozdíly v rozpustnosti jednotlivých polymorfů, což lze využít ke zlepšení absorpce a biologické dostupnosti.¹¹ Hlavní překážka ve využití metastabilních polymorfů spočívá v jejich postupné přeměně ve stabilnější krystalické formy v průběhu zpracování, skladování, ale i při průchodu gastrointestinálním traktem. Rozdíl v rozpustnosti jednotlivých polymorfů je vzhledem k jejich relativně malým rozdílům ve volné energii navíc obvykle malý. Větší potenciál pro využití proto mají stabilizované amorfni soustavy s vysokou energií, typicky ve formě tuhých disperzí.¹²

3.2.5 Tuhé disperze

Pojem tuhé disperze označuje pevné produkty složené z alespoň dvou komponent, nejčastěji hydrofilní matrix a hydrofobního léčiva. Matrix může být krystalická nebo amorfni a v ní léčivo dispergované molekulárně, nebo ve formě amorfniích či krystalických částic. Tuhé disperze v sobě kombinují několik výhod, které vedou ke zlepšené disoluci léčiva. Zmenšení částic je zejména u molekulárních disperzí provedeno na nejmenší možnou úroveň. Tyto částice s velkým výsledným povrchem jsou po rozpuštění nosiče uvolněny do disolučního média.

Formulace tuhých disperzí vede také ke zlepšené smáčivosti léčiva i při použití povrchově neaktivních nosičů (urea, kyselina citronová). U povrchově aktivních nosičů (cholová kyselina, estery cholesterolu, lecitin) je pak tento efekt ještě výraznější. Nosiče mohou zároveň ovlivnit disoluční profil jako kosolventy. Částice v tuhých disperzích vykazují větší porozitu, která také přispívá k rychlejšímu uvolňování léčiva. V neposlední řadě ke zlepšení rozpustnosti přispívá amorfni stav, protože nevyžaduje žádnou energii k rozbití krystalické struktury. Toho lze, především u léčiv s nízkou teplotou tání, docílit vhodnou volbou nosiče.¹³

Tuhé disperze vycházejí z jednoduchých eutektických směsí, které se skládají ze dvou látek zcela mísitelných v kapalném a velmi omezeně mísitelných v pevném stavu. Obě látky po ochlazení krystalizují současně za vzniku velmi drobných krystalů. Pokud je jednou z těchto látek léčivo a druhou inertní, ve vodě vysoce rozpustný nosič, tento se rychle rozpouští a uvolňuje krystaly léčiva. Velký povrch výsledné suspenze urychlí disoluci a zlepší biologickou dostupnost.¹⁴

Později byly připraveny tuhé molekulární disperze s mannitem jako nosičem.¹⁵ Krystalické nosiče jako urea a cukry však mají tendenci tvořit termodynamicky stálější krystalické disperze, které uvolňují léčivo pomaleji než amorfni. Nejčastěji používanými amorfními nosiči jsou polymery. Ty mohou být zcela syntetické jako například povidon (PVP), polyethylenglykoly (PEG), polymethakryláty, nebo jde o polymery odvozené od celulózy, jako například hydroxypropylmethylcelulosa (HPMC), ethylcelulosa, hydroxypropylcelulosa, nebo deriváty škrobu -cyklodextriny.¹⁶

Amorfni tuhé disperze můžeme na základě interakce mezi nosičem a léčivem klasifikovat jako tuhé roztoky, suspenze nebo jejich směs. V amorfních tuhých roztocích jsou nosič a léčivo zcela mísitelné a rozpustné. Tento typ tuhé disperze je tedy homogenní na molekulární úrovni a je přítomná pouze jedna fáze. Amorfni tuhá suspenze vznikne, pokud je léčivo v polymeru rozpustné omezeně nebo má extrémně vysoký bod tání. Tyto disperze jsou tvořeny dvěma fázemi, částice léčiva dispergované v polymerním nosiči tvoří amorfni produkt. Další vylepšení disolučního profilu léčiva a stabilizaci tuhé disperze přinese využití povrchově aktivního nosiče nebo směsi surfaktantu a amorfního polymeru jako nosiče. Povrchová aktivita brání precipitaci a aglomeraci ve větší hydrofobní částice.¹³

Tuhé disperze lze připravit několika způsoby. První z nich je metoda tavením („melting method“). Při ní dojde ke smísení léčiva a ve vodě rozpustného nosiče s následným zahříváním, dokud se tato směs neroztaví. Po rychlém ztuhnutí v ledové lázni za intenzivního míchání se výsledná masa drtí, práškuje a sítuje. Tato metoda má mnoho modifikací ve způsobech nalévání a chlazení roztavené směsi.

Supersaturace léčiva v systému můžeme dosáhnout rychlým ochlazením z vysoké teploty, kdy jsou molekuly solutu zachyceny v matrix solventu velmi rychlým, okamžitým procesem tuhnutí.¹⁷ Často používanými polymery jsou polyethylenglykol a polyvinylpyrrolidon. Nevýhodou této metody je skutečnost, že mnoho látek se za

vysokých teplot rozkládá nebo vypařuje. Tomu lze zamezit přípravou v uzavřeném kontejneru, tavením ve vakuu nebo v přítomnosti inertních plynů. Použití této metody je možné v případě, že léčivo a polymer jsou kompatibilní a dobře mísitelné při zahřívání, v opačném případě vznikají nehomogenní tuhé disperze.

Druhá metoda obnáší použití rozpouštědla, ve kterém se rozpustí léčivo i nosič („solvent method“). Po odpaření rozpouštědla vznikne čirý film, který se suší do konstantní hmotnosti. Odpadá tedy zahřívání a nehrozí rozklad léčiva ani nosiče. Nevýhodou tohoto postupu je vysoká cena, obtíže při odstraňování rozpouštědla, jehož přítomnost v hotovém produktu může ovlivnit stabilitu a obtížná rekrystalizace.¹⁸

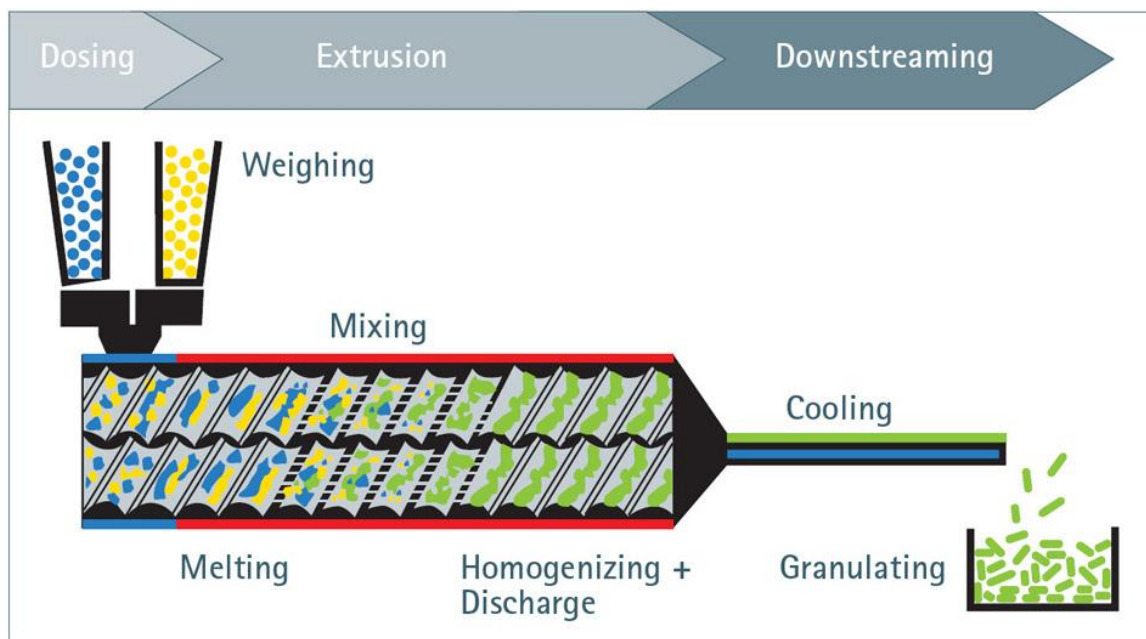
Další možností, jak tuhé disperze připravit, je rozpuštění léčiva a nosiče ve společném rozpouštědle a inkorporace této směsi do roztaveného polyethylenglykolu („melt solvent method“), který se potom odpařuje do vzniku čirého filmu. Film se suší do konstantní hmotnosti.¹⁹ Tato metoda kombinuje výhody obou předchozích postupů.

