

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

*Katedra farmaceutické technologie*

**OLIGOESTEROVÉ MATRICE  
S PROTIMIKROBNÍMI LÁTKAMI III.**

*Diplomová práce*

*Hradec Králové 2006*

*Klára Lazařová*

Děkuji PharmDr. Evě Šnejdové za odborné vedení a poskytnuté rady při vypracování diplomové práce.

Klára Lazařová

# Obsah

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>8</b>
4.1.	ŘÍZENÉ UVOLŇOVÁNÍ LÉČIV	8
4.2.	BIOADHEZE	8
4.3.	BIODEGRADACE	9
4.4.	FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIOADHEZI	11
4.4.1.	<i>Faktory související s polymerem</i>	11
4.4.2.	<i>Faktory související s prostředím</i>	11
4.4.3.	<i>Fyziologické faktory</i>	12
4.5.	POLYMERY POUŽÍVANÉ V BIOADHEZIVNÍCH TERAPEUTICKÝCH SYSTÉMECH	12
4.6.	KYSELINA POLYGLYKOLOVÁ, POLYMLÉČNÁ A JEJICH KOPOLYMERY	12
4.6.1.	<i>Příprava mikročástic</i>	14
4.7.	MYKOTICKÉ INFEKCE (MYKÓZY)	15
4.8.	ANTIFUNGÁLNÍ LÁTKY	16
4.8.1.	<i>Polyeny</i>	16
4.8.2.	<i>Antimetabolity</i>	17
4.8.3.	<i>Azolová antimykotika</i>	17
4.8.4.	<i>Allylaminová antimykotika</i>	17
4.9.	FLUKONAZOL	17
4.10.	TERBINAFIN	18
<b>5.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>20</b>
5.1.	POUŽITÉ SUROVINY	20
5.2.	POUŽITÉ PŘÍSTROJE	20
5.3.	PRACOVNÍ POSTUP	20
5.3.1.	<i>Charakteristika nosičů</i>	20
5.3.2.	<i>Liberační medium</i>	21
5.3.3.	<i>Kalibrační přímka</i>	21
5.3.4.	<i>Příprava matric</i>	24
5.3.5.	<i>Disoluční test</i>	24
5.3.6.	<i>Stanovení liberovaných léčiv</i>	26
<b>6.</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>27</b>
6.1.	TABULKY	27
6.2.	GRAFY	39
<b>7.</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>61</b>
7.1.	LIBERACE FLUKONAZOLU Z NOSIČŮ ŘADY D	62
7.2.	LIBERACE FLUKONAZOLU Z NOSIČŮ ŘADY M	63
7.3.	VLIV TYPU VĚTVÍČÍ SLOŽKY NA LIBERACI FLUKONAZOLU	63

7.4. LIBERACE TERBINAFINU Z VĚTVENÝCH OLIGOESTERŮ .....	63
7.5. LIBERACE TERBINAFINU Z NOSIČŮ ŘADY D .....	64
7.6. LIBERACE TERBINAFINU Z NOSIČŮ ŘADY M .....	64
7.7. VLIV TYPU A KONCENTRACE VĚTVÍČÍ SLOŽKY NA LIBERACI TERBINAFINU .....	65
<b>8. ZÁVĚRY .....</b>	<b>66</b>
<b>9. SOUHRN .....</b>	<b>67</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>68</b>

## 1. Úvod

Výzkum a vývoj nové generace léčiv a lékových forem, které umožňují orgánově specifickou cílenou terapii je velmi důležitý. Takováto léčiva by měla být vyvíjena z biomolekul na bázi polymerních nosičů rozložitelných v těle na netoxické produkty. Tyto bioaktivní molekuly by měly být schopny dopravit léčivo na místo požadovaného účinku. Náhrada ztracených tkání a buněk je často jedinou možností jak zachránit život pacienta.

Výzkum se zaměřuje zvláště na molekuly nesoucí léčiva antibakteriální, antivirotická, imunomodulační a protizánětlivá a léčiva zvyšující účinnost chemoterapie nádorů.

Funkce polymerů určených pro použití v medicíně jejich distribuce, účinek či exkrece jsou výsledkem interakcí polymeru se složkami prostředí, v němž se nacházejí. Tyto interakce souvisí rovněž se strukturou polymeru, jeho chemickým složením, konformací řetězce, přítomností funkčních skupin apod. Studované materiály na bázi kopolymeru polylaktidu obsahují biologicky aktivní funkční skupiny, které ovlivňují adhezi buněk k povrchu polymeru. Je nutné důkladně prostudovat interakce polymeru a živých buněk a jejich využití pro vývoj nových biomateriálů a jejich využití v medicíně.

## 2. Seznam zkratek

D .....	dipentaerythritol
DLLA .....	kyselina mléčná
DL-PLA .....	kyselina polymléčná složená z racemické směsi izomerů
GA .....	kyselina glykolová
L-PLA .....	kyselina polymléčná složená z L-izomerů
M .....	mannitol
$M_n$ .....	číselný průměr molární hmotnosti
$M_w$ .....	hmotnostní průměr molární hmotnosti
PEG .....	polyethylenglykol
PGA .....	kyselina polyglykolová
PLA .....	kyselina polymléčná
PLGA .....	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
TEC .....	triethylcitrát

### 3. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo studium liberace terbinafinu a flukonazolu z oligoesterových nosičů pracovně označených 3M, 5M, 8M, 3D, 5D a 8D. Jedná se o terpolymery kyseliny D,L-mléčné, kyseliny glykolové a mannitolu nebo dipentaerythritolu.

Úkol diplomové práce lze rozdělit do následujících dílčích kroků:

1. Příprava matric o hmotnosti 150,0 mg složených z nosiče plastifikovaného 30% triethylcitrátu a ze 4% léčiva.
2. Studium liberace terbinafinu a flukonazolu z matric do fosfát citrátového pufru pH 5,0 při 37°C.
3. Porovnání průběhu liberace terbinafinu a flukonazolu z jednotlivých nosičů.

## 4. Teoretická část

### 4.1. Řízené uvolňování léčiv

Jedná se o systém transportu léčiv (Drug Delivery System), který může přesně kontrolovat uvolněné množství nebo zacílení (targeting) léčiv do specifického místa. Má veliký význam pro systém zdravotní péče. V posledních 20 letech došlo k významným objevům na poli specifických materiálů pro nové systémy uvolňování léčiv.<sup>1</sup>

Technologie přenašečů nabízí inteligentní postup pro uvolňování léčiv pomocí spojení léčiva s přenašečem, jako jsou mikrosféry, nanočástice, lipozomy atd. Ty moduluji uvolnění a absorpci daného léčiva. Mikrosféry se ukázaly jako vhodné díky své malé velikosti a účinnosti jako přenašeče.

### 4.2. Bioadheze

Obecně může být popsána jako připojení syntetických nebo biologických makromolekul k biologické tkáni. Adhezivní vazbu mohou tvořit: vrstva epitelálních buněk, souvislá mukózní vrstva nebo kombinace obou.<sup>2</sup>

Existují různé teorie vysvětlující mechanismus adheze:

- Elektronová - mechanismus zajišťují atrakční elektrostatické síly mezi glykoproteiny mucinu a bioadhezivním materiálem. Přenos elektronů nastává mezi dvěma zdvojenými vrstvami s elektrickým nábojem na rozhraní fází.
- Adsorpční - o chemické vazbě rozhodují povrchové síly. Silné primární síly – kovalentní vazby, slabé sekundární síly- iontové vazby, vodíkové vazby a van der Waalsovy síly.
- Teorie smáčení - bioadhezivní polymer je schopen se rozprostřít a vytvořit úzký kontakt s mukózní membránou. Kontaktní úhel mezi polymerem a buňkami musí být blízký nule.
- Difúzní - fyzikálními překážkami jsou proužky mucinu a flexibilní polymerní řetězce. Maximální difúze a bioadheze je dána podobnými parametry rozpustnosti ( $\delta$ ) polymeru i mukózního glykoproteinu.
- Teorie zlomu - analyzuje maximální tahovou sílu, která vzniká při odlučování bioadhezivního systému pro uvolňování léčiv od mukózního povrchu.



### 4.3. Biodegradace

Biodegradací, jak ji definovali Albertsson a Karlsson<sup>3</sup>, se rozumí proces, kdy jsou polymery rozkládány aktivitou enzymů, jsou rozkládány chemicky ve spojení s živými organismy ( bakterie, houby) nebo produkty jejich sekrece. Mikrobiologický rozklad může být způsoben jak exoenzymy, tak endoenzymy nebo produkty jejich chemické či biochemické činnosti. Polymery mohou podlehnout rozkladu také působením jiných reakcí ( fotolýza, oxidace, hydrolýza), tyto reakce mohou také proběhnout před biodegradací nebo v jejím průběhu.

