

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické technologie

Diplomová práce

Izotonizace vodných roztoků léčiv. Oxymetazolin hydrochlorid.
Tonicity adjustment of aqueous solutions of drugs. Oxymetazoline
hydrochloride.

Prohlášení

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

Martina Kučerová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Doc. PharmDr. Zdeňce Šklubalové, Ph.D. za odborné vedení při psaní této diplomové práce, za věcné připomínky při stylizaci jednotlivých částí práce, za poskytnutí odborné literatury a za čas, který mi tímto způsobem věnovala.

Obsah

1	Abstrakt.....	6
2	Abstract.....	7
3	Zadání	8
4	Použité symboly.....	9
5	Úvod.....	10
6	Teoretická část	11
6.1	Oční přípravky	11
6.1.1	Biodostupnost léčiva po oční aplikaci	11
6.1.2	Typy očních přípravků.....	12
6.1.3	Vlastnosti očních přípravků	14
6.2	Nosní přípravky.....	16
6.2.1	Typy nosních přípravků	16
6.2.2	Pomocné látky nosních přípravků.....	18
6.3	Osmóza a osmotický tlak	18
6.3.1	Osmotický tlak parenterálních přípravků	19
6.3.2	Osmotický tlak očních přípravků.....	21
6.4	Osmolalita	21
6.4.1	Snížení teploty tuhnutí roztoku (kryoskopie)	22
6.4.2	Zvýšení teploty varu (ebulioskopie)	24
6.5	Izotonizace vodných roztoků léčiv.....	24
6.6	Oxymetazolin hydrochlorid	26
7	Experimentální část.....	28
7.1	Použité suroviny.....	28
7.2	Použité přístroje	28
7.3	Příprava roztoků	28
7.4	Měření hustoty	29
7.5	Měření osmolality	29

7.6	Zpracování výsledků	30
8	Výsledky	31
9	Diskuse.....	47
10	Závěry	51
11	Použitá literatura	52

1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické technologie

Školitel: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Posluchač: Martina Kučerová

Název diplomové práce: Izotonizace vodných roztoků léčiv. Oxymetazolin hydrochlorid

Vodné roztoky léčivých látek pro oční a nosní aplikaci by měly být izotonické. Izotonizace se nejčastěji provádí pomocí kryoskopické hodnoty. Cílem této experimentální diplomové práce bylo změřit hustotu, osmolalitu a kryoskopickou hodnotu roztoků oxymetazolin hydrochloridu a zjištěné experimentální výsledky využít k odhadu molálního osmotického koeficientu a osmotického tlaku roztoků.

Důležitým praktickým výstupem bylo připravit podklady pro doplnění kryoskopických hodnot v Tabulce VIII Českého lékopisu.

2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of: Pharmaceutical Technology

Consultant: Doc. PharmDr. Zdeňka Šklubalová, Ph.D.

Student: Martina Kučerová

Title of Thesis: Tonicity adjustment of aqueous solutions of drugs.
Oxymetazoline hydrochloride

The aqueous solutions of drugs for ophthalmic and nasal administration should be isotonic. Tonicity adjustment is mostly performed by the freezing point depression method. The objective of this experimental thesis was to measure density, osmolality and the freezing point depression of the oxymetazoline hydrochloride solutions and to use the experimental results for estimation of the molal osmotic coefficient and the osmotic pressure of the solutions. The objective, important in practice, is to set freezing-point depression data to complete a Table VIII of the Czech Pharmacopoeia.

3 Zadání

Úkolem této diplomové práce je vypracovat literární rešerši zaměřenou na význam osmotického tlaku a izotonizaci vodných roztoků léčiv. S ohledem na experimentální část je dílčím úkolem podat informace o farmakologických vlastnostech a využití oxymetazolin hydrochloridu v očních a nosních přípravcích.

Cílem experimentální práce je změřit hustotu, osmolalitu a kryoskopickou hodnotu roztoků oxymetazolin hydrochloridu v koncentracích 0,25 - 4,92 % w/w. Hodnoty osmolality a průměrné hustoty roztoků při 20°C budou využity k odhadu molálního osmotického koeficientu a osmotického tlaku roztoků.

Motivem práce je připravit podklad pro doplnění izotonizační tabulky Národní části Českého lékopisu.

4 Použité symboly

zkratka	název	jednotka
Π	osmotický tlak	Pa
m_{os}	osmolalita	mOsmol/kg
h	hustota	kg/m ³ nebo g/cm ³
R	univerzální plynová konstanta	J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
T	teplota	K
c	koncentrace	% w/w
n	počet iontů vzniklých v roztoku	-
Φ	molální osmotický koeficient	-
ΔT	snížení teploty tuhnutí	°C
SD	směrodatná odchylka	-

5 Úvod

Osmolalita charakterizuje schopnost působit osmotickým tlakem na semipermeabilní membráně. Normální hodnoty osmolality v plazmě jsou 275 - 295 mmol/kg. Osmolalita je identická ve všech tělesných kompartmentech, za podmínek ustáleného stavu. Voda se distribuuje tak, aby tuto podmínku zajistila.

Objem intracelulární tekutiny se mění při odchylkách osmolality extracelulárního prostoru, ale nemění se při neosmotických změnách extracelulárního prostoru. Intracelulární i extracelulární prostor se mění jako celek. Je-li primární poruchou vzestup efektivní osmolality extracelulární tekutiny, voda opouští buňky, snižuje se objem intracelulárních tekutin, dochází k sraštění buněk a osmolalita intracelulární tekutiny se zvyšuje. Následkem toho dochází k celkovému zvýšení osmolality tělesných tekutin než normálně, ale přesunem vody dochází ke zmírnění poruchy. Pokud je primární poruchou snížená osmolalita extracelulární tekutiny, voda vstupuje do buněk, zvyšuje se objem intracelulární tekutiny, dochází k duřeni buněk a osmolalita intracelulární tekutiny se snižuje. Celková osmolalita je nižší než obvykle, ale změna je mírněna vlivem přesunu vody.¹

Z výše uvedených informací je patrné, že je důležitá úprava osmolality u parenterálních, očních a nosních přípravků, aby nedocházelo k bolestivé parenterální aplikaci, vzniku nekróz, porušení krvinek nebo vzniku trombů, k bolestivým projevům oka, k dráždění či vysoušení nosní sliznice.²

Upravit osmotický tlak je však možné jen, je-li nižší než osmotický tlak plazmy a slz. Přidáním potřebného množství vhodné soli nebo jiné látky se tlak zvýší a hypoosmotický roztok se stane izoosmotickým. U roztoků s vyšším obsahem rozpuštěných léčivých látek, hyperosmotických, se osmotický tlak neupravuje, protože by došlo k jejich zředění a tím by se snížila účinnost přípravku.

Podle typu přípravku je pro úpravu osmotického tlaku nejčastěji používán chlorid sodný, popř. dusičnan draselný (pouze oční), glukosa, mannitol a další látky.²

6 Teoretická část

6.1 Oční přípravky

6.1.1 Biodostupnost léčiva po oční aplikaci

Slzy jsou produkovány slznými, hlenovými a tukovými žlázami, aby svlažovaly povrch očního bulbu. Slzy jsou izotonickým nebo slabě hypotonickým roztokem s pH 7,3 - 7,7. Z 99 % jsou tvořeny vodou, 1 % je sušina složená z tuků, hlenů, proteinů, krystaloid a oloupaných epitelí. V slzách bylo objeveno velké množství enzymů, zejména lysozym a betalyzin. Lysozym je enzym s baktericidním účinkem vznikající v slzné žláze a žlázách spojivky a představuje 25 % všech proteinů obsažených v slzách.

Ke zvýšené sekreci slz dochází psychicky při smíchu nebo při pláči, reflektoricky při podráždění senzitivních nervů (při mrazivém větru, erozi na rohovce, zánětech nosní sliznice), přímo podrážděním sekretorického nervu (při kašli). Snížená tvorba slz se vyskytuje zřídka, při poškození sekrečních vláken nebo přerušáním vývodů žlázy (při poleptání spojivky).

Slzy vytvářejí na povrchu oka kapilární vrstvičku a stékají do slzného jezírka ve vnitřním koutku, odtud jsou pohybem víček nasávány slznými kanálky do vaku a odtékají do nosní dutiny. Tímto způsobem dochází k odplavování částic prachu a bakterií z povrchu oka do nosu. Množství slz ovlivňuje vypařování, při němž dochází k 10 - 25% ztrátě objemu slz při transportu oční štěrbinou.

Slzný film se vytváří na rohovce při mrkání. Má velké povrchové napětí, které brání stékání vodné vrstvy filmu, svlažuje rohovku a spojivku. Slzný film chrání rohovku před infekcí, vyživuje a okysličuje ji. ³

Farmakokinetika je často popsána jako reakce těla na léčivý přípravek, farmakodynamika je reakce léčivého přípravku v těle. Specifičtější je vysvětlení, že farmakodynamika je měření farmakologických odpovědí spojených s dávkou a koncentrací. Farmakologická odpověď vyvolaná léčivým přípravkem v oku se může

značně lišit jedinec od jedince, kvůli rozdílným faktorům jako je oční pigmentace, patologický stav oka, slzení, rychlost mrkání.⁴

Absorpce léčiva z očních kapek je obecně překvapivě složitá vzhledem k jednoduchosti aplikace. Absorpce rohovkou zahrnuje sled událostí zahrnujících vkapání, ředění v slzní tekutině, difuzi skrz slznou vrstvu mucinu, penetraci rohovkou a přenos z rohovky do komorové vody. Paralelní absorpční cesta existuje mezi spojivkou a sklérou. Většina léčivých přípravků využívá absorpci rohovkou.⁴

6.1.2 Typy očních přípravků

Oční přípravky zahrnují předepisované i volně prodejné léčivé přípravky, produkty sloužící k péči o oční čočky a produkty spojené s oční chirurgií.⁴

OČNÍ KAPKY

Oční kapky jsou nejběžněji používanou formou dávkování léčivé látky do oka. Složky jsou zcela rozpustné, proto není problémem rovnoměrnost dávkování a je zde minimální ovlivnění zraku.⁴

Oční kapky mohou obsahovat pomocné látky na úpravu tonicity nebo viskozity, na nastavení nebo ustálení pH, na zvýšení rozpustnosti léčivé látky, na zvýšení stálosti roztoku. Žádná z těchto látek nesmí mít nežádoucí účinky při dané aplikaci a v použitém množství nesmí místně dráždit. Vodné roztoky ve vícedávkových obalech musí obsahovat protimikrobní přísadu, pokud tuto povahu nemá sama léčivá látka. Protimikrobní látka musí být kompatibilní s ostatními složkami přípravku a její aktivita musí být zachována po celou dobu používání. Oční kapky bez těchto přísad by měly být dodávány v jednodávkových obalech. Roztoky, které jsou očními kapkami, musí být čiré a bez viditelných částic. Suspenze musí mít snadno roztřepatelný sediment a nesmí rychle sedimentovat, aby byl po roztřepání dostatek času na odměření dávky.²

Výhodou podávání očních kapek při onemocnění oka před celkovým podáváním je, že je v tkáních předního segmentu dosažena potřebná koncentrace účinné látky a současně je maximálně omezen vznik celkových nežádoucích účinků. Je však

nezbytně nutné naučit pacienta správné technice aplikace očních kapek. Absorpce se zlepši pokud prstem stlačíme vnitřní koutek a oblast slzného vaku, aby se zamezilo odtoku kapek slznými cestami a snížila se celková absorpce nosní sliznicí.³



Obr. 1: Oční kapky s oxymetazolin hydrochloridem používané v zahraničí.^{5,6}

OČNÍ VODY

Oční vody jsou sterilní vodné roztoky určené k mytí, k vyplachování dráždivých látek nebo cizích tělísek z oka a spojivkového vaku nebo k napuštění očních obkladů. Platí pro ně stejná pravidla jako pro oční kapky. Při použití u chirurgických výkonů nebo při první pomoci nesmí obsahovat protimikrobní látky a měly by se dodávat v jednodávkových obalech.²

POLOTUHÉ OČNÍ PŘÍPRAVKY

Sterilní krémy, masti nebo gely určené k aplikaci na spojivku jsou složeny z jedné nebo více léčivých látek rozpuštěných nebo dispergovaných ve vhodném základu, který nesmí dráždit spojivku. Jsou baleny v tubách, které bývají opatřeny aplikátorem. Musí být dobře uzavřeny, aby léčivý přípravek chránily před mikrobiální kontaminací.²

Oční masti prodlužují kontaktní čas léčivé látky s rohovkou. Látky nerozpustné v tucích tvoří v masti mikrokrystaly. Pouze povrchově uložené krystaly se rozpustí v slzách, léčivá látka se uvolňuje postupně. Jen látka dobře rozpustná v tucích a částečně ve vodě pronikne z masťového základu jak do rohovky, tak do slz.³

PRAŠKY PRO OČNÍ KAPKY A OČNÍ VODY

Tyto prášky se před samotnou aplikací rozpouštějí nebo dispergují ve vhodné kapalině. Mohou obsahovat nejen léčivou látku, ale i látky pomocné. Jsou vhodnou formou pro nestálá léčiva. ²

OČNÍ INZERTY

Oční inzerty jsou určeny ke vkládání do spojivkového vaku, kde slouží k uvolnění léčiva. Jsou sterilní, polotuhé nebo tuhé útvary velikostí a tvarem přizpůsobené oční aplikaci. Léčivo je umístěno v zásobníku s membránou, která řídí jeho uvolňování, nebo v matrici. Léčivá látka se uvolňuje po delší, předem stanovenou dobu. ²

6.1.3 Vlastnosti očních přípravků

OSMOTICKÝ TLAK

Osmotickému tlaku očních přípravků je v této diplomové práci věnována samostatná kapitola 6.3.2..