3.2.6 Extruze z taveniny (hot-melt extruze)

Široce používanou metodou k přípravě tuhých disperzí je technika hot-melt extruzí (HME). Umožňuje přípravu molekulárních tuhých disperzí léčiv do různých polymerů nebo lipidových matic. Při samotném procesu dochází k protlačování materiálu za zvýšené kontrolované teploty a tlaku přes otvor nebo trysku, za vzniku produktu uniformního tvaru a hustoty.²⁰

Vytlačovací stroj, extrudér, se skládá z plnicího zařízení, unášecího spirálově tvarované hřídele (tzv. šneku), vyhřívaného pouzdra a vytlačovací hlavy. Dvoušnekové extrudery jsou výhodnější než jednošnekové, protože pracují rychleji, efektivněji a nemají tendenci přehřívat extrudovaný materiál. Jednošnekové extrudery jsou konstrukčně jednodušší a méně finančně náročné.^{21,22}

Léčivo, polymer a pomocné látky v práškové formě procházejí vyhřívaným pouzdrem, kde se pomocí šnekového zařízení míchají, hnětou a taví. Roztavená masa je protlačována vytlačovací hlavou a následně chlazena.



Obr.3.1: Dvoušnekový extruder (převzato 15.3.2014z <http://www.rottenhof.com/index.php/hot-melt-extrusion.html>)²¹

Surovinami používanými při HME procesu jsou tavitelné materiály jako polymerní nosiče nebo nízkotající vosky, plastifikátory a další pomocné látky (modifikátory uvolňování, disintegranty, viskozifikanty a antioxidanty). Nejčastěji používanými polymery jsou deriváty celulosy, jako například ethylcelulosa (EC), hydroxypropylcelulosa (HPC), a dále látky typu PEG, PEO a polymethakryláty. Jako plastifikátory slouží citrátové estery (triethylcitrát, tributylcitrát), glykolové deriváty (PEG, propylenglykol), sebakáty a ftaláty. Použití vhodného plastifikátory umožňuje snížení výrobní teploty a smykových sil potřebných k extruzi polymeru, čímž se zlepšuje zpracovatelnost některých vysokomolekulárních polymerů.²³ Všechny používané materiály musí být dostatečně termálně, fyzikálně a chemicky stabilní.

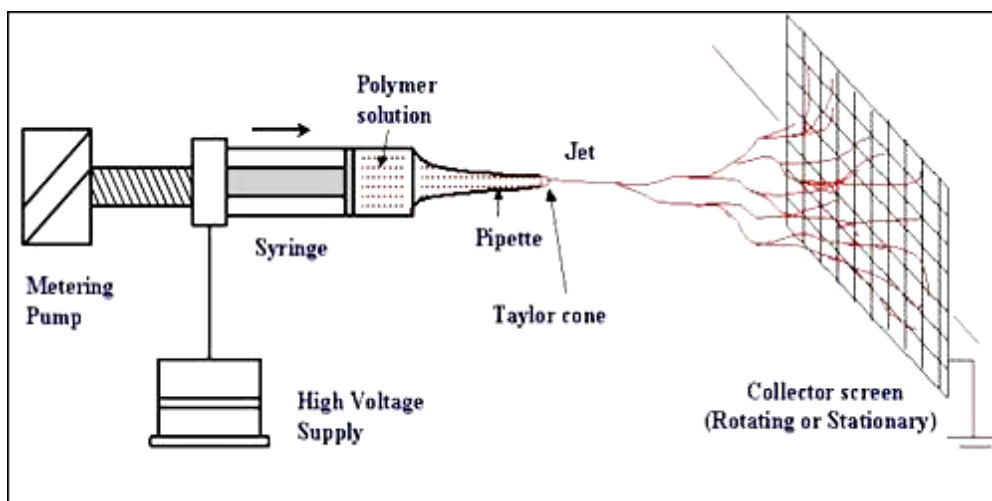
Jelikož se jedná o proces, při kterém dochází ke zvýšení teploty zpracovávaného materiálu, hrozí degradace jak léčiva, tak použitého polymeru, zvláště pokud je bod tání léčiva vysoký. Novější postup výroby extruzí, při kterém je léčivo nejdříve převedeno na amorfni formu metodou „melt solvent“ a poté extrudována s vhodným polymerem, umožňuje práci za teplot výrazně pod bodem tání léčiva. Je-li teplota skelného přechodu amorfni formy léčiva nižší než T_g polymeru, samotné léčivo slouží jako plastifikátor.²⁴

3.2.7 Elektrostatické zvlákňování (elektrospinning)

Elektrostatické zvlákňování kombinuje výhody tradičních tuhých disperzí a nanotechnologií. Jedná se o přímý a univerzální proces, kterým lze vyrobit nanovlákná o průměru od několika nanometrů do mikrometrů. Tato vlákna se dají použít ve formě membrán jako nosiče léčiv, jako aplikační soustavy pro uvolňování léčiv (DDS) různých typů, například transdermální, perorální, implantační a jako 3D matrice (označované často jako skafoldy) pro růst nové tkáně.

Nanovláknenné membrány mají pro výrobu perorálních lékových forem několik výhodných vlastností. Velký povrch vláken, který umožňuje rychlé uvolňování inkorporovaných aktivních ingrediencí, vysokou porozitu a s použitím vhodných pomocných látek umožňují existenci léčiva v polymerní matrix v amorfní nebo v nanokrystalické formě.²⁵

Základní princip výroby nanovláken lze popsat na zvlákňování ze stříkačky (trysky). Při výrobě působí na kapku roztoku polymeru, který drží svým povrchovým napětím na konci kapiláry, elektrické pole a na povrchu polymeru vzniká náboj. Vzájemné odpudivé síly způsobí sílu opačnou k povrchovému napětí. Zvyšováním síly elektrického pole se kapka roztoku na špičce kapiláry prodlužuje a tvoří kónický tvar známý jako Taylorův kužel. Když elektrické pole dosáhne kritické hodnoty, při které odpudivá elektrická síla převáží povrchové napětí, vystřelí vlákno roztoku. Při cestě vzduchem se rozpouštědlo odpaří a nabitě vlákno polymeru se přichytí na uzemněný kolektor.



Obr. 3.2: Základní schéma výroby nanovláken (převzato 15.3.2014 z <http://www.che.vt.edu/Faculty/Wilkes/GLW/electrospinning/electrospinning.html>)²⁶

Na stejném principu funguje i zvlákňování z trnu, struny a z válečku (NANOSPIDER).

