

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

**Disoluce léčiva z tenkých filmů
na bázi plastifikovaných PLGA derivátů**

**Dissolution of a drug from thin films
based on plasticized PLGA derivatives**

Diplomová práce

Hradec Králové 2022

Simona Kodytková

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým autorským dílem, který jsem vypracovala samostatně pod odborným vedením PharmDr. Evy Šnejdrové, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem pro zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Také prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Simona Kodytková

Touto cestou bych chtěla poděkovat své školitelce PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a připomínek a v neposlední řadě za mimořádně vstřícný přístup.

OBSAH

Obsah	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Zadání práce.....	8
Úvod.....	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Systémy pro <i>in situ</i> formulaci tenkých filmů (FFS).....	10
1.1.1 Definice, tvorba, použití	10
1.1.2 Mechanismus vzniku FFS.....	13
1.2 Složení FFS	15
1.2.1 Léčivo	15
1.2.2 Rozpouštědlo	16
1.2.3 Polymer.....	16
1.2.4 Plastifikátor.....	17
1.3 Testování FFS	18
1.3.1 Doba evaporace organického rozpouštědla	18
1.3.2 Tloušťka filmu	18
1.3.3 Pevnost v tahu.....	19
1.3.4 Test propustnosti pro vodní páry	19
1.3.5 Fyzikálně chemická charakterizace filmů.....	20
1.3.6 Disoluce léčiva.....	21
1.3.7 Adhezivita filmu	22
1.3.8 Reologické vlastnosti FFS	25
1.4 Disoluce léčivých látek z tenkých filmů	25

1.4.1	Permeační testy	26
1.5	Složení formulovaných FFS.....	28
1.5.1	Kyselina salicylová	28
1.5.2	Methyl-salicylát	29
1.5.3	PLGA.....	29
2	Experimentální část	31
2.1	Použité přístroje	31
2.2	Použité suroviny.....	31
2.3	Test rozpustnosti kyseliny salicylové a methyl-salicylátu.....	32
2.4	Příprava FFS.....	32
2.5	Disoluční testy.....	33
3	Výsledky.....	34
3.1	Rozpustnost kyseliny salicylové a methyl-salicylátu.....	34
3.2	Formulace tenkých filmů odpařením rozpouštědla.....	34
3.3	Množství kyseliny salicylové a methyl-salicylátu uvolněné z tenkých filmů	36
4	Diskuze	46
4.1	Liberace SA a MS z lineárního PLGA.....	48
4.2	Liberace SA a MS z větveného PLGA/A	51
4.3	Vliv typu polymeru na disoluci SA a MS	53
5	Závěry.....	55
6	Literatura	56

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Autorka: Simona Kodytková
Název diplomové práce: Disoluce léčiva z tenkých filmů na bázi
plastifikovaných PLGA derivátů
Školitel: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cílem předložené práce bylo formulovat kapalnou soustavu pro tvorbu *in situ* tenkých filmů (FFS) na bázi kopolymerů kyseliny D,L-mléčné a glykolové (PLGA) a studovat vliv kombinace kyseliny salicylové a methyl-salicylátu ve filmu a vliv jejich různých koncentrací na disoluční profily. V teoretické části byly shrnuty obecné poznatky o charakteristikách, látkách používaných k formulaci FFS a metody jejich testování. V experimentální části byly připraveny kapalnou formulace tvořící *in situ* filmy evaporací rozpouštědla, založené na lineárním nebo větveném PLGA polymeru s kyselinou salicylovou jako léčivem obtížně rozpustným ve vodě, a s methyl-salicylátem ve funkci multifunkčního plastifikátoru, a to v různých koncentracích. Byl proveden test rozpustnosti kyseliny salicylové, methyl-salicylátu a jejich směsi a disoluční testy léčiva a plastifikátoru do tlumivého fosforečnanového pufru pH 5,5 při 37 °C. Analýza salicylátů byla provedena metodou HPLC. Na základě výsledků lze konstatovat, že rychlejší disoluce kyseliny salicylové a methyl-salicylátu byla zjištěna při použití větveného PLGA. Za 24 hodin se uvolnilo 53 % kyseliny salicylové a celková doba liberace byla 5 dní. Z lineárního PLGA se kyselina salicylová uvolňovala s burstem 33 % za 24 hodin a celková liberace trvala 8 dní.

Klíčová slova: tenký film, PLGA, plastifikátory, disoluce léčiva

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Simona Kodytková
Title of Diploma thesis: Dissolution of a drug from thin films based on plasticized PLGA derivatives
Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

The aim of the presented work was to formulate liquid systems for the formulation of *in situ* thin films (FFS) based on copolymers D,L-lactic and glycolic acid (PLGA) and to study the effect of a combination of salicylic acid and methyl salicylate in film and the effect of their various concentrations on dissolution profiles. The theoretical section summarizes the general knowledge about the characteristics, substances used to formulate FFS and methods for their testing. In the experimental section, liquid systems forming *in situ* films by solvent evaporation were prepared, based on a linear or branched PLGA polymer containing salicylic acid as a poor water soluble drug, and methyl-salicylate as a multifunctional plasticizer, at different concentrations. The solubility test of salicylic acid, methyl salicylate and their mixtures, and dissolution tests of drug and plasticizer in phosphate buffer buffer pH 5.5 at 37 °C were performed. Salicylate analysis was performed by HPLC. Based on the results, it can be stated that faster dissolution of salicylic acid and methyl salicylate was found using branched PLGA. In 24 hours, 53% of salicylic acid was released and the total release time was 5 days. The salicylic acid was released from the linear PLGA with a burst of 33% in 24 hours and the total dissolution lasted 8 days.

Key words: film forming system, PLGA, plasticizers, drug release

ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo formulovat kapalně soustavy pro tvorbu *in situ* tenkých filmů (FFS *film forming systems*) na bázi kopolymerů kyseliny D,L-mléčné a glykolové (PLGA) a testovat disoluci aktivních látek.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Pro formulaci FFS použít PLGA lineární nebo větvené struktury.
2. Zvolený polymer plastifikovat různou koncentrací methyl-salicylátu (MS).
3. Do plastifikovaných polyesterů inkorporovat různé množství kyseliny salicylové (SA).
4. Provést disoluční testy methyl-salicylátu a kyseliny salicylové *z in situ* filmů.
5. Množství uvolněného MS a SA stanovit HPLC ve spolupráci s Katedrou farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy.
6. Studovat vliv formulačních faktorů na uvolňování methyl-salicylátu a kyseliny salicylové z tenkých filmů.

ÚVOD

Filmotvorné systémy (FFS) představují perspektivní lékovou formu, která po aplikaci v kapalném stavu vytvoří tenký film *in situ* evaporací rozpouštědla. V této oblasti mohou FFS představovat alternativu ke konvenčním topickým lékovým formám, jako jsou polotuhé přípravky (gely, masti, krémy, pasty) a náplasti, jelikož eliminují některé jejich nevhodné vlastnosti. FFS lze aplikovat na kůži nebo dostupné sliznice, kde vytvoří transparentní rychleschnoucí film, který je nelepivý, pružný, odolný vůči otření, snadno odstranitelný. *In situ* filmy mají lepší odolnost vůči mechanickým vlivům a umožní snížení frekvence dávkování. To vše přispívá ke zlepšení compliance pacienta s léčbou.

FFS jsou tvořeny léčivou látkou, filmotvorným polymerem, plastifikátorem a těkavým rozpouštědlem. Plastifikátor má ve formulaci za cíl usnadnit tvorbu filmu, zvýšit jeho pružnost a zlepšit jeho pevnost. Není vyloučeno, že by mohl mít určitou farmakologickou aktivitu, která by podpořila účinek léčby. V této diplomové práci byl jako plastifikátor a zároveň možný zdroj salicylátu použit methyl-salicylát. Jako léčivo byla použita kyselina salicylová, která v závislosti na koncentraci vykazuje buď keratoplastický nebo keratolytický efekt a své uplatnění nachází jako dermatologikum při kožních onemocněních, nebo jako model léčiva nerozpustného ve vodě.

Práce tematicky a metodicky navozuje na diplomové a rigorózní práce, které se taktéž zabývaly uvolňováním léčiv z biodegradabilních filmů, s tím rozdílem, že byly použity jiné typy a koncentrace polyesterů, plastifikátorů a léčiv.¹⁻³

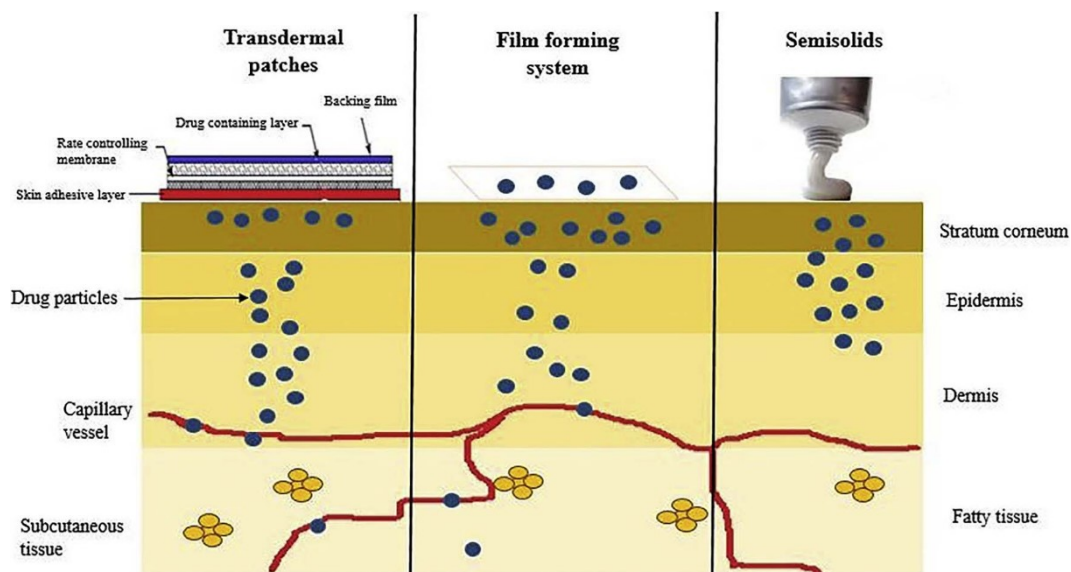
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Systémy pro *in situ* formulaci tenkých filmů (FFS)

1.1.1 Definice, tvorba, použití

Film tvořící systém (FFS – film forming system) je nový přístup, který lze využít k dermálnímu a transdermálnímu podání léčiva jako alternativu ke konvenčním lokálním přípravkům. Je definován jako kapalná léková forma vytvářející film *in situ*, tj. po aplikaci na kůži nebo sliznici. Tyto systémy jsou obvykle složeny z účinné látky a filmotvorných látek rozpuštěných ve vehikulu, které se rychle odpařuje nebo se absorbuje.^{4,5}

Pro úspěšnou léčbu je zapotřebí, aby bylo léčivo udržováno v místě účinku po určitou dobu. Většina lékových forem pro topickou aplikaci léčiv, jako jsou např. náplasti, masti, krémy, mají určitá omezení a nevýhody. U náplastí je to především špatná přilnavost na zakřivených plochách, podráždění pokožky, jelikož okluzivní vlastnosti způsobují ucpání potních kanálek, bolestivé odstranění, popř. zanechání zbytku lepidla na kůži či neestetický vzhled. Polotuhé přípravky tyto nevýhody odstranily. Zato mají jiná omezení, jako např. nedokáží zajistit dlouhodobý kontakt léčiva s povrchem kůže, lze je snadno setřít oděvem, vyžadují opakovanou aplikaci, která zanechává pocit mastnoty a lepkavosti. Tyto faktory mohou zhoršit compliance pacienta k léčbě.^{5,6}



Obr. 1: Porovnání distribuce léčiva po aplikaci transdermální náplasti (transdermal patches), systému pro tvorbu filmu a polotuhého přípravku (semisolids) ⁵

Vývoj filmotvorných přípravků by mohl zlepšit odolnost vůči mechanickým a kosmetickým aspektům a zásadně tak zlepšit compliance. Mezi výhody oproti konvenčním přípravkům lze zmínit skutečnost, že mohou být aplikovány na místo bez ohledu na tvar a plochu, kde těsně přilnou na kůži a vytvoří tenký transparentní rychleschnoucí film, který je nelepivý, pružný, snadno odstranitelný, ale zároveň odolný vůči otření. Dále dokáže zajistit dodání účinné látky po určitou dobu a umožní tak méně časté dávkování.⁷

Tab. 1: Porovnání přípravků pro lokální podání^{5,7}

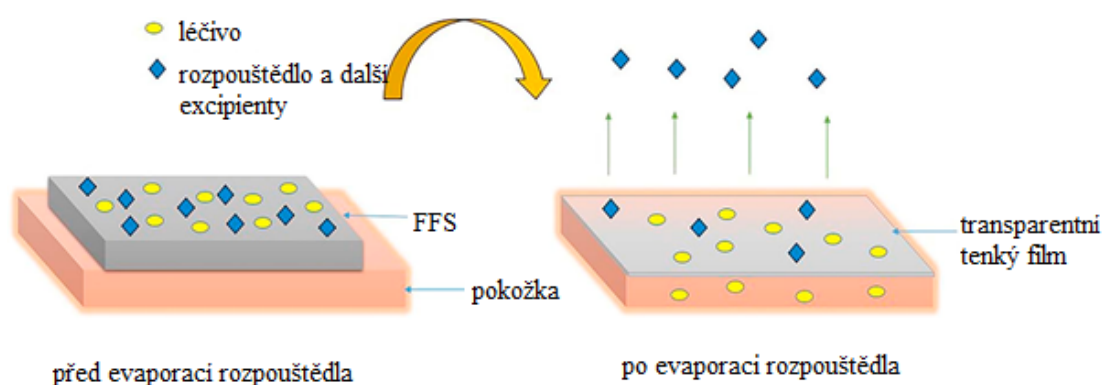
Vlastnost	Náplasti	Polotuhé přípravky	FFS
Vizuální vzhled	Vysoce viditelné	Viditelné	Téměř neviditelné
Pocit na kůži	Nelepí, nemastí	Někdy lepkavé, mastné	Nelepí, nemastí
Aplikace	Pohodlné	Spíše nepraktické	Pohodlné
Nastavení dávky	Nízká	Vysoká	Vysoká
Frekvence dávkování	1-7 dní	1 den nebo méně	1-2 dny
Prodloužené uvolňování	Ano	Ne	Ano
Okluzivní vlastnosti	Ano	Ne	Ne
Odolnost vůči otření	Ano	Ne	Ano
Zbytky reziduí	Možný	Ne	Ne