VISKOZITA

Oční kapky mají viskozitu vody, ale v některých případech je užitečné viskozitu zvýšit. Oko chrání proti vnějším vlivům slzní tekutina pokrývající rohovku. Pokud se vylučování slz sníží nebo přeruší, je potřeba tento nedostatek nahradit přívodem umělé slzní tekutiny podobné slzám. Viskozita slz se pohybuje v rozmezí 1,02 - 1,93 mPa·s. Umělá slzní tekutina musí mít vyšší viskozitu než slzy (15 - 30 mPa·s). Roztoky s viskozitou nad 50 mPa·s se nedoporučují, jelikož mohou vyvolat nepříjemný pocit při aplikaci a ucpat slzní kanálky.

Viskozitu očních kapek zvyšujeme pro zpomalení odtoku přípravku a prodloužení kontaktu s rohovkou. Viskóznější roztok snižuje oční dráždivost, slzení, pohyb víček, a tím zpomaluje zředování přípravku. Roztoky s vyšší viskozitou dosáhnou stejného terapeutického účinku i při menší koncentraci léčivé látky. K ovlivnění viskozity se používají polymerní látky přírodního (kyselina alginová a její soli), syntetického

(polyvinylalkohol, povidon) i polosyntetického (methylcelulosa, hypromelosa) původu. Některé tyto látky mají i mukoadhezivní vlastnosti a zvyšují kontaktní čas přípravku s rohovkou tvorbou spojů s mucinem nebo gelovají při styku se slzní tekutinou působením v ní přítomných iontů nebo změnou pH či teploty. Tento gel pak vydrží déle na povrchu rohovky. ²

AKTUÁLNÍ ACIDITA

Stejně jako osmotický tlak i aktuální acidita souvisí s bolestivostí a dráždivostí při aplikaci. Průměrné pH slz je 7,4. U očních kapek není důležité upravovat pH na uvedenou izohydrickou hodnotu, jelikož roztoky v rozmezí pH 5,8 - 11,4 oko citelně nedráždí. Úpravu acidity musíme posuzovat i z hlediska rozpustnosti a stálosti léčiv. Léčiva používaná v oftalmologii mají většinou optimální stabilitu při pH 2 - 3. Aby nedocházelo ke zmýdelnění lokálních anestetik při neutrální reakci, většinu očních kapek upravujeme na roztoky euhydrické, na aktuální aciditu přizpůsobenou požadavkům stálosti přípravků. Úprava pH se musí sladit s izosmotickou úpravou. Podráždění oka způsobené nepříznivým pH nebo nevhodným osmotickým tlakem vyvolává slzení. Oční kapky se tak rychle zředí a velká část léčiva se z oka vyplaví, aniž by vyvolala požadovaný terapeutický efekt. ²

POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

Vyššího terapeutického účinku a lepšího rozdělení roztoků na rohovce se dosáhne snížením povrchového napětí očních přípravků. Přidáním tenzidu se může zvýšit dráždivost očních kapek. Povrchové napětí slz je $462,4 \mu\text{N}\cdot\text{cm}^{-1}$. U očních přípravků by mělo být povrchové napětí nižší, tedy okolo $300 \mu\text{N}\cdot\text{cm}^{-1}$. ²

STERILITA

Sterilita očních přípravků je důležitá, jelikož bakteriální infekce může způsobit oslepnutí. Nejobávanějším patogenním mikroorganismem je *Pseudomonas aeruginosa*, který je odolný proti většině antibiotik, konzervačním látkám a je relativně rezistentní i proti účinkům tepla. *Pseudomonas aeruginosa* se vyskytuje ve

většině vodních zdrojů, proto se může vyvíjet i v očních přípravcích, pokud neobsahují vhodnou protimikrobní přísadu. Na rohovce způsobuje těžké ulcerace a produkuje enzym, který ji rozrušuje odbouráváním rohovkového kolagenu. Oční přípravky musí být sterilní, vyhovovat zkoušce na sterilitu. ²

6.2 Nosní přípravky

Nosní přípravky jsou určeny k podání do dutiny nosní a k získání místního nebo systémového účinku. Mohou obsahovat jednu i více účinných látek. Tyto přípravky nesmějí dráždit a porušovat funkce nosní sliznice a jejích řasinek. Vodné nosní kapky jsou obvykle izotonické. Dodávají se ve vícedávkových nebo jednodávkových obalech, které jsou podle potřeby opatřeny aplikátory a chrání obsah před mikrobiální kontaminací. Ve vícedávkových obalech mají obsahovat protimikrobní přísadu, pokud léčivo samo nemá tento účinek. ²

6.2.1 Typy nosních přípravků

NOSNÍ KAPKY A KAPALNÉ NOSNÍ SPREJE

Jedná se o roztoky, emulze nebo suspenze na vkapávání nebo vstříkování do nosní dutiny. Emulze a suspenze musí mít potřebnou fyzikální stálost a musí být snadno roztřepatelné, aby rychle došlo k obnovení jejich homogenosti. Nosní spreje jsou dodávány v nádobkách s rozprašovačem nebo v tlakových baleních s dávkovacím ventilem. Velikost dispergovaných částic sprejů musí vyhovovat jejich lokalizaci v nosní dutině. ²



Obr. 2: Běžně užívané nosní kapky a spreje s oxymetazolin hydrochloridem. ^{7, 8, 9}

NOSNÍ ZÁSYPY

Nosní zásypy jsou určeny k insuflaci do nosních dutin vhodnou aplikační pomůckou. Částice musí být tak velké, aby ulpěly na nosní sliznici. ²

POLOTUHÉ NOSNÍ PŘÍPRAVKY

Svémi vlastnostmi musí polotuhé nosní přípravky splňovat platné jakostní požadavky pro masti, krémy, gely. ²

NOSNÍ OMÝVADLA

Nosní omývadla jsou obvykle vodné roztoky určené k čištění nosních dutin. Přípravky na poraněnou sliznici nebo před chirurgickým zákrokem jsou sterilní. ²

NOSNÍ TYČINKY

Nosní tyčinky jsou tuhé léčivé přípravky k místní aplikaci. Jsou tvarovány pro snadnější aplikaci, většinou mají kónický tvar, skládají se ze základu a léčiv, které při teplotě těla tají nebo se rozpouštějí. ²

6.2.2 Pomocné látky nosních přípravků

Základním vehikulem nosních kapek a sprejů je čištěná voda. Hypotonické roztoky se izotonizují, aby nedocházelo k dráždění nosní sliznice a k narušení funkce řasinek. Rovněž se může upravit i aktuální acidita doporučenými tlumivými přísadami (citronanové, fosforečnanové roztoky). Do vícedávkových vodných kapek se přidávají protimikrobní přísady.

Jako nevodné vehikulum je vhodné použití rostlinných olejů, případně syntetických olejů. U emulzních nosních kapek se upřednostňují systémy o/v (olej/voda), které jsou šetrnější k řasinkovému epitelu. Použití látek zvyšujících viskozitu, případně mukoadhezivních látek prodlužuje kontaktní dobu léčivé látky s místem kde byla aplikována. U přípravků se systémovým účinkem je potřeba přidat urychlovače absorpce (tenzidy, soli žlučových kyselin, ...). Mezi polotuhými nosními přípravky se upřednostňují hydrofilní gely (karbomerové, z derivátů celulosy), vhodné jsou i hydromasti (makrogolové základy), oleofilní masti.²

6.3 Osmóza a osmotický tlak

Osmóza předpokládá dvě kapaliny, které jsou od sebe odděleny membránou propustnou pro vodu a nepropustnou pro jednu nebo více rozpuštěných látek. Tato membrána se nazývá semipermeabilní nebo selektivně permeabilní. Koncentrace bude vyšší na jedné straně membrány než na straně druhé. Voda bude procházet přes membránu ke straně s větší koncentrací nedifundujících látek ve snaze koncentraci vyrovnat, tento typ difuze je nazýván osmóza.^{10, 11}

Osmotický tlak je jednou z koligativních vlastností roztoků. Dalšími koligativními vlastnostmi jsou snížení tenze par, snížení teploty tuhnutí a zvýšení teploty varu. Koligativní vlastnosti roztoku jsou závislé na počtu rozpuštěných částic bez ohledu na to, zda se jedná o molekuly nebo ionty, velké nebo malé. Jednou z nejdůležitějších praktických využití těchto vlastností je příprava izotonických parenterálních a očních roztoků.¹²

Roztok projevuje ideální chování, když nedochází k interakci mezi rozpuštěnými látkami a rozpouštědlem. Pro roztoky obsahující nedisociované rozpuštěné látky je osmotický tlak (π) přímo úměrný jeho molalitě (mol/kg):

$$\Pi = \left(\frac{h \cdot R \cdot T}{1000} \right) \cdot m \quad (1)$$

kde h je hustota rozpouštědla při teplotě T , R je univerzální plynová konstanta a m je molalita roztoku.

Pro reálný roztok, obsahující více než jednu rozpuštěnou látku, je dán osmotický tlak vzorcem:

$$\Pi = \left(\frac{h \cdot R \cdot T}{1000} \right) \sum n_i \cdot m_i \cdot \Phi_{m,i} \quad (2)$$

kde n_i je počet částic tvořených disociací jedné molekuly z i rozpuštěných látek.

n_i je rovno jedné pro neionizované rozpuštěné látky, m_i je molalita i rozpuštěných látek a Φ je molální osmotický koeficient i rozpuštěných látek.¹³

Molální osmotický koeficient udává počet interakcí mezi ionty opačného náboje v roztoku. Závisí na hodnotě molality roztoku. Hodnota molálního osmotického koeficientu je obtížně měřitelná se zvyšující se složitostí roztoku.¹⁴

Molalita udává počet molů rozpuštěných látek v jednom kilogramu rozpouštědla, jednotkou molality je mol/kg.¹⁵

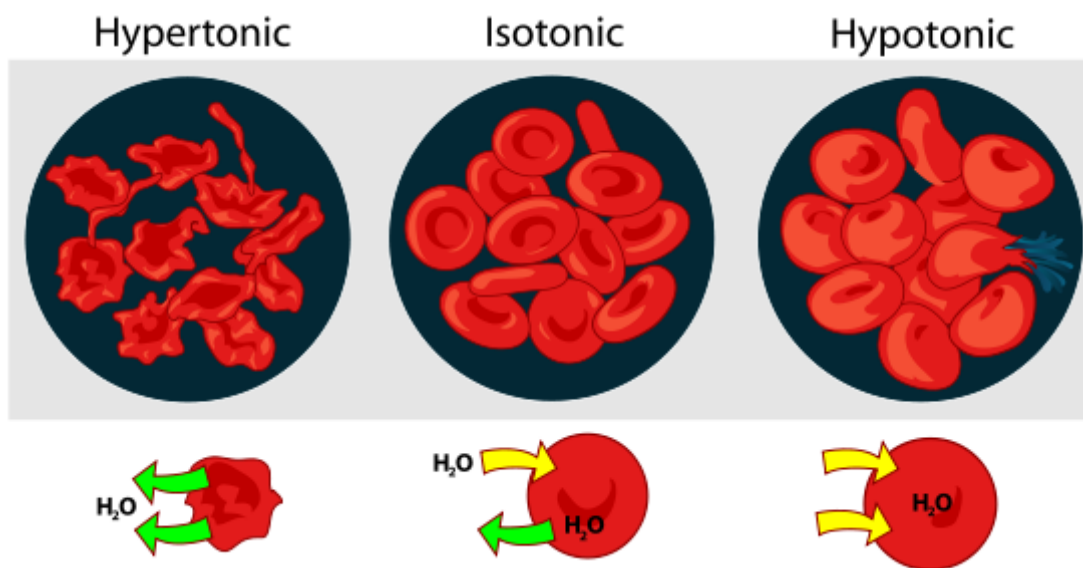
6.3.1 Osmotický tlak parenterálních přípravků

Osmotický tlak krevní plazmy při 37°C se udává v rozmezí 0,73 - 0,81 MPa. Pokud se osmotický tlak injekce a zejména infúze významně odlišuje od osmotického tlaku krevní plazmy (aplikace hypertonického nebo hypotonického roztoku), projeví se to bolestivostí při intramuskulárním podání, vznikem nekrot, porušením krvinek nebo vznikem trombů při intravenózním podání.

Porušení krvinek v hypotonickém prostředí se nazývá hemolýza. Jedná se o vstup vody do krevních buněk, který se projeví uvolněním krevního barviva. Tento proces je nevratný. V hypertonickém prostředí voda vystupuje z krevních buněk. V tomto případě se jedná o hemoptýzu, která je vratná, když se krvinka dostane do normální

osmotické situace. Vliv osmotického tlaku na červené krvinky je znázorněn na obrázku 3.