Biodegradace<sup>4</sup> je přirozený proces, kterým jsou chemické látky převáděny na jednodušší sloučeniny, jsou mineralizovány, jsou přerozdělovány pomocí základních cyklů uhlíku, dusíku, síry ( karbon, nitrogen, sulphur cycles). Biodegradace může probíhat jen za předpokladu, že biosféra a mikroorganismy hrají v tomto procesu hlavní roli. Úplná mineralizace v praxi pravděpodobně nikdy neproběhne u většiny přírodních polymerů. Definice / norma ISO 472: 1988 definuje biodegradabilní polymer, ve kterém je změna v chemické struktuře je výsledkem činnosti přirozeně se vyskytujících mikroorganismů.

Chemická struktura substrátu je pro enzymatický účinek velmi důležitá. Aktivita enzymů může být ovlivněna i fyzikálními faktory uvnitř organismu: pH 6-8, koncentrace solí 0,15 mol (0,9% NaCl), teplota 35-40°C. I minimální změna těchto parametrů je schopna enzym zcela inaktivovat či enzym zničit.

V případě inertních organických molekul (lignin, guma) je počátečním krokem degradace oxidace, která redukuje molekulovou hmotnost až na hodnotu potřebnou pro uskutečnění biodegradace.<sup>5,6</sup>

Hydrolýzou se rozumí rozklad molekuly polymeru na menší části za přítomnosti vody. Hydrolýze podléhají sloučeniny, které obsahují hydrolyticky nestabilní vazby (hydroxylové skupiny jsou velmi reaktivní). V řetězci polymeru je řada slabých vazeb, které mohou být místy přerušení řetězce. Reaktivní skupiny jsou v řetězci často rozmístěny velmi pravidelně.<sup>7</sup> Tímto způsobem jsou rozkládány polymery, které nejsou rozložitelné enzymaticky – neobsahují vazebné místo pro enzym (polysacharidy, polypeptidy).<sup>8</sup> Hydrolýza je ovlivnitelná celou řadou faktorů: chemická struktura, typ vazby, plocha povrchu, hmotnost systému, velikost matrice, pH. Při hydrolýze voda proniká do polymeru, v němž přednostně napadá jeho amorfni část. Tímto je sice redukována hmotnost tělesa, ale jeho mechanické vlastnosti narušeny nejsou, pokud nedojde k hydrolýze i krystalické části. Objemovou erozí (bulk erosion) se označuje

proces, kdy dochází k redukci hmotnosti a poté následuje fyzický rozklad polárního tělesa. Povrchovou erozí je rozuměno zmenšování tělesa za současného zachování fyzické integrity (hydrofobní polymery typu polyanhydridů a polyorthoesterů). "

Po implantaci biodegradabilního nosiče s léčivem je žádoucí, aby vlastnosti polymeru vydržely po celou dobu uvolňování léčiva a poté aby byl polymer rozložen na netoxické produkty, které budou z těla vyloučeny.

Konečným stadiem degradace je eliminace. L-laktát<sup>9</sup> vstupuje do citrátového cyklu, zde je metabolizován a z organismu vyloučen v podobě vody a oxidu uhličitého. Glykolát<sup>10</sup> může být vyloučen ledvinami nezměněn (glomerulární filtrací, tubulární sekrecí) nebo rovněž vstupuje do citrátového cyklu (jako prekurzor oxalátu) a po rozkladu opouští organismus ve formě vody oxidu uhličitého.

## 4.4. Faktory ovlivňující bioadhezi

### 4.4.1. Faktory související s polymerem

- molekulová hmotnost: nízká molekulová hmotnost podporuje interpenetraci polymerních molekul; vysoká molekulová hmotnost podporuje fyzikální spletení (physical entanglement). Optimální molekulová hmotnost činí nejméně 100 000 (prahová hodnota).
- ohebnost polymerních řetězců: je důležitá pro interpenetraci a zauzlení. U vysoce zesíťovaných polymerů (highly cross-linked polymers) se pohyblivost jednotlivých řetězců snižuje, což vede ke snížení bioadhezivivity.
- prostorové uspořádání: upřednostňována je konformace dvojité šroubovice
- koncentrace polymeru: pevný adhezivní systém - čím větší koncentrace polymeru, tím silnější je bioadheze; kapalný adhezivní systém - vysoká koncentrace může způsobit svinutí polymerních molekul a tím redukcii flexibility řetězců.

### 4.4.2. Faktory související s prostředím

- pH: povrchový náboj kolísá s pH, čímž dochází k rozdílům v disociaci funkčních skupin sacharidů a aminokyselin přítomných v polypeptidu. Povrchový náboj polymeru souvisí se stupněm hydratace - protonované karboxylové skupiny tvoří vodíkové vazby s mucinem .
- počáteční tlak aplikovaný na kontaktní plochu: ovlivní hloubku penetrace. Vysoký tlak aplikovaný po dostatečně dlouhou dobu podporuje atrakční síly bioadhezivního polymeru a mucinu..
- počáteční doba kontaktu: určuje míru nabobtnání a prostoupení polymerních řetězců.
- stupeň nabobtnání: závisí na koncentraci polymeru a přítomnosti vody. Umožňuje odloučení BDDS po uvolnění aktivní složky.

#### **4.4.3. Fyziologické faktory**

- přeměna mucinu limituje dobu zdržení adhezivního systému na mukózní vrstvě, u gastrointestinální mukózy závisí na přítomnosti potravy, intranasální mukociliární clearance je inhibována chitosany.
- stav onemocnění může změnit fyzikálně- chemické vlastnosti mukózy, např. rýma, žaludeční vředy, bakteriální a mykotické infekce a záněty.<sup>11</sup>

#### **4.5. Polymery používané v bioadhezivních terapeutických systémech**

Polymery používané pro tvorbu bioadhezivních systémů obsahují jak rozpustné a nerozpustné polymery, tak nedegradabilní a degradabilní polymery. Může se jednat o hydrogely, termoplasty, homopolymery, kopolymery nebo jejich směsi; přírodní či syntetické polymery.

Hydrofilní polymery jsou ve vodě rozpustné polymery, které se omezeně zvětšují při kontaktu s vodou. Případně jsou schopny úplného rozkladu.

Hydrogely jsou ve vodě bobtnající materiály, obvykle příčně zesítěné polymery s omezenou kapacitou bobtnavosti.

Termoplastické polymery obsahují nerozvinutý polystyren a semikrystalické bioerozivní polymery, které během degradace tvoří skupiny karboxylových kyselin, např. polymléčná kyselina a polyanhydridy. Různé syntetické polymery, užívané pro bioadhezivní lékové formy, obsahují polyvinylalkohol, polyamidy, polymetakrylovou kyselinu, halogenidy, methylcelulosu, ethylcelulosu, hydroxypropylcelulosu, sodnou sůl karmelosy.

#### **4.6. Kyselina polyglykolová, polymléčná a jejich kopolymery**

Polymery kyseliny glykolové a mléčné jsou nejčastěji používané nosiče pro řízené uvolňování léčiv.

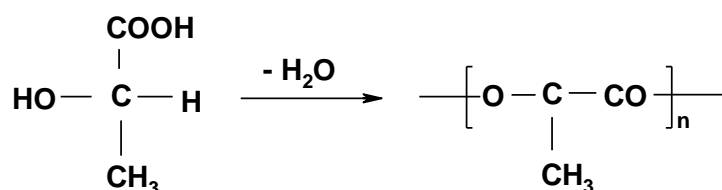
Léčivo je v polymerním nosiči dispergováno a uvolňuje se v závislosti na stupni eroze polymeru. Nevýhodou je, že v průběhu eroze polymeru dochází rovněž ke zmenšování povrchu systému, ze kterého se léčivo uvolňuje.