Proces je ovlivněn vlastnostmi roztoku jakými jsou viskozita, konduktivita a povrchové napětí, dále rovněž hydrostatickým tlakem v kapiláře, elektrickým potenciálem na jejím konci, vzdáleností konce od kolektoru, teplotou, vlhkostí a rychlostí vzduchu v komoře.²⁷

Samotná nanovláknna mají řadu výhodných vlastností, pro jejich využitelnost jako aplikační systémy léčiv je však nezbytné jejich zpracování do flexibilních membrán a inkorporace léčiva do jejich struktury. Podle charakteru léčiva, kterým mohou být malé molekuly, proteiny nebo geny, je třeba zvolit vhodnou metodu.

Ko-elektrospinning

Nejjednodušší metodou inkorporace léčiva do nanovláken je jeho rozpuštění s polymerem ve společném solventu a následné zvlákňování. Uvolňování léčiva potom závisí na jeho distribuci v nanovlákněch a morfologii samotných vláken. Je třeba zvážit fyzikálně-chemické vlastnosti polymeru a jejich interakce s molekulami léčiva. Lipofilitě a hydrofilitě léčiva tedy musíme přizpůsobit lipofilitu a hydrofilitu polymeru. Nízká rozpustnost léčiva v polymeru způsobí tvorbu disperze, jejímž zvlákňováním může dojít k migraci molekul API k povrchu nanovláken, což má za následek překotné nárazové uvolnění („burst release“). Pozvolného uvolňování můžeme dosáhnout kombinací hydrofilních a lipofilních polymerů. Hydrofilní polymery jako želatina, PEG, PVA a amfifilní kopolymery mohou výrazně zvýšit množství léčiva pojmutého ve vlákněch a tím zabránit burst release. Pro vysokomolekulární terapeutické látky je vhodné použití hydrofilních polymerů.²⁸

Povrchová modifikace vláken

Povrchovou modifikací nanovláken dosáhneme imobilizace léčiva na jejich povrchu. Tím se vyhneme denuraci léčiva způsobené vysokým napětím nebo organickými rozpouštědly, používanými při ko-elektrospinningu. Molekuly léčiva jsou na nanovlákněch drženy fyzikální absorpcí, elektrostaticky, hydrofobními interakcemi, vodíkovými a van der Waalsovými vazbami. K imobilizaci růstových faktorů byl s úspěchem použit heparin. Dalším způsobem imobilizace léčiva je zavedení funkčních skupin na povrch nanovláken (chemická modifikace). Tak lze lépe kontrolovat množství

léčiva inkorporovaného do vláken a zároveň dosáhnout pozvolného uvolňování s redukcí burst release.²⁹

Uspořádání typu jádro-plášť (Core-shell design)

Pomocí speciální trysky můžeme vyrobit vlákna skládající se z jádra, ve kterém je inkorporované léčivo, a pláště. Léčivo je tak zpočátku chráněno proti vnějším podmínkám a uvolňováno přes vnější plášť postupně. Uvolňování je ovlivněno mnoha faktory, včetně složení a chemických vlastností jádra a pláště, tloušťkou pláště a degradabilitou. K výrobě jádra se nejčastěji používají ve vodě rozpustné polymery nebo proteiny, například PEG, kolagen, bovinní sérový albumin, PCL.³⁰

3.2.8 Acetonitril a methanol^{31,32}

Organické solventy nejčastěji používané jako mobilní fáze pro reverzní chromatografii jsou acetonitril a methanol. Acetonitril je semipolární, s vodou mísitelné rozpouštědlo, které je zároveň dostatečně hydrofobní, aby elovalo látky z nepolární (například C18) chromatografické kolony. Je s vodou mísitelný ve všech poměrech, netvoří s ní však asociáty, směs vody a acetonitrilu si tedy zachovává binární charakter a umožňuje snadný odhad retence na základě koncentrace. Methanol tvoří s vodou pevné asociáty, v koncentracích 25% až 75% se mobilní fáze skládá z komplexní ternární směsi methanolu, asociátů methanol-voda a vody. Acetonitril má při malých vlnových délkách nižší absorpční než methanol, při UV detekci tedy produkuje méně šumu a jeho směs při stejném průtoku působí na kolonu menším tlakem než je tomu u methanolu.

3.2.9 Polyvinylpyrrolidon

Polyvinylpyrrolidon (PVP) je ve vodě rozpustný polymer. Je založen na monomeru N-vinylpyrrolidonu. V suchém stavu se jedná o hygroskopický prášek, v roztoku má velmi dobrou smáčivost a snadno tvoří film. Ve farmacii nachází použití jako stabilizátor, pojivo a polymerní nosič léčiv.³³

Díky svojí chemické struktuře tvoří komplexy s řadou látek, včetně farmakologicky aktivních substancí. Solubilita a stabilita těchto komplexů je velmi rozdílná, ale až na výjimky ve vodě uvolňují léčivo rychleji nebo stabilněji, než čistá léčivá látka. *In vivo*

povidon zvyšuje biologickou dostupnost léčiv. Tuhé disperze s využitím povidonu jako matrix vykazují vysokou stabilitu.

PVP je vhodným polymerem také pro zvláknování, včetně tvorby nanovláken pomocí elektrospinningu. ^{34,35,36}

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité látky

Acetonitril pro HPLC	Lachner, Neratovice
Ztužený tuk (ČL 2012)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Kyselina citronová (ČL 2012)	Lachner, Neratovice
Kyselina chlorovodíková č.	Lachner, Neratovice
Trometamol (TRIS)	Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové
Mannitol	Teva, Opava
Voda čištěná	FaF UK, Hradec Králové
Voda pro HPLC ultračistá	FaFUK, Hradec Králové
Látka G, pracovně gatrin	Boehringer-Ingelheim, Praha

Všechny suroviny odpovídaly jakosti deklarované příslušnými dodavateli a byly používány bez úprav ve stavu, v jakém byly dodány.

Čištěná voda a voda pro HPLC pochází z centrální přípravný na FaF UK a nebyla podrobena lékopisným zkouškám.

Testované nanovláknenné membrány byly vyrobeny za použití technologie Nanospider™ a získány od firmy Elmarco s.r.o., Liberec s těmito základními informacemi:

PVP_G50 (staticky), plošná hmotnost 17,6; průměr vláken 198nm

PVP_G40 (staticky), plošná hmotnost 14,9; průměr vláken 184nm

4.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy Kern 440-45N	Kern Sohn, Německo
Digitální pH metr Gryf 209L	Gryf HB s.r.o., ČR
Elektronická míchačka Variomag	Labortechnik, Německo
HPLC sestava HP 1200 series	Agilent Technologies, USA
Magnetické míchadlo Telesystem	Labortechnik, Německo
Ultrazvuková lázeň VČ 300259	Tesla, Vráble
Vodní lázeň Grant JB5	Grant Instruments, Velká Británie

Stříkačkové membránové filtry Simplepure 0,45 μm (NY), injekční stříkačky, injekční jehly, chirurgické nůžky, pinzety, gumové rukavice a jiné běžné laboratorní pomůcky.

Specifikace sestavy pro HPLC:

- Isokratické čerpadlo: IsoPump G1310A
- UV/VIS detektor: VWD G1414B s proměnnou vlnovou délkou,
- Kolony: ZorbaxEclipse plus C18, sorbent oktadecylsilanový, průměr 4,6mm, délka 150mm, zrnitost 5 mikrometrů
- Mobilní fáze: acetonitril: TRIS pufr pH 8 (75:25)
Software: ChemStation 1.22

Stanovení bylo prováděno při 320 nm; množství vzorku pro nástřik činilo 100 μl .