Osmotický tlak se upravuje na izotonický zejména u parenterálních infúzí podávaných ve větších objemech a u těch, které by mohly být hypotonické. Hypertonické roztoky se neupravují na izotonické, protože by docházelo k jejich ředění a snižoval by se obsah léčivé látky v jednotce objemu.²



Obr. 3: Vliv osmotického tlaku na červené krvinky¹⁶

Efektivní osmotický tlak injekcí je podobný jako tlak krevního séra. Tento efektivní osmotický tlak je nazýván tonicita, není vždy identický s osmolalitou, protože se týká jen těch rozpuštěných látek v roztoku, které mohou působit průchod vody skrz biologickou membránu. Roztoky, které mají stejnou tonicitu jako krevní sérum, jsou izotonické. Roztoky s vyšší tonicitou jsou hypertonické a ty s nižší tonicitou jsou hypotonické roztoky. Pro zabránění nepříjemného podání roztoku léčivé látky přes citlivé tělesné membrány, jako jsou např. oči, musí být tyto roztoky izotonické s těmito tkáněmi.¹⁵

6.3.2 Osmotický tlak očních přípravků

Přípravek aplikovaný do oka, jehož osmotický tlak se výrazně liší od osmotického tlaku slzní tekutiny, dráždí oko a působí bolest. Proto je jedním z požadavků na úpravu osmotického tlaku očních kapek jejich izotonicita. Při výpočtu potřebného množství izotonizační přísady se nejčastěji vychází ze snížení teploty tuhnutí. Zkušenosti ukazují, že pro odstranění bolestivosti není nutné, aby osmotický tlak očních kapek přesně odpovídal osmotickému tlaku slz. Např. roztok chloridu sodného při vkapávání do oka je bolestivý jen při koncentraci pod 0,4 % a nad 1,7 %.² Proto existují návrhy, aby se úprava osmotického tlaku řešila pouze u extrémně zředěných roztoků.²

6.4 Osmolalita

Osmolalita je osmotická koncentrace definovaná jako počet osmolů rozpuštěných látek na kilogram rozpouštědla (vody).¹⁷

Teoretická osmolalita roztoku je dána rovnicí:

$$m_{os} = \sum n_i m_i \Phi_{m,i} \quad (3)$$

Osmolalita skutečného roztoku odpovídá molalitě ideálního roztoku obsahujícího nedisociované rozpuštěné látky a je vyjádřena v osmolech nebo miliosmolech na kilogram rozpouštědla (Osmol/kg nebo mOsmol/kg). S osmolalitou roztoku souvisejí jeho koligativní vlastnosti. Vztah mezi osmolalitou m_{os} a snížením teploty tuhnutí ΔT vyjadřuje následující rovnice:¹⁴

$$m_{os} = \frac{\Delta T}{1,86} \cdot 1000 \text{ (mOsmol/kg)} \quad (4)$$

1,86 osmolů je kryoskopická konstanta pro vodu, to znamená, že jeden osmol rozpuštěné látky přidaný k jednomu kilogramu vody sníží teplotu tuhnutí o 1,860.¹³

Pro měření osmolality se používá osmometr, který se skládá ze:

- zařízení pro chlazení nádoby pro měření

- systému pro měření teploty, obsahujícího elektrický odpor citlivý na teplotu (termistor) a přístroje pro běžné měření proudu nebo měření rozdílu potenciálů, který má stupnici pro snížení teploty nebo přímo pro osmolalitu
- zařízení pro míchání vzorku (obvykle součást přístroje)

Pracovní postup měření: připraví se požadované porovnávací roztoky pro kalibraci osmometru, nastaví se nulová hodnota přístroje použitím *vody R*. Pak se provede kalibrace přístroje pomocí porovnávacích roztoků, jejich složení je uvedeno tabulce 2.2.35-1 v Českém lékopise 2009.¹⁴ Do měřicí kyvety se převede 50 μ l až 250 μ l vzorku podle požadavků výrobce a zapne se chladicí systém. Přístroj má obvykle míchací systém naprogramován tak, aby pracoval při nižší teplotě, než je teplota očekávaná v průběhu kryoskopického snížení, aby nenastalo přechlazení. Vhodným zařízením se indikuje dosažení rovnováhy. Před každým měřením se nádobka vypláchne roztokem, který se pak měří.

Stejným způsobem se postupuje se zkoušenými vzorky. Osmolalita se odečte přímo na přístroji nebo se vypočítá ze snížení teploty tuhnutí. Zkoušku lze hodnotit, jestliže nalezená hodnota leží v intervalu daném kalibrační křivkou.¹⁴

Osmolalita odráží celkovou koncentraci elektrolytů (sodík, draslík, chlór) a v menší míře i ostatních rozpuštěných látek (glukózy, urey) v těle. Osmolalita je zvyšována retencí sodíku (vlivem hormonu aldosteronu), zahuštěním plazmy při deficitu antidiuretického hormonu (diabetes insipidus), hyperglykemií při deficitu inzulínu (diabetes mellitus - může dojít ke vzniku hyperosmolárního komatu). Snížování osmolality je způsobeno ztrátou sodíku (hypokortikalismus - nedostatečná funkce kůry nadledvin s nedostatečnou produkcí jejích hormonů - kortikoidů), retencí vody (zřed'ovací hyponatremie), sníženou hladinou aldosteronu.¹⁸

6.4.1 Snížení teploty tuhnutí roztoku (kryoskopie)

Přidání netěkavé látky do rozpouštědla má za následek zvýšení teploty varu, ale způsobuje také snížení teploty tání. Na principu měření poklesu teploty tání přídatkem jiné látky je založeno kryoskopické stanovení molární hmotnosti rozpuštěné látky.

Nejdříve se změří teplota tání čistého rozpouštědla, k němu se přidá známé množství rozpuštěné látky a znovu se určí teplota tání. Rozdíl mezi teplotou tání roztoku s rozpuštěnou látkou T a teplotou tání čistého rozpouštědla T_0 udává hodnotu snížení teploty tuhnutí ΔT (kryoskopickou hodnotu).

$$\Delta T = T - T_0 \quad (5)$$

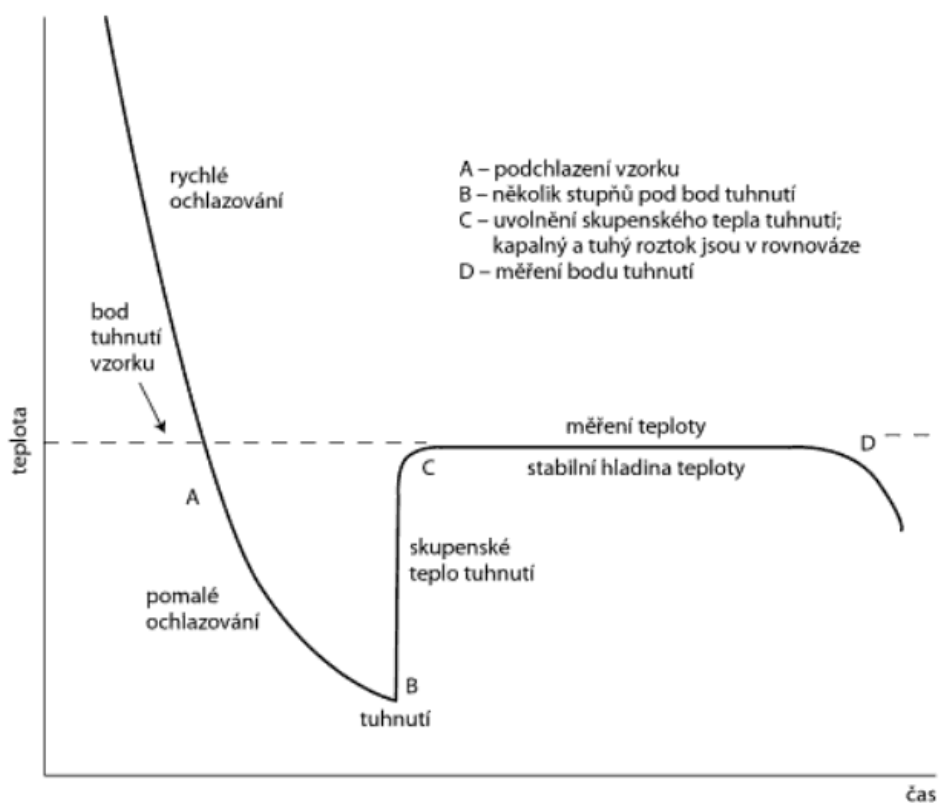
Molární hmotnost rozpuštěné látky pak můžeme vypočítat ze vztahu mezi snížením teploty tuhnutí ΔT a molární hmotností rozpuštěné látky M_2 :¹⁹

$$\Delta T = K_K \cdot m_2 = K_K \cdot \frac{m_2}{m_1 \cdot M_2} \quad (6)$$

kde m_1 a m_2 jsou hmotnosti rozpouštědla a rozpuštěné látky, K_K je kryoskopická konstanta, která je pro vodu 1,86 osmolů.¹³

Měřený vzorek roztoku musí být nejprve podchlazen, toho se dosáhne asi za minutu, poté dojde k uvolnění skupenského tepla tuhnutí (obvykle pomocí vibrace), a v následujícím teplotním sedle se měří snížení bodu tuhnutí roztoku odpovídající jeho osmolalitě. Osmometry musí být vybaveny velmi citlivým teploměrem (v řádu tisícín °C), protože snížení teploty tuhnutí jsou velmi malé (přibližně o 0,5 °C v séru). Princip kryoskopické osmometrie ukazuje obrázek 4.

Kryoskopické osmometry se používají mnohem častěji než osmometry ebullioskopické. Výhodou je jejich cena, jedinou nevýhodou je větší spotřeba séra (20 - 200 μ l) ve srovnání s ebullioskopickým osmometrem (2 μ l).¹



Obr. 4: Princip kryoskopické osmometrie ¹

6.4.2 Zvýšení teploty varu (ebulioskopie)

Ebulioskopická osmometrie sleduje snížení tenze par rozpouštědla nad roztokem resp. snížení rosného bodu par nad roztokem v závislosti na koncentraci částic v roztoku pomocí termoelektrického hygrometru. Stanovení se provádí za laboratorní teploty. Strmost poklesu rosného bodu je menší (0,303 °C na mol/kg vody) ve srovnání se snížením bodu tuhnutí (1,86 °C na mol/kg vody). Při měření interferuje přítomnost alkoholu a jiných těkavých látek v krvi. ¹

6.5 Izotonizace vodných roztoků léčiv

Izotonické roztoky látek jsou roztoky, které vzájemně porovnány mají stejné koligativní vlastnosti. Za izotonický (izoosmotický) s lidskou krví, slzami a tkáňovým mokem se považuje vodný roztok chloridu sodného o koncentraci 9,0 g/l,

jehož snížení teploty tuhnutí (kryoskopická hodnota) vzhledem k vodě je $-0,520^{\circ}\text{C}$, nebo jiné roztoky se shodnou kryoskopickou hodnotou (dusičnan draselný, mannitol a další). Hypotonické roztoky mají nižší hodnoty, hypertonické naopak vyšší. Izotonizují se hypotonické roztoky.

K izotonizaci se použije vhodná izotonizační přísada, která nesmí s žádnou složkou roztoku chemicky reagovat ani jinak měnit její účinek. K výpočtu množství izotonizační přísady se používají experimentálně zjištěné kryoskopické hodnoty uvedené v tabulce VIII v národní části Českého lékopisu 2009. Nebo výpočet pomocí molárních koncentrací, který je ovšem méně přesný.¹⁴

Postup izotonizace použitím chloridu sodného nebo dusičnanu draselného jako izotonizační přísady si můžeme ukázat na příkladu 0,01 % w/w roztoku oxymetazolin hydrochloridu, který se běžně používá v nosních kapkách a sprejích.

Množství chloridu sodného potřebného k izotonizaci lze vypočítat z rovnice:¹⁴

$$\text{NaCl(g)} = 0,0173 \cdot m \cdot (0,520 - \sum \Delta T) \quad (7)$$

kde m je celkové množství roztoku v gramech.

$$\text{NaCl(g)} = 0,0173 \cdot 10 \cdot (0,520 - 0,004)$$

0,004 je experimentálně zjištěná kryoskopická hodnota 0,01 % roztoku oxymetazolin hydrochloridu. Celkové množství chloridu sodného potřebného k izotonizaci bude 0,09 g.

V případě použití dusičnanu draselného pro výpočet použijeme rovnici:¹⁴

$$\text{KNO}_3(\text{g}) = 0,0312 \cdot m \cdot (0,520 - \sum \Delta T) \quad (8)$$

Dosazením získáme následující vztah:

$$\text{KNO}_3(\text{g}) = 0,0312 \cdot 10 \cdot (0,520 - 0,004)$$

Potřebné množství dusičnanu draselného pro izotonizaci 0,01% roztoku oxymetazolin hydrochloridu bude 0,16 g.