Polyglykolid a polylaktid jsou obecně známy jako polyglykolová (PGA) a polymléčná (PLA) kyselina. Vysokomolekulární polymery glykolové a mléčné kyseliny není možné připravit přímou kondenzací karboxylových kyselin. Proto jsou připravovány

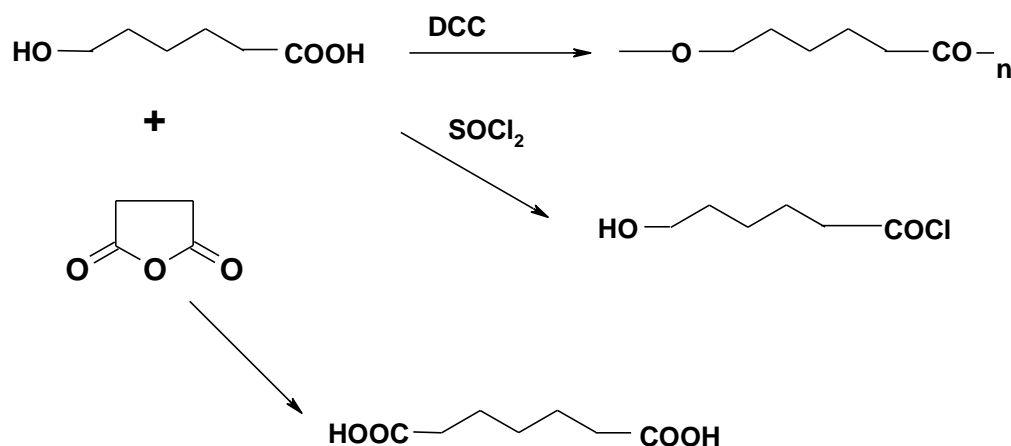
polymerizací za otevření kruhu jejich cyklických diesterových dimerů, glykolidu a laktidu. Pro urychlení přípravy jsou používány katalyzátory, zejména Zn, Sn, estery karbonylu a železité soli jako iniciátory polymerace laktátu při teplotě nad 150°C. koncentrací iniciátoru je regulována hmotnost vznikajícího polymeru. Při syntéze homopolymeru vznikají stejné produkty, zatímco při syntéze kopolymerů se jednotlivé sekvence náhodně střídají.<sup>12,13</sup>

Obr.1:

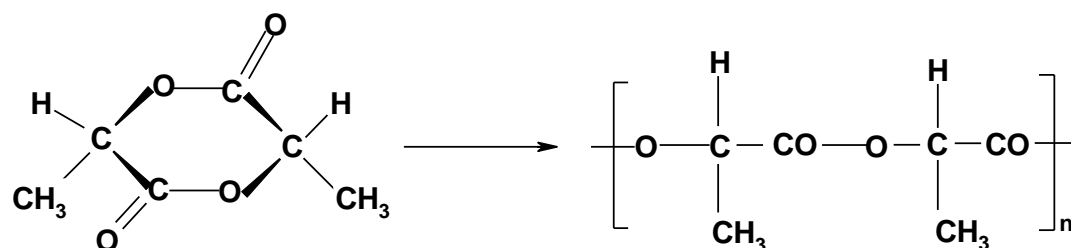
a) polykondenzace (step-growth polymerization)



b) polykondenzace + funkcionalizace + následné reakce



c) polymerace za otevření kruhu



PGA je biodegradabilní polymer empirického vzorce  $(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2)_n$  s vysokou teplotou tání ( $T_m$ ) okolo 225°C a teplotou skelného přechodu ( $T_g$ ) 35 °C. Tato teplota je mezní hodnotou, kdy zaniká sklovitý stav amorfních polymerů. Při této teplotě se začínají pohybovat celé části (segmenty) řetězce. Hodnota  $T_g$  závisí na délce segmentů (vzdálenosti míst konfirmačních změn vazeb) a na molekulové hmotnosti. Jeho vlastnosti jsou dány molekulovou hmotností, vysokým podílem krystalické fáze (35 -75 %) a

hydrofilními charakteristikami. PGA je nerozpustný ve většině organických rozpouštědel, má vysokou pevnost a modul elasticity. PGA se vyrábí přímou nebo nepřímou polymerací z kyseliny glykolové. Přímá polykondenzace vede ke vzniku nízkomolekulární PGA se slabými mechanickými vlastnostmi. Výšemolekulární PGA se získává polymerací za otevření kruhu (ring-opening) cyklického dimeru kyseliny glykolové.<sup>14</sup>

PLA má odlišné chemické, fyzikální a mechanické vlastnosti než PGA. Rozdíl je dán přítomností methylové skupiny na  $\alpha$ -uhlíku. Díky chirálnímu uhlíku jsou možné L, D a DL izomery. L- laktát se vyskytuje v přírodě a je více biokompatibilní. DL izomer je racemickou směsí obou izomerů. L- PLA je semikrystalický, biodegradabilní polymer s teplotou tání ( $T_m$ ) 170 °C teplotou skelného přechodu ( $T_g$ ) 56 °C. Krystalinita se pohybuje nad hodnotou 40%. DL- PLA je amorfní polymer s proměnlivým zastoupením obou izomerů a teplotou tání 57 °C. Není tak pevný jako L- PLA, snáze podléhá degradaci a je proto používán jako biodegradabilní nosič léčiv. Pro snížení krystalinity L- PLA a tedy zkrácení doby degradace je možné použít kopolymery L- PLA/ DL- PLA.

#### **4.6.1. Příprava mikročástic**

##### *a) Odpařování rozpouštědla (solvent evaporation)*

Je nejvíce používanou metodou enkapsulace ( obalování). Zakalený nebo čirý roztok léčiva, který může obsahovat viskozifiant nebo stabilizační činidlo, je přidán do organické fáze sestávající z polymeru rozpuštěného v dichlormethanu ( nebo ethylacetátu, chloroformu). Prudkým mícháním vzniká primární voda v olejové emulzi. Tato emulze je přidána ke značnému objemu vody, který obsahuje emulgátor, např. polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidon, aby vznikla složená emulze (v/o/v). Emulze je poté vystavena míchání, dokud se většina organického rozpouštědla neodpaří; zůstanou jen pevné mikročástice o velikosti 1- 100 $\mu$ m. Mohou být poté omyty, centrifugovány a usušeny, aby byly získány volně tekoucí vysušené částice.<sup>15</sup>

##### *b) Enkapsulace za horka (Hot melt encapsulation)*

Polymer je nejprve roztaven a smíchán s částčkami léčiva ( velikost min. 50 $\mu$ m). Směs je suspendována v nemísitelném rozpouštědle (např. silikonový olej), soustavně míchána a zahřívána na teplotu, která je o 5°C vyšší než je bod tání polymeru. Jakmile je emulze stabilizovaná, je nutné ji chladit dokud se částičky polymerů nestanou pevnými. Vzniklé makrosféry jsou omyty v petroletheru. Tento proces enkapsulace je vhodný pro polymery nestálé ve vodě ( polyanhydridy). Jsou získány částice o

průměru 1- 1000  $\mu\text{m}$ , jejichž velikost je závislá na intenzitě míchání. Jedinou nevýhodou je omezení teploty, které je léčivo vystaveno.<sup>16</sup>

#### 4.7. Mykotické infekce (mykózy)

Onemocnění způsobené houbami (plísňe, kvasinky). Místní mykóza zejm. kožní (dermatomykóza), popř. slizniční patří k velmi častým chorobám a na jejím vzniku se podílí zapaření (nákaza např. na veřejných koupalištích, bazénech), nedostatečná hygiena, přenos infekce kontaktem s nemocným pacientem nebo zdravým nosičem (nozokomiální infekce ve zdravotnických zařízeních), poraněním kůže či sliznice aj. Častěji vzniká u diabetiků. Celková mykóza s postižením vnitřních orgánů (plic, jícnu, střev, mozku) se vyskytuje především u osob s narušenou imunitou. Většina původců těchto chorob je všudypřítomná, ale za normálních okolností onemocnění nevyvolává.

Mykotické infekce je možno rozlišit dle jejich lokalizace na povrchové- místní (napadající kůži a sliznice) invazivní- hluboké (zasahující jednotlivé orgány) . Pokud je postiženo více orgánů lidského těla nebo celý organismus, popř. je zachycena infekce v krvi je možné označit mykózu za diseminovanou. Invazivní a diseminované mykózy se označují jako systémové mykózy.

K nejznámějším povrchovým mykózám patří plísňové onemocnění sliznic dutiny ústní projevující se bílými povlaky na jazyku. Dále mykóza kůže mezi prsty nohou (projevující se svěděním, pálením a olupováním kůže mezi nehty) nebo onychomykóza- mykóza nehtů. Nejčastějšími původci těchto mykóz jsou dermatofyty, dále kandidy, kryptokoky či aspergily.