První kapalný filmotvorný systém pro dodání léčiva do kůže popsal v roce 1996 Amit Mirsa et al. Film obsahoval testosteron v kombinaci s dvěma polymery – poly(vinylalkohol) a poly(vinylpyrrolidon) v isopropanolu se změkčovadlem (tekutý parafín) a povrchově aktivní látkou (Tween 20).⁸⁻¹⁰

Téma filmotvorných systémů zaznamenal v posledních desetiletí velký zájem v oblasti farmacie. Nejprve byly filmotvorné systémy užívány převážně v oblasti chirurgie či péče o rány (tkáňová lepidla pro uzavírání operačních ran). V současnosti FFS mají velký terapeutický potenciál jako nová forma topického podání pro lokální i systémový účinek. Na trhu jsou přípravky pro lokální léčbu dermatologických onemocnění (terbinafini hydrochloridum), na léčbu bolesti (kombinace lidokainu a tetrakainu) a pro systémové terapeutické účinky (estradiol, testosteron), přičemž řada dalších je ve fázi klinického testování.^{4,7,9}

1.1.2 Mechanismus vzniku FFS

FFS začne vznikat po kontaktu s terapeutickým miestom v okamžiku, kdy se začne odpařovat rozpouštědlo. Tvorba filmu však závisí na tom, zda je polymer rozpuštěn nebo dispergován. U roztoků dochází k tvorbě filmu při odpaření rozpouštědla, jelikož jsou polymerní řetězce důkladně promíchány. U tvorby filmu z polymerních disperzí se vyžaduje koalescence polymerních částic, aby bylo umožněno prolínání jednotlivých polymerních řetězců. Koalescence je způsobena tím, že s odpařením rozpouštědla se zvyšují kapilární síly.¹¹



Obr. 2: Mechanismus tvorby tenkého filmu⁵

Po aplikaci FFS se jeho složení v důsledku ztráty těkavého vehikula mění a dojde k vytvoření transparentního filmu na povrchu kůže. Ten může působit jako depo léčiva pro jeho penetraci do kůže nebo permeaci přes kůži.⁶ Po odpaření rozpouštědla dochází ke ztrátě objemu, což má za následek zvýšení koncentrace léčiva ve filmu až do stádia přesycení, které vede ke zvýšenému toku léčiva přes kůži zvýšením termodynamické aktivity systému, bez toho, aniž by došlo k ovlivnění kožní bariéry. Zároveň se sníží vedlejší účinky či podráždění pokožky.^{5,6}

Přesycení lze vysvětlit upravenou formou Fickova zákona difúze (1). Fickův zákon difúze popisuje rovnice níže:

$$J = \frac{DKCv}{h} \quad (1)$$

kde

J rychlost pronikání léčiva na jednotku plochy kůže za jednotku času (tok)
[mol·cm⁻²·s⁻¹]

D difúzní koeficient léčiva [cm²·s⁻¹]

K rozdělovací koeficient léčiva [bezrozměrný]

C_v koncentrace léčiva [mol·cm⁻³]

h tloušťka bariéry proti difúzi [cm]

Z rovnice vyplývá, že rychlost permeace léčiva přes kůži je úměrná koncentraci léčiva. To však platí pouze v případě, kdy je léčivo ve vehikulu rozpuštěno. Upravenou formu Fickova zákona difúze popisuje rovnice:

$$J = \frac{\alpha D}{\gamma h} \quad (2)$$

kde

α termodynamická aktivita léčiva ve formulaci

γ termodynamická aktivita léčiva v membráně

Dle této rovnice je tok léčiva přímo úměrný termodynamické aktivitě formulace, což souvisí se saturací. Nelze však opomenout skutečnost, že při zvýšení přesycení se zvyšuje i termodynamická nestabilita. FFS problém nestability překonává, jelikož přesycené systémy se vytváří ihned po aplikaci na kůži.^{5,6}

1.2 Složení FFS

Formulace FFS obecně obsahují kombinaci léčiva, pomocných látek, mezi něž řadíme filmotvorný polymer a plastifikátor, a těkavé rozpouštědlo. Tyto komponenty mají vliv jednak na mechanické a kosmetické vlastnosti výsledného filmu, ale i na rychlost uvolňování léčiva přes kůži.^{9,12}

1.2.1 Léčivo

Léčivo, bez ohledu na to, zda má být použito k topické či transdermální aplikaci, musí být schopné proniknout do stratum corneum. Lépe do stratum corneum pronikají látky s převážně lipofilním charakterem. Rozdělovací koeficient log P je ideálně mezi 1-3 a určuje cestu, jakou bude lék procházet kůží.^{4,5,13} Dalším důležitým faktorem pro pronikání léčiva je molekulová hmotnost, neboť malé molekuly vykazují vyšší rychlost difúze. Molekulová hmotnost by měla být ideálně nižší než 500.^{4,5} Dále je třeba uvažovat o rozpustnosti léčiva i v netěkavých složkách přípravku, aby během procesu odpařování těkavých složek nedošlo ke krystalizaci léčiva. Studie ukazují, že přípravky by měly být ideálně v rozmezí pH 5-10, aby nedocházelo k podráždění pokožky během aplikace.⁴ Další parametry, které by léčivo mělo splňovat je počet vodíkových vazebných skupin, který by neměl překročit 2 (jelikož chemická struktura také ovlivňuje difuzivitu) a nízký bod tání (méně než 200 °C).^{9,13}

Vyjma shora uvedených faktor, které jsou nezávislé na formě dávkování, je nutno vzít v úvahu také specifika FFS. Mezi ně patří zejména velikost rezervoáru léčiva, která je dána tloušťkou filmu a aplikační plocha, která bývá udávána v řádu desítek cm². Rezervoár léčiva může být utvářen v samotné formulaci a pomalu pronikat do stratum corneum, popřípadě alternativně procházet přímo z formulace do stratum corneum a vytvářet tam svůj rezervoár. V takovém případě slouží vytvořený film jako ochrana.¹⁰

Formulace FFS budou atraktivní především pro léčiva, která mají vysokou účinnost, vysokou propustnost kůží a vysokou rozpustnost v rozpouštědle.¹⁴

1.2.2 Rozpouštědlo

Rozpouštědlo tvoří důležitý komponent při tvorbě filmu, i když ve výsledném filmu není přítomen, jelikož při kontaktu s pokožkou dojde k jeho odpaření. Vhodné rozpouštědlo musí být kompatibilní s pokožkou a během procesu odpařování ji nemá dráždit. Zároveň musí poskytnout dostatečnou rozpustnost jak pro filmotvorný polymer, tak i pro léčivo. Důležitou vlastností FFS, která je ovlivněna rozpouštědlem, je doba vyschnutí. Neměla by přesáhnout 5 minut, aby se zamezilo nepohodlí pacienta. Proto jsou preferována vysoce těkavá organická rozpouštědla. Nejčastěji používaná rozpouštědla pro dermální a transdermální použití jsou uvedena v Tab. 2.^{4,5,14}

Tab. 2: Rozpouštědla používaná ve formulacích FFS⁵

Kategorie	Příklady
Alkoholy	ethanol, butanol, isopropanol, benzylalkohol
Glykoly	Propylenglykol
Ostatní	ethylacetát, isopropylmyristát

1.2.3 Polymer

Polymer patří mezi nejdůležitější excipienty při formulaci filmu. Jeho volba má největší vliv na substantivitu výsledného filmu. Je klíčové, aby byl polymer rozpustný v těkavém, nedráždivém rozpouštědle, byl kompatibilní s účinnou látkou a schopný vytvořit čirý, pružný, tenký a odolný film při teplotě těla (28 – 32 °C).

Hydrofilní polymery jsou ideální pro formulace, z nichž léčivo rychle pronikne do stratum corneum, kde si vytvoří zásobník. Hydrofóbní polymery naopak tvoří voděodolné filmy s vysokou substantivitou na kůži, což napomáhá vzniku rezervoáru léčiva, ze kterého lze docílit trvalého uvolňování. Jejich nevýhoda tkví v křehkosti a nedostatečné flexibilitě, což ztěžuje přilnavost k pokožce a může způsobit drobení výsledného filmu. Proto se přidávají obvykle plastifikátory, které ovlivní mechanické vlastnosti a adhezivitu. Polymery s kratšími délkami řetězců jsou pro filmotvorné systémy vhodnější z hlediska viskozity a uspořádanosti v prostoru, kde vzdálenost pro interakce polymerních řetězců je blíže ideálnímu

stavu.^{4,5,15} Různé komerčně dostupné polymery (Tab. 3) byly v posledních desetiletí testovány na FFS *in situ*, přičemž mnohé z nich vykazovaly uspokojivé výsledky. Mezi nejčastěji používané polymery patří celulosové a methakrylátové deriváty, jenž pokrývají širokou škálu polarit.¹⁶ Lze očekávat, že se tento seznam rozroste z důvodu stále probíhajících výzkumů a nutnosti dosáhnout dostatečného výběru pro další vývoj a nová léčiva.

Tab. 3: Příklady polymerů užívaných ve formulacích FFS

Polymer	Rozpustnost ve vodě	Rozpustnost v ethanolu	Polarita
Hydroxypropylmethylcelulosa (HPMC) HPMC (E4M, E15, E50M, K4M)	ano (studená)	ano	hydrofilní
Ethylcelulosa (EC)	ne	ano	hydrofobní
Poly(mléčná-ko-glykolová) kyselina	ne	ne	lipofilní
Hydroxypropylcelulosa	ano (studená)	ano	hydrofilní
Polyvinylpyrrolidin (PVP) (PVP K30, PVP VA64)	ano	ano	hydrofilní
Polyvinylalkohol (PVA)	ano	ano	hydrofilní
Chitosan	ne	ne	hydrofilní
Eugradit (polymethakrylátový kopolymer) Eugradit RS 100, Eugradit RL 100, Eugradit NE, Eugradit RS 30D, Eugradit S 100	ne	ano	lipofilní
Silikony Polydimethylsiloxan	ne	ne	lipofilní
Akrylátový kopolymer Avalure® AC 118, AC 120	ne	ano	lipofilní

1.2.4 Plastifikátor

Funkcí plastifikátoru ve formulaci FFS je usnadnit tvorbu, zvýšit pružnost a zlepšit pevnost v tahu výsledného filmu. Aby došlo k vytvoření čirého transparentního filmu s pokožkou, je zapotřebí, aby změkčovadlo a polymer byly navzájem kompatibilní, tzn. aby plastifikátory mohly pronikat mezi řetězce polymeru, kde zvýší volný objem a pohyblivost polymerního řetězce, což má za důsledek snížení teploty skelného přechodu (T_g) a zvýšení difúze léčiva. Vlastností plastifikátoru by pochopitelně měla být nízká propustnost kůží, aby bylo zabráněno úniku z filmu.^{4,9}

Přestože nelze formulovat obecné pravidlo k určení koncentrace plastifikátoru pro tvorbu filmu, je nutno ji individuálně stanovit. Důvodem nutnosti stanovení je skutečnost, že nedostatečné množství vede ke vzniku křehkých filmů s nízkou přilnavostí k pokožce, oproti nadměrnému množství, které sice vede k hladkým, ovšem též lepkavým filmům.¹⁴ Kromě toho je možné, že i samotné změkčovadlo by mohlo mít určitou farmakologickou aktivitu, která by mohla podpořit účinek léčby.