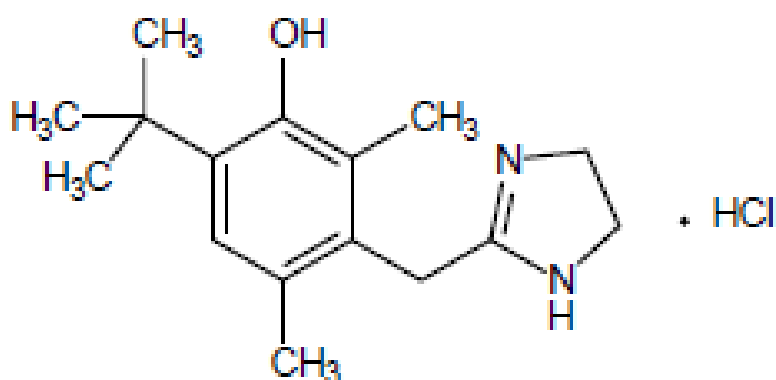
Rozdíl v množství použité izotonizační přísady mezi chloridem sodným a dusičnanem draselným je dán jejich odlišnou izotonickou koncentrací, která pro chlorid sodný je 0,9 % w/w, zatímco pro dusičnan draselný je 1,62 % w/w.¹⁴

6.6 Oxymetazolin hydrochlorid

Oxymetazolin je přímé sympatomimetikum s α -adrenergní aktivitou. Při aplikaci na mukózní membránu je vazokonstriktorem a redukuje zduření a kongesci. Účinkuje v průběhu pár minut a vyvolaný efekt trvá až dvanáct hodin. Ve formě hydrochloridu je používán k úlevě symptomatické nosní kongesce. 0,05% roztok oxymetazolin hydrochloridu je lokálně aplikován ve formě nosních kapek nebo spreje u dospělých a dětí nad šest let, obvykle dva až třikrát denně podle potřeby do každé nosní dírky. Volně prodejné přípravky pro léčbu kašle a nachlazení obsahující sympatomimetické dekonjestivum (zahrnující oxymetazolin) smí být s opatrností užívány i u dětí.

0,025% roztok oxymetazolin hydrochloridu může být nakapán do oka každých šest hodin k vyvolání spojivkové dekongesce u dospělých a dětí nad šest let.²⁰

Dlouhodobé používání nosních dekonjestiv může způsobit rebound kongesci, která se projeví zarudnutím nosní sliznice a jejím zduřením, zúžením nosních průduchů a rezistencí na podávání dalších dávek přípravku, a rhinitis medicamentosa (medikamentózní rýma). Dlouhodobé používání nosních dekonjestiv může vést k poškození slizničního epitelu s útlumem ciliární aktivity, což může vyvolat nevratné poškození se suchým zánětem nosní sliznice s pocitem šimrání v nose. Proto by bez doporučení lékaře neměly být používány déle než sedm po sobě následujících dní.²¹



Obr. 5: Chemická struktura oxymetazolin hydrochloridu¹⁴

V České republice jsou v současnosti registrovány tyto přípravky s oxymetazolin hydrochloridem: Afrin, Nasivin, Nasivin Sensitive, Oxamet a Sinex Vicks Aloe a Eukalyptus.²² Jednotlivé nosní přípravky se liší aplikací, jedná se o nosní spreje nebo kapky, liší se také koncentrací oxymetazolin hydrochloridu v nich obsažených a použitím dalších pomocných látek a silic.

7 Experimentální část

7.1 Použité suroviny

Ultra čistá voda, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové.

Oxymetazolin hydrochlorid (OX1). BASF, číslo šarže: 007999AX11. (dar Zentiva Group, a.s.)

Oxymetazolin hydrochlorid (OX2). Ph. Eur. 7.0, OD 80012480 U1, číslo artiklu 3790802 (dar Teva Pharmaceuticals CR, s.r.o.)

7.2 Použité přístroje

Hustoměr DMA 4100M, Anton Paar GmbH, Rakousko.

Automatický semi-mikrosmometr K-7400, KNAUER GmbH, Německo.

Analytické váhy KERN ABJ 120-4M, KERN & Sohn GmbH, Německo. d = 0,1mg

Váhy Acculab Atilon ATL-4202-V, firma Sartorius Group, Německo. d = 0,01g

Mikropipeta EPPENDORF research, 20-200 μ l.

Ultrazvuková lázeň RK 106, Bandelin Sonorex, Německo.

7.3 Příprava roztoků

Připravila jsem si celkem 15 vzorků vodných roztoků oxymetazolin hydrochloridu (OX) o koncentracích od 0,25 až do 4,92 % (w/w). Zkoumala jsem dvě různé šarže od různých výrobců, které jsem si označila OX1 a OX2.

Na analytických vahách jsem navážila oxymetazolin hydrochlorid s přesností na 0,1 mg do vytárované kádinky a poté jsem dovážila do 30,0 g ultra čistou vodou na vahách s přesností 0,01 g. Po rozpuštění jsem roztok přelila do dobře uzavřené lahvičky. Roztoky jsem použila k měření hustoty a osmolality. Roztoky jsem připravovala vždy čerstvé.

7.4 Měření hustoty

Před samotným měřením jsem přístroj zapnula asi na 15 minut. Zkontrolovala jsem kalibrační hodnoty pro hustotu vzduchu při teplotě 20°C a vody pomocí ultra čisté vody, kterou jsem odpěnila v UZ lázni.

Hustotu každého vzorku jsem měřila při teplotách 20°C a 25°C. Každý vzorek jsem měřila pětkrát tak, že jsem pomocí stříkačky naplnila měřicí celu cca 1 ml vzorku. Před každým měřením daného vzorku jsem měřicí celu propláchla malým množstvím vzorku a zkontrolovala jsem, aby v cele nebyly žádné bubliny. Mezi jednotlivými vzorky jsem měřicí celu vždy propláchla vodou.

Na závěr všech měření jsem měřicí celu důkladně propláchla čištěnou vodou, přebytečnou vodu odstranila profouknutím vzduchem a přístroj vysušila.

Výsledky měření jsem zaznamenala, vypočítala průměrnou hodnotu a směrodatnou odchylku. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 1-4.

7.5 Měření osmolality

Osmometr by měl být před začátkem měření zapnutý alespoň 15 minut. Před samotným měřením bylo nutné kalibrovat osmometr ultra čistou vodou na 0 mOsmol/kg a standardním roztokem chloridu sodného na 400 mOsmol/kg. Tento roztok lze připravit rozpuštěním 12,684 g chloridu sodného v jednom kg ultra čisté vody.¹⁴

Před měřením je třeba osmometr kalibrovat pomocí kalibračních roztoků chloridu sodného o osmolalitě 100 - 700 mOsmol/kg. Složení kalibračních roztoků uvádí tabulka v Českém lékopise 2009 (2.2.35-1).¹⁴

Z naměřených hodnot jsem vypočítala kalibrační rovnici

$$y = 1,00969 \cdot x - 2,216667 \quad (9)$$

kde y je naměřená hodnota osmolality a x je ideální osmolalita podle lékopisu.

Při měření jsem naplnila měřicí zkumavku 0,15 ml roztoku vzorku pomocí mikropipety a opatrně jsem ji umístila na termistor. Stisknutím tlačítka Start jsem spustila měření. Po změření jsem zaznamenala výsledek a přepočítala pomocí

kalibrační rovnice (9) na hodnoty ideální osmolality m_{os} (mOsmol/kg). Zaznamenala jsem si rovněž kryoskopickou hodnotu.

Po měření je třeba opláchnout termistor a také měřicí zkumavku čištěnou vodou a oboje důkladně osušit.

Každý vzorek jsem měřila pětkrát a vypočítala jsem průměrnou hodnotu. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6 pro osmolalitu a v tabulkách 7 a 8 pro kryoskopickou hodnotu.



Obr. 6: Automatický semi-mikroosmometr K-7400, KNAUER GmbH, Německo. ²³

7.6 Zpracování výsledků

Výsledky měření jsem zpracovala v programu Excel. Spočítala jsem průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (SD), které jsou součástí tabulek.

Pro statistické zpracování výsledků měření osmolality a kryoskopické hodnoty a hodnocení vlivu opakování přípravy a šarže léčiva jsem využila dvoufaktorovou analýzu rozptylu (ANOVA). Výsledky jsem uvedla v tabulce 9 a 10.

Průměrné hodnoty hustoty při 20°C (293,16 K) jsem využila k odhadu osmotického tlaku π studovaných roztoků podle rovnice (2). ¹³ Průměrné hodnoty osmolality m_{os} , jsem využila k odhadu molálního osmotického koeficientu Φ pomocí rovnice (3). ¹⁷ Výsledky obou odhadů jsou zaznamenány v tabulce 12.

8 Výsledky

Tab. 1: Hustota ρ (g/cm^3) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX1 při 20°C.

c (% w/w)	hustota ρ (g/cm^3) při 20°C					
	1	2	3	4	průměr	SD ($\cdot 10^{-5}$)
0,25	0,9987	0,9987	0,9987	0,9987	0,9987	0,0
0,50	0,9991	0,9991	0,9991	0,9991	0,9991	1,9
0,75	0,9994	0,9994	0,9994	0,9994	0,9994	0,0
1,00	0,9998	0,9998	0,9998	0,9998	0,9998	1,9
1,25	1,0001	1,0001	1,0001	1,0001	1,0001	0,0
1,50	1,0004	1,0004	1,0005	1,0005	1,0004	5,2
1,75	1,0008	1,0008	1,0008	1,0008	1,0008	0,0
2,00	1,0012	1,0012	1,0012	1,0012	1,0012	1,1
2,25	1,0015	1,0015	1,0015	1,0015	1,0015	0,0
2,50	1,0019	1,0019	1,0019	1,0019	1,0019	0,0
3,00	1,0026	1,0026	1,0026	1,0026	1,0026	0,0
3,50	1,0033	1,0033	1,0033	1,0033	1,0033	0,0
4,00	1,0040	1,0040	1,0040	1,0040	1,0040	0,0
4,50	1,0047	1,0047	1,0047	1,0047	1,0047	0,0
4,92	1,0053	1,0053	1,0053	1,0054	1,0053	5,0

Tab. 2: Hustota ρ (g/cm^3) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX1 při 25°C.

c (% w/w)	hustota ρ (g/cm^3) při 25°C					
	1	2	3	4	průměr	SD ($\cdot 10^{-5}$)
0,25	0,9976	0,9976	0,9976	0,9976	0,9976	1,0
0,50	0,9979	0,9979	0,9979	0,9979	0,9979	0,0
0,75	0,9982	0,9982	0,9982	0,9982	0,9982	0,0
1,00	0,9986	0,9986	0,9986	0,9986	0,9986	0,0
1,25	0,9989	0,9989	0,9990	0,9989	0,9989	5,0
1,50	0,9993	0,9993	0,9993	0,9993	0,9993	1,2
1,75	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,0
2,00	1,0000	0,9999	0,9999	1,0000	1,0000	4,7
2,25	1,0003	1,0003	1,0003	1,0003	1,0003	0,0
2,50	1,0007	1,0006	1,0006	1,0007	1,0006	5,3
3,00	1,0013	1,0013	1,0013	1,0014	1,0013	4,4
3,50	1,0021	1,0020	1,0021	1,0021	1,0021	4,0
4,00	1,0028	1,0027	1,0028	1,0028	1,0028	4,4
4,50	1,0035	1,0035	1,0035	1,0034	1,0035	5,0
4,92	1,0041	1,0041	1,0041	1,0040	1,0041	4,0

Tab. 3: Hustota ρ (g/cm³) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX2 při 20°C.

c (% w/w)	hustota ρ (g/cm ³) při 20°C					
	1	2	3	4	průměr	SD ($\cdot 10^{-5}$)
0,25	0,9987	0,9987	0,9987	0,9987	0,9987	0,0
0,50	0,9991	0,9991	0,9990	0,9991	0,9991	3,7
0,75	0,9994	0,9994	0,9994	0,9994	0,9994	0,0
1,00	0,9998	0,9997	0,9997	0,9998	0,9997	4,9
1,25	1,0001	1,0001	1,0001	1,0001	1,0001	0,0
1,50	1,0004	1,0004	1,0004	1,0005	1,0004	4,8
1,75	1,0008	1,0008	1,0008	1,0008	1,0008	1,0
2,00	1,0011	1,0011	1,0011	1,0011	1,0011	0,0
2,25	1,0015	1,0015	1,0015	1,0015	1,0015	0,0
2,50	1,0019	1,0019	1,0018	1,0018	1,0019	3,5
3,00	1,0026	1,0026	1,0026	1,0026	1,0026	1,9
3,50	1,0033	1,0033	1,0033	1,0033	1,0033	1,0
4,00	1,0040	1,0040	1,0040	1,0040	1,0040	1,2
4,50	1,0047	1,0047	1,0047	1,0047	1,0047	0,0
4,92	1,0053	1,0053	1,0053	1,0053	1,0053	1,0

Tab. 4: Hustota ρ (g/cm^3) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX2 při 25°C.

c (% w/w)	hustota ρ (g/cm^3) při 25°C					
	1	2	3	4	průměr	SD ($\cdot 10^{-5}$)
0,25	0,9976	0,9976	0,9975	0,9975	0,9976	5,0
0,50	0,9979	0,9979	0,9979	0,9979	0,9979	0,0
0,75	0,9982	0,9982	0,9982	0,9982	0,9982	0,0
1,00	0,9986	0,9986	0,9986	0,9986	0,9986	1,0
1,25	0,9989	0,9989	0,9989	0,9989	0,9989	0,0
1,50	0,9993	0,9993	0,9993	0,9993	0,9993	1,6
1,75	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,9996	0,0
2,00	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,9999	0,0
2,25	1,0003	1,0003	1,0003	1,0003	1,0003	0,0
2,50	1,0006	1,0006	1,0006	1,0006	1,0006	0,0
3,00	1,0013	1,0013	1,0013	1,0013	1,0013	0,0
3,50	1,0020	1,0020	1,0020	1,0020	1,0020	0,0
4,00	1,0027	1,0027	1,0027	1,0027	1,0027	0,0
4,50	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034	1,0034	1,9
4,92	1,0040	1,0040	1,0041	1,0041	1,0040	4,0