4.3 Pracovní postupy a metody

4.3.1 Příprava mobilní fáze pro HPLC

Mobilní fáze je směs acetonitril: TRIS pufr pH 8 v poměru 75:25

4.3.1.1 TRIS pufr pH8

Složení:

Trometamol	3,03g
Voda čištěná	ad 1000 ml
Kyselina chlorovodíková	do pH 8

Postup:

3,03g trometamolu se rozpustí v asi 1000 ml čištěné vody, pomocí pH metru se zjistí hodnota pH připraveného roztoku, kyselinou chlorovodíkovou se upraví hodnota pH na 8 (při 20°C).

4.3.2 Příprava disolučního média (McIlvaine pH6)

Složení:

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	45,2g
Kyselina citronová	7,7g
Voda čištěná	ad 1l

Postup:

45,2g hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu a 7,7g kyseliny citronové se rozpustí v čištěné vodě a doplní na 1litr.

4.4 Testování nanovláknenných membrán

4.4.1 Disoluce nanovláknenných membrán s gatrinem

Disoluce byla provedena s nanovláknennou membránou označenou jako PVP G 50, obsahující 33 % gatrinu. Membránu jsme nastříhali na obdélníky o velikosti 2,5 cm x 2 cm (o celkové exponované počáteční ploše 10 cm²), vysušili v exsikátoru a pomocí analytických vah jsme zaznamenali navážky.

$$n1 = 0,0106g$$

$$n2 = 0,0102g$$

$$n3 = 0,0106g$$

Po nastříhání, vysušení a zvažení jsme každý zvažený vzorek membrány vložili do kádinky s magnetickým míchadélkem a 50ml disolučního média o teplotě 37°C. Tyto kádinky byly poté umístěny do vodní lázně vytemperované na 37°C.

Odběry 0,5ml disolučního média jsme prováděli v předem dohodnutých časových intervalech, konkrétně po 1, 4, 8, 12, 16, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 minutách.

Způsob odběru:

Stříkačkou s membránovým filtrem jsme odebrali 0,5 ml vzorku, filtr odstranili ze stříkačky, vzorek disolučního média vpravili do vialky, stejnou stříkačkou nabrali 0,5 ml čistého disolučního média vytemperovaného na 37°C, filtr opět nasadili a disolučním médiem propláchli zpět do kádinky, ze které jsme vzorek odebrali (s testovanou membránou).

Takto bylo odebráno 36 vzorků disolučního média, které byly následně analyzovány pomocí HPLC.

4.4.2 Disoluce laminovaných nanovlákných membrán

K disoluci jsme tentokrát použili membránu označenou jako PVP 40%, s deklarovaným obsahem 28% gátrinu.

Tuto membránu jsme nastříhali na 5 čtverců velikosti 5cm x5cm, vysušili v exsikátoru a zvažili na analytických vahách. Celková navážka všech čtverců membrány činila 0,0363 g.

K laminaci jsme zvolili ztužený tuk. Laminaci jsme provedli tak, že jsme nastříhané čtverce membrány naskládali na sebe, aby se přesně překrývaly, zafixovali jsme je na podložce a nanесли na ně roztavený ztužený tuk. Po vychladnutí jsme tuto sestavu nařezali na 7 stejně širokých proužků o šířce 0,7 cm.

Tři proužky jsme vložili společně s magnetickým míchadélkem do kádinek, do každé kádinky jeden proužek, naplněných 50ml disolučního média o teplotě 37°C. Tyto kádinky byly následně umístěny do vodní lázně vytemperované na 37°C.

Odběry 0,5 ml vzorku byly opět prováděny tak, jak je popsáno v odst. 4.4.1

Ukončení disoluce bylo sledováno vizuálně, odběry pro stanovení léčiva pokračovaly až do předem dohodnutého časového intervalu.

Celkem bylo takto získáno 39 vzorků, které byly následně analyzovány pomocí HPLC.

4.4.3 Disoluce hydrofobně laminovaných membrán zalisovaných do tablet

Tři proužky získané z předchozího pokusu jsme nastříhali na čtverečky (0,7 cm x0,7 cm), poskládali je na sebe a s mannitolem jako plnivem zalisovali individuálně do tablet. Tuto individuální kusovou „výrobu tablet“ na výstředníkové tabletovačce KORSCH Maschinen Fabrik Berlin provedl Mgr. Pavel Berka.

Tyto výlisky (v dalším textu jsou označovány také jako tablety) jsme opět vkládali společně s magnetickým míchadélkem do kádinek s 50ml disolučního média o teplotě 37°C. Další postup disolučního testu byl shodný s postupem popsáním v odstavci 4.4.1.

Chování tablety při disoluci jsme opět kontrolovali vizuálně.

V této pokusné sérii bylo ke stanovení odebráno 42 vzorků, ve kterých bylo následně množství léčiva stanovováno pomocí HPLC.

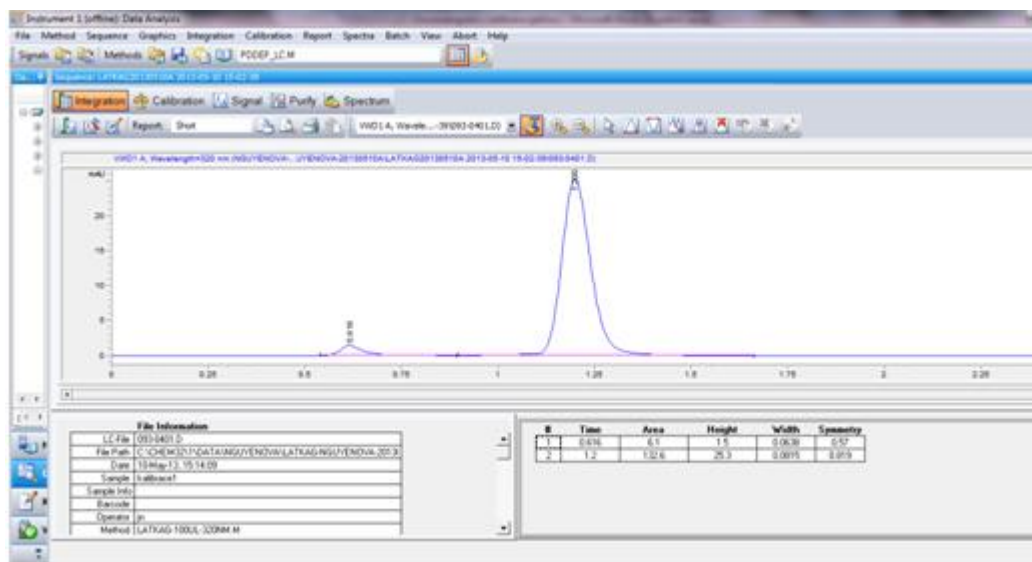
Kalibrační rovnice byla vypočtena běžným postupem v programu MS Excel, který poskytl také vyčíslení hodnoty R^2 koeficientu determinace.

Naměřená data příslušných ploch AUC pod křivkou píku gatriinu na chromatogramech byla přepočtena nejprve na údaje koncentrační ($\mu\text{g/ml}$) a po korekci na odběry a doplňování akceptorového média přepočtena na hodnoty Q celkově stanoveného léčiva. Z takto získaných dílčích hodnot Q byly vypočteny hodnoty průměrů \bar{Q} a jejich příslušných směrodatných odchylek (SEM).

Souhrnně jsou primární hodnoty AUC a příslušné hodnoty jejich SEM uvedeny v **tabulce 6.1** výsledkové části a částečně také na **obr. 6.1**.