Plastifikaci filmu zajišťují obvykle nízkomolekulární látky, jako např. glycerol, polyethylenglykol, sorbitol, dibutylftalát, propylenglykol, polyethylenglykol 300 nebo 400, triacetin, triethylcitrát aj.^{4,5}

1.3 Testování FFS

1.3.1 Doba evaporace organického rozpouštědla

Doba potřebná k evaporaci organického rozpouštědla pro vytvoření filmu je klíčovým parametrem FFS. V literatuře se uvádí, že doba schnutí by neměla být delší než 5 minut při teplotě okolí, aby se nesnížilo compliance pacienta.¹⁷ Pro vyhodnocení doby schnutí se předepsané množství formulace aplikuje na nepřilnavý povrch, obvykle sklo nebo teflon, a stopkami se měří čas potřebný k tvorbě filmu bez známek vlhkosti. Kritickým bodem je detekce suchého stavu filmu. Ta se obvykle provádí metodou dotyku prstu nebo skleněným sklíčkem bez tlaku. Pokud na sklu/prstu po vyjmutí není žádná viditelná kapalina, považuje se film za suchý.^{12,18–20} Další metodou je diferenční vážení filmu před a po evaporaci.²¹

1.3.2 Tloušťka filmu

Tloušťka filmu je přesným a snadno měřitelným parametrem, jelikož koreluje s přesně definovaným množstvím FFS a místem aplikace. Například tloušťka bukálního filmu by měla být ideálně v rozmezí 50 - 1000 μm .²²

FFS se nanese na nelepivý povrch, obvykle teflon nebo sklo, po odpaření rozpouštědla se film odloupne.⁵ Tloušťka vytvořených tenkých filmů se měří pomocí posuvného měřítka, elektronického digitálního mikrometru, šroubového

měřidla nebo snímků ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) na víc místech s následným výpočtem střední tloušťky.²²

1.3.3 Pevnost v tahu

Pro charakterizaci mechanické pevnosti filmů se nejčastěji používá analyzátor textury, který měří sílu a pohyb sondy poté, co se sonda dostane do kontaktu s povrchem vzorku, tzv. spouštěcí síla. Posun sondy probíhá danou konstantní rychlostí až do doby, než dojde k oddělení filmu. Zaznamená se síla a hloubka průniku, tzv. posunutí, dále teplota a relativní vlhkost. Bylo prokázáno, že doba kontaktu společně s kontaktní silou a rychlostí pohybu sondy má výrazný vliv na pevnost filmu.^{5,16,22}

Analyzátor textury umožní měřit mechanické vlastnosti jako je maximální síla, při které přestává být materiál elastický a postupně začíná docházet k plastickým deformacím či lámání, prodloužení při přetržení a Youngův modul, jenž odráží tuhost a elasticitu filmu.²²

Pevnost v tahu (σ) tak lze vypočítat dle vzorce (3),

$$\sigma = \frac{F_{\max}}{A} \quad (3)$$

kde:

F_{\max} maximální síla [N]

A plocha průřezu [m²]

1.3.4 Test propustnosti pro vodní páry

Propustnost pro vodní páry je charakterizována jako množství vody procházející jednotkovou plochou filmu za jednotku času. Data o permeaci vodní páry slouží k určování permeačních charakteristik filmu. Ty mohou ovlivnit vlastnosti pokožky, mezi něž řadíme hydrataci stratum corneum, průtok krve a teplotu kůže. Metody měření propustnosti vodní páry, které se často používají, jsou stanoveny v British Pharmacopoeia. Metoda spočívá ve vytvoření filmu na podklad, který umožňuje jeho vyschnutí. Následně se ze suchých filmů vyříznou kruhové vzorky, které se vloží do skleněné lahvičky s destilovanou vodou. Po stanovení hmotnosti se lahvičky umístí do exikátoru, který vytváří buď atmosféru s nízkou relativní

vlhkostí nebo s relativní vlhkostí 58%. Jsou udržovány při stanovené teplotě po určitou dobu a váženy v předem stanovených časových intervalech. Z úbytku hmotnosti se vypočítá propustnost vodní páry (WVP).^{5,16,18}

$$WVP = \frac{W}{A * t} \quad (4)$$

kde

W úbytek hmotnosti obsahu v lahvičce [g]

A plocha povrchu [cm²]

t čas [h]

1.3.5 Fyzikálně chemická charakterizace filmů

Mezi fyzikálně chemické metody pro charakterizaci filmů lze zahrnout Fourierovu transformační infračervenou spektroskopii, Ramanovu mikrospektroskopii, dále metody termické analýzy jako diferenciální skenovací kalorimetrie a termogravimetrická analýza, rastrovací elektronová mikroskopie, transmisní elektronová mikroskopie a mikroskopie atomové síly určující morfologii filmu.

Fourierova transformační infračervená spektroskopie (FT-IR) se používá k analýze chemické struktury nebo k identifikaci možných molekulárních interakcí mezi komponenty tvořící film. Měření se provádí ve spektrálním rozsahu 400 – 4000 cm⁻¹ a rozlišením 4 cm⁻¹.²³

Informace o chemickém složení polymerních filmů odhaluje Ramanova mikrospektroskopie. Z Ramanových spekter získané chemické mapy nám poskytují míru chemické homogenity filmu. Techniky, které jsou založeny na Ramanově rozptylu, lze využít mimo jiné i ke sledování permeace lokálně aplikovaných sloučenin kůží.²⁴

Mezi nejčastěji používané metody pro termickou analýzu FFS se řadí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a termogravimetrická analýza (TGA). DSC zkoumá teplo absorbované materiálem ve srovnání s referencí. Umožňuje tak posoudit parametry, mezi které patří teplota tání (T_t) a teplota skelného přechodu (T_g).^{25,26}

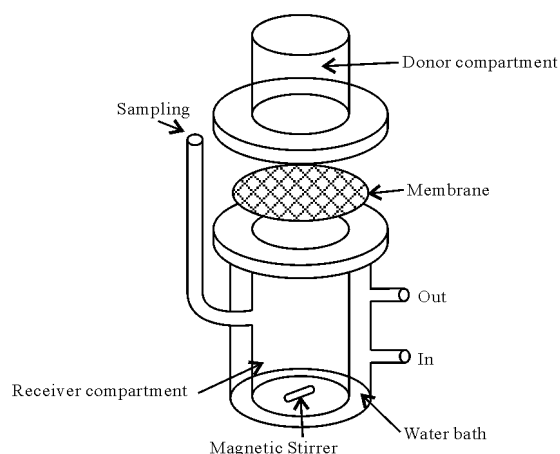
Tato metoda se uplatňuje především pro určení účinnosti plastifikátorů.²⁷ TGA měří změnu hmotnosti vzorku během jeho zahřívání, nebo ochlazování, proto se užívá k vymezení vlastností materiálu v závislosti na jejich tepelné změně.²⁵

Aby byla zabezpečena rovnoměrná distribuce léčiva v polymerní směsi, je zapotřebí posoudit morfologii a texturu povrchu filmu, která by měla být homogenní a spojitá. Pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM), transmisní elektronové mikroskopie (TEM), mikroskopie atomové síly (AFM) a souvisejících zobrazovacích technik lze získat informace o topografických a mechanických vlastnostech. Mezi takové vlastnosti řadíme povrchovou texturu, která může být hladká nebo drsná, tloušťku, distribuci léčiva, zda je agregovaná nebo rozptýlená, a počet pórů na povrchu polymerního filmu.^{5,22,24}

1.3.6 Disoluce léčiva

Stanovení profilu uvolňování léčiva *in vitro* se užívají k prognóze permeačních charakteristik FFS *in vivo*.⁵ Hojně využívaným zařízením pro studie *in vitro* patří Franzova difuzní cela, méně často pak dialyzační trubičky, jejichž nevýhodou je, že během kontaktu s médiem dochází k rozpouštění vysušeného filmu.^{28,29}

Franzova difuzní cela (Obr. 3) se skládá ze dvou oddílů, donorového a přijímacího, mezi nimiž je ukotvena difuzní membrána.⁹ Ta může být tvořena z různých materiálů, jako například z nylonu¹⁶, silikonu¹² nebo celulosy³⁰. Donorový prostor je místem pro připojení FFS k difuzní membráně, zatímco receptorová komora obsahuje difuzní médium temperované na předem definovanou teplotu. Hodnocení uvolňování se provádí v předem stanovených časových intervalech, kdy se odeberou vzorky a nahradí se stejným objemem čerstvého receptorového média. Uvolněné množství účinné látky ve vzorcích se analyzují vhodnou metodou, nejčastěji HPLC nebo spektrofotometrickou analýzou.^{5,9}



Obr. 3: Modifikovaná Franzova difuzní cela⁶²

Aby bylo možné zkoumat dodání léčiva přes kožní bariéru do systému, měly by být provedeny *ex vivo* permeační studie. Pro studium permeace lze užít Franzovu difuzní celu nebo Keshary-Chienovu difuzní celu.⁵ Testování *ex vivo* probíhá na izolovaných zvířecích tkáních.

Při těchto zkouškách se FFS aplikuje na neporušený povrch kůže prasečích uší nebo kůže krysy, která je následně umístěna mezi dva kompartmenty, přičemž stratum corneum směřuje k donorovému a dermis k receptorovému kompartmentu. Ten obsahuje fyziologický roztok fosforečnanového pufru a je udržován při předem definované teplotě. Vzorky jsou odebírány v určitých časových intervalech a analyzovány vhodnou metodou.^{5,16,31}

1.3.7 Adhezivita filmu

Při testování FFS je nutno rozlišit adhezivitu vnější vrstvy filmu, tzv. lepivost filmu a přilnavost v místě aplikace na povrch kůže (vnitřní vrstvu filmu).

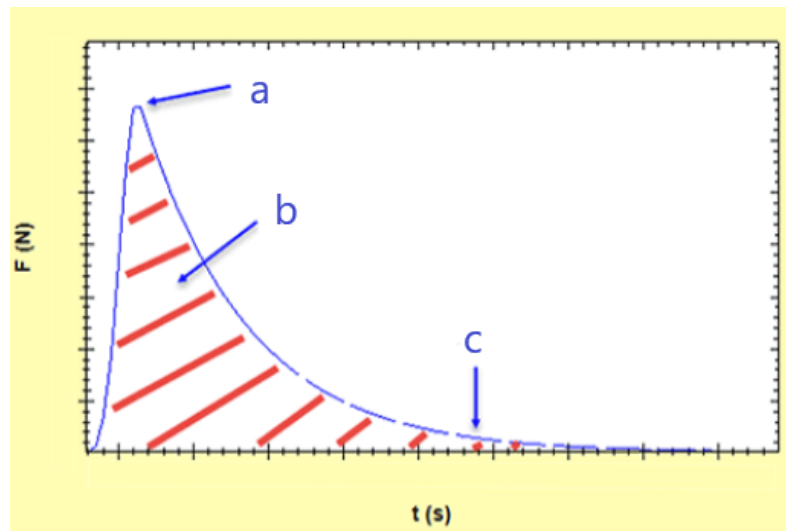
Vnější vrstva výsledného filmu by neměla lepit, aby nedocházelo k přilnutí filmu na oděv, což by bylo pro pacienta nežádoucí, proto je tento parametr testování zásadní. Lepivost filmu lze určit přitlačení vaty na suchý film nízkým tlakem. V důsledku množství vláken zachycených na filmu lze hodnotit přilnavost jako vysokou, pokud dochází k husté akumulaci vláken na filmu, středí, pokud uplývá na filmu tenká vrstva vláken, a nízkou, pokud dochází k občasné nebo žádné lepivosti vláken.^{5,12,19}

Přilnavost filmu v místě aplikace je považován za kritický parametr při tvorbě filmu. Je nezbytné vytvořit film s dostatečnou přilnavostí k povrchu kůže nebo sliznice, aby bylo zaručeno kontinuální dodávání léčiva bez toho, aniž by došlo k přilnutí na jiným materiál, jako například textil, čímž by se snížil průnik léčiva kůži.¹⁵ Ve literatuře je uvedeno několik bioadhezivních testů, avšak doposud nebyly v morfologiích a lékopisech zavedeny žádné standardní testovací metody či přístroje.³²

V současné době se používají adhezivní testování *in vivo*, *in vitro* a *ex vivo*, přičemž nejpoužívanější metody pro stanovení adhezivních vlastností a také většina dostupných dat pramení z metod *in vitro*.

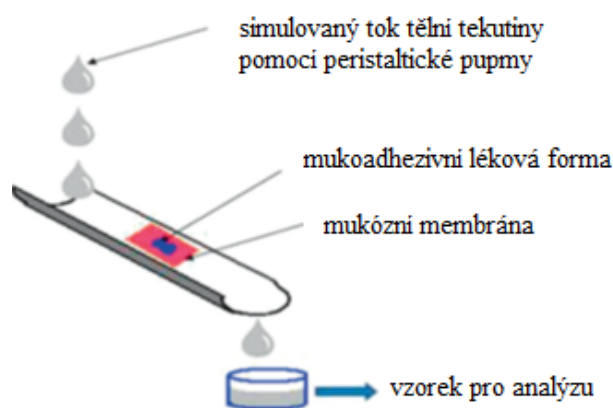
Odtrhávací neboli peel off testy se používají k měření síly, která je potřebná k odtržení filmu od povrchu substrátu. Předepsaný objem FFS se nanese na vyznačenou plochu skleněné desky a nechá se zaschnout při teplotě okolí, aby došlo ke vzniku filmu. Skalpelem se rozdělí na totožné části, na které je následně nanesena a lehce přitlačena lepicí celofánová folie a následně je odtržena. Vypočítá se plocha skleněné desky, která obsahuje zbytky filmu a stanoví se procento plochy odstraněné páskou.^{33,34}

Standardní testovací metodou, která se používá k zjištění síly adheze, je zkouška tahem.³⁵ Vzorek se vloží mezi dvě kontaktní plochy, přičemž jedna je fixní a druhá se dostává do kontaktu s fixní částí, na které je umístěn vzorek, v průběhu testování a následně dojde k oddělení ploch.³⁶ Tímto způsobem pracuje i test přichycení sondy, kdy je sonda aplikována po určitou dobu definovanou silou k filmu a následně je řízeně odtazena.³⁵ Test byl vytvořen, aby nahradil běžně používaný test připínáček-palec, jež spočíval v přitlačení připínáčku palcem na krátkou dobu na povrch a následném vnímání silové obtížnosti při odtržení připínáčku od filmu. I když je tento test jednoduchý pro hodnocení adheze, skýtá řadu nevýhod, především subjektivitu a skutečnost, že je obtížně kvantifikovatelný.³⁷ Obvykle jsou zaznamenávány tři hlavní parametry, a to maximální síla požadovaná k přerušení filmu od povrchu (a), plocha pod křivkou (b) a čas poklesu síly o 90% (c).³⁶



Obr. 4: Hodnocení adhezivního testu v průběhu času ukazující normálové síly³⁶
 a – pík maximální normálové síly
 b – plocha pod křivkou jakožto míra adhezivní/kohezivní síly
 c – doba pro maximální pokles normálové síly o 90%

Smývací testy (wash off, wash out) jsou metody pro odhad adhezivních vlastností lékových forem, jež jsou podávány na tkáň či sliznice, které jsou vysoce ovlivněny průtokem biologických tekutin. Pro experiment je nezbytné napodobit prostředí lidského těla v místě aplikace léčiva. Mezi nejdůležitější faktory, které je třeba imitovat, zahrnujeme teplotu a vlhkost na povrchu sliznice, složení biologické tekutiny a její průtokovou rychlost. Schematicky je princip testu znázorněn na Obr. 5.