Tab. 5: Vliv koncentrace c (% w/w) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX1 na osmolalitu m_{os} (mOsmol/kg).

c (% w/w)	osmolalita OX1 (mOsmol/kg)					
	1	2	3	4	průměr	SD
0,25	18,6	19,2	17,2	18,0	18,3	0,85
0,50	38,6	36,5	36,5	35,9	36,9	1,22
0,75	51,9	51,5	51,1	50,7	51,3	0,51
1,00	69,5	67,2	65,0	64,6	66,6	2,28
1,25	85,6	82,4	82,2	81,8	83,0	1,73
1,50	95,9	98,1	98,1	97,7	97,4	1,04
1,75	114,3	111,1	112,7	112,7	112,7	1,29
2,00	130,0	125,8	125,6	125,2	126,6	2,23
2,25	143,4	139,3	140,9	140,7	141,0	1,73
2,50	159,9	153,5	153,5	154,5	155,4	3,04
3,00	187,4	183,2	182,3	184,2	184,3	2,23
3,50	213,3	212,8	209,8	210,6	211,6	1,71
4,00	240,9	237,3	235,0	238,3	237,9	2,44
4,50	272,2	266,6	263,6	265,4	267,0	3,69
4,92	296,9	289,0	291,0	287,6	291,1	4,10

Tab. 6: Vliv koncentrace c (% w/w) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX2 na osmolalitu m_{os} (mOsmol/kg).

c (% w/w)	osmolalita OX2 (mOsmol/kg)					
	1	2	3	4	průměr	SD
0,25	17,6	17,4	17,8	21,4	18,6	1,89
0,50	36,3	38,4	34,9	37,1	36,7	1,49
0,75	51,5	48,3	45,6	52,1	49,4	3,03
1,00	67,4	63,6	65,4	69,1	66,4	2,40
1,25	84,6	79,4	82,6	85,0	82,9	2,53
1,50	98,1	97,7	91,9	102,4	97,5	4,31
1,75	109,4	110,5	105,4	117,3	110,6	4,94
2,00	129,4	128,6	126,6	125,6	127,5	1,74
2,25	142,8	143,0	142,2	140,9	142,2	0,98
2,50	155,1	155,7	153,9	155,3	155,0	0,77
3,00	172,3	179,7	181,7	183,0	179,2	4,76
3,50	213,3	208,8	213,2	211,6	211,7	2,10
4,00	237,9	240,3	238,1	237,7	238,5	1,20
4,50	266,4	264,3	263,3	262,7	264,2	1,65
4,92	289,8	288,4	285,1	287,6	287,7	2,00

Tab. 7: Vliv koncentrace c (% w/w) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX1 na kryoskopickou hodnotu ΔT .

c (% w/w)	kryoskopická hodnota OX1 (°C)					
	1	2	3	4	průměr	SD
0,25	0,031	0,032	0,028	0,029	0,030	0,0018
0,50	0,068	0,064	0,064	0,063	0,065	0,0024
0,75	0,093	0,093	0,092	0,091	0,092	0,0010
1,00	0,126	0,122	0,118	0,117	0,121	0,0041
1,25	0,156	0,150	0,150	0,149	0,151	0,0033
1,50	0,175	0,180	0,180	0,179	0,178	0,0021
1,75	0,210	0,204	0,207	0,207	0,207	0,0024
2,00	0,239	0,232	0,231	0,232	0,234	0,0037
2,25	0,264	0,257	0,260	0,259	0,260	0,0031
2,50	0,295	0,284	0,284	0,285	0,287	0,0056
3,00	0,347	0,339	0,337	0,341	0,341	0,0042
3,50	0,395	0,394	0,388	0,390	0,392	0,0033
4,00	0,447	0,440	0,436	0,442	0,441	0,0045
4,50	0,505	0,495	0,489	0,493	0,495	0,0070
4,92	0,552	0,537	0,540	0,534	0,541	0,0076

Tab. 8: Vliv koncentrace c (% w/w) roztoků oxymetazolin hydrochloridu OX2 na kryoskopickou hodnotu ΔT .

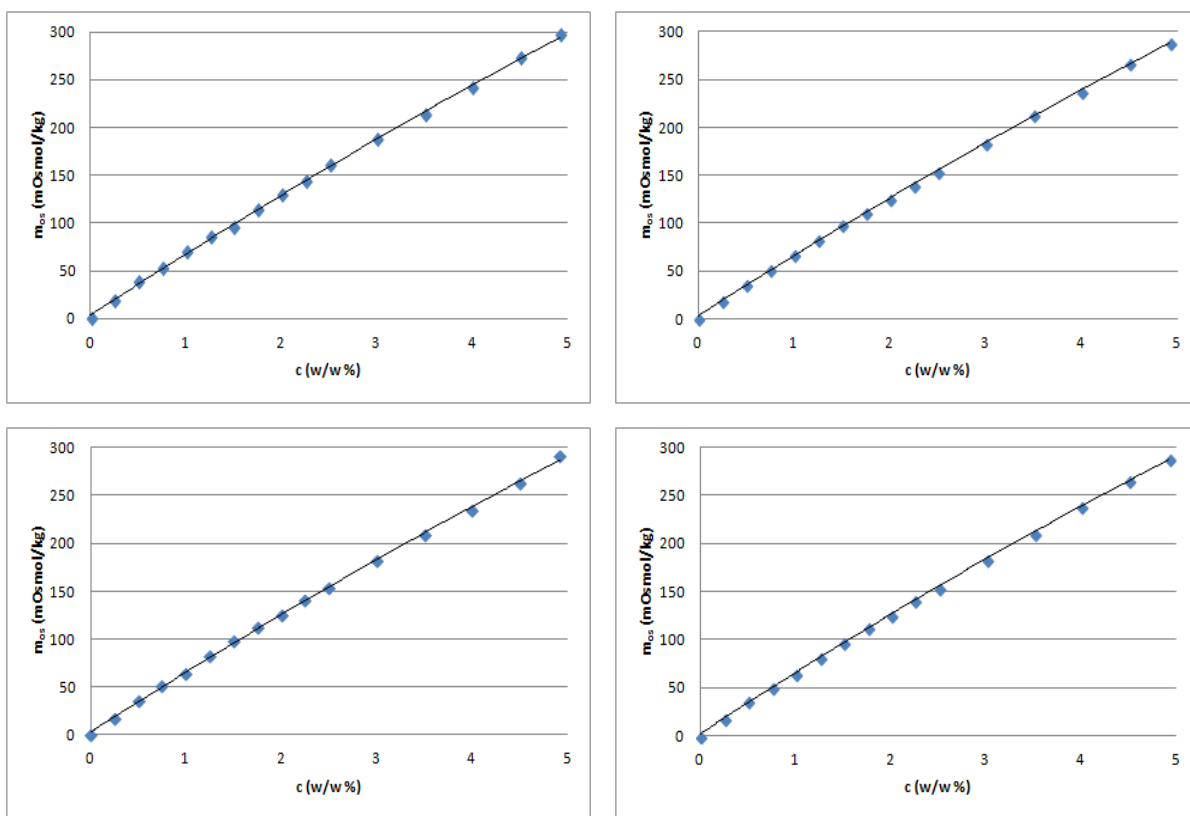
c (% w/w)	kryoskopická hodnota OX2 (°C)					
	1	2	3	4	průměr	SD
0,25	0,029	0,029	0,030	0,036	0,031	0,0034
0,50	0,064	0,068	0,061	0,065	0,065	0,0030
0,75	0,093	0,086	0,081	0,094	0,089	0,0058
1,00	0,122	0,115	0,119	0,125	0,120	0,0044
1,25	0,154	0,144	0,150	0,155	0,151	0,0049
1,50	0,180	0,179	0,168	0,187	0,179	0,0079
1,75	0,200	0,203	0,193	0,215	0,203	0,0092
2,00	0,238	0,236	0,233	0,231	0,235	0,0031
2,25	0,263	0,263	0,262	0,260	0,262	0,0017
2,50	0,286	0,287	0,284	0,287	0,286	0,0013
3,00	0,315	0,332	0,336	0,338	0,331	0,0105
3,50	0,395	0,387	0,395	0,392	0,392	0,0040
4,00	0,441	0,446	0,441	0,441	0,442	0,0023
4,50	0,495	0,490	0,488	0,488	0,490	0,0031
4,92	0,539	0,536	0,529	0,534	0,535	0,0039

Tab. 9: Výsledky dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pro hodnocení vlivu opakování přípravy a šarže léčiva na hodnoty osmolality.

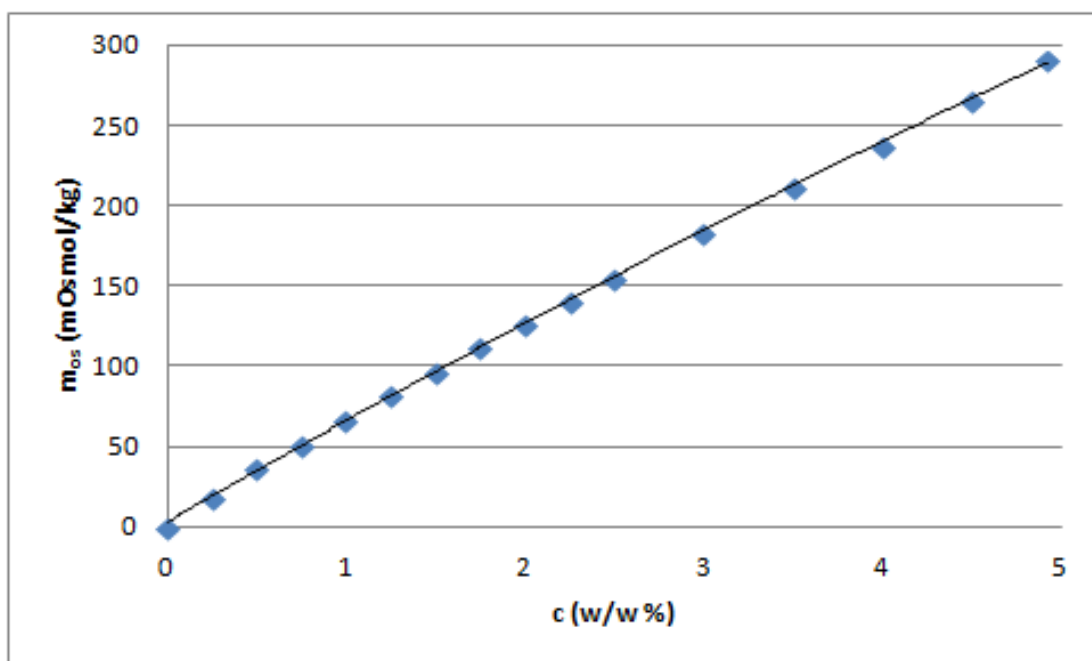
Příčina rozptylu	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina významnosti	F-kritická
šarže	22,445	1,00	22,445	0,00315	0,95	3,92583
opakování	109,094	3,00	36,365	0,00510	≥0,99	2,68564
interakce	76,540	3,00	25,513	0,00358	≥0,99	2,68564
reziduum	798182,435	112,00	7126,629			
celkem	798390,514	119,00				

Tab. 10: Výsledky dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) pro hodnocení vlivu opakování přípravy a šarže léčiva na kryoskopické hodnoty.