5 DOKUMENTACE

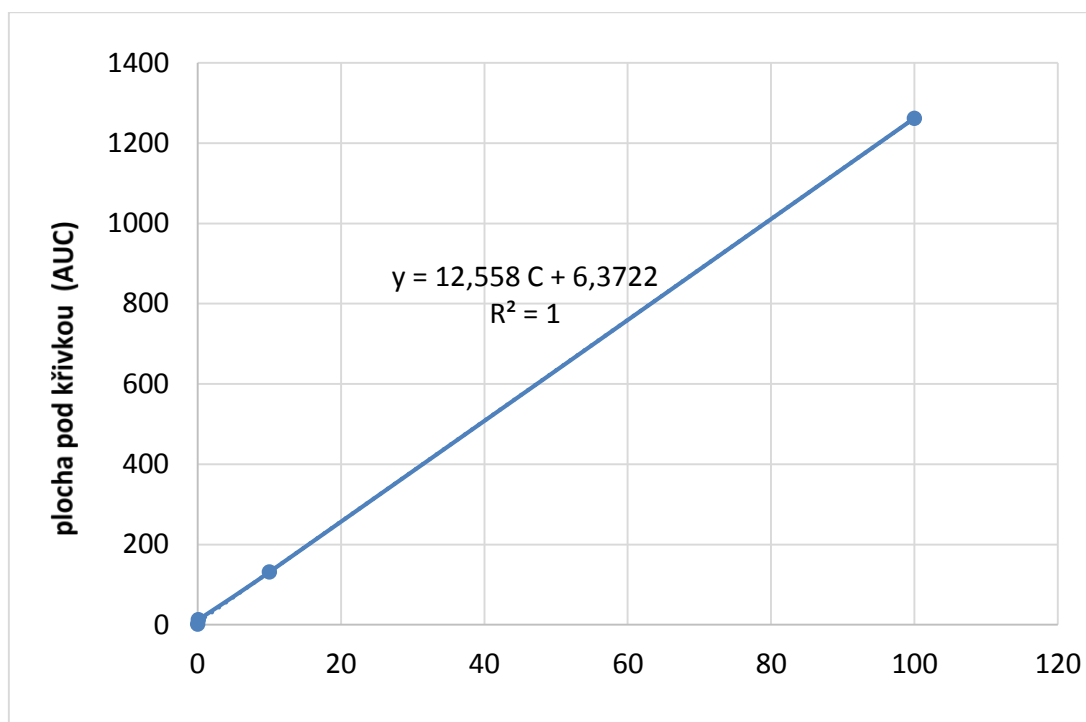
Obr. 5.1 Chromatogram z kalibrace gatinu 1 µg/ml (retenční čas 1,2 min)



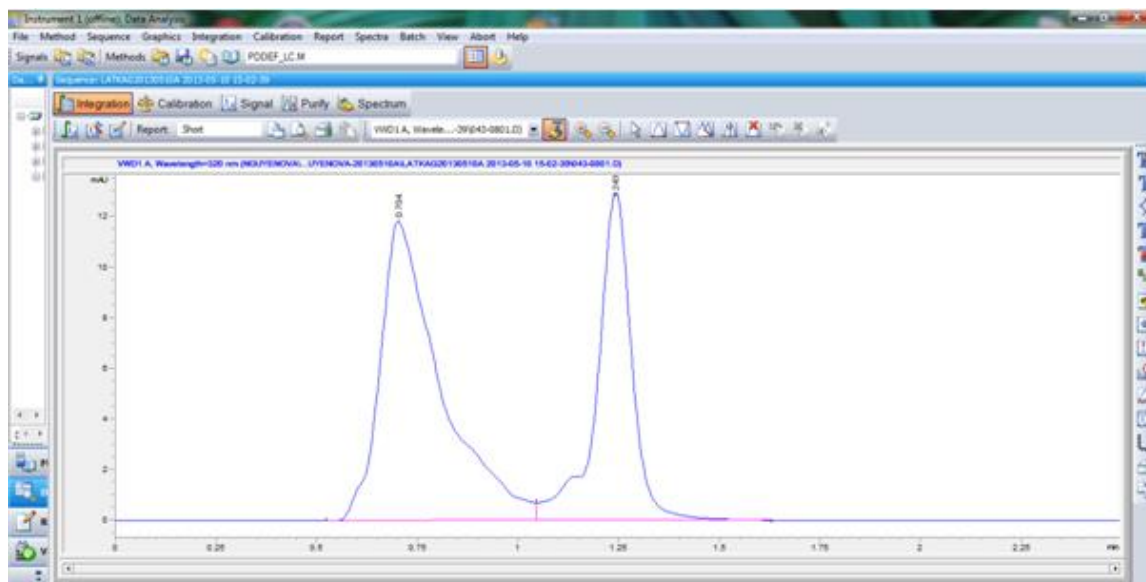
Tab. 5.1 Kalibrační data gatinu z HPLC stanovení při UV detekci

koncentrace		dílní hodnoty ploch pod křivkou						průměr	SEM
mg/100ml	µg/ml	AUC	AUC	AUC	AUC	AUC	AUC	AUC	AUC
0.001	0.01	2.9	1.8	1.5	1.6	1.7	1.3	1.8	0.52
0.01	0.1	14.2	13.3	10.7				12.7	1.48
1	10	129.7	132.2	132.6	132.8	131.1	130.8	131.5	1.10
10	100	1263.3	1258	1265.2	1241.9	1231.5	1239.7	1262.2	12.82

Obr. 5.2: Kalibrační závislost gatrinu z HPLC stanovení při UV detekci ($\lambda = 320 \text{ nm}$)



Obr 5.3: Typický chromatogram vzorku z disolučního testu laminované nanomembrány po 8 minutách (retenční čas gatrinu 1,2 min)



Protokol č. 1: Disoluce gatrinu z nanomembrány PVP G 50_1

V_o	[ml]	fosf. pufr pH 6.0
t	[min]	
AUC		
C_{nk}	[$\mu\text{g}/1\text{ml}$]	
ΔV_{dop}	[ml]	
C_k	[$\mu\text{g}/1\text{ml}$]	
Q_t	[μg]	ve V_o

$V_o = 50$

Membrána	PVPG50_1
----------	----------

Navážka [mg]	10,6
--------------	------

Látka	gatrín
-------	--------

t	AUC	C_{nk}	ΔV_{dop}	Q_t
1	162	12.393	0.5	620
4	187	14.383	0.5	719
8	150	11.437	0.5	572
12	188	14.463	0.5	723
16	123	9.287	0.5	464
20	158	12.074	0.5	604
30	120	9.048	0.5	452
45	188	14.463	0.5	723
60	250	19.400	0.5	970
90	235	18.206	0.5	910
120	268	20.834		1 042

Q_m v membráně: 3 300 μg

Podíl stanoveného gatrínu po 120 minutách: cca 30 procent

Protokol 2: Disoluce gatrinu z nanomembrány PVP G 40 LAM_1

V_o	[ml]	fosf. pufr pH 6.0
t	[min]	
AUC		
C_{nk}	[$\mu\text{g}/1\text{ml}$]	
ΔV_{dop}	[ml]	
C_k	[$\mu\text{g}/1\text{ml}$]	
Q_t	[μg]	ve V_o