Obr. 5: Princip smývacího testu³⁸

Formulace se aplikuje na tkáň, která je připevněna na sklíčku. Pomocí perfúzní pumpy simulujeme biologický tok tekutiny za použití pufru k promytí slizniční tkáně, ze které se vymývá adhesivum a tekutina následně stéká do sběrné nádoby. Analýzu množství léčiva či adhezivního polymeru lze provést buď spektrofotometricky nebo pomocí vysokoúčinné kapalinové nebo gelové permeační chromatografie. Mimo to by mohla být provedena i analýza množství přípravku dosud adhezerovaného na membráně.^{38,39}

1.3.8 Reologické vlastnosti FFS

Charakterizace reologických vlastností FFS je důležitá, neboť má zásadní vliv pro pochopení jejich chování během vývoje, zpracování a finálního použití. Tokové chování filmů je vlastnost, jenž by mohla mít vliv na roztíratelnost, tloušťku filmu, mechanické vlastnosti, balení a stabilitu v průběhu času, ale také aplikaci, mající dopad na přesnost podání a compliance pacienta.^{40,41}

U FFS se stanovují reologické parametry jako elastický modul (G'), ztrátový modul (G'') fázový úhel (δ), viskozita (η), tixotropie.¹⁶ FFS chová jako newtonská kapalina a vykazuje pseudoplastické chování, jehož zdánlivá viskozita se snižuje s rostoucím namáháním.⁴² Viskozita je závislá na koncentraci plastifikátoru, se zvyšující se koncentrací plastifikátoru viskozita klesá. Je prokázáno, že vysoká viskozita ztěžuje dispergování složek a eliminaci vzduchových bublin, které se mohou tvořit během přípravy tenkých filmů. Proto by ve výsledném filmu neměl být použit příliš viskózní roztok.⁴¹

1.4 Disoluce léčivých látek z tenkých filmů

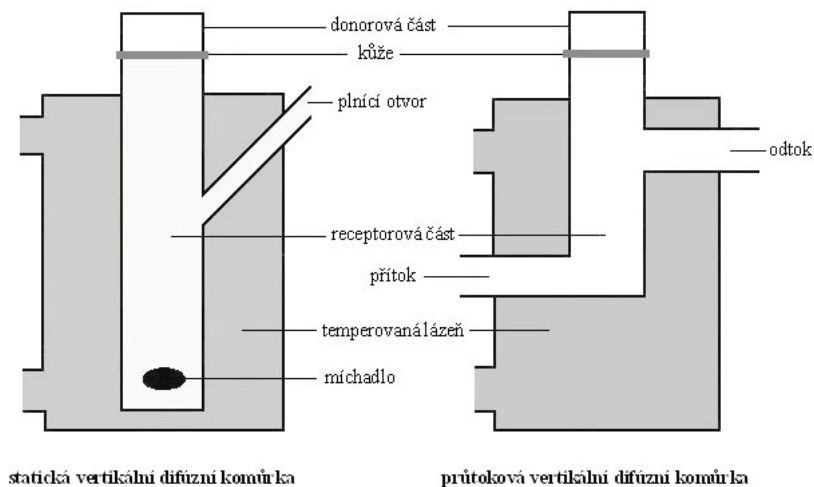
Disolučními testy lze stanovit uvolňování léčivé látky z lékové formy v předepsané kapalině (disoluční médium, disoluční roztok) a v předepsaném čase. Na základě jejich výsledků lze odhadnout biologickou dostupnost léčivé látky *in vivo* a farmakokinetiku lékové formy, zejména při vývoji nových léčivých přípravků.⁴³ Lékopis definuje zkoušku disoluce pevných lékových forem, transdermálních přípravků, lipofilních tuhých lékových forem a léčivých žvýkacích gum. Dále specifikuje přístroje, složení, objem a teplotu disolučního

média, rychlost otáček, popř. průtokovou rychlost média, dobu, metodu a množství zkoušeného roztoku pro vzorkování, metodu analýzy a v neposlední řadě kritéria přijatelnosti.⁴⁴ Uvolňování léčiva z tenkých filmů může probíhat několika způsoby, mezi něž řadíme difúzi přes matrici, desorpci léčiva vázaného na povrch, erozi matrice, kombinovaný proces eroze a difúze, difúzi přes polymerní stěnu.⁴⁵

1.4.1 Permeační testy

Testování přechodu léčiva přes membrány je důležité k hodnocení permeačních charakteristik léčivého přípravku. Obecně lze využít metody *in vivo* a *in vitro*, popř. modelování absorpce *in silico*.⁴⁶ Výhoda experimentů *in vitro* oproti testování *in vivo* spočívá ve snadnějším provedení, úspoře času a nákladů, v lepší reprodukovatelnosti výsledků, snadnější kontrole faktorů prostředí (teplota) a v neposlední řadě použití kůže jak lidské, tak i jiných druhů živočichů.⁴⁷ Ke stanovení permeace se používá metoda difúzních cel nebo paralelní test permeability umělých membrán (PAMPA).

Difúzní cely jsou základním laboratorním zařízením pro testování permeace *in vitro*. I přesto, že během testování lze akceptovat oba směry penetrace, jak horizontální, tak vertikální, v praxi se více uplatňuje vertikální směr. Existují dva základní typy difúzních cel: statická vertikální difúzní cela a průtoková difúzní cela (Obr. 6). Statickou vertikální difúzní komůrku označujeme jako Franzovu difúzní celu, v níž receptorová kapalina musí být neustále míchána, přičemž odebírání vzorků pro analýzu se provádí manuálně. Popis a proces fungování Franzovy cely je popsán v kapitole 1.3.6. U průtokové vertikální difúzní cely, označované jako Bronaughova cela, dochází k odstranění receptorové kapaliny kontinuálně pomocí peristaltické pumpy. Proto je tento typ zařízení pro studium metabolismu látek doporučován jako vhodnější. I přesto, že konstrukce obou cel je rozdílná, nebyly ve srovnávacích studiích nalezeny rozdíly ve výsledcích v měření propustnosti kůže.⁴⁶



Obr. 6: Porovnání statické a vertikální difúzní komůrky⁴⁶

Paralelní test propustnosti umělých membrán (PAMPA) je proces *in vitro* zaměřující se na stanovení pasivních membránových permeabilit léčivých přípravků. Tento systém byl zpočátku vyvinut a optimalizován, aby napodobil membránu gastrointestinálního traktu při výzkumu orální absorpce nových léčiv. PAMPA se skládá z dvoujamkové destičky, která vytváří tzv. sendvičovou strukturu. Donorová destička s jamkami obsahuje porézní membránu, která je potažena lipidovým roztokem vytvářející dvojvrstvou, aby se napodobila biologická membrána. Změnou lipidového složení lze napodobovat různé membrány a díky tomu můžeme predikovat permeabilitu kůže, sítnice a hematoencefalické bariéry. Membrána je ponořena v jamkách akceptorové destičky. Donorové jamky obsahují léčivo ve vodném pufovacím roztoku (pH 3-10), kdežto akceptorové jamky obsahují pouze roztok pufru (pH 7,4). Léky pronikající membránou tak budou pasivně difundovat do přijímacích jamek.⁴⁸ Vzorky pro analýzu jsou odebírané v předem stanovených časových intervalech z roztoku akceptoru. PAMPA systém by mohl sloužit jako nástroj pro rychlé hodnocení permeace během vývojového procesu nových léčivých přípravků.⁴⁹



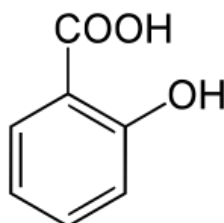
Obr. 7: PAMPA systém⁶³

1.5 Složení formulovaných FFS

1.5.1 Kyselina salicylová

Kyselina salicylová se vykytuje ve formě bílého krystalického prášku nebo bílých či bezbarvých jehlicovitých krystalů. Kyselina se původně získávala z kůry vrby bílé (*Salix alba*), z jejíhož latinského názvu je odvozem. Má mírně nasládlou chuť a je bez zápachu. Rozpustnost vykazuje v 96 % lihu, etheru, mírně rozpustná v dichlormethanu a těžce rozpustná ve vodě.⁴⁴

V nízkých koncentracích pod 10 % vykazuje keratoplastický efekt, tzn. že povzbuzuje epitel k růstu. Naopak při vyšších koncentracích se projevuje keratolytickým efektem, který způsobuje změkčení keratinu a pomáhá tak odstranit vrstvy suché, šupinaté pokožky. Odstranění svrchní vrstvy pokožky je žádoucí efekt, neboť dochází k účinnějšímu průniku látek k pokožce, proto je velmi často v kožních přípravcích kyselina salicylová obsažena samostatně nebo v kombinaci s jinými účinnými látkami. Svě uplatnění nachází jako dermatologikum při léčbě hyperkeratózy, akné, bradavic psoriázy, ichtyózy a seboroické či chronické atopické dermatitidě. Neopomenutelné použití kyseliny salicylové je ve výrobě kyseliny acetylsalicylové.⁵⁰

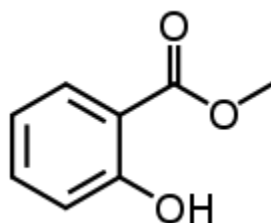


Obr. 8 Vzorec kyseliny salicylové⁵⁰

1.5.2 Methyl-salicylát

Methyl-salicylát je charakterizován jako bezbarvá až světle žlutá viskózní kapalina se sladkou, ovocnou vůní po libavce poléhavé (*Gaultheria procumbens*), ze které byl poprvé izolován. V přírodě je produkován mnoha druhy rostlin, ze kterých byl získáván destilací, dnes už se vyrábí především synteticky. Rozpustnost vykazuje v alkoholu, etheru, chloroformu, avšak ve vodě je velmi těžce rozpustný.^{44,51}

Ve vyšších koncentracích se používá jako rubefacient a topické analgetikum při akutních bolestech spojené s revmatickými stavy, lumbagem či ischiem. S koncentrací nižší než 0,04 % se užívá do ústních vod jako antiseptikum.⁵²



Obr. 9 Vzorec methyl-salicylátu⁵¹

1.5.3 PLGA

V předložené práci byly testovány kopolymer kyseliny D,L-mléčné (PLA) a kyseliny glykolové (PGA), který označujeme jako PLGA (poly(laktidy-co-glykolidy)) a polymer PLGA větvený na kyselině polyakrylové.⁵³ PLGA je lineární polyester s různou molekulovou hmotností. Je to biologicky odbouratelný a vysoce biokompatibilní polymer a schválený FDA a EMA. Její známé nevyhovující mechanické vlastnosti lze modifikacemi molekuly zlepšit. V dnešní době se užívají nejen v chirurgii, ortopedii a tkáňovém inženýrství, ale také nachází uplatnění jako systémy pro podání léků s řízeným a cílovým uvolňováním inkorporovaného léčiva ve formě pevné disperze, FFS, mikročástice a nanočástice.^{15,54,55}

Syntézu polymerů lze provést přímou katalytickou polykondenzací za sníženého tlaku, azeotropickou polykondenzací, polymerací v pevném stavu nebo

polymerací za otevření kruhu.⁵³ Poměrné zastoupení monomerů v kopolymeru mohou být různé, např. 85:15, 75:25, 65:35, 50:50. Při vyšším obsahu PGA zpravidla dochází k rychlejší degradaci, která souvisí s vyšší rozpustností kopolymeru. Výjimkou je poměr 50:50 PLA/PGA, který vykazuje nejrychlejší degradaci.⁵⁴ Obsah PGA má také vliv na strukturu. Pokud je její obsah mezi 25 - 70%, znamená to, že kopolymer je amorfni, což je výhodnější pro získání mikročástic s prodlouženým uvolňováním.⁵⁶ Pro zajištění kontinuální degradace polymerního nosiče a tím zajištění výhodnější liberace léčiva, se PLGA doplňuje větvičím monomerem různého typu a koncentrace. Právě typ a koncentrace větvičího monomeru určuje stupeň větvení a maximální dosažitelnou molární hmotnost polymeru. Jako větvičí monomer lze použít alkoholy, cukry, jako například manitol, polyvinylalkohol, glukosa, penta-, dipenta- nebo tripentaerythriol.⁵⁵

Větvené polymery na rozdíl od lineárních mají nižší molekulovou hmotnost a větší povrch, a proto dochází k rychlejší degradaci nosiče (řádově hodiny až několik dní). Dobu degradace ovlivňuje i stupeň krystalinity a fyzikálně chemické vlastnosti prostředí. Degradace probíhá procesem hydrolýzy nestabilních esterových vazeb v řetězci polymeru. Dochází tak ke vzniku kyseliny L-mléčné a glykolové. Kyselina mléčná vstoupí do citrátového cyklu, kde se metabolizuje a z těla se eliminuje ve formě CO₂ a vody. Kyselina glykolová se z velké části exkretuje v nezměněné formě ledvinami, pouze v malé míře vstupuje do citrátového cyklu, kde je metabolizována a eliminována.^{53,57}

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité přístroje

Analytické digitální váhy KERN ABS, max. 220 g, d= 0,1 mg

Digitální stolní pH metr, Hanna Instruments - HI 221

Digitální váhy KERN PLE, max. 420 g, d = 0,001g

Digitální váhy Sartorius, max. 420 g, d = 0,001 g

Horkovzdušná sušárna Memmert

Lázně s integrovanou třepací platformou SW 22 (Julabo)

Magnetická míchačka IKA - WERKE

2.2 Použité suroviny

Aceton p.a. (Lach:ner,s.r.o.), CAS: 67-64-1

Acetonitril

Čištěná voda (Farmaceutická fakulta UK HK)

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (Lachema a.s.), CAS: 7778-77-0

Hydroxid sodný čistý (Penta Chrudim), CAS: 1310-73-2

Kyselina salicylová (Fargon a.s.), CAS: 69-72-7

Methyl-salicylát (Sigma – Aldrich), CAS: 119-36-8

PLGA/A poly(laktid-co-glykolid) 50:50 větvený na kyselině polyakrylové Mw 2000 g·mol⁻¹ (Farmaceutická fakulta UK HK)

PLGA poly(laktid-co-glykolid) 50:50 lineární (Farmaceutická fakulta UK HK)

2.3 Test rozpustnosti kyseliny salicylové a methyl-salicylátu

Byla testována rozpustnost kyseliny salicylové, methyl-salicylátu a jejich směsi v pufru pH 5,5 při teplotě 32 °C. Do třech skleněných zkumavek bylo naváženo 25,0 mg SA nebo 25,0 mg MS, resp. směs 25,0 mg SA a 25,0 mg MS. Byla změřena hustota fosforečnanového pufru pH 5,5. Do vialek bylo přidáno 5,0 ml pufru a pomocí ultrazvuku byly látky rozpouštěny po dobu 24 hod. Byla stanovena koncentrace nasyceného roztoku metodou HPLC. Test rozpustnosti byl proveden duplicitně.