Systémové mykózy jsou závažnějším, mnohdy život ohrožujícím stavem. Postiženými orgány jsou zejména plíce, vedlejší dutiny nosní, slezina, střeva či mozek. Méně často jsou postiženy ledviny, srdce, oko. Infekce proniká do orgánu, prorůstá jím a dále v něm roste. Tento typ mykóz postihuje zejména skupiny lidí se závažnými onemocněními, poruchami obranyschopnosti organismu.

Systémové mykózy se dělí na primární a sekundární. Primární infekce jsou vyvolávány houbami rodu *Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*. U zdravých pacientů nedochází k zjevným příznakům, může dojít k lehké plicní infekci, která se spontánně vyléčí. Většinou vystupují jako nosiči. U imunoalterovaných (AIDS, nedonošené děti) se infekce projeví jako bronchopneumonie se vznikem granulomů jako při TBC (*Coccidioides*), dále jsou infekcí postiženy lymfoidní tkáň, kůže, GIT, sliznice, uzliny. K nákaze dochází vdechnutím spor plicemi. Spory se nacházejí v exkrementech ptáků,

netopýřů, v prachu či půdě. Lékem volby je amfotericin B. Zdrojem primární systémové mykózy také může být vysoce virulentní kmen *Candidy albicans*. Dalším původcem je *Cryptococcus* způsobující u zdravých pacientů respirační infekci, u imunodeficientních kryptokokovou meningitidu, meningoencefalitidu s hematogenním rozsevem. Lékem volby je flukonazol, amfotericin B v kombinaci. Rezervoárem kryptokoků jsou ptačí hnízda a trus holubů.

Sekundární mykotické infekce jsou způsobeny oportunními houbami, které pro zdravého člověka nepředstavují závažné nebezpečí. Nejčastěji se vyskytují jako nozokomiální infekce. Hlavním zdrojem sekundárních mykóz je *Candida albicans*, mykotické infekce vznikají u imunoalterovaných jedinců. V patogeneze je důležitým faktorem plasticita genomu, která umožňuje rychlé změny vlastností, zejména virulence. Důležitá je adherence k epitelu, endotelu, fibrinu, kanyle a tvorba hyf s lepším prorůstáním do tkáně. Pro diagnostiku se používají výtěry z lézí, sputum; mikroskopie, kultivace, biochemická identifikace, imunologické metody (test ELISA) atd. Lékem volby je flukonazol, amfotericin B v případě meningitidy, eventuelně i v kombinaci. Dalším zdrojem sekundárních mykóz u imunoalterovaných pacientů (cytostatická terapie, maligní tumory, lokální poruchy v dolních cestách dýchacích). Akutně vzniká akutní aspergilóza, která přechází v chronickou s abscesy, fibrózou, aspergilomem. Vlivem infekce může dojít k rozvoji endokarditidy, postižení CNS, oka, nosu. Lékem volby je amfotericin B, případně i v kombinaci. <sup>17</sup>

## **4.8. Antifungální látky**

### **4.8.1. Polyeny**

Polenová antibiotika<sup>18</sup> se vážou na steroly, které se nacházejí v membráně kvasinek a hub, povrchově aktivním účinkem porušují cytoplazmatickou membránu a způsobují tak její rozklad. Působí jen na mikroorganismy s odpovídajícími sterolovými strukturami v buněčné membráně. Mezi zástupce patří lokální nystatin a natamycin, používané na kandidózy, a systémově používaný amfotericin B. Je dostupný v přípravcích na tukovém nosiči. Je lékem volby při aspergilových infekcích ( orgánové transplantace) a mukormykóze. Nevýhodou amfotericinu B jsou jeho nežádoucí účinky, z akutních to jsou horečka, třesavka, nauzea a zvracení, bolesti hlavy, svalstva a kloubů, alergické reakce. Chronické nežádoucí účinky se projevují zejména nefrotoxitou s následnou elektrolytovou dysbalancí.



#### 4.8.2. Antimetabolity

Jediným zástupcem antimetabolitů je flucytosin se systémovým účinkem. Je aktivně transportován do buňky mikromycet, kde je deaminován na vlastní účinnou látku 5-fluorouracil. V kombinaci je indikován k léčbě orgánové kandidózy, kryptokokózy, blastomykózy, atd.

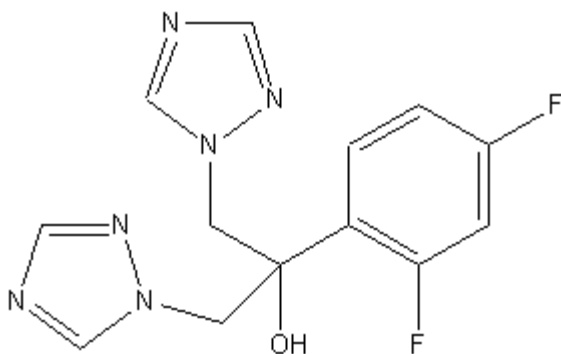
#### 4.8.3. Azolová antimykotika

Jsou syntetické látky zahrnující jednak starší zástupce mikonazol a ketokonazol, jednak novější triazoly flukonazol a itrakonazol. Azolová antimykotika inhibují enzymy působící v konečné fázi syntézy ergosterolu v membráně hub. Dalšími zástupci jsou ekonazol, klotrimazol, fentikonazol a tiokonazol. Použití nacházejí u kandidových infekcí. S výjimkou itrakonazolu nejsou použitelná u aspergilózy.

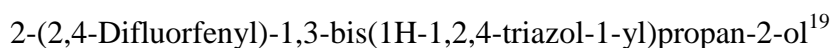
#### 4.8.4. Allylaminová antimykotika

Blokují biosyntézu ergosterolu inhibicí aktivity enzymu skvalen-epoxidázy. Jsou účinnější na vláknité formy hub, inhibují tvorbu mycelií, které jsou vůči inhibici buněčné membrány citlivější než kvasinky. Mezi zástupce této skupiny léčiv patří terbinafin a naftifin.

### 4.9. Flukonazol



Obr. : strukturní vzorec flukonazolu



Flukonazol<sup>18</sup> je novější systémové triazolové antimykotikum použitelné jak perorálně tak parenterálně. Mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy ergosterolu. Má nejvyšší terapeutický index, nejméně nežádoucích účinků a lékových interakcí ze všech triazolových derivátů. Je hydrofilní. Nejcitlivější na účinek flukonazolu jsou *Candida* spp. (méně *non-albicans* kmeny), *Cryptococcus* spp, dermatofyty (

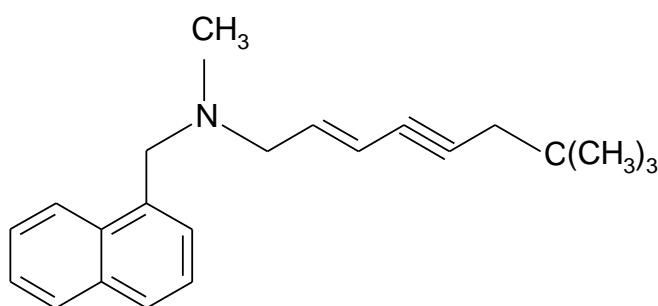
Miscosporum spp., Trichophyton spp.), Blastomyces dermatitis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum. Primárně rezistentní je Candida krusei, rezistence byla zjištěna rovněž u Candida glabrata. Je převážně neúčinný u aspergilózy a zcela neúčinný u zygomykózy.

Po perorálním podání se flukonazol rychle a téměř úplně vstřebává. Koncentrace v plazmě jsou obdobné jak po perorálním tak po nitrožilním podání. Potrava vstřebávání neovlivňuje. Na plazmatické bílkoviny se váže 10- 12%, dobře proniká do tělních tekutin včetně likvoru, placenty a mateřského mléka. Z 80% se vylučuje ledvinami (glomerulární filtrace). Biologický poločas se pohybuje mezi 25- 30 hodinami. Při poškození renálních funkcí se prodlužuje.

Dávkování se řídí rozsahem infekce. Je stejné pro perorální i parenterální aplikaci. U systémových mykóz je počáteční dávka dvojnásobná. Pro systémové kandidózy je použito dávkování 5mg/kg/den (400mg/den) po 3- 4 týdny, pro orofaryngeální kandidózy 50- 100 mg 7- 14 dní, flukonazol je zde použit při útočné i udržovací léčbě. Kryptokokóza (nitrolební, plicní, kožní) vyžaduje flukonazol jako lék volby v dávkách 400 mg 1. den, dále 200- 400 mg/den u pacientů s AIDS po týdny, udržovací léčba vyžaduje 200 mg/den po týdny až měsíce. Dermatomykózy s indikací tinea versicolor je léčena 300 mg 1 x týdně po dobu 2-3 týdnů, s indikací onychomykózy 150 mg 1 x týdně po dobu 3- 6 měsíců (nehty rukou) resp. 6- 12 měsíců (nehty nohou).