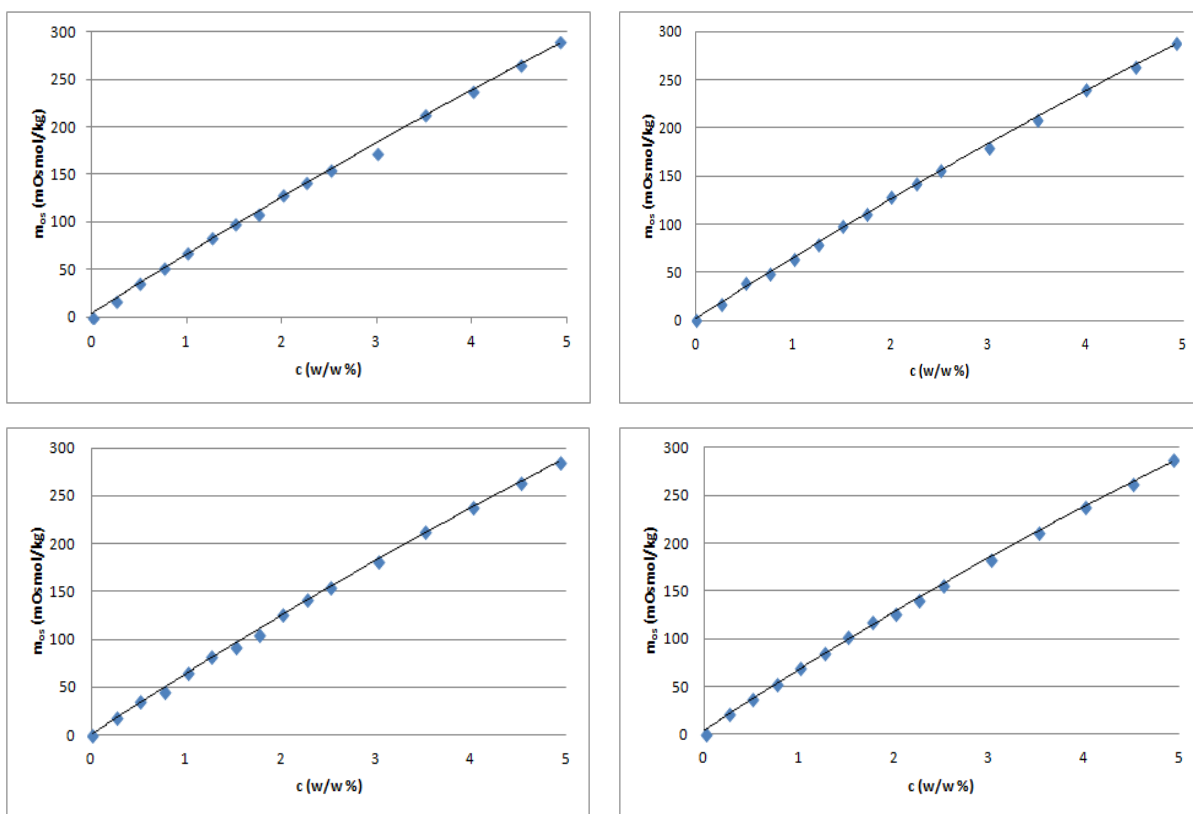
Příčina rozptylu	Součet čtverců	Stupně volnosti	Průměrný čtverec	F-hodnota	Hladina významnosti	F-kritická
šarže	$8,6 \cdot 10^{-5}$	1,00	$8,6 \cdot 10^{-5}$	0,00346	0,95	3,92583
opakování	0,00036	3,00	0,00012	0,00486	≥0,99	2,68564
interakce	0,00028	3,00	$9,17 \cdot 10^{-5}$	0,00368	≥0,99	2,68564
reziduum	2,79444	112,00	0,02495			
celkem	2,79517	119,00				



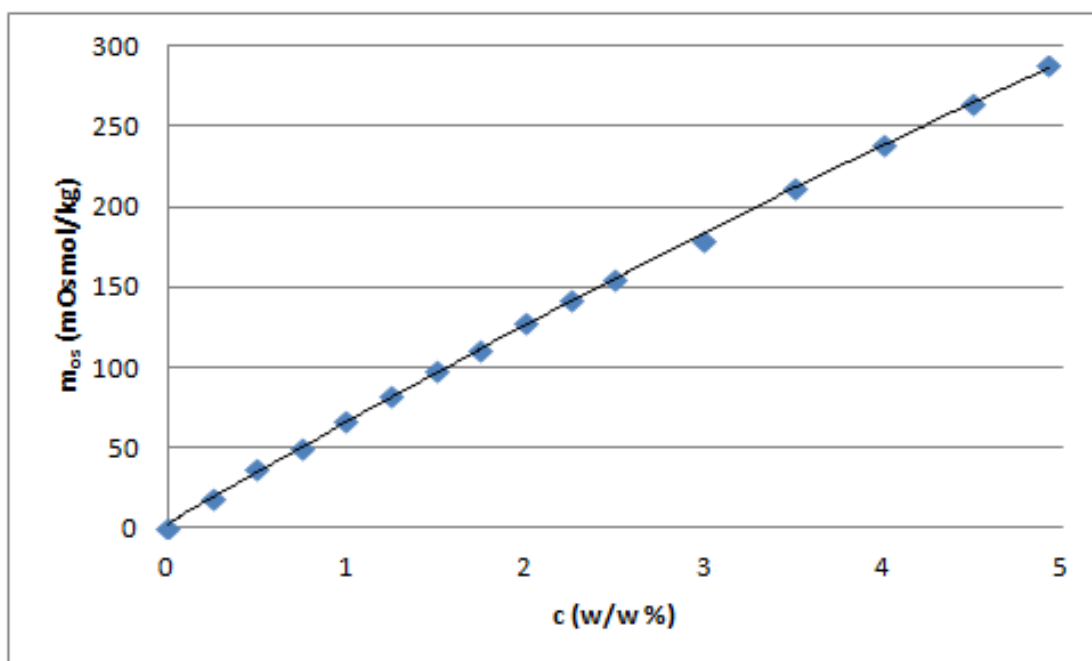
Obr. 7: Vliv koncentrace roztoků vzorků OX1 na osmolalitu.



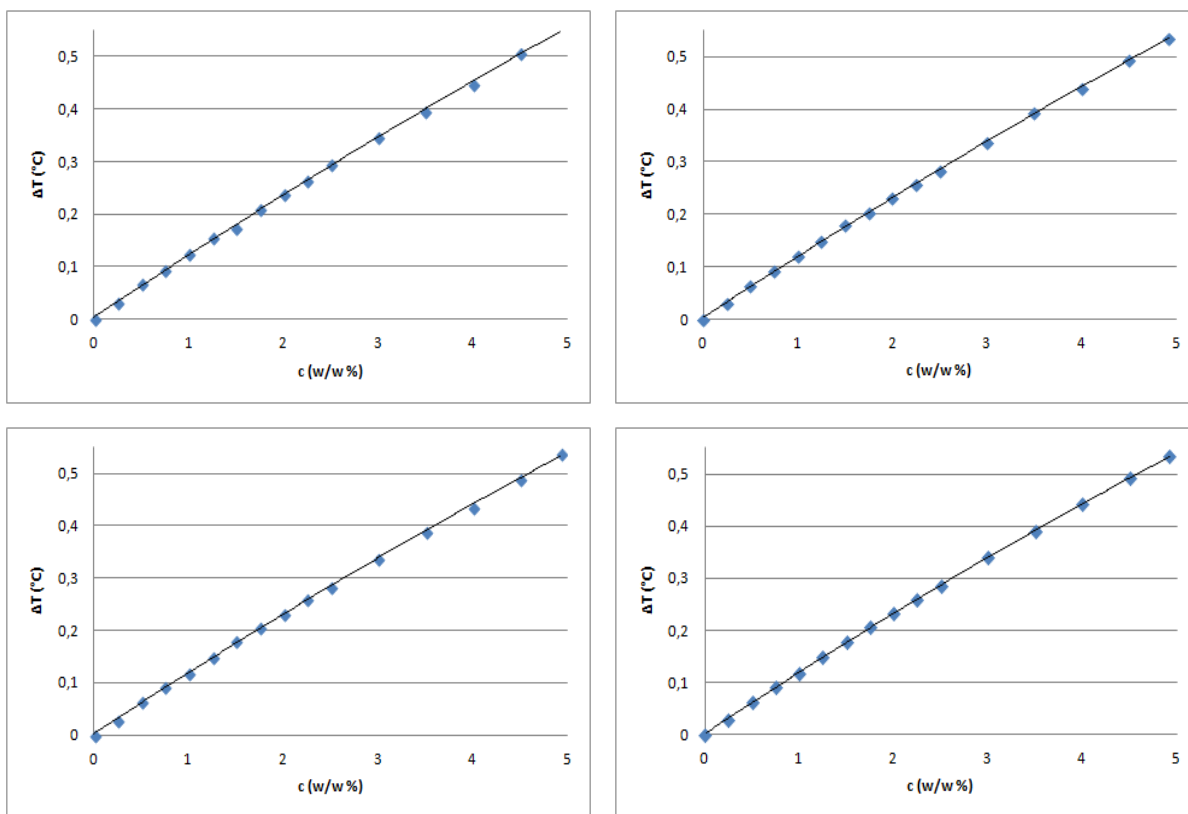
Obr. 8: Závislost průměrné hodnoty osmolality ($n = 4$) na koncentraci vzorků OX1.



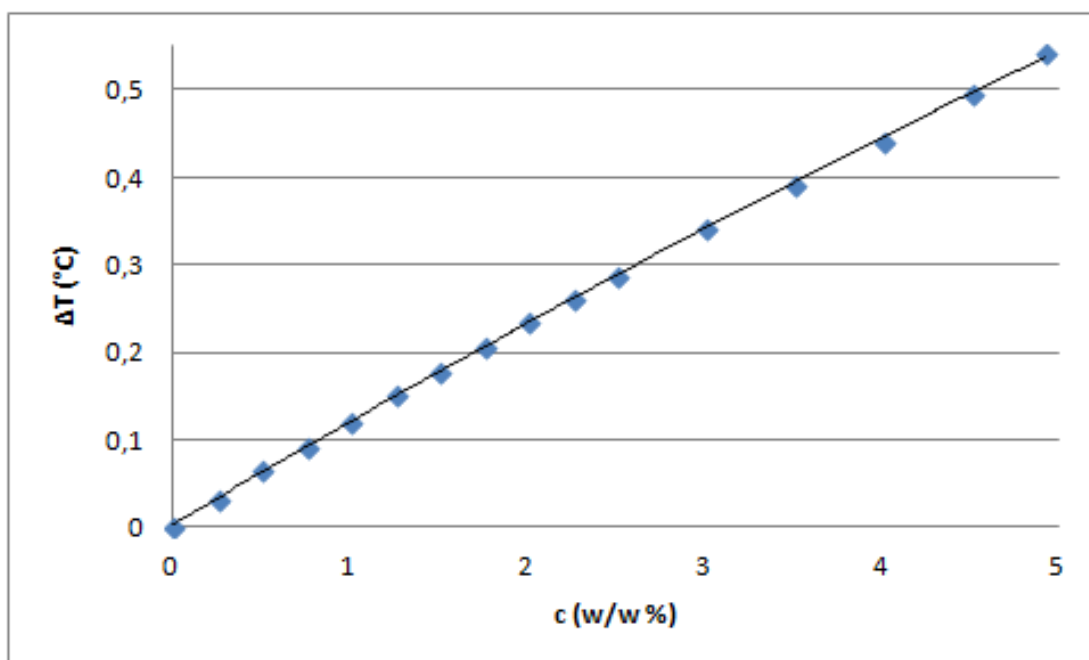
Obr. 9: Vliv koncentrace roztoků vzorků OX2 na osmolalitu.



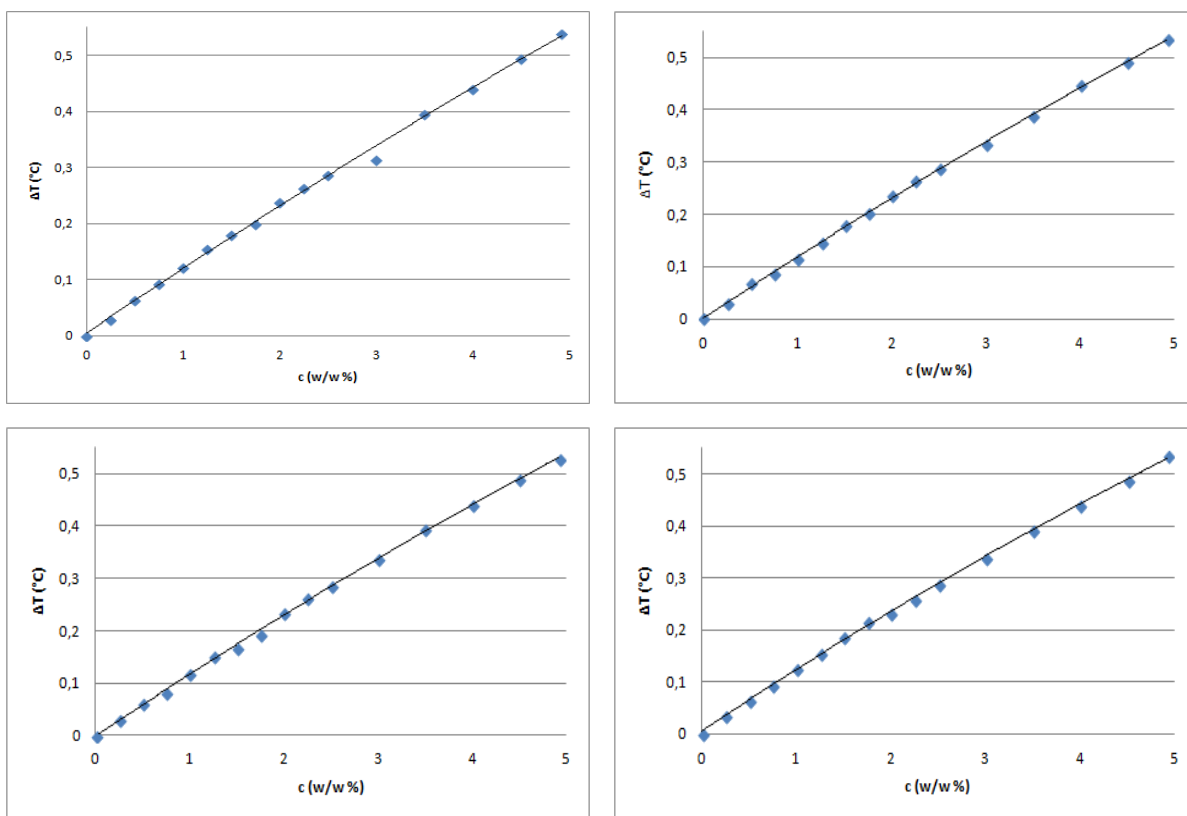
Obr. 10: Závislost průměrné hodnoty osmolality ($n = 4$) na koncentraci vzorků OX2.