2.4 Příprava FFS

Byly připraveny kapalně soustavy pro tvorbu filmů *in situ*. Lineární PLGA, resp. větvený polymer PLGA/A byl rozdrobňen v porcelánové třence na jemný prášek. Do skleněné vialky bylo odváženo předepsané množství polymeru a na magnetické míchačce při laboratorní teplotě rozpuštěno v acetonu. Následně byla přidána rozdrobňená kyselina salicylová nebo/a methyl-salicylát. Soustava byla ponechána na elektromagnetické míchačce do úplného rozpuštění. Množství jednotlivých složek v kapalných formulacích je uvedeno v Tab. 4 a 5.

Z každé kapalně formulace bylo do čtyř skleněných vialek odváženo 200,0 mg. Otevřené vialky byly umístěny do termostatu o teplotě 37 °C, aby došlo k odpaření acetonu. Byla zaznamenána finální hmotnost filmu, potřebná pro stanovení obsahu SA a MS. Jeden film od každé formulace byl rozpuštěn v 5 ml acetonitrilu a metodou HPLC byl stanoven obsah SA a/nebo MS. Zbylé tři filmy byly použity pro disoluční testy.

Tab. 4: Složení FFS na bázi lineárního PLGA

Formulace	PLGA	Kyselina salicylová	Methyl-salicylát	Aceton
FFS 1	2250 mg	450 mg	-	3000 mg
FFS 2	2700 mg	-	300 mg	3000 mg
FFS 3	2550 mg	225 mg	225 mg	3000 mg

Tab. 5: Složení FFS na bázi větveného PLGA/A

Formulace	PLGA/A	Kyselina salicylová	Methyl-salicylát	Aceton
FFS 4	2400 mg	225 mg	375 mg	3000 mg
FFS 5	2325 mg	375 mg	300 mg	3000 mg
FFS 6	2175 mg	225 mg	600 mg	3000 mg

2.5 Disoluční testy

Pro disoluční testy byl připraven fosforečnanový tlumivý roztok pH 5,5 smísením 250,0 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného 0,2 mol/l a 18 ml hydroxidu sodného 0,2 mol/l a následným zředěním čištěnou vodou na 1000,0 ml.⁴⁴ Hodnota pH byla upravena pomocí 0,2 mol/l roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a ověřena na digitálním pH metru. Roztok byl uchováván ve skleněné nádobě se šroubovacím uzávěrem v chladničce (2-8 °C).

Filmy ve vialkách (Tab. 4 a 5) byly přelity 15,0 ml pufru pH 5,5. Následně byly vialky vloženy do lázně s integrovanou třepací platformou, která byla vytemperována na 37 °C. Frekvence třepání byla 50 kmitů/min a míchání probíhalo horizontálním pohybem po dráze 22 mm. Ve stanovených časových intervalech (1-2-3-4-5-8-11-18 dnů) byly vialky z termostatu vyjmuty, slita disoluční kapalina, vzorky znovu přelity 15,0 ml pufru předehřátého na 37 °C a vloženy zpět do vodní lázně. V odebraných vzorcích bylo stanoveno množství uvolněného léčiva a plastifikátoru metodou HPLC ve spolupráci s Katedrou farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy. Kyselina salicylová a methyl-salicylát byly stanoveny metodou vnějšího standardu. Porovnávací roztoky byly připraveny rozpuštěním navážky standardu v acetonitrilu a před měřením byly naředěny pufrem použitým pro disoluce v poměru 1:1. Vzorky z disoluci byly před měřením naředěny acetonitrem (1:1).

3 VÝSLEDKY

3.1 Rozpustnost kyseliny salicylové a methyl-salicylátu

Tab. 6: Rozpustnost kyseliny salicylové (SA) a methyl-salicylátu (MS)

Složení	SA mg/ml	MS mg/ml
SA v PBS 5,5	2,91 ± 0,08	-
MS v PBS 5,5	-	0,90 ± 0,02
SA, MS v PBS 5,5	2,37 ± 0,06	3,56 ± 0,11

3.2 Formulace tenkých filmů odpařením rozpouštědla

Tab. 7: Hmotnost PLGA filmů po odpaření rozpouštědla a obsah SA a MS

FFS	Vialka (g)	FFS 500 μ l (g)	Σ (g)	po odpaření acetonu (g)	Film (mg)	SA mg	MS mg
1A	15,735	0,493	16,228	16,030	198	29,7	-
1B	15,020	0,498	15,518	15,313	205	30,7	-
1C	15,553	0,499	16,052	15,851	201	30,1	-
2A	14,725	0,489	15,214	15,010	204		20,4
2B	14,925	0,490	15,415	15,212	203		20,3
2C	15,017	0,486	15,503	15,296	207		20,7
3A	15,164	0,486	15,650	15,448	202	15,2	15,2
3B	15,346	0,492	15,838	15,641	197	14,8	14,8
3C	15,086	0,496	15,582	15,379	203	15,2	15,2

Tab. 8: Hmotnost PLGA/A filmů po odpaření rozpouštědla a obsah SA a MS

FFS	Vialka (g)	FFS 500 μ l (g)	Σ (g)	po odpaření acetonu (g)	Film (mg)	SA mg	MS mg
4A	13,752	0,487	14,239	14,038	201	15,1	25,1
4B	13,436	0,489	13,925	13,723	202	15,2	25,2
4C	14,585	0,492	15,077	14,872	205	15,4	25,6
5A	14,937	0,496	15,433	15,229	204	15,3	39,8
5B	13,671	0,492	14,163	13,960	203	15,2	39,5
5C	14,716	0,489	15,205	14,995	210	15,7	40,9
6A	13,662	0,493	14,155	13,949	206	25,8	20,6
6B	13,768	0,491	14,259	14,059	200	25,0	20,0
6C	13,636	0,495	14,131	13,929	202	25,3	20,2

3.3 Množství kyseliny salicylové a methyl-salicylátu uvolněné z tenkých filmů

Tab. 9: Množství kyseliny salicylové uvolněné z FFS 1

čas dny	SA ug/ml	SA mg/15ml	průměr mg	SD	kum mg
1	626	9,39	9,93	1,95	9,93
	553	8,30			
	806	12,09			
2	200	3,01	2,34	0,58	12,27
	140	2,09			
	128	1,92			
3	224	3,37	5,66	2,45	17,92
	549	8,24			
	357	5,36			
4	280	4,19	4,41	0,18	22,33
	302	4,53			
	300	4,50			
5	263	3,95	2,55	1,22	24,88
	117	1,76			
	129	1,94			
8	305	4,58	3,98	0,53	28,86
	253	3,79			
	238	3,58			
11	76	1,15	0,88	0,23	29,73
	49	0,74			
	50	0,75			
15	5	0,08	0,07	0,02	29,80
	3	0,05			
	5	0,08			

Tab. 10: Množství methyl-salicylátu uvolněné z FFS 2

čas dny	MS ug/ml	MS mg/15ml	průměr mg	SD	kum mg
1	196	2,95	2,63	0,31	2,63
	173	2,60			
	155	2,33			
2	123	1,85	2,12	0,40	4,75
	129	1,93			
	172	2,58			
3	131	1,97	2,00	0,04	6,75
	132	1,98			
	137	2,05			
4	128	1,92	2,06	0,15	8,81
	147	2,21			
	137	2,06			
5	146	2,19	2,09	0,13	10,90
	142	2,13			
	130	1,95			
8	271	4,06	3,70	0,33	14,60
	241	3,62			
	228	3,42			
11	267	4,01	3,77	0,23	18,37
	249	3,74			
	237	3,55			
15	139	2,09	2,33	0,21	20,69
	162	2,43			
	164	2,46			

Tab. 11: Množství kyseliny salicylové uvolněné z FFS 3

čas dny	SA ug/ml	SA mg/15ml	průměr mg	SD	kum mg
1	203	3,04	3,23	0,30	3,23
	204	3,07			
	238	3,57			
2	82	1,23	1,37	0,36	4,59
	73	1,10			
	118	1,77			
3	203	3,04	2,85	0,77	7,45
	133	2,00			
	234	3,52			
4	302	4,53	3,71	0,74	11,15
	206	3,09			
	233	3,50			
5	60	0,89	1,05	0,23	12,21
	63	0,95			
	88	1,31			
8	182	2,74	2,29	0,39	14,49
	135	2,03			
	140	2,10			
11	34	0,51	0,46	0,04	14,95
	29	0,43			
	30	0,44			
15	4	0,06	0,06	0,00	15,01
	4	0,06			
	4	0,06			

Tab. 12: Množství methyl-salicylátu uvolněné z FFS 3

čas dny	MS ug/ml	MS mg/15ml	průměr mg	SD	kum mg
1	122	1,83	2,10	0,30	2,10
	162	2,43			
	136	2,04			
2	76	1,14	1,33	0,23	3,44
	85	1,28			
	106	1,58			
3	87	1,30	1,63	0,34	5,07
	108	1,62			
	131	1,97			
4	143	2,15	1,89	0,24	6,96
	124	1,86			
	111	1,67			
5	89	1,33	1,32	0,08	8,28
	82	1,24			
	93	1,39			
8	204	3,05	2,83	0,21	11,11
	176	2,64			
	187	2,81			
11	165	2,47	2,42	0,07	13,53
	156	2,34			
	163	2,44			
15	122	1,83	1,76	0,09	15,29
	119	1,79			
	111	1,67			

Tab. 13: Množství kyseliny salicylové uvolněné z FFS 4

čas dny	SA ug/ml	SA mg/15ml	SA mg	SD	kum mg
1	514	7,710	7,955	0,213	7,955
	537	8,055			
	540	8,100			
2	206	3,090	3,315	0,251	11,270
	239	3,585			
	218	3,270			
3	127	1,905	1,765	0,310	13,035
	132	1,980			
	94	1,410			
4	65	0,975	1,185	0,256	14,220
	74	1,110			
	98	1,470			
5	36	0,540	0,550	0,210	14,770
	23	0,345			
	51	0,765			
8	26	0,390	0,385	0,038	15,155
	28	0,420			
	23	0,345			
11	3	0,042	0,043	0,019	15,198
	2	0,025			
	4	0,063			
15	0	0,000	0,007	0,006	15,205
	1	0,010			
	1	0,010			

Tab. 14: Množství methyl-salicylátu uvolněné z FFS 4

čas dny	MS ug/ml	MS mg/15ml	MS mg	SD	kum mg
1	329	4,935	4,475	0,399	4,475
	282	4,230			
	284	4,260			
2	258	3,870	3,580	0,285	8,055
	238	3,570			
	220	3,300			
3	257	3,855	3,450	0,613	11,505
	250	3,750			
	183	2,745			
4	238	3,570	3,595	0,085	15,100
	246	3,690			
	235	3,525			
5	191	2,865	3,085	0,191	18,185
	213	3,195			
	213	3,195			
8	219	3,285	3,315	0,241	21,500
	206	3,090			
	238	3,570			
11	138	2,072	2,365	0,404	23,865
	147	2,198			
	188	2,826			
15	47	0,701	0,677	0,069	24,542
	40	0,599			
	49	0,731			

Tab. 15: Množství kyseliny salicylové uvolněné z FFS 5

čas dny	SA ug/ml	SA mg/15ml	SA mg	SD	kum mg
1	585	8,775	8,485	0,623	8,485
	594	8,910			
	518	7,770			
2	291	4,365	3,795	0,549	12,280
	250	3,750			
	218	3,270			
3	76	1,140	1,180	0,083	13,460
	85	1,275			
	75	1,125			
4	52	0,780	0,785	0,009	14,245
	52	0,780			
	53	0,795			
5	23	0,345	0,355	0,046	14,600
	27	0,405			
	21	0,315			
8	7	0,105	0,115	0,017	14,715
	7	0,105			
	9	0,135			
11	3	0,045	0,047	0,008	14,762
	3	0,040			
	4	0,056			
15	0	0,005	0,013	0,018	14,775
	0	0,000			
	2	0,033			