Nežádoucími účinky flukonazolu jsou většinou nezávažné dyspeptické obtíže, bolesti hlavy. Častější kožní změny se vyskytují u nemocných s AIDS.

#### 4.10. Terbinafin



Obr. : strukturní vzorec terbinafinu<sup>20</sup>

*trans-N-methyl-N-(1-naftylmethyl)-6,6-dimethylhept-2-en-4-ynyl-1-amin*

Terbinafin je allylaminové antibiotikum jehož primárně fungicidní účinek spočívá v inhibici enzymatické (epoxidázové) aktivity a intracelulární akumulaci skvalenů, nedostatek ergosterolu pro stavbu buněčné stěny se projeví fungistaticky. Neinhibuje

procesy závislé na cytochromu P450 a nesnižuje tedy koncentrace steroidních hormonů (estrogenů, testosteronu, kortisolu). Spektrum terbinafinu zahrnuje dermatofyty (Trichophyton spp., Microsporum spp., Epidermophyton floccosum), kvasinky (Candida spp., Pityosporum spp.), plísňe (Aspergillus spp.), dimorfní houby (Blastomyces dermatitis, Histoplasma capsulatum), parazity (Trypanosoma cruzi).

Více než 70% terbinafinu se vstřebá po perorálním podání, potrava tento proces zásadně neovlivní. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo za 2 hodiny. Na plazmatické bílkoviny se váže s 99%. Je vysoce lipofilní, koncentruje se v tukové tkáni, kůži (ve stratum corneum je koncentrace 2. den po podání 10 x vyšší koncentrace než v plazmě), ve vlasových folikulech, vlasech, nikoli v potu. Poločas eliminace z tkání je 4-5 dní se zachovaným fungicidním účinkem po dobu 3 týdny po ukončení léčby.

U dospělých je indikována dávka 250 mg/den jednou nebo rozděleně do 2 dávek po 12 hodinách. Délka léčby se liší dle indikace: dermatomykózy- tinea pedis 2- 6 týdnů, kožní kandidózy 2- 4 týdny, onychomykózy 6- 12 týdnů nehty rukou, až 24 týdnů nehty nohou.

Jako nežádoucí účinky jsou uváděny dyspeptické obtíže – nevolnost, nechutenství, mírná bolest břicha, průjem; popř. alergický kožní exantém. Po 4- 8 týdnech se může objevit ztráta chuti, nejprve na slané, později na sladké vjemy.

## **5. Experimentální část**

### **5.1. Použité suroviny**

Kyselina citronová monohydrát ( Lachema Neratovice s.r.o.)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ( Lachema Neratovice s.r.o.)

Azid sodný ( Fluka)

Destilovaná voda ( FaF UK Hradec Králové)

Oligoesterové nosiče ( syntetizované na katedře Farmaceutické technologie FaF UK)

Triethylcitrát , p.a. (Merck)

### **5.2. Použité přístroje**

Digitální váhy Kern 440- 33 ( max. 120g; d= 0,01g)

Digitální váhy Kern 440- 47 ( max. 1200g; d= 0,1g)

Digitální váhy Kern 440- 53 ( max. 6000g; d= 1g)

Ultrazvuková míchačka Sonorex super 10 P ( Bandelin)

Digitální pH metr Piccolo HI 1280 ( Hanna)

Biologický termostat BT 120 ( Laboratorní přístroje Praha)

Mikrovlnná trouba Alaska MW 1000 GC

Magnetická míchačka Heidolph MR 3001

Analytické váhy AND HR – 120, A D Company

Analytické váhy AND HM – 202 A D copany

Spektrofotometr Hélios Gama/ Delta, Unicam

### **5.3. Pracovní postup**

#### **5.3.1. Charakteristika nosičů**

Jako nosiče byly použity terpolymery kyseliny mléčné a glykolové v poměru 1:1 s větvící složkou mannitolem nebo dipentaerythritolem v množství 3, 5, 8% ( označení 3M, 5M, 8M; nebo 3D, 5D, 8D).

Tab. 1: Charakteristiky nosičů

Označení nosiče	Složení nosiče DLLA:GA:M(D)	$M_n$ (g/mol)	$M_w$ (g/mol)
3M	48,5 : 48,5 : 3	2600	3800
5M	47,5 : 47,5 : 5	1600	2200
8M	46,0 : 46,0 : 8	1400	1600
3D	48,5 : 48,5 : 3	3600	5300
5D	47,5 : 47,5 : 5	1900	2300
8D	46,0 : 46,0 : 8	1400	1700

M ..... mannitol

D ..... dipentaerythritol

DLLA ..... kyselina mléčná

GA ..... kyselina glykolová

$M_n$  ..... číselně střední molekulová hmotnost

$M_w$  ..... hmotnostně střední molekulová hmotnost

### 5.3.2. Liberační medium

Liberačním médiem pro terbinafin byl fosfát-citrátový pufr pH 5,0; který byl připraven podle chemických tabulek.<sup>21</sup> Pro přípravu 1000 ml pufru bylo nutné použít x dílů roztoku A a 100 – x dílů roztoku B.

Pro pH 5,00 je roztokem A 490,0 ml 0,1 mol/ l roztoku monohydrátu kyseliny citrónové, roztokem B 510,0 ml 0,2 mol/ l roztoku hydrogenfosforečnanu sodného. Po rozpuštění bylo nutné stanovit skutečnou hodnotu pH digitálním pH metrem a případné odchylky odstranit přidáním kyseliny citrónové nebo dihydrogenfosforečnanu sodného. Po úpravě následovalo přidání 0,02% azidu sodného jako stabilizační přísady.

Liberačním médiem flukonazolu byl opět fosfát- citrátový pufr pH 5,0.

### 5.3.3. Kalibrační přímka

Protože byla v experimentu použita dvě léčiva, musely být sestrojeny i dvě kalibrační přímky. Pro flukonazol při pH 5,0 při vlnové délce 261nm a pro terbinafin při pH 5,0 a vlnové délce 283 nm.

Zásobní roztok flukonazolu byl připraven rozpuštěním 0,040 g flukonazolu ve 100 ml pufru pH 5,0. Postupným ředěním vznikly roztoky o koncentracích 40- 400 mg/ml.

Obecná rovnice kalibrační přímky:  $y = Ax + B$

y ..... absorbance

x ..... koncentrace léčiva (mg/l)

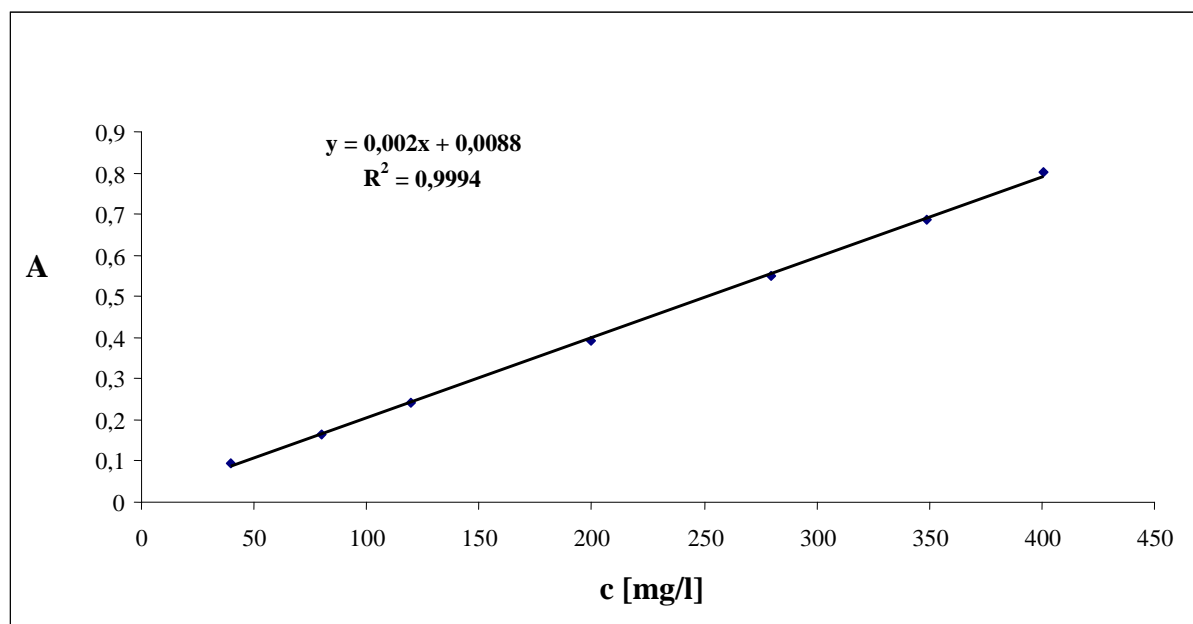
A ..... absolutní člen

B ..... směrnice

Tab. 2: Absorbance odměrných roztoků flukonazolu

<b>koncentrace flukonazolu mg/l</b>	<b>absorbance</b>
40,0	0,095
80,0	0,164
120,0	0,241
200,0	0,393
280,0	0,550
348,8	0,685
401,0	0,802