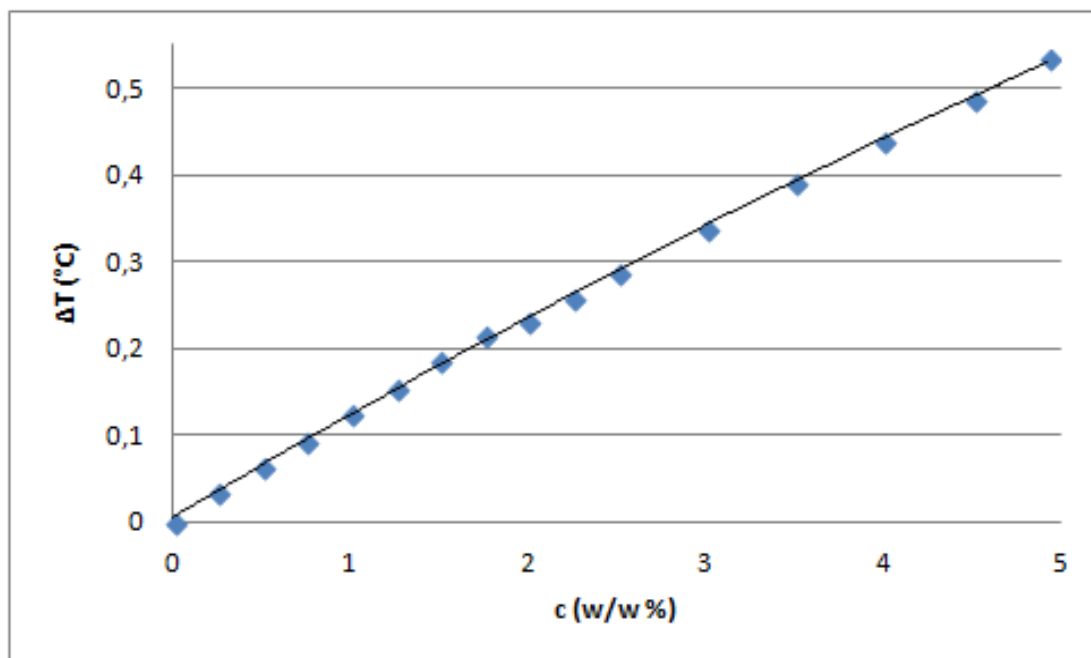
Obr. 11: Vliv koncentrace roztoků vzorků OX1 na kryoskopickou hodnotu.



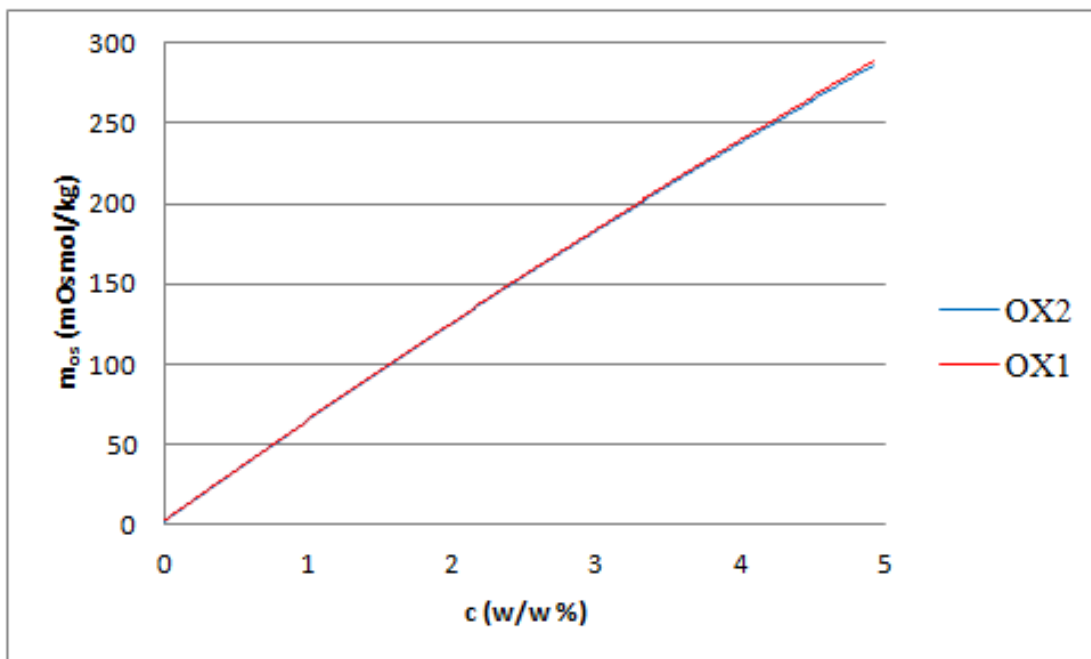
Obr. 12: Závislost průměrné kryoskopické hodnoty ($n = 4$) na koncentraci vzorků OX1.



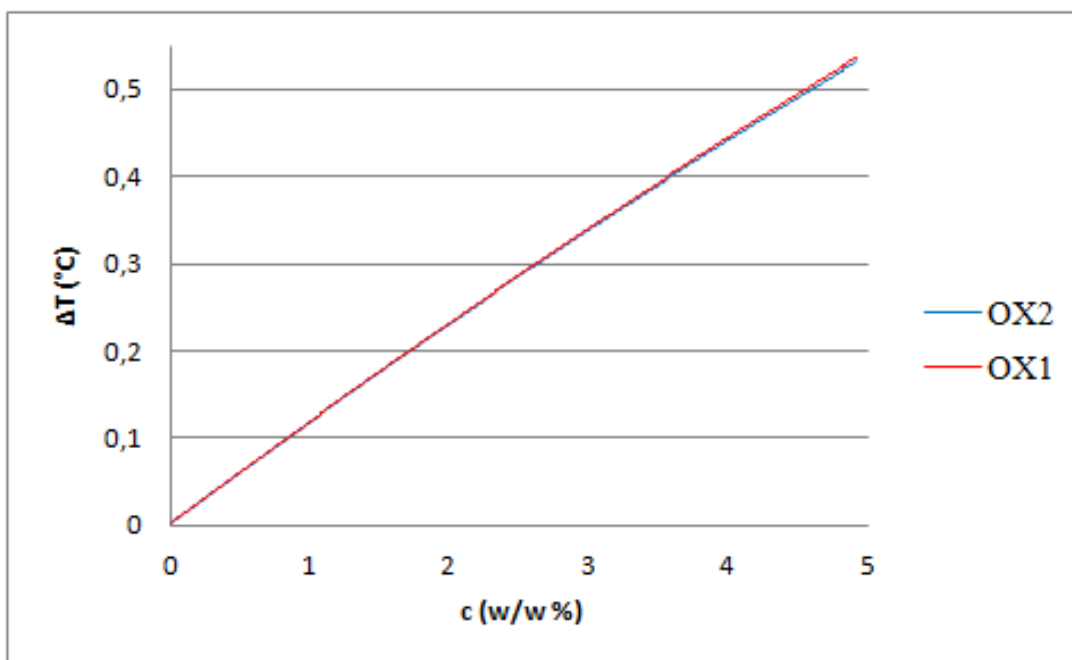
Obr. 13: Vliv koncentrace roztoků vzorků OX2 na kryoskopickou hodnotu.



Obr. 14: Závislost průměrné kryoskopické hodnoty ($n = 4$) na koncentraci vzorků OX2.



Obr. 15: Závislost průměrné hodnoty osmolality ($n = 4$) na koncentraci vzorků šarží OX1 a OX2.



Obr. 16: Závislost průměrné kryoskopické hodnoty ($n = 4$) na koncentraci vzorků šarží OX1 a OX2.

Tab. 11: Porovnání experimentálně získaných hodnot kryoskopické hodnoty ΔT ($n = 8$) a odhadu ΔT z rovnice (4).

c (% w/w)	ΔT	odhad ΔT	rozdíl
0,25	0,031	0,034	0,004
0,50	0,065	0,068	0,004
0,75	0,090	0,094	0,003
1,00	0,120	0,124	0,003
1,25	0,151	0,154	0,003
1,50	0,178	0,181	0,003
1,75	0,205	0,208	0,003
2,00	0,234	0,236	0,002
2,25	0,261	0,263	0,002
2,50	0,287	0,289	0,002
3,00	0,336	0,338	0,002
3,50	0,392	0,394	0,002
4,00	0,442	0,443	0,001
4,50	0,493	0,494	0,001
4,92	0,538	0,538	0,001

Tab. 12: Odhad osmotického tlaku Π a molálního osmotického koeficientu Φ roztoků oxymetazolin hydrochloridu z rovnice (2).

c (% w/w)	m (mol/kg)	m_{os} (Osmol/kg)	h₂₀ (kg/m ³)	Φ (-)	Π (kPa)
0,25	74,2	0,018	998,7	0,1242	44,9
0,50	148,4	0,037	999,1	0,1238	89,5
0,75	222,6	0,050	999,4	0,1131	122,7
1,00	296,8	0,066	999,8	0,1120	162,0
1,25	371,1	0,083	1000,1	0,1118	202,2
1,50	445,3	0,097	1000,4	0,1095	237,7
1,75	519,5	0,112	1000,8	0,1075	272,4
2,00	593,7	0,127	1001,1	0,1070	310,1
2,25	667,9	0,142	1001,5	0,1060	345,8
2,50	742,1	0,155	1001,9	0,1046	379,0
3,00	890,5	0,182	1002,6	0,1020	444,1
3,50	1038,9	0,212	1003,3	0,1019	517,6
4,00	1187,4	0,238	1004,0	0,1003	582,9
4,50	1335,8	0,266	1004,7	0,0994	650,3
4,92	1460,5	0,289	1005,3	0,0991	709,2

9 Diskuse

Vzájemné porovnávání osmotického tlaku roztoků, nebo-li hodnocení izotonie, je významné především z hlediska přípravy vodných parenterálních, nosních a očních přípravků. Aplikuje-li se např. do oka přípravek, jehož osmotický tlak se výrazně liší od osmotického tlaku slzní tekutiny, přípravek dráždí oko a působí bolest. Proto je důležité upravit osmotický tlak očních kapek tak, aby byly pokud možno izosmotické. Rovněž vodné nosní kapky jsou obvykle izosmotické, aby nedocházelo k dráždění a porušování funkce nosní sliznice a jejích řasinek.

Složení hypoosmotických (hypotonických) očních roztoků se upravuje přidáním potřebného množství vhodné pomocné látky, nejčastěji chloridu sodného, popř. dusičnanu draselného, glukosy. Při výpočtu potřebného množství izotonizační přísady se nejčastěji vychází ze snížení teploty tuhnutí roztoku, tj. kryoskopické hodnoty, ΔT .²

Cílem této experimentální diplomové práce bylo zpracovat podklady pro rozšíření Tabulky VIII Národní části Českého lékopisu 2009. V této experimentální práci jsem proto měřila hustotu, kryoskopickou hodnotu a osmolalitu roztoků oxymetazolin hydrochloridu, o různých koncentracích v rozmezí 0,25-4,92 % w/w. Rozsah koncentrací připravovaných roztoků jsem určila podle koncentrací používaných v Tabulce VIII Českého lékopisu 2009.¹⁴ Předpokládanou izotonickou koncentrací 4,92 % w/w jsem zjistila ze zahraničních zdrojů.^{24, 25}

Oxymetazolin hydrochlorid se u nás v ČR v současné době používá pouze v nosních kapkách a sprejích např. Nasivin, Nasivin sensitive, Oxamet a dalších, v koncentracích 0,01-0,05 %. V koncentraci 0,025 % je dostupný v zahraničí v očních kapkách Ocuclear, Visine LR.²⁶

Předpokladem zpracování dat pro lékopisnou tabulku je použití nejméně dvou odlišných šarží léčivé látky. Využila jsem daru dvou českých výrobců. Šarže jsem si označila OX1 a OX2. Z každé šarže jsem připravila čtyři vzorky vodných roztoků v již uvedeném koncentračním rozmezí, abych podchytila variabilitu v přípravě a mezi jednotlivými šaržemi. Roztoky jsem připravovala vždy čerstvé, kvantitativním rozpuštěním navážky a doplněním do 30,0 g ultračistou vodou.

Hustotu roztoků jsem měřila při 20 a 25°C. Výsledky jsou zaznamenány v tabulkách 1-4 pro každou teplotu a každou šarži odděleně, jsou doplněny průměrnou hodnotou a směrodatnou odchylkou (SD). Z výsledků vyplývá, že hustota roztoků se stoupající koncentrací roste, zatímco při stoupající teplotě se hustota roztoků snižuje. V řadě předchozích diplomových prací byla závislost hustoty na teplotě optimálně charakterizována rovnicí kvadratické regrese.