Tab. 16: Množství methyl-salicylátu uvolněné z FFS 5

čas dny	SA ug/ml	SA mg/15ml	SA mg	SD	kum mg
1	492	7,380	6,925	0,419	6,925
	437	6,555			
	456	6,840			
2	438	6,570	5,765	1,063	12,690
	411	6,165			
	304	4,560			
3	448	6,720	5,720	1,037	18,410
	386	5,790			
	310	4,650			
4	391	5,865	6,020	0,175	24,430
	399	5,985			
	414	6,210			
5	353	5,295	5,675	0,607	30,105
	425	6,375			
	357	5,355			
8	418	6,270	6,055	0,286	36,160
	411	6,165			
	382	5,730			
11	215	3,228	3,206	0,100	39,366
	206	3,096			
	219	3,292			
15	64	0,962	0,917	0,044	40,283
	61	0,915			
	58	0,875			

Tab. 17: Množství kyseliny salicylové uvolněné z FFS 6

čas dny	SA ug/ml	SA mg/15ml	SA mg	SD	kum mg
1	605	9,08	9,715	0,623	9,715
	688	10,32			
	650	9,75			
2	446	6,69	6,495	0,177	16,210
	430	6,45			
	423	6,35			
3	334	5,01	3,855	1,038	20,065
	200	3,00			
	237	3,56			
4	167	2,51	2,710	0,381	22,775
	165	2,48			
	210	3,15			
5	20	0,30	1,240	0,823	24,015
	106	1,59			
	122	1,83			
8	67	1,01	1,200	0,188	25,215
	81	1,22			
	92	1,38			
11	20	0,30	0,277	0,051	25,492
	15	0,22			
	21	0,31			
15	1	0,02	0,018	0,011	25,510
	1	0,01			
	2	0,03			

Tab. 18: Množství methyl-salicylátu uvolněné z FFS 6

čas dny	SAL ug/ml	SAL mg/15ml	SA mg	SD	kum mg
1	168	2,520	2,865	0,310	2,865
	197	2,955			
	208	3,120			
2	199	2,985	2,970	0,173	5,835
	209	3,135			
	186	2,790			
3	200	3,000	2,715	0,293	8,550
	182	2,730			
	161	2,415			
4	161	2,415	2,425	0,075	10,975
	157	2,355			
	167	2,505			
5	141	2,115	2,360	0,256	13,335
	156	2,340			
	175	2,625			
8	159	2,385	3,040	0,568	16,375
	223	3,345			
	226	3,390			
11	140	2,093	2,364	0,275	18,739
	157	2,355			
	176	2,643			
15	99	1,492	1,284	0,218	20,023
	70	1,057			
	87	1,303			

4 DISKUZE

Polymerní systémy založené na plastifikovaných PLGA polymerech s inkorporovanou kyselinou salicylovou byly studovány v několika diplomových a rigorózních pracích, dříve obhájených na katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK. První prací na toto téma byla diplomová práce Rychterové³, která se zabývala přípravou a testováním tuhých disperzí tvořených PLGA větveným na tripentaerythritolu s inkorporovanou kyselinou salicylovou. Tuhé disperze byly připraveny metodou tavení nebo metodou rozpouštění v methylesteru kyseliny mravenčí. Při metodě tavení byl polymer plastifikován methyl-salicylátem v koncentraci 10 %, 20 %, 30 % nebo 40 % a bylo inkorporováno 5 % kyseliny salicylové. Při metodě rozpouštění nebyl polymer plastifikován, a kromě 5 % kyseliny salicylové byly použity i koncentrace vyšší (10 %, 15 % a 20 %). Termická analýza metodou DSC prokázala, že kyselina salicylová je v amorfním PLGA molekulárně dispergována. Rovněž snižuje teplotu skelného přechodu a působí tedy v polymerním systému jako plastifikátor. Při nízké molární hmotnosti M_w a teplotě skelného přechodu T_g polymeru však může dojít k rekrystalizaci léčiva.⁵⁸ Tyto závěry realizovaného experimentu byly zohledněny při volbě PLGA, koncentrace kyseliny salicylové a koncentrace methyl-salicylátu pro formulaci a testování FFS v předložené diplomové práci. Byly použity dva nekomerční deriváty PLGA, lineární PLGA 50:50 s molární hmotností M_w 7 500 g·mol⁻¹ a PLGA větvený na kyselině polyakrylové (PLGA/A) s M_w 14 400 g·mol⁻¹.¹⁵ Charakteristiky polymerů uvádí Tab. 19. Lze předpokládat různý průběh uvolňování léčiva inkorporovaného do PLGA v závislosti molární hmotnosti, větvení a hydrofobicitě polymeru, dané koncovými hydroxyly u PLGA, resp koncovými karboxyly u PLGA/A.

Tab. 19: Číselné (M_n) a hmotnostní (M_w) průměry molární hmotnosti, hmotnostní průměr vnitřní viskozity $[\eta]_w$, větvící poměr $g'(M_w)$ a teplota skelného přechodu T_g ¹⁵

Polymer	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	$[\eta]_w$ (mL/g)	$g'(M_w)$	T_g (°C)
PLGA 50:50	5 400	7 500	12,2	1,0	32,8
PLGA/A	8 600	14 400	8,9	0,54	38,4

FFS jsou určeny k aplikaci na kůži nebo sliznice. Lze předpokládat, že v případě aplikace na sliznice, které jsou pokryty mukózní vrstvou obsahující 90 až 95 % vody,⁵⁹ bude hydrolytická degradace PLGA rychlejší než při aplikaci FFS na kůži. Tuto skutečnost je nutno testovat *ex vivo* nebo *in vivo*. *In vitro* disoluční testy realizované v předložené práci byly modifikovány s ohledem na podmínky v místě aplikace FFS. Film vytvořený na dně vialky byl ve styku s disolučním médiem jen jednou stranou a byla zajištěna konstantní plocha styku média s filmem. Objem disolučního média a intenzita míchání byly sníženy při zachování sink podmínek. Právě nedodržení sink podmínek a dosažení nasycené koncentrace léčiva v disolučním médiu mohly být v dříve realizovaných experimentech ³ důvodem stagnace uvolňování ve vodě špatně rozpustného léčiva z tenkého filmu.

V literatuře je udána rozpustnost kyseliny salicylové ve vodě při 25 °C v množství 2,240 mg/ml.⁶⁰ Rozpustnost methyl-salicylátu se uvádí menší než 1 mg/ml, např. 0.639 mg/ml (21 °C) a 0.697 mg/ml (30 °C).⁶¹ V předložené práci byla stanovena koncentrace nasyceného roztoku kyseliny salicylové, methyl-salicylátu a jejich směsi v PBS pH 5,5 při 37 °C. Hodnoty jsou prezentovány v Tab. 6. Zajímavé je zjištění, že rozpustnost methyl-salicylátu byla významně vyšší ve směsi s kyselinou salicylovou. Zatímco koncentrace nasyceného roztoku samotného MS v pufru byla pouze 0,90 mg/ml, v roztoku SA a MS byla stanovena koncentrace MS 3,56 mg/ml.

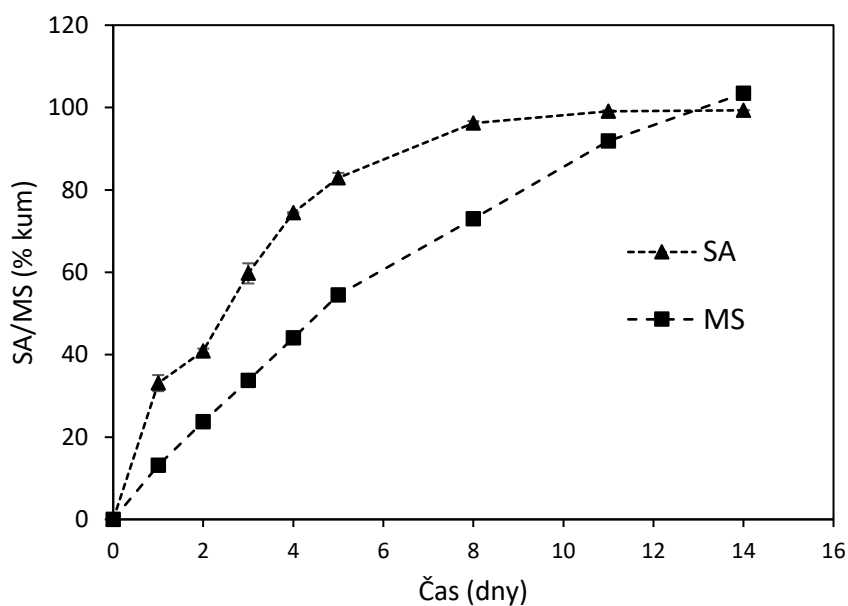
V místě aplikace *in situ* filmu dochází vlivem vlhkosti jednak k hydrolytické degradaci PLGA polymeru a zároveň se předpokládá liberace inkorporované

kyseliny salicylové. Rovněž nastává hydrolyza methyl-salicylátu, který tak kromě funkce plastifikátoru má funkci proléčiva.

4.1 Liberace SA a MS z lineárního PLGA

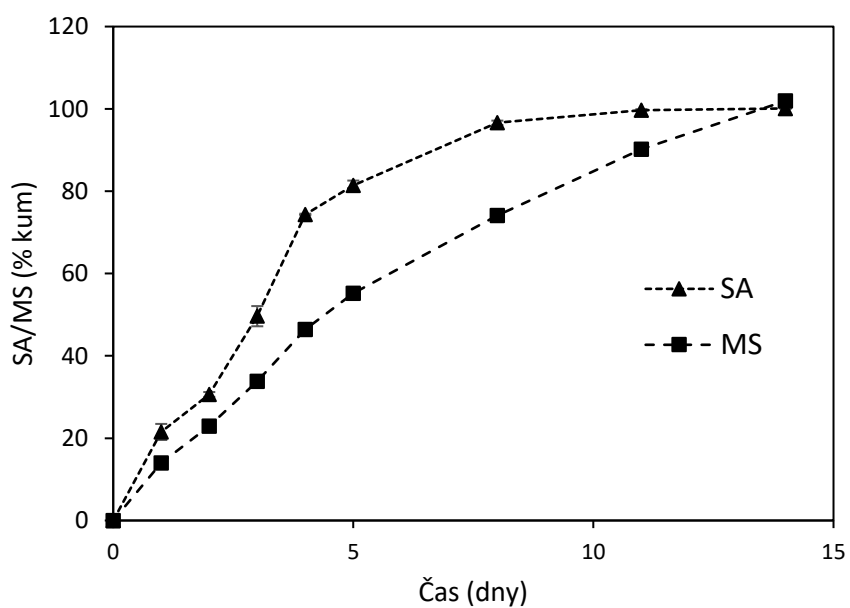
Byla testována disoluce kyseliny salicylové a methyl-salicylátu z PLGA filmů. Filmy obsahovaly buď jen SA (FF1) nebo MS (FFS2), nebo obě sloučeny (FF3) viz. Tab. 4. Množství SA a MS bylo voleno zejména v souvislosti s formulacemi testovanými v předešlých experimentech.¹⁻³

Na Obr. 10 je průběh uvolňování SA a MS z filmů tvořených lineárním PLGA s obsahem buď SA, anebo MS. Je patrné, že kyselina salicylová se z PLGA uvolňovala kinetikou 1. řádu. Za 24 hodin se uvolnilo asi 33 % a celková doba liberace byla 8 dní. MS se uvolňoval pomaleji. Za 24 hodin se uvolnilo jen 13 %, celková doba liberace byla 14 dnů a kinetika uvolňování se blíží 0. řádu.