Graf 1: Kalibrační přímka flukonazolu při 261 nm

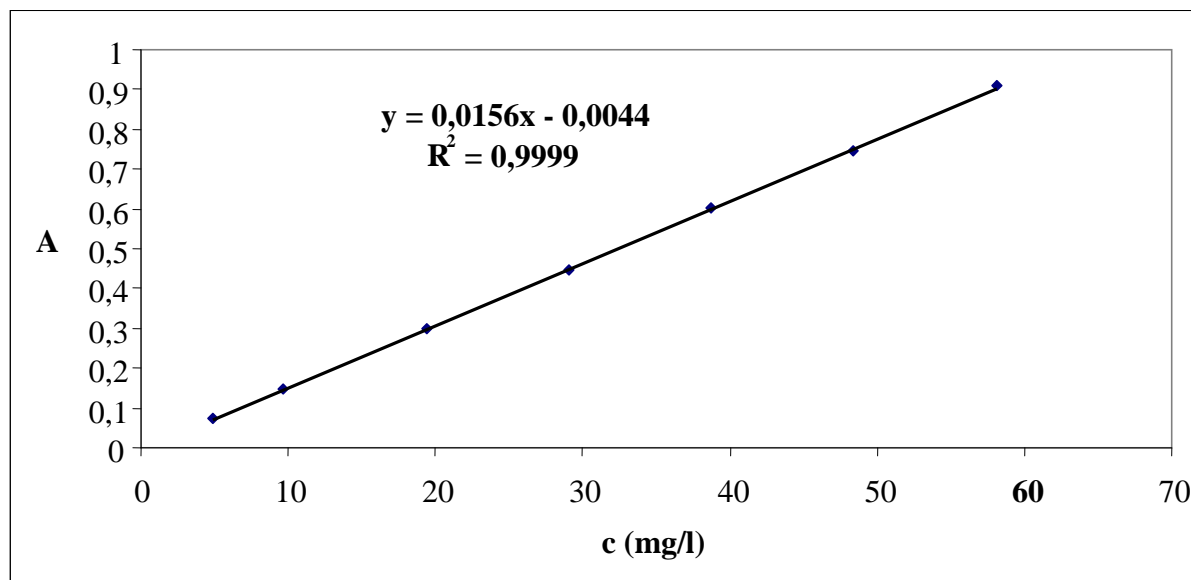


Rozpuštěním 0,040g terbinafinu ve fosfát citrátovém pufru pH 5,00 vznikl zásobní roztok o koncentraci 400 mg/l . Byla změřena absorbance při absorpčním maximu při 283 nm proti pufru . Koncentrace roztoků při měření absorbance se pohybovala v rozmezí 4-60 mg/l.

Tab. 3: Absorbance odměrných roztoků terbinafinu

<b>koncentrace mg/l</b>	<b>absorbance</b>
9,68	0,146
19,36	0,301
29,04	0,445
38,72	0,602
48,40	0,747
58,08	0,908
4,84	0,073

Graf 2: Kalibrační přímka terbinafinu při 283 nm



#### 5.3.4. Příprava matric

Byly připraveny matrice o hmotnosti 150,0 mg složené z nosiče, plastifikátoru (triethylcitrát) v koncentraci 30 % a léčiva v koncentraci 4% (terbinafin, flukonazol).

Do 5 ml kádinky bylo naváženo 400 mg polymeru (3M, 5M, 8M, 3D, 5D, 8D), který byl roztaven v mikrovlnné troubě po dobu 3 minut při středním výkonu. Poté byl přidán plastifikátor předem zahřátý v mikrovlnné troubě (30 sekund při středním výkonu), aby po jeho přidání k roztavenému nosiči směs neztuhla. Vzniklá směs byla důkladně homogenizována kopistkou. Bylo přidáno léčivo (terbinafin nebo flukonazol v koncentraci 4%) a opět provedena důkladná homogenizace kopistkou. V případě rychlého tuhnutí směsi během homogenizace je možné opětovné, ale velmi opatrné zahřátí (např. 1 x 10 sekund nebo 1 x 20 sekund dle typu nosiče).

Ze směsi byly odváženy jednotlivé matrice o hmotnosti 150,0 mg a pomocí kopistky byly umístěny do řádně označených scintilačních lahvíček. Scintilační lahvíčky byly umístěny na 3- 5 minut na elektrický vařič při teplotě 50- 60 °C, aby se matrice rovnoměrně rozprostřely po dně lahvíček. Do každé lahvíčky bylo přidáno 15,0 ml pufru. Scintilační lahvíčky byly umístěny do termostatu vytemperovaného na 37,0 °C, kde byly umístěny po celou dobu disolučního testu.

#### 5.3.5. Disoluční test

Disoluční test probíhal v termostatu vytemperovaném na 37,0 °C. Pro odběr vzorků byly scintilační baňky vyjímány z termostatu a přenášeny do laboratoře. Výměna liberačního média proběhla odlitím pufru do předem označených scintilačních baněk a přelitím matrice s léčivem 15,0 ml fosfát- citrátového pufru pH 5,0.

Následně byly lahvíčky s matricemi odneseny zpět do termostatu. Lahvíčky se vzorky byly přeneseny ke spektrofotometru, kde proběhlo měření absorbancí. Spektrofotometr bylo nutné 30 minut před započítím měření nechat vytemperovat. Do přístroje byly vkládány kyvety s pufrem jako slepým vzorkem a kyvety s uvolněným léčivem v liberačním médiu.

Vzhled matric po

- 24 hodinách:  
3D- celistvá (peckovitého tvaru), bílá  
5D- nažloutlá, peckovitého tvaru



8D- nažloutlá, celistvá  
3M- nažloutlá (poloprůsvitná), celistvá  
5M- bílá, celistvá  
8M- průhledná, celistvá

- 2 dnech (48 hodinách)

3D- bílá, celistvá, mírně zbobtnalá  
5D- nažloutlá, celistvá  
8D- nažloutlá (matná), mírně fragmentovaná, nezbobtnalá  
3M- nažloutlá (matná), mírně zbobtnalá  
5M- bílá, celistvá, mírně zbobtnalá  
8M- průhledná, celistvá, nezbobtnalá

- po 3 dnech

3D- bílá, celistvá, mírně zbobtnalá  
5D- nažloutlá, více zbobtnalá, celistvá  
8D- nažloutlá (matná), nezbobtnalá, mírně fragmentovaná  
3M- nažloutlá, matná, zbobtnalá  
5M- bílá, celistvá, zbobtnalá  
8M- bělavá, nezbobtnalá, fragmentovaná

- po 4 dnech

3D- bílá, celistvá, více zbobtnalá  
5D- žlutá (průhledná), zbobtnalá,  
8D- nažloutlá, nezbobtnalá, mírně fragmentovaná  
3M- nažloutlá, zbobtnalá (peckovitý tvar), celistvá  
5M- bílá, zbobtnalá, nepravidelného tvaru, celistvá  
8M- bílá, málo zbobtnalá, celistvá

- po 5 dnech

3D- nabělalá, zbobtnalá, celistvá  
5D- žlutá (průhledná), zbobtnalá, fragmentovaná  
8D- žlutá, nezbobtnalá, fragmentovaná  
3M- nažloutlá, zbobtnalá, celistvá  
5M- bílá, zbobtnalá, defragmentovaná  
8M- bílá, málo zbobtnalá, mírně fragmentovaná

### 5.3.6. Stanovení liberovaných léčiv

Stanovení flukonazolu probíhalo měřením absorbancí při 261 nm proti fosfát citrátovému pufru pH 5,0. Stanovení terbinafinu bylo provedeno měřením absorbancí při 283 nm proti stejnému pufru. Všechny naměřené hodnoty byly zaneseny do tabulek.