Osmolalitu a kryoskopickou hodnotu jsem měřila na automatickém semi-mikro osmometru. Průměrné hodnoty osmolality pro čtyři opakování připravených roztoků OX1 jsou uvedeny v tabulce 5 a analogicky pro OX2 v tabulce 6. Výsledky jsou doplněny průměrnou hodnotou a směrodatnou odchylkou (SD). Vliv koncentrace na osmolalitu jednotlivých vzorků obou šarží je znázorněn na obrázcích 7 a 9. Obrázky 8 a 10 ilustrují závislost průměrných hodnot ($n = 4$) osmolality na koncentraci. Kryoskopické hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7 pro OX1 a v tabulce 8 pro OX2, včetně průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (SD). Vliv koncentrace na kryoskopickou hodnotu je znázorněn na obrázcích 11 a 13 pro dílčí měření OX1 a OX2, průměrné kryoskopické hodnoty čtyř měření jednotlivých šarží ukazují obrázky 12 a 14.

Z výsledků uvedených v tabulkách 5-8 a na obrázcích 7 - 14 nebyly zřejmé žádné podstatné rozdíly mezi šaržemi OX1 a OX2 a dílčími vzorky připravených roztoků. To potvrzují i obrázky 15 a 16, na nichž je znázorněna závislost osmolality a kryoskopické hodnoty na koncentraci OX1 a OX2. Z těchto obrázků je patrné, že mezi šaržemi není žádný rozdíl a křivky se téměř překrývají.

Pro vyjádření statistické významnosti variability mezi šaržemi a jednotlivě připravenými vzorky roztoků byly experimentálně zjištěné kryoskopické hodnoty a hodnoty osmolality zpracovány pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Výsledky dvoufaktorové analýzy rozptylu jsou uvedeny v tabulce 9 a 10. Na hladině významnosti $p \geq 0,95$ nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi hodnotami osmolality a/nebo kryoskopickými hodnotami pro jednotlivé šarže (inter-individuální rozdíly) ani mezi vzorky (intra-individuální rozdíly).

Z výsledků měření vyplývá, že osmolalita i kryoskopická hodnota roztoků OX se zvyšují s rostoucí koncentrací vzorků. Pro popis závislosti mezi koncentrací c (% w/w) a osmolalitou m_{os} (mOsmol/kg) nebo kryoskopickou hodnotou ΔT ($^{\circ}\text{C}$) byly použity průměrné hodnoty všech osmi měření. Závislost je nejlépe popsána rovnicemi kvadratické regrese (10 a 11) se shodným koeficientem determinace $R^2 = 0,9998$.

$$m_{os} = 64,596011 \cdot c + 2,750001 - 1,362855 \cdot c^2 \quad (10)$$

$$\Delta T = 0,119458 \cdot c + 0,002726 - 0,002295 \cdot c^2 \quad (11)$$

Z těchto rovnic je možný odhad osmolality nebo kryoskopické hodnoty pro potřebnou koncentraci roztoků.

Závislost mezi kryoskopickou hodnotou a osmolalitou popisuje rovnice (4).¹⁴ Porovnání experimentálně zjištěných kryoskopických hodnot ΔT s odhadem z hodnot osmolality je uveden v tabulce 11. Vyjádřené rozdíly v řádu tisícin jsou zanedbatelné. Známe-li osmolalitu, můžeme pomocí rovnice (4) vypočítat kryoskopickou hodnotu látky.

Průměrné hodnoty osmolality m_{os} jsem využila k odhadu osmotického koeficientu Φ podle rovnice (3). Výsledky jsou zaznamenány v tabulce 12. Z výsledků vyplývá, že molální osmotický koeficient klesá s rostoucí molalitou. Experimentálně zjištěné průměrné hodnoty hustoty roztoků oxymetazolin hydrochloridu při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($293,16\text{ K}$) byly využity k odhadu osmotického tlaku Π pomocí rovnice (2)¹³. Závislost mezi procentní koncentrací roztoku oxymetazolin hydrochloridu a osmotickým tlakem nejlépe popisuje rovnice kvadratické regrese (12) s koeficientem determinace $R^2 = 0,9998$.

$$\Pi = 157,232798 \cdot c + 6,658865 - 3,121618 \cdot c^2 \quad (12)$$

Výsledky jsou prezentovány v tabulce 12.

Výsledky diplomové práce byly porovnány s literárními údaji,²⁵ dostupnými pro oxymetazolin hydrochlorid. Rozdíly mezi experimentálně získanými kryoskopickými hodnotami ΔT a ΔT_{lit} ukazuje tabulka 13, ze které je zřejmé, že rozdíly jsou zanedbatelné.

Tab. 13: Rozdíly mezi experimentálně zjištěnou kryoskopickou hodnotou ΔT a $\Delta T_{lit.}$ ²⁵

c (%)	0,5	1	2	3
ΔT	0,065	0,120	0,234	0,336
$\Delta T_{lit.}$	0,063	0,124	0,232	0,335

Jak již bylo zmíněno dříve, byly zahraniční izotonizační tabulky využity také při vyhledání izotonické koncentrace oxymetazolin hydrochloridu. Referovaná koncentrace byla 4,92 %. Výsledky této práce ukazují, že tato koncentrace je slabě hypertonická ($\Delta T = 0,538$). Pomocí rovnice (11) a standardní kryoskopické hodnoty $0,520^{\circ}\text{C}$ pro izotonický roztok¹⁴ jsem spočítala izotonickou koncentraci oxymetazolin hydrochloridu 4,77 % w/w. Rozdíl mezi zjištěnými izotonickými koncentracemi může být dán odlišným uváděním koncentrací roztoků. V ČR se používají přednostně hmotnostně hmotnostní procenta (% w/w), neboť příprava probíhá hmotnostně, zatímco v uvedených izotonizačních tabulkách byla použita koncentrace hmotnostně objemová (% w/v).²⁵

K ověření zjištěné závislosti mezi koncentrací a osmolalitou/kryoskopickou hodnotou (rovnice 4) jsem připravila 0,01; 0,025 a 0,05%ní roztoky oxymetazolin hydrochloridu, které jsem izotonizovala přidavkem chloridu sodného.¹⁴ Kryoskopické hodnoty pro tak nízké koncentrace jsem vypočítala pomocí rovnice (11). U takto připravených roztoků jsem změřila osmolalitu a kryoskopickou hodnotu. Složení roztoků a výsledky jsou uvedeny v tabulce 14. Je zřejmé, že výsledky jsou blízké izotonickým hodnotám m_{os} 286 mOsmol/kg a ΔT 0,520.

Tab. 14: Experimentální ověření výsledků pomocí izotonizovaných roztoků oxymetazolin hydrochloridu

c (% w/w)	ΔT	m_{os}
0,010	0,524	282,4
0,025	0,533	287,6
0,050	0,530	285,8
4,770	0,526	283,8

10 Závěry

Z výsledků této experimentální diplomové práce vyplývají následující závěry:

- 1) Pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) byla prokázána nevýznamnost rozdílů mezi šaržemi oxymetazolin hydrochloridu a připravenými vzorky roztoků ($p \geq 0,95$).
- 2) Hodnota osmolality se zvyšuje se stoupající koncentrací roztoků oxymetazolin hydrochloridu v rozmezí 0,25 - 4,92 % w/w. Závislost byla popsána rovnicí kvadratické regrese (10) s koeficientem determinace $R^2 = 0,9998$. Z této rovnice je možný odhad osmolality pro známou koncentraci.
- 3) S rostoucí koncentrací vodných roztoků oxymetazolin hydrochloridu v rozmezí 0,25 - 4,92 % w/w kryoskopická hodnota stoupá. Závislosti mezi koncentrací a kryoskopickou hodnotou byla popsána rovnicí kvadratické regrese (11) s koeficientem determinace $R^2 = 0,9998$, která umožňuje odhad ΔT roztoku pro známou koncentraci.
- 4) Hodnoty osmolality umožnily odhad molálního osmotického koeficientu, jehož hodnota s rostoucí koncentrací klesá.
- 5) Průměrné hustoty roztoků při 20°C byly využity k odhadu osmotického tlaku roztoků. Závislost mezi koncentrací roztoku a osmotickým tlakem byla popsána rovnicí kvadratické regrese (12) s koeficientem determinace $R^2 = 0,9998$, která umožňuje odhad osmotického tlaku pro známou koncentraci.
- 6) Byla zjištěna shoda mezi experimentálně získanými kryoskopickými hodnotami a hodnotami uvedenými v literárních zdrojích.
- 7) Z rovnice (11) byla určena izotonická koncentrace oxymetazolin hydrochloridu 4,77 % w/w.
- 8) Byla ověřena přesnost odhadu kryoskopické hodnoty z osmolality roztoku oxymetazolin hydrochloridu v rozmezí 0,25 - 4,92 % w/w. Rovnice (4) umožňuje vzájemný převod obou veličin.

11 Použitá literatura

- 1 JABOR, A.: *Vnitřní prostředí*. 1. vyd. Praha: Grada, 2008, 530 S, ISBN 978-802-4712-215.
- 2 KOMÁREK, P., RABIŠKOVÁ, M. a kol.: *Technologie léků: galenika.3.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006, 399 S, ISBN 80-7262-423-7.
- 3 ROZSÍVAL, P.: *Oční lékařství*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2006, 373 S. ISBN: 80-7262-40-40.
- 4 FLORENCE, A. T., SIEPMANN, J. (eds): *Modern pharmaceuticals, vol. 2 Applications and advances*, New York, 2009. 510 S., ISBN: 1-4200-6566-1, *Design and evaluation of ophthalmic pharmaceutical products*, s. 107 - 111.
- 5 <http://www.drugstore.com/visine-l-r-long-lasting-redness-relief-eye-drops/qxp12392> (6. 2. 2013)
- 6 <http://www.socialgrocery.com/products/OcuClear/Redness-Reliever-Eye-Drops> (6. 2. 2013)
- 7 <http://www.nasivin.cz/produkty/nasivin-sensitive-0-05> (6. 2. 2013)
- 8 http://monka.hysteria.cz/marko/domaci_lekar/horecka/ryma_leky.html (6. 2. 2013)
- 9 <http://www.vicks.cz/vyrobky/sinex-nosni-sprej/?accessible=true> (6. 2. 2013)
- 10 GUYTON AC: *Textbook of medical physiology*, 5th ed., Philadelphia: WB Saunders, 1976. s. 46 - 49, s. 431 - 433.
- 11 DANIELS, F., ALBERTY, R.: *Physical chemistry*, 3rd ed. New York: John Wiley, 1967. s. 170 - 172.
- 12 TROY, D.B. (Ed.): *Remington: The science and practice of pharmacy*. 21st Ed., Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005, 2393 S, ISBN 0-7817-4673-6, *Solutions and phase equilibria*. s. 220 - 225.
- 13 UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION: *United States Pharmacopoeia - National formulary* 35th Ed., 2012, Rockville, ISBN 978-1-936424-00-9, <785>, *Osmolality and osmolarity*, s. 335 - 336.
- 14 MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR: *Český lékopis 2009, Doplněk 2012*. Praha: Grada Publ., 3968 S, ISBN: 978-80-247-2994-7.

-
- 15 FLORENCE, A. T., ATTWOOD, D.: *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 4th Ed., Pharmaceutical Press, 2006, 492 S, ISBN: 0 85369 608 X, *Physicochemical properties of drugs in solution*, s. 56 - 74.
- 16 <http://chemistry.about.com/b/2012/11/04/osmotic-pressure-and-tonicity.htm> (4. 8. 2012)
- 17 DEARDORFF, D. L.: *Osmotic strength, osmolality, and osmolarity*. Am. J. Hosp. Pharm, 1980, vol. 37, s. 504 - 509.
- 18 TROJAN, S. a kol.: *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha, 2003, 772 S, ISBN: 8024704125, *Fyziologie žláz s vnitřní sekrecí*, s. 359.
- 19 NOVÁK, J. a kol.: *Fyzikální chemie - bakalářský a magisterský kurz*. VŠCHT Praha, 2008, 506 S, ISBN: 978-80-7080-675-3, *Fázové rovnováhy*, s. 207 - 208.
- 20 SWEETMAN, S. C. (Ed): *Martindale. The complete drug reference*. 37th Ed. London, Chicago: Pharm. Press, 2011. 4142 S. ISBN: 978 0 85369 933 0.
- 21 <http://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC12861.pdf&type=spc&as=oxamet-0-5-pm-spc> (6. 2. 2013)
- 22 <http://goo.gl/GI6Ef> (12. 3. 2013)
- 23 http://www2.knauer.net/e/e_index.html?cf='http://www2.knauer.net/cgi-bin/e_prodpage.pl?artnr=A3707&zusatz=with' (6. 2. 2013)
- 24 TROY, D. B. (Ed.): *Remington: The science and practice of pharmacy*. 20st Ed., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2393 s., ISBN 0-6833-0647-2, *Tonicity, osmoticity, osmolality, and osmolarity*. s. 259.
- 25 LUND, W. (Ed.): *British pharmaceutical codex*. 12th Ed., Pharmaceutical Press, London, 1994. 1117 S., ISBN: 08-536-9290-4, *Solution properties*, s. 60.
- 26 RHEE, D. J., COLBY, K. A., SOBRIN, L., RAPUANO, Ch. J.: *Ophthalmologic Drug Guide*. 2nd Ed., Springer, 2011, 138 S, ISBN: 978-1-4419-7620-8, *Miscellaneous*, s. 91.