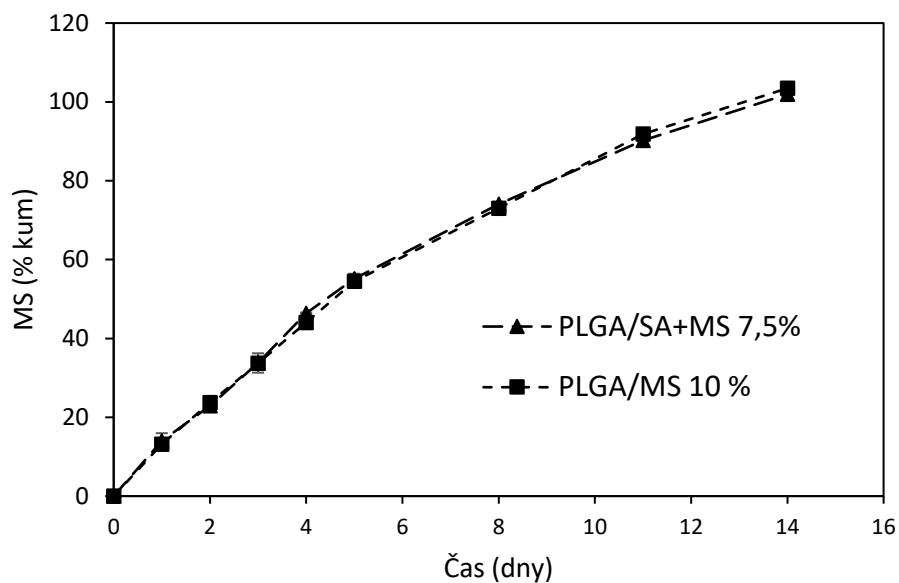


Obr. 10: Průběh uvolňování kyseliny salicylové (SA) a methyl-salicylátu (MS) z lineárního PLGA

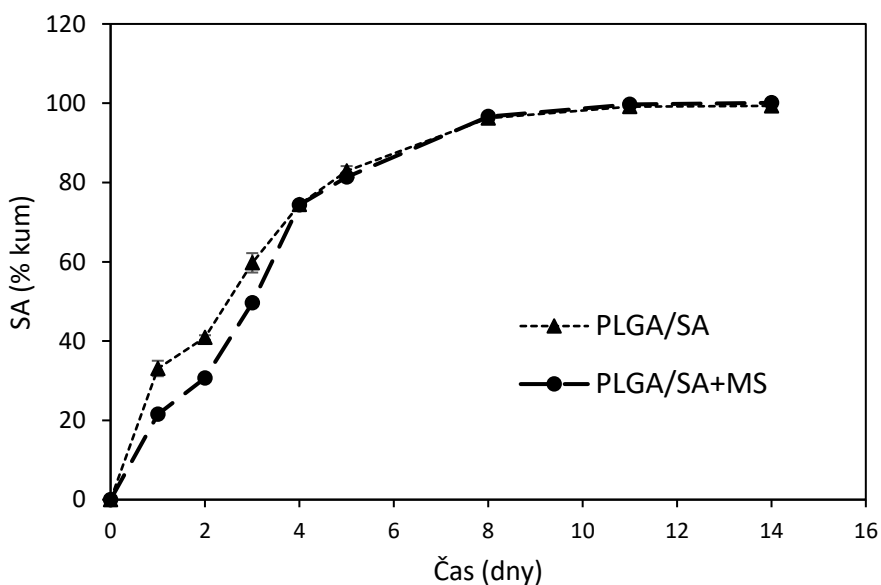
Byla testována disoluce SA a MS z PLGA filmu, který obsahoval obě tyto sloučeniny (Obr. 11). Disoluční profil MS byl stejný jako u filmu obsahujícího pouze MS, a to i přesto, že koncentrace MS byla různá (7,5 % resp. 10 %) (Obr. 12). Vlivem obsahu MS ve filmu došlo ke zpomalení liberace kyseliny salicylové v časovém intervalu 0 až 3 dny (Obr. 13).



Obr. 11: Průběh uvolňování kyseliny salicylové (SA) a methyl-salicylátu (MS) z PLGA filmu



Obr. 12: Porovnání průběhu uvolňování methyl-salicylátu (MA) z filmu obsahujícího jenom MS (PLGA/MS) a z filmu obsahujícího SA i MS (PLGA/SA+MS)

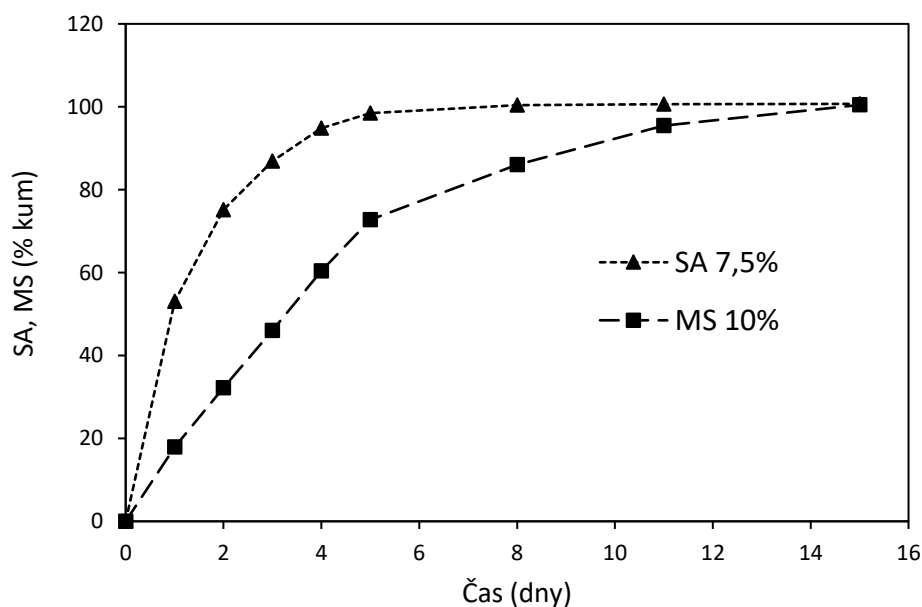


Obr. 13: Porovnání průběhu uvolňování kyseliny salicylové (SA) z filmu obsahujícího jenom SA (PLGA/SA) a z filmu obsahujícího SA i MS (PLGA/SA+MS)

4.2 Liberace SA a MS z větveného PLGA/A

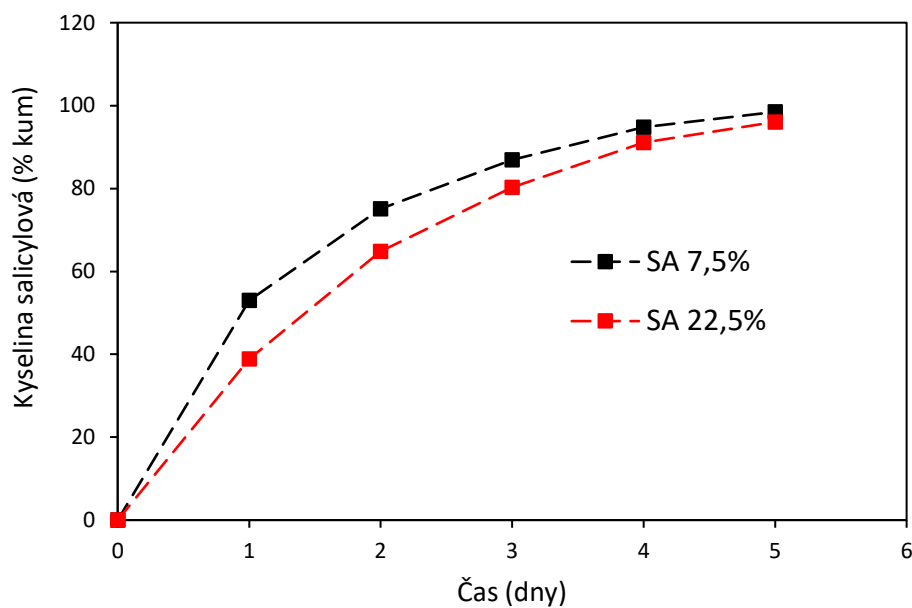
Byly formulovány FFS tvořené PLGA větveným na kyselině polyakrylové (M_w 2200 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), které obsahovaly vždy SA i MS (Tab. 5). Na základě výsledků termické analýzy metodou DSC v dříve realizovaných experimentech byla zvolena koncentrace SA ve filmu 7,5 % nebo 22,5 % a koncentrace MS 10 % nebo 20 %. Byl studován vliv kombinace SA a MS ve filmu a vliv různé koncentrace SA resp. MS na disoluční profily.

Průběh uvolňování kyseliny salicylové a methyl-salicylátu z PLGA/A filmu obsahujícího 7,5 % SA a 10 % MS je na Obr. 14. Kyselina salicylová se z filmu uvolnila za 5 dnů a je vidět vysoký 24hodinový burst 53 %. Methyl-salicylátu se za 5 dnů uvolnilo kinetikou 0. řádu přibližně 73 %, poté došlo ke zpomalení a celková doba liberace byla 15 dnů.



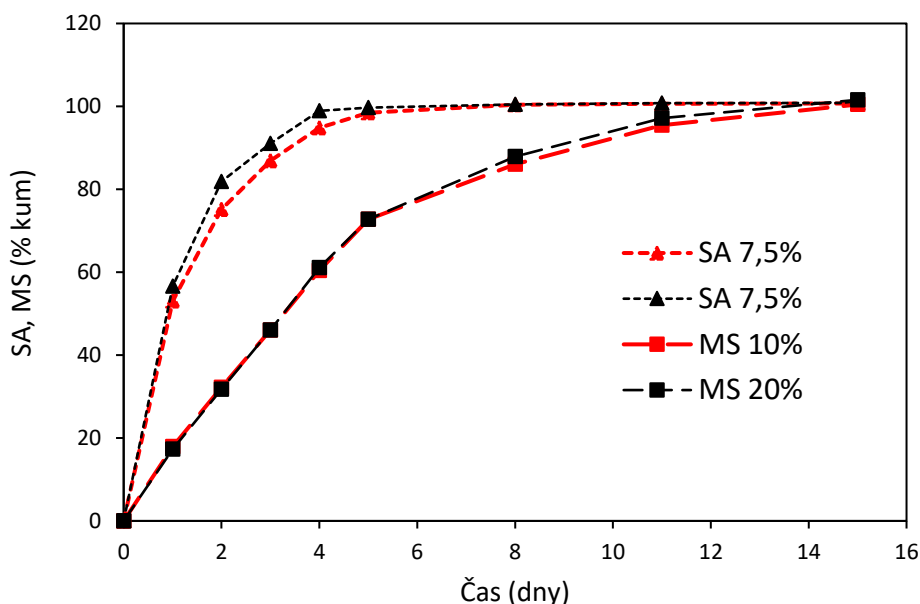
Obr. 14: Průběh uvolňování kyseliny salicylové (SA) a methyl-salicylátu (MS) z PLGA/A filmu

Byl formulován PLGA/A film s vyšším obsahem kyseliny salicylové (22,5 %) při stejné koncentraci methyl-salicylátu (10 %). Jak je vidět na Obr. 15, došlo ke zpomalení liberace kyseliny salicylové. Za 24 hodin se množství uvolněné SA snížilo z původních 53 % na 38 %. Průběh liberace MS byl nezměněn.



Obr. 15: Vliv množství kyseliny salicylové (SA) na její uvolňování z PLGA/A filmů se stejnou koncentrací methyl-salicylátu

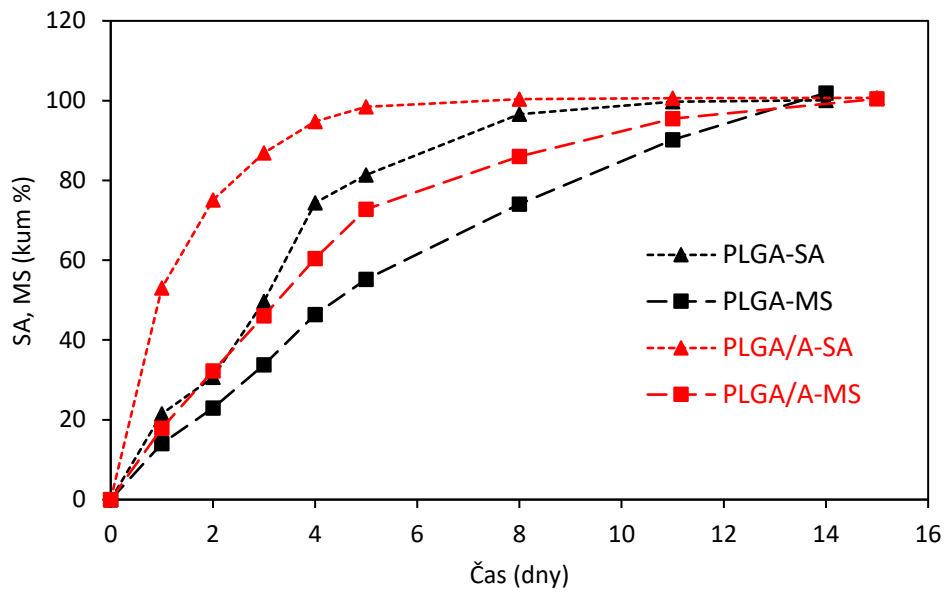
Byl formulován PLGA/A film s vyšším obsahem methyl-salicylátu (10 % zvýšeno na 20 %) při stejné koncentraci kyseliny salicylové (7,5 %). Vyšší koncentrace MS neovlivnila ani průběh liberace SA, ani průběh liberace MS (Obr. 16).



Obr. 16: Vliv koncentrace methyl-salicylátu (MS) na průběh liberace kyseliny salicylové (SA) z PLGA/A filmu

4.3 Vliv typu polymeru na disoluci SA a MS

Byla porovnána disoluce kyseliny salicylové a methyl-salicylátu z filmů tvořených lineárním polymerem PLGA a PLGA polymerem větveným na kyselině akrylové (Obr. 17). Rychlejší disoluce SA i MS byla zjištěna při použití větveného PLGA. Důvodem může být nižší hydrofobicita daná koncovými karboxylovými skupinami a nižší vnitřní viskozita a s tím spojená vyšší citlivost k plastifikaci, což je dáno větvenou strukturou polymeru. Tyto faktory mají významnější vliv na průběh liberace než molární hmotnost polymerů.



Obr. 17: Vliv typu polymeru na průběh uvolňování kyseliny salicylové (SA) a methyl-salicylátu (MS) z lineárního polymeru PLGA a větveného PLGA/A

5 ZÁVĚRY

Byly připraveny kapalně formulace tvořící *in situ* filmy odpařením rozpouštědla, založené na lineárním nebo větveném PLGA polymeru a obsahující kyselinu salicylovou a/nebo methyl-salicylát. Kyselina salicylová (SA) stále nachází své terapeutické uplatnění při topické aplikaci, popř. je modelem hydrofobního léčiva. Methyl-salicylát (MS) má v *in situ* filmu funkci multifunkčního plastifikátoru.

Z lineárního PLGA se SA uvolňovala kinetikou 1. řádu s burstem 33 % za 24 hodin a celkovou dobou liberace 8 dní. MS se uvolňoval 14 dnů kinetikou blízkou 0. řádu a burstem pouhých 13 %. Disoluční profil methyl-salicylátu nebyl ovlivněn ani koncentrací methyl-salicylátu ve filmu, ani obsahem kyseliny salicylové ve filmu. Disoluce kyseliny salicylové byla v časovém intervalu 0 až 3 dny zpomalena vlivem methyl-salicylátu.