$V_o = 50$

Membrána	PVPG40_LAM 1
----------	--------------

Navážka [mg]	10,3
--------------	------

Látka	gatrín
-------	--------

t	AUC	C_{nk}	ΔV_{dop}	Q_t
1	0		0.5	
4	7.2	0.066	0.5	3
8	60.7	4.326	0.5	216
12	78.3	5.728	0.5	286
16	51.0	3.554	0.5	178
20	33.0	2.120	0.5	106
30	44.0	2.996	0.5	150
45	16.0	0.767	0.5	38
60	24.0	1.404	0.5	70
90	30.0	1.881	0.5	94
120	23.0	1.324		66

Q_m v membráně: 2 800 μg

Podíl stanoveného gatrínu po 12 minutách: cca 10 procent

Protokol 3

Disoluce gatrinu z nanomembrány PVP G 40_TAB 3

V_o	[ml]	fosf. pufr pH 6.0
t	[min]	
AUC		
C_{nk}	[$\mu\text{g}/1\text{ml}$]	
ΔV_{dop}	[ml]	
C_k	[$\mu\text{g}/1\text{ml}$]	
Q_t	[μg]	ve V_o

$V_o = 50$

Membrána	PVPG40_TAB 3
----------	--------------

Navážka [mg]	10,3
--------------	------

Látka	gatrín
-------	--------

t	AUC	C_{nk}	ΔV_{dop}	Q_t
1	0		0.5	
4	48	3.299	0.5	165
8	71	5.178	0.5	259
12	81	5.935	0.5	297
16	59	4.167	0.5	208
20	58	4.087	0.5	204
30	41	2.757	0.5	138
45	31	1.961	0.5	98
60	27	1.643	0.5	82
90	25	1.483	0.5	74
120	25	1.483		74

Q_m v membráně: 2 800 μg

Podíl stanoveného gatrínu po 12 minutách: cca 10 procent

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Základním úkolem práce bylo vytvořit podklady pro navazující permeační experimenty zaměřené především na sublingvální, případně perorální biodostupnost léčivé látky, která je pro zjednodušení v rámci této práce označována jako gatrín.

Plánované biodostupnostní pokusy vyžadují předběžnou znalost disolučních parametrů daného léčiva, které bylo vybráno jako modelové, s některými častými aplikačně nevýhodnými vlastnostmi, zejména špatnou rozpustností ve vodném prostředí. Není cílem této práce vlastnosti gatrínu rozebírat, lze však říci, že jeho zpracování do podoby nanovláken je spojeno s očekáváním zvýšené rychlosti jeho rozpouštění, tudíž zvýšení jeho koncentrace v místě absorpce, tedy v konečném důsledku také zlepšení parametrů jeho biodostupnosti. Současně může být řešena i jeho stabilizace v lékových formách pro oba zmíněné typy podání.

Výběr polymeru ve smyslu výše naznačených záměrů vedl k využití polyvinylpyrrolidonu jako jednoho z polymerů první volby. Jedná se totiž o polymer s velmi dobře popsány vlastnostmi, a to i z hlediska jeho uplatnění v lékových formách (viz odst. 3.2.8). Stejně podstatné jsou jeho vlastnosti také z hlediska možností jeho zpracování do podoby nanovláken za využití techniky Nanospider™. S ní jsou na katedře farmaceutické technologie dostatečné zkušenosti díky dlouholeté spolupráci s firmou Elmarco s.r.o. Liberec.

Nanovlákněné membrány s třemi odstupňovanými koncentracemi gatrínu ve vláknech byly vyrobeny podle základních požadavků ve spolupráci s ing. D. Stránskou a Mgr. Petrem Vrbatou.

K získání disolučních podkladů bylo nutné zvolit vhodnou analytickou metodu, která by byla dostatečně robustní také v případě stanovení gatrínu v biologických vzorcích (např. krevní plasma). Proto byla v prvních krocích této diplomové práce věnována pozornost stanovení gatrínu za podmínek in vitro. K tomu zvolena metoda HPLC s UV detekcí. Důležitým krokem v dané souvislosti byl výběr mobilní fáze pro HPLC, přičemž první volbou byla pufrovaná fáze s acetonitrilem.

Acetonitril je polární rozpouštědlo mísitelné s vodou, přesto však je dostatečně hydrofobní a má natolik silně vyjádřené hydrofobně disperzní vlastnosti, že umožňuje eluci látek z chromatografické kolony. Děje se tak prostřednictvím disperzních interakcí jak acetonitrilu s rozpuštěnou látkou, tak acetonitrilu s vnitřním povrchem materiálu kolony.

Acetonitril je přitom mísitelný s vodou ve všech poměrech specificky zvláštním způsobem. Počínaje čistou vodou jako mobilní fází může kapalná soustava postupným přidáváním acetonitrilu získávat stále silnější hydrofobně disperzní vlastnosti. Při použití v kapalinové chromatografii tak mobilní fáze může postupně eluovat větší množství nepolárních látek. Acetonitril není pevněji asociován s vodou, a proto, na rozdíl od methanolu, si směsi acetonitril-voda ponechávají binární charakter. To zjednodušuje nejen teorii interakcí, ale především umožňuje jednodušší odhad či predikci retence analyzovaných látek ve vztahu ke koncentraciacetonitrilu.³²

Methanol naopak vytváří silné provázané asociáty s vodou, takže se mobilní fáze při vysokých koncentracích vody chová jako binární směs vody a asociátu voda-methanol. Při vysokých koncentracích methanolu lze tedy hovořit o mobilní fázi složené ze směsi methanolu a vody se současně přidruženým methanolem. Mezi těmito extrémy, tedy mezi 25 % methanolu a 75 % methanolu, se mobilní fáze skládá z komplexní ternární směsi methanolu, vody asociované s methanolem a samotné vody.

Na rozdíl od směsi acetonitril-voda činí složitost soustav methanolu s vodou předpověď retenčního času rozpuštěné látky obtížnější.

Pro disoluční, případně liberační a permeační pokusy je nutné s těmito skutečnostmi počítat nejen z hlediska volby vhodných podmínek pro stanovení, ale také konkrétních podmínek pro uspořádání *in vitro* pokusu.

Ukázalo se, že samotné stanovení gatrinu ve vodném prostředí fosforečnanového pufru pH 6.0 nečiní za daných podmínek žádný problém, jak je znázorněno na **obr. 5. 1**.

Je v něm uvedena také kalibrační rovnice, která byla používána v modifikovaném tvaru

$$C (\mu\text{g/ml}) = y - 6.3722/12.558 \quad (1)$$

Odhad detekčního limitu metodiky pro gatrin je v oblasti 10 ng/ml.

Za povšimnutí stojí extrémní hodnota R^2 , tedy koeficientu determinace. Jeho velikost není možné přeceňovat, i když je na první pohled výrazně působivá. Důvodem je mimo jiné to, že nebyla získána kompletní sada výsledků potřebná k vyjádření příslušných lékopisných parametrů a náležitostí správné laboratorní praxe, jak je ostatně zřejmé z **tab. 5.1** v části **5. Dokumentace**. Přesto je jasné, že získaná kalibrační závislost je dostatečně lineární, navíc ve velkém rozsahu koncentrací. Proto byla jako potenciálně dobře použitelná a v diplomové práci nadále také prakticky využita (příslušná rovnice byla spočtena MS Excel).

Jak se však v navazujících pokusech ukázalo, toto první uspokojivé konstatování neplatilo při stanovení gatriinu v disolučních pokusech.

Z naměřených disolučních dat gatriinu z nanovláknenných membrán, které jsou souhrnně uvedeny v **tabulce 6.1**, stojí za pozornost několik skutečností.

Pro všechny vzorky nanomembrán je to významný nejprve ten fakt, že po počátečním rychlém rozpuštění gatriinu, tj. mezi nulou a asi 12. minutou proběhne prakticky veškerá disoluce gatriinu.