Abychom zachytili počáteční fázi uvolňování léčiva, byla změřena absorbance po 2 a po 6 hodinách. Následně byly vzorky odebírány po 24 hodinách. Ke konci experimentu byly vzorky odebírány v intervalu až několika dnů.

Podle vzorců odvozených z kalibračních přímků bylo vypočteno množství léčiva uvolněného z matrice. Hodnoty bylo nutné převést na podíly uvolněného léčiva k celkovému množství léčiva v matrici v %. Průběh liberace léčiva byl zaznamenán graficky jako závislost kumulativních procent uvolněného léčiva na čase.

Výpočet uvolněného flukonazolu při pH 5 (261 nm):

$$x_1 = \frac{y - 0,0088}{0,0020}$$

$$x_2 = x_1 \times 0,015 \times D$$

$$x \% = \frac{x_2}{0,04 \times m_n} \times 100$$

Výpočet uvolněného terbinafinu při pH 5 (283 nm):

$$x_1 = \frac{y - 0,0044}{0,0156}$$

$$x_2 = x_1 \times 0,015 \times D$$

$$x \% = \frac{x_2}{0,04 \times m_n} \times 100$$

$x_1$  ..... množství léčivé látky (mg/l)

$x_2$  ..... množství léčivé látky v 15 ml (mg/l)

$x$  % ..... množství liberovaného léčiva (%)

$D$  ..... ředění vzorku

$m_n$  ..... navážka matrice

$y$  ..... absorbance

## 6. Výsledky

### 6.1. Tabulky

Tab.4: Liberace flukonazolu z nosiče 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	FLUK	FLUK [%]	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]			%
0,083	0,021	1	0,092	1,55	1,04	1,04
	0,013	1	0,032	0,53		
0,25	0,053	1	0,332	5,62	4,73	5,77
	0,039	1	0,227	3,84		
1	0,161	1	1,142	19,36	19,29	25,06
	0,160	1	1,134	19,22		
2	0,101	1	0,692	11,73	11,91	36,98
	0,104	1	0,714	12,10		
3	0,089	1	0,602	10,20	9,05	46,03
	0,071	1	0,467	7,91		
4	0,078	1	0,519	8,80	9,18	55,21
	0,084	1	0,564	9,56		
5	0,120	1	0,834	14,15	12,74	67,96
	0,098	1	0,669	11,34		
6	0,119	1	0,827	14,02	13,70	81,65
	0,114	1	0,789	13,37		
8	0,048	1	0,294	4,99	6,96	88,61
	0,079	1	0,527	8,92		
12	0,099	1	0,677	11,47	12,11	100,71
	0,109	1	0,752	12,74		

Tab. 5: Liberace flukonazolu z nosiče 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu

čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,191	1	1,367	22,53	23,01	23,01
	0,203	1	1,457	23,49		
0,25	0,194	2	2,778	45,81	46,76	69,77
	0,206	2	2,958	47,71		
1	0,216	2	3,108	51,25	49,24	119,01
	0,204	2	2,928	47,23		
2	0,077	1	0,512	8,44	8,28	127,30
	0,076	1	0,504	8,13		
3	0,009	1	0,001	0,02	0,00	127,26
	0,008	1	0,000	0,00		
4	0,009	1	0,001	0,02	0,02	127,28
	0,009	1	0,001	0,02		
5	0,009	1	0,001	0,02	0,02	127,31
	0,009	1	0,001	0,02		
6	0,009	1	0,001	0,02	0,02	127,33
	0,009	1	0,001	0,02		
8	0,009	1	0,001	0,02	0,00	127,30
	0,008	1	0,001	0,00		

Tab. 6: Liberace flukonazolu z nosiče 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	FLUK	FLUK [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,286	1	2,079	34,28	30,46	30,46
	0,229	1	1,652	26,64		
0,25	0,328	1	2,394	39,48	34,27	64,73
	0,249	1	1,802	29,06		
1	0,188	1	1,344	22,16	21,56	86,29
	0,182	1	1,299	20,95		
2	0,044	1	0,264	4,35	5,39	91,68
	0,062	1	0,399	6,44		
3	0,042	1	0,249	4,11	4,67	96,35
	0,052	1	0,324	5,23		
4	0,072	1	0,474	7,82	7,79	104,14
	0,073	1	0,482	7,77		
5	0,079	1	0,527	8,68	8,28	112,42
	0,074	1	0,489	7,89		
6	0,094	1	0,639	10,54	9,64	122,06
	0,081	1	0,542	8,73		
8	0,018	1	0,069	1,14	0,76	122,82
	0,012	1	0,024	0,39		
12	0,021	1	0,092	1,55	1,36	124,18
	0,018	1	0,069	1,17		

Tab. 7: Liberace flukonazolu z nosiče 3M plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,029	1	0,152	2,45	2,26	2,26
	0,025	1	0,122	2,08		
0,25	0,073	1	0,482	7,77	7,81	10,07
	0,070	1	0,459	7,84		
1	0,220	1	1,584	25,56	25,87	35,94
	0,213	1	1,532	26,17		
2	0,109	1	0,752	12,13	12,55	48,49
	0,110	1	0,759	12,97		
3	0,086	1	0,579	9,34	9,36	57,85
	0,082	1	0,549	9,38		
4	0,085	1	0,572	9,22	9,56	67,41
	0,086	1	0,579	9,89		
5	0,083	1	0,557	8,98	9,69	77,10
	0,090	1	0,609	10,41		
6	0,145	1	1,022	16,49	17,48	94,58
	0,153	1	1,082	18,48		
12	0,057	1	0,362	5,83	5,81	100,40
	0,054	1	0,339	5,79		

Tab. 8: Liberace flukonazolu z nosiče 5M plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,038	1	0,219	3,55	3,54	3,54
	0,037	1	0,212	3,53		
0,25	0,096	1	0,654	10,60	10,50	14,04
	0,092	1	0,624	10,40		
1	0,235	1	1,697	27,50	28,01	42,05
	0,237	1	1,712	28,53		
2	0,141	1	0,992	16,07	16,49	58,54
	0,144	1	1,014	16,90		
3	0,088	1	0,594	9,63	10,14	68,68
	0,094	1	0,639	10,65		
4	0,101	1	0,692	11,21	11,49	80,17
	0,103	1	0,707	11,78		
5	0,091	1	0,617	10,00	10,20	90,37
	0,092	1	0,624	10,40		
6	0,104	1	0,714	11,58	11,36	101,74
	0,098	1	0,669	11,15		
8	0,032	1	0,174	2,82	2,58	104,31
	0,028	1	0,144	2,33		
12	0,052	1	0,324	5,25	5,31	109,63
	0,053	1	0,332	5,37		

Tab. 9: Liberace flukonazolu z nosiče 8M plastifikovaného 30% triethylcitrátu

čas	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]			%
0,083	0,209	1	1,502	24,34	21,93	21,93
	0,165	1	1,172	19,53		
0,25	0,194	1	1,389	22,52	21,71	43,64
	0,176	1	1,254	20,90		
1	0,183	1	1,307	21,18	20,04	63,68
	0,160	1	1,134	18,90		
2	0,075	1	0,497	8,05	7,16	70,85
	0,059	1	0,377	6,28		
3	0,056	1	0,354	5,74	5,19	76,04
	0,046	1	0,279	4,65		
4	0,068	1	0,444	7,20	7,92	83,97
	0,078	1	0,519	8,65		
5	0,092	1	0,624	10,12	10,07	94,04
	0,089	1	0,602	10,03		
6	0,071	1	0,467	7,56	8,54	102,58
	0,085	1	0,572	9,53		
8	0,013	1	0,032	0,51	0,83	103,41
	0,018	1	0,069	1,15		
12	0,067	1	0,437	7,08	4,55	107,96
	0,025	1	0,122	2,03		