Z PLGA polymeru větveného na kyselině polyakrylové se SA uvolňovala rychleji, za 24 hodin se uvolnilo již 53 % a celková doba liberace byla 5 dnů. Methyl-salicylátu se kinetikou 0. řádu uvolnilo za 5 dnů přibližně 73 % a celková doba liberace byla 15 dnů.

Zvýšením koncentrace SA ve filmu došlo ke zpomalení její liberace. Průběh liberace methyl-salicylátu změněn nebyl. Vyšší koncentrace methyl-salicylátu neovlivnila ani průběh liberace SA, ani průběh liberace MS.

Rychlejší disoluce kyseliny salicylové i methyl-salicylátu byla zjištěna při použití větveného PLGA. Důvodem může být nižší hydrofobicita a nižší vnitřní viskozita daná větvenou strukturou polymeru. Tyto faktory hrají důležitější roli než molární hmotnost polymerů.

6 LITERATURA

1. Věříš A. *Charakterization of PLGA-Based Film Forming Systems*. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta. Rigorózní práce; 2021.
2. Soukupová J. *Adhezivní Vlastnosti Tenkých Filmů Na Bázi Plastifikovaných Polyesterů*. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta. Diplomová práce; 2019.
3. Rychterová G. *Plastifikované Polymerní Soustavy s Kyselinou Salicylovou*. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta. Diplomová práce; 2016.
4. Pünnel LC, Lunter DJ. Film-forming systems for dermal drug delivery. *Pharmaceutics*. 2021;13(932). doi:10.3390/pharmaceutics13070932
5. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;12(6):487-497. doi:10.1016/j.ajps.2017.07.004
6. Bornare SS, Aher SS, Saudagar RB. A review: Film forming gel novel drug delivery system. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2018;10(2):25. doi:10.22159/ijcpr.2018v10i2.25886
7. de Oliveira FFD, de Menezes LR, Tavares MIB. Film-forming systems in topically administered pharmaceutical formulations. *Materials Sciences and Applications*. 2020;11(08):576-590. doi:10.4236/msa.2020.118038
8. Misra A, Raghuvanshi RS, Ganga S, Diwan M, Talwar GP, Singh O. Formulation of a transdermal system for biphasic delivery of testosterone. *Journal of Controlled Release*. 1996;39(1):1-7. doi:10.1016/0168-3659(95)00122-0
9. Tran TTD, Tran PHL. Controlled Release Film Forming Systems in Drug Delivery: The Potential for Efficient Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 2019;11(6):290. doi:10.3390/pharmaceutics11060290
10. Zurdo Schroeder I, Franke P, Schaefer UF, Lehr CM. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery.

- European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
2007;65(1):111-121. doi:10.1016/J.EJPB.2006.07.015
11. Felton LA. Mechanisms of polymeric film formation. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013;457(2):423-427.
doi:10.1016/J.IJPHARM.2012.12.027
 12. Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015;91:9-15. doi:10.1016/J.EJPB.2015.01.002
 13. Thomas BJ, Finnin BC. The transdermal revolution. *Drug Discovery Today*. 2004;9(16):697-703. doi:10.1016/S1359-6446(04)03180-0
 14. Bajaj H, Kumar T, Singh V. Film forming gels: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016;7(4):2085-2091. Accessed February 2, 2022. ISSN 0975-8585
 15. Šnejdrová E, Martiška J, Loskot J, et al. PLGA based film forming systems for superficial fungal infections treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;163:105855.
doi:10.1016/J.EJPS.2021.105855
 16. Monica LL, Jordi G, Francisco FC. In situ bioadhesive film-forming system for topical delivery of mometasone furoate: Characterization and biopharmaceutical properties. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;59:101852. doi:10.1016/J.JDDST.2020.101852
 17. Khasraghi AH, Thomas LM. Preparation and evaluation of lornoxicam film-forming gel. *Drug Invention Today* |. 2019;11(8):1906-1913.
<https://www.researchgate.net/publication/337286182>
 18. Zurdo Schroeder I, Franke P, Schaefer UF, Lehr CM. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
2007;65(1):111-121. doi:10.1016/J.EJPB.2006.07.015

19. van Bocxlaer K, McArthur KN, Harris A, et al. Film-forming systems for the delivery of DNDI-0690 to treat cutaneous leishmaniasis. *Pharmaceutics*. 2021;13(516). doi:10.3390/pharmaceutics13040516
20. Šveikauskaitė I, Briedis V. Effect of film-forming polymers on release of naftifine hydrochloride from nail lacquers. *International Journal of Polymer Science*. 2017;(1466270):1-7. doi:10.1155/2017/1476270
21. Huanbutta K, Sittikijyothin W, Sangnim T. Development of topical natural based film forming system loaded propolis from stingless bees for wound healing application. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2020;50:625-634. doi:10.1007/s40005-020-00493-w
22. Karki S, Kim H, Na SJ, Shin D, Jo K, Lee J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;11(5):559-574. doi:10.1016/j.ajps.2016.05.004
23. Ghasemlou M, Khodaiyan F, Oromiehie A. Rheological and structural characterisation of film-forming solutions and biodegradable edible film made from kefiran as affected by various plasticizer types. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;49(4):814-821. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2011.07.018
24. Garvie-Cook H, Frederiksen K, Petersson K, Guy RH, Gordeev S. Characterization of topical film-forming systems using atomic force microscopy and Raman microspectroscopy. *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(3):751-757. doi:10.1021/mp500582j
25. Wu Y, Qin Y, Yuan M, et al. Characterization of an antimicrobial poly(lactic acid) film prepared with poly(ϵ -caprolactone) and thymol for active packaging. *Polymers for Advanced Technologies*. 2014;25(9):948-954. doi:10.1002/pat.3332
26. Livecchi L, McAuley WJ, Kerai-Varsani L. The use of optical differential scanning calorimetry to investigate ibuprofen miscibility in polymeric films for topical drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2021;169:125-133. doi:10.1016/J.EJPB.2021.10.004

27. Jadhav NR, Gaikwad VL, Nair KJ, Kadam HM. Glass transition temperature: Basics and application in pharmaceutical sector. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2009;3(2):82-89. doi:10.4103/0973-8398.55043
28. Lunter DJ, Daniels R. New film forming emulsions containing Eudragit® NE and/or RS 30D for sustained dermal delivery of nonivamide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2012;82(2):291-298. doi:10.1016/J.EJPB.2012.06.010
29. Kim DW, Kim KS, Seo YG, et al. Novel sodium fusidate-loaded film-forming hydrogel with easy application and excellent wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;495(1):67-74. doi:10.1016/J.IJPB.2015.08.082
30. Salamanca ID CH, Barrera-Ocampo AI, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz diffusion cell approach for pre-formulation characterisation of ketoprofen semi-solid dosage forms. *Pharmaceutics*. 2018;10(148). doi:10.3390/pharmaceutics10030148
31. Silva-Alvarez AF, Ferreira MP, Vicentini FTMC, Pedrazzi V, de Freitas O. A new approach to ex vivo permeation studies in in-situ film-forming systems. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2020;21(257). doi:10.1208/s12249-020-01799-6
32. Wokovich AM, Prodduturi S, Doub WH, Hussain AS, Buhse LF. Transdermal drug delivery system (TDDS) adhesion as a critical safety, efficacy and quality attribute. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;64(1):1-8. doi:10.1016/j.ejpb.2006.03.009
33. Yang F, Yu X, Shao W, et al. Co-delivery of terbinafine hydrochloride and urea with an in situ film-forming system for nail targeting treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;585:119497. doi:10.1016/J.IJPB.2020.119497
34. Aggarwal R, Targotra M, Sahoo PK, Chauhan MK. Efinaconazole nail lacquer for the transungual drug delivery: Formulation, optimization, characterization and in vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;60:101998. doi:10.1016/J.JDDST.2020.101998

35. Souza LK, Bruno CH, Lopes L, Pulcinelli SH, Santilli C v., Chiavacci LA. Ureasil–polyether hybrid film-forming materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;101:156-161. doi:10.1016/J.COLSURFB.2012.06.009
36. Assessing tackiness and adhesion using a pull away test on a rotational rheometer. *Malvern Instruments Limited*. Published online 2015. Accessed March 18, 2022.
<https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/AN150527AssessingTackinessPullAway.pdf>
37. Minghetti P, Cilurzo F, Casiraghi A. Measuring adhesive performance in transdermal delivery systems. *American Journal Drug Deliv*. 2004;2(3):193-206. doi:<https://doi.org/10.2165/00137696-200402030-00004>
38. Khutoryanskiy VV. Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromolecular Bioscience*. 2011;11(6):748-764. doi:10.1002/mabi.201000388
39. Cook SL, Bull SP, Methven L, Parker JK, Khutoryanskiy V v. Mucoadhesion: A food perspective. *Food Hydrocolloids*. 2017;72:281-296. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.05.043
40. J Mastropietro D. Rheology in Pharmaceutical Formulations-A Perspective. *Journal of Developing Drugs*. 2013;02(02). doi:10.4172/2329-6631.1000108
41. Ma Q, Du L, Yang Y, Wang L. Rheology of film-forming solutions and physical properties of tara gum film reinforced with polyvinyl alcohol (PVA). *Food Hydrocolloids*. 2017;63:677-684. doi:10.1016/J.FOODHYD.2016.10.009
42. Silva-Weiss A, Bifani V, Ihl M, Sobral PJA, Gómez-Guillén MC. Polyphenol-rich extract from murta leaves on rheological properties of film-forming solutions based on different hydrocolloid blends. *Journal of Food Engineering*. 2014;140:28-38. doi:10.1016/J.JFOODENG.2014.04.010

43. Jirsáková J, Ondrejček P, Wolaschka T, Řehula M, Rabišková M. Aplikční možnosti disoluční metody s průtokovou celou. *Chemické listy*. 2015;109(34-40):ISSN: 1213-7103.
44. *Český Lékopis 2017: Pharnacopoea Bohemica MMXVII (Ph.B. MMXVII)*. První vydání. Grada Publishing a.s., Praha; 2017.
45. Lee JH, Yeo Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science*. 2015;125:75-84.
doi:10.1016/J.CES.2014.08.046
46. Kotingová L, Borská L, Fiala Z. Testování transdermální absorpce chemických láte in vitro. *Chemické listy*. 2009;103(533-539):ISSN: 1213-7103.
47. Bartosova L, Bajgar J. Transdermal drug delivery in vitro using diffusion cells. *Current Medicinal Chemistry*. 2012;19:4671-4677.
doi:10.2174/092986712803306358
48. Clemons K, Kretsch A, Verbeck G. Parallel artificial membrane permeability assay for blood–brain permeability determination of illicit drugs and synthetic analogues. *Science & Justice*. 2014;54(5):351-355.
doi:10.1016/J.SCIJUS.2014.06.004
49. Vizserálek G, Berkó S, Tóth G, et al. Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;76:165-172.
doi:10.1016/J.EJPS.2015.05.004
50. Salicylic Acid. Sigma Aldrich. Accessed February 7, 2022.
https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_salicylique
51. Methyl salicylate. Accessed February 3, 2022.
https://cs.frwiki.wiki/wiki/Salicylate_de_m%C3%A9thyle
52. Methyl salicylate. Accessed February 3, 2022.
<https://www.fengchengroup.com/pharmaceutical-api/functional-api/salicylic-acid-cas-69-72-7-methyl-salicylate.html>
53. Šnejdrová E, Dittrich M. Poly(alfa-hydroxykyseliny) jako nosiče léčiv. *Chemické listy*. 2011;105(27-33):ISSN: 1213-7103.

54. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*. 2011;3:1377-1397. doi:10.3390/polym3031377
55. Snedjrova E, Podzimek S, Martiska J, Holas O, Dittrich M. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. *Acta Pharma*. 2020;70:63-75. doi:10.2478/acph-2020-0011
56. Vysloužil J, Dvořáčková K, Kejdušová M, Rabišková M. Příprava léčivých mikročástic metodou odpařování rozpouštědla. *Chemické listy*. 2013;107(16-23):ISSN: 1213-7103.
57. d'Arcy R, Burke J, Tirelli N. Branched polyesters: Preparative strategies and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;107:60-81. doi:10.1016/J.ADDR.2016.05.005
58. Asgreen C, Knopp MM, Skytte J, Löbmann K. Influence of the polymer glass transition temperature and molecular weight on drug amorphization kinetics using ball milling. *Pharmaceutics*. 2020;12(6). doi:10.3390/PHARMACEUTICS12060483
59. Bansil R, Turner BS. The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;124:3-15. doi:10.1016/J.ADDR.2017.09.023
60. Yalkowsky SH, Dannenfelser RM. Salicylic acid. Accessed May 5, 2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salicylic-acid>
61. Methyl salicylate. Accessed May 5, 2022. http://www.sciencemadness.org/smwiki/index.php/Methyl_salicylate
62. Ming-Jun Tsai YSFYHLYBHPCW. Modified Franz diffusion cell. Accessed February 20, 2022. https://plos.figshare.com/articles/figure/_Modified_Franz_diffusion_cell_/120086
63. Larson B, Banks P. Low Cost Solution for PAMPA Assays - Using the Epoch Microplate Spectrophotometer with PION's PAMPA Explorer™ for the In-vitro Drug Permeability Studies. Accessed March 18, 2022. <https://www.biotek.com/resources/application-notes/low-cost-solution-for->

pampa-assays-using-the-epoch-microplate-spectrophotometer-with-pions-
pampa-explorer-for-the-in-vitro-drug-permeability-studies/