Tab. 6.1 Souhrn naměřených primárních dat z HPLC stanovení gatriinu

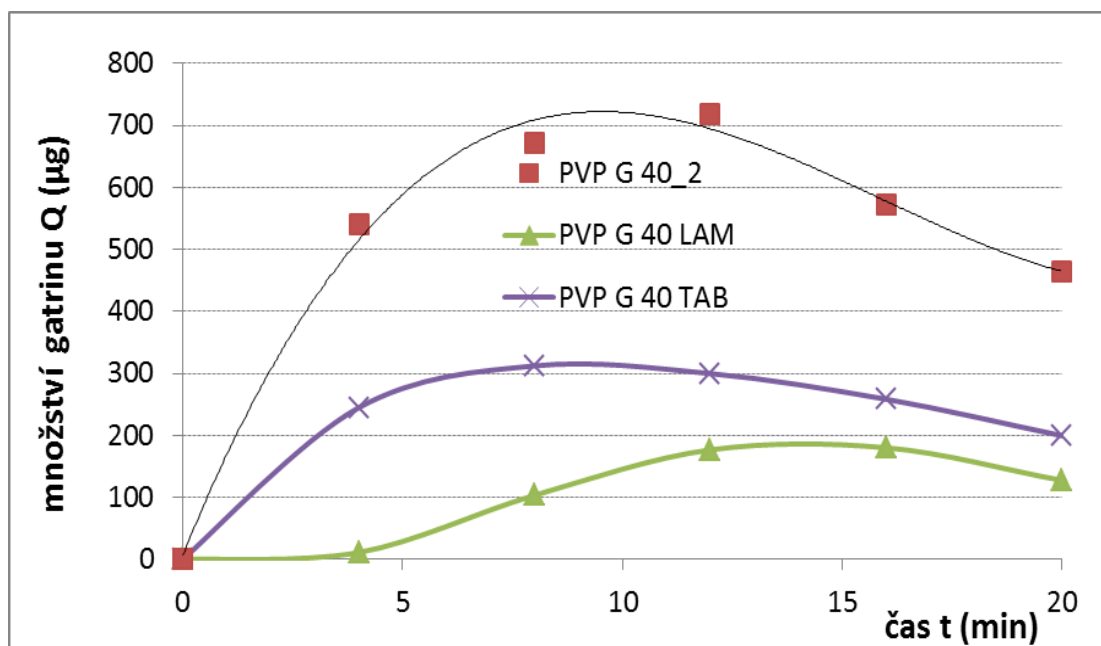
t	PVP G40		PVP G40 LAM		PVP G40 TAB	
	AUC	SEM	AUC	SEM	AUC	SEM
4	15,2	14,8	7,2	2,8	55,7	3,1
8	18,7	6,3	60,0	27,2	69,0	1,4
12	30,7	4,3	71,0	18,5	58,0	2,4
16	18,3	19,3	56,0	2,4	48,3	6,9
20	17,1	11,7	33,0	6,4	41,0	2,2
30	16,0	7,9	44,0	3,4	36,7	4,2
45	16,5	4,0	30,0	3,1	31,3	3,7
60	16,7	7,5	33,0	7,8	29,7	3,1
90	17,7	2,3	22,0	2,5	29,3	3,7
120	20,6	1,7	19,0	7,4	30,0	3,6
150	22,4	2,4	17,0	4,5	34,0	5,0
180	22,4	1,6	21,0	4,8	37,5	0,5

Také vizuálně pozorovatelné rozpuštění nanovláken se jevílo jako kompletní, jen snad poněkud pomalejší. Následující hodnoty stanovovaných kvant léčiva v dalších odběrových intervalech vždy stagnují, nebo spíše dosti nepravidelně a asi po 20. minutě dokonce rychle klesají. Podrobnosti jsou souhrnně uvedeny **tabulce 6.1** a graficky částečně znázorněny na **obr. 6.1**.

Tato skutečnost představuje problém, který se nepodařilo zcela uspokojivě vysvětlit. Vzhledem k tomu, že šlo o první sérii vzorků z rozpouštění nanovláčkových membrán s gatrinem, očekávali jsme, jestli se tento obraz disoluce a stanovení gatrinu potvrdí i v dalších případech. V zásadě se tak nakonec vždy stalo.

K úplnému popisu situace je dobré poukázat ještě také na orientační výpočet maximálního teoretického množství gatrinu, které by mělo být v akceptorovém médiu teoreticky nalezeno při úplném rozpuštění léčiva.

Obr. 6.1: Typické průběhy disoluce gatrinu z neupravené, laminované a tabletové nanovláčkové membrány PVP G 40_2



Konkrétněji, množství léčiva, které by po úplném rozpuštění nanovláčkové membrány o hmotnosti cca 10 miligramů mělo v akceptorovém vehikulu být, činilo asi 3,3 miligramů gatrinu pro membránu PVP G 50 a asi 2,8 mg gatrinu pro membránu PVP G 40.

Tento podíl činil při prvním měření méně než deset procent, později se výsledky pohybovaly kolem 30 procent, jak je například uvedeno v **protokolu 1** a je výše patrné z **obr. 6.1**.

Vzhledem k uvedenému nesouladu byla postupně vylepšována technika filtrace vzorků před stanovením. Kromě spekulace o adsorpci gatriinu na stěny disoluční nádoby apod., patřilo hlavní podezření nedostatečnému uvolnění gatriinu z jinak již vizuálně rozpuštěné membrány. Opačné obavy byly spojeny s představou, že ve vzorcích odebraných injekční stříkačkou ke stanovení léčiva byla nějaká nedefinovaná část gatriinu přítomna ještě uzavřená v PVP, v opticky jinak již rozpuštěném materiálu membrány. Takové útvary jsou ve farmaceutické technologii popisovány ve spojení s tvorbou nestechiometrických komplexů, aduktů různých látek s PVP.³⁷ V nich sice může být léčivo díky PVP rozpustnější ve vodě, ale současně může mít zpomalený průnik membránami. Zvýšení rozpustnosti ve vodném prostředí může tedy současně vést ke zpomalení průniku biologickými bariérami a snížení biodostupnosti.

Počáteční úseky disoluce, které nebyly nápadně poznamenány možnými artefakty ze stanovení, jsou pro ilustraci znázorněny na **obr. 6.1**. Z něj je možné předběžně uzavřít, že laminace i zalisování nanovlákněné membrány vedly ke snížení disolučních hodnot gatriinu, navzájem se v tomto ohledu nijak podstatně nelišily.

K tomuto je možné dodat a jako výstup pilotní vyhledávací studie navrhnout změnu polymerního materiálu pro nanovlákněné membrány s gatriinem. K ověření se nabízí například hydroxymethylpropylcelulosa, která z hlediska dobré rozpustnosti ve vodných vehikulech může být vůči PVP vhodnou alternativou.

7 ZÁVĚRY

1. Pro HPLC stanovení gatrinu za daných podmínek *in vitro* pokusů, tedy při daném složení akceptorového vehikula, intervalech odběrů, objemu vzorku injikovaného na kolonu a dalších parametrech je UV detekce při 320 nm vyhovující, nedochází k žádné interferenci s další látkou.
2. Kalibrační rovnice má za daných podmínek tvar:
$$C [\mu\text{g/ml}] = \text{AUC} - 6,4 / 12,6$$
3. Separační vlastnosti použité mobilní fáze acetonitril-fosfátový pufr pH 8 jsou pro gatrín z *in vitro* disolučních pokusů v konfliktu s vlastnostmi PVP jakožto nosičového materiálu léčiva v nanovláčkách.
4. Pro další experimenty lze pro stanovení gatrinu doporučit mobilní fázi s methanolem.
5. Rozpuštění gatrinu z nanovláček je samo o sobě rychlé a pravděpodobně předbíhá rozpouštění PVP. Prakticky veškeré množství stanovitelné množství gatrinu se z nanovláček uvolní a rozpustí asi do 8 až 12 minut.
6. V dalších časových intervalech disolučního pokusu, tedy asi po 12. minutě od počátku neodpovídají výsledky stanovení gatrinu vizuálně zřetelnému kompletnímu rozpouštění vzorku membrány (gatrinu i nanovláčkového nosiče), případně také plniva manitolu. Maximálně dosahované hodnoty obsahu gatrinu v akceptorové fázi jsou na úrovni jedné čtvrtiny teoretického předpokladu.
7. Vzhledem k možným interakcím gatrinu s PVP lze pro další práci doporučit zvláknění gatrinu například s hydroxypropylmethylcelulosou.
8. Hydrofobní laminace nanovláčkových membrán s gatrínem za daných podmínek jeho disoluční profil neovlivňuje ani pozitivně ani negativně.

9. Pokusné zalisování nanovláken do mannitolu se za daných podmínek na rychlostním profilu rozpouštění gatrinu ztelně neprojevilo.

8 POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

V_0	výchozí objem akceptorového média
Q_t	množství látky v čase t
Q_m	množství látky v membráně
t	čas
AUC	plocha pod píkem chromatogramu gatriinu
SEM	směrodatná odchylka průměru
PVP	polyvinylpyrrolidon

Další zkratky byly použity pouze společně s příslušným celým termínem.

9 LITERATURA

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/Solubility> (staženo 12. 12. 2013).
2. Český lékopis 2009 - Doplněk 2012, Gradaublishing 2012, s. 114.
3. Ketan T., Savjani, A. K.: Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. ISRN Pharmaceutics, 2012, 10 s. doi.10.54,2/2012/195727.
4. Amidon G. L., Lennernäs H., Shah V. P., Crison J. R.: A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 1995, **12**, s. 413-20.
5. Benet L.Z.: The Role of BCS (Biopharmaceutics Classification System) and BDDCS (Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System) in Drug Development. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013, **101**, s. 34-42.
6. Linn M., Collnot E.M., Djuric D., Hempel, Fabian, E., Kolter, K, Lehr, C-M: Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, **45**, s. 336–343.
7. Tsume Y, Mudie D. M., Langguth P., Amidon G. E. , Amidon G. L.: The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for In Vivo Predictive Dissolution (IPD) Methodology and IVIVC. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2014, **57**, s. 152–163.
8. Savjani K.T., Gajjar A.K., Savjani J.K.: Drug Solubility: Importance and enhancement techniques. ISRN Pharmaceutics, 2012, 10 s. doi:10.5402/2012/195727
9. Joshi J.T.: A Review on Micronization Techniques. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2011, **3**, s. 651-681.
10. Kamble V.A, Jagdal D.M., Kadam V.J.: Nanosuspension a novel drug delivery system. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2010; **1**, s. 352-360.
11. Aguiar A.J., Krc J., Kinkel A.W., Samyn J.C.: Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1967, **56**, s. 847–853.
12. Blagden N., de Matas M., Gavan J.C., York P.: Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, **59**, s. 617–630.
13. Dhirendra K., Lewis S., Udupa N., Atin K.: Solid dispersions: A review. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, **22**, s. 234-246.

-
14. Leuner C., Dressman J.: Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions; *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, s.47-60.
 15. Levy G.: Effect of particle size on dissolution and gastrointestinal absorption rates of pharmaceuticals. *American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1963, s. 78–92.
 16. Vasconcelos T., Sarmiento B., Costa P.: Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, 2007, s. 1068-75.
 17. Goldberg A., Gibaldi M., Kanig J. L.: Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures III - experimental evaluation of griseofulvin- succinic acid solid solution *Journal Pharmaceutical Sciences*, 1966; **55**, s. 487-492.
 18. Mogal S., Gurjar P., Yamgar D., Kamod A.C.: Solid dispersion technique for improving solubility of some poorly soluble drugs. *Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre*, 2012, s. 1574-1586.
 19. Chhater S., Praveen K.: Solvent evaporation method for amorphous solid dispersions: Predictive tool for improve the dissolution rate of pioglitazone hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2013, **3**, s. 350-359.
 20. Maniruzzaman M., Boateng J.S., Snowden M.J., Douroumis D.: A Review of Hot-Melt Extrusion: Process Technology to Pharmaceutical Products, *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 9 s. doi:10.5402/2012/436763
 21. Crowley M.M., Zhang F., Repka M.A., Thumma S., Upadhye S.B., Battu S.K., McGinity J.W., Martin C.: Pharmaceutical applications of hot-melt extrusion: part I. *Drug Development of Industrial Pharmacy*, 2007, **33**, s. 909-26.
 22. <http://www.rottendorf.com/index.php/hot-melt-extrusion.html> (staženo 15.3.2014).
 23. Madan S.: Hot melt extrusion and its pharmaceutical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, **7**, s. 123-133.
 24. Lakshman J.P., Cao Y., Kowalski J., Serajuddin A.: Application of Melt Extrusion in the Development of a Physically and Chemically Stable High-Energy Amorphous Solid Dispersion of a Poorly Water-Soluble Drug. *Molecular Pharmaceutics*, 2008, **5**, s. 994–1002.
 25. Yu D.G., Shen X.X., Branford-White C., White K., Zhu L.M., Bligh S.W.: Oral fast-dissolving drug delivery membranes prepared from electrospun polyvinylpyrrolidone ultrafine fibers. *Nanotechnology*, 2009; **5**, 9 s.

-
26. <http://www.che.vt.edu/Faculty/Wilkes/GLW/electrospinning/electrospinning.html> (staženo: 15.3.2014).
27. Doshi J., Reneker D.H.: Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers. *Journal of Electrostatics*, 1995, **35**, s. 151-160.
28. Zamani M., Prabhakaran M.P., Ramakrishna S.: Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials for drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, **8**, s. 2997–3017.
29. Son Y. J., Yoo H. S.: Electrospun nanofibers for drug delivery systems. *Archives of Pharmaceutical Research*, 2014, **37**, s. 69–78.
30. Shin S.H., Purevdorj O., Castano O., Planell J.A., Kim H.W.: A short review: Recent advances in electrospinning for bone tissue regeneration, *Journal of Tissue Engineering* 2012, **3**, s. 1-11
31. <http://www.chromatography-online.org/topics/acetaminophen.php> (staženo 21.8.2014).
32. <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/ictalk/35/35lab.html> (staženo 21.8.2014).
33. Volker Bühler, *Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals*, Springer Berlin Heidelberg, New York. 2005, 126 s. ISBN 3-540-23412-8
34. Ignatious, F., Sun, L., Lee, C.-P., Baldoni, J.: Electrospun nanofibers in oral drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 2010, **27**, 576–88.
35. Rutledge, G.C., Fridrikh, S. V, Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. **59**, s. 1384–91.
36. Vrbata, P., Berka, P., Stránská, D., Doležal, P., Musilová, M., Čížinská, L.: Electrospun drug loaded membranes for sublingual administration of sumatriptan and naproxen. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, **457**, s.168–76.
37. Rowe, R. C, Sheskey, P. J., Fuinn, M. E (Eds)., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6.vyd., 2009, Pharmaceutical Press/American Pharmacists Association. s. 581-593.