Tab. 10: Liberace terbinafinu z nosiče 3D plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	TERB	TERB [%]	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]			%
0,083	0,098	1	0,090	1,55	1,48	1,48
	0,092	1	0,084	1,41		
0,25	0,232	1	0,219	3,76	3,64	5,12
	0,223	1	0,210	3,53		
1	0,150	1	0,140	2,41	2,12	7,24
	0,118	1	0,109	1,83		
2	0,157	1	0,147	2,52	1,90	9,15
	0,084	1	0,077	1,28		
3	0,085	1	0,078	1,33	1,18	10,32
	0,068	1	0,061	1,03		
4	0,124	1	0,115	1,98	1,91	12,24
	0,119	1	0,110	1,85		
5	0,173	1	0,162	2,79	2,51	14,75
	0,143	1	0,133	2,24		
6	0,231	1	0,218	3,74	3,26	18,00
	0,176	1	0,165	2,77		
7	0,197	1	0,185	3,18	2,98	20,98
	0,176	1	0,165	2,77		
8	0,317	1	0,301	5,16	4,39	25,37
	0,229	1	0,216	3,62		
9	0,767	1	0,733	12,60	9,24	34,61
	0,369	1	0,351	5,88		
10	0,177	1	0,166	2,85	4,42	39,04
	0,376	1	0,357	6,00		
11	0,279	1	0,264	4,54	4,36	43,40
	0,264	1	0,250	4,19		
14	0,874	1	0,836	14,37	12,42	55,81
	0,653	1	0,624	10,46		
18	0,871	1	0,833	14,32	14,21	70,02
	0,878	1	0,840	14,09		
20	0,881	1	0,843	14,48	14,26	84,28
	0,874	1	0,836	14,03		
22	0,495	1	0,472	8,11	6,24	90,51
	0,275	1	0,260	4,37		

Tab. 11: Liberace terbinafinu z nosiče 5D plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,680	1	0,650	10,51	11,06	11,06
	0,755	1	0,722	11,61		
0,25	0,728	2	1,392	22,52	23,38	34,44
	0,788	2	1,507	24,24		
1	0,610	2	1,165	18,84	19,05	53,49
	0,627	2	1,197	19,26		
2	0,796	1	0,761	12,32	13,19	66,68
	0,913	1	0,874	14,05		
3	0,523	1	0,499	8,07	8,95	75,63
	0,640	1	0,611	9,83		
4	0,786	1	0,752	12,16	12,88	88,51
	0,883	1	0,845	13,59		
5	0,370	1	0,352	5,69	6,30	94,80
	0,451	1	0,429	6,91		

Tab. 12: Liberace terbinafinu z nosiče 8D plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]			%
0,083	0,056	1	0,050	0,80	0,78	0,78
	0,054	1	0,048	0,77		
0,25	0,207	1	0,195	3,14	3,12	3,90
	0,204	1	0,192	3,10		
1	0,224	1	0,211	3,41	3,34	7,24
	0,215	1	0,203	3,27		
2	0,264	1	0,250	4,03	4,04	11,28
	0,266	1	0,252	4,06		
3	0,249	1	0,235	3,79	3,85	15,13
	0,256	1	0,242	3,90		
4	0,260	1	0,246	3,96	4,09	19,22
	0,276	1	0,261	4,21		
5	0,270	1	0,255	4,12	4,24	23,46
	0,286	1	0,271	4,37		
6	0,369	1	0,351	5,65	5,03	28,49
	0,289	1	0,274	4,41		
7	0,293	1	0,278	4,48	4,82	33,31
	0,337	1	0,320	5,16		
8	0,288	1	0,273	4,40	4,43	37,74
	0,292	1	0,277	4,46		
10	0,202	1	0,190	3,06	3,73	41,47
	0,288	1	0,273	4,40		
15	0,215	1	0,203	3,27	3,34	44,81
	0,224	1	0,211	3,41		
17	0,162	1	0,152	2,44	2,70	47,51
	0,195	1	0,183	2,96		
20	0,183	1	0,172	2,77	3,00	50,51
	0,213	1	0,201	3,24		
22	0,125	1	0,116	1,87	2,54	53,05
	0,211	1	0,199	3,20		

Tab. 13: Liberace terbinafinu z nosiče 3M plastifikovaného 30% triethylcitrátu

Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní
			[mg/15ml]			%
0,083	0,005	1	0,001	0,01	0,00	0,00
	0,004	1	0,000	0,00		
0,25	0,005	1	0,001	0,01	0,00	0,00
	0,004	1	0,000	0,00		
1	0,005	1	0,001	0,01	0,03	0,03
	0,007	1	0,003	0,04		
2	0,012	1	0,007	0,12	0,20	0,23
	0,022	1	0,017	0,28		
3	0,019	1	0,014	0,23	0,32	0,55
	0,030	1	0,025	0,41		
4	0,047	1	0,041	0,68	0,83	1,39
	0,066	1	0,059	0,99		
5	0,097	1	0,089	1,48	1,52	2,90
	0,101	1	0,093	1,55		
6	0,023	1	0,018	0,30	0,28	3,19
	0,021	1	0,016	0,27		
7	0,034	1	0,028	0,47	0,51	3,70
	0,039	1	0,033	0,55		
8	0,030	1	0,025	0,41	0,37	4,07
	0,025	1	0,020	0,33		
10	0,178	1	0,167	2,78	2,69	6,76
	0,166	1	0,155	2,59		
15	0,264	1	0,250	4,16	4,34	11,09
	0,286	1	0,271	4,51		
17	0,187	1	0,176	2,93	3,82	14,91
	0,298	1	0,282	4,71		
20	0,258	1	0,244	4,06	4,31	19,22
	0,289	1	0,274	4,56		
22	0,274	1	0,259	4,32	4,30	23,52
	0,271	1	0,256	4,27		

Tab. 14: Liberace terbinafinu z nosiče 5M plastifikovaného 30% triethylcitrátu

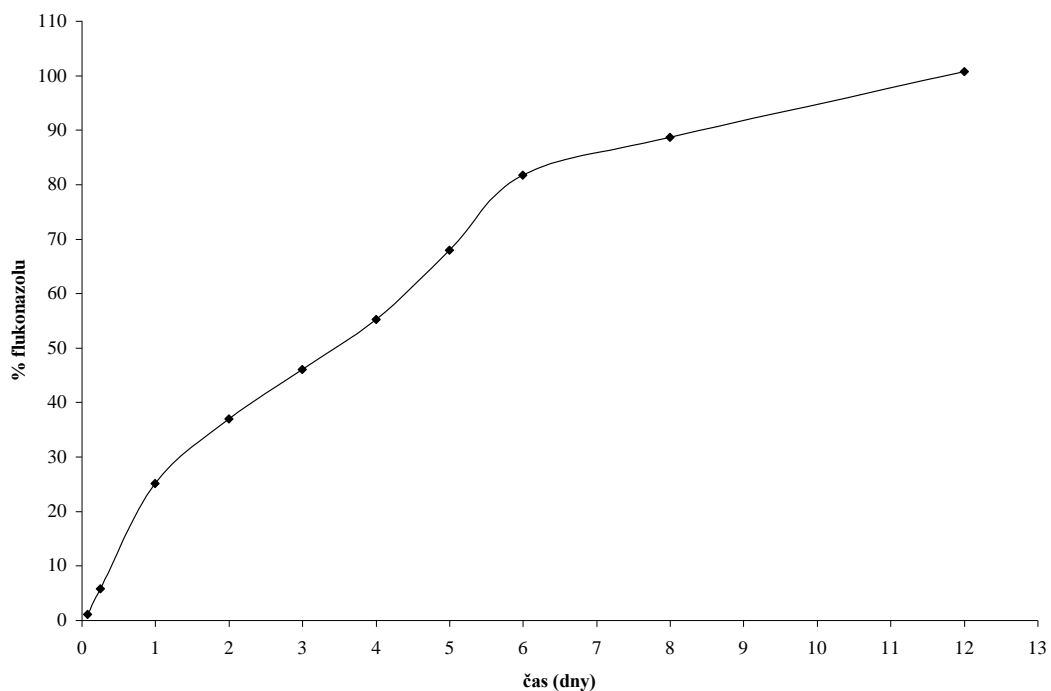
Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,034	1	0,028	0,47	0,32	0,32
	0,015	1	0,010	0,16		
0,25	0,274	1	0,259	4,25	3,87	4,18
	0,229	1	0,216	3,48		
1	0,217	1	0,204	3,35	2,87	7,05
	0,158	1	0,148	2,38		
2	0,217	1	0,204	3,35	2,91	9,95
	0,163	1	0,153	2,46		
3	0,187	1	0,176	2,88	2,47	12,42
	0,137	1	0,128	2,06		
4	0,169	1	0,158	2,59	2,19	14,61
	0,119	1	0,110	1,78		
5	0,236	1	0,223	3,65	2,97	17,58
	0,152	1	0,142	2,29		
6	0,295	1	0,279	4,58	3,66	21,24
	0,181	1	0,170	2,74		
7	0,275	1	0,260	4,27	3,45	24,68
	0,174	1	0,163	2,63		
8	0,239	1	0,226	3,70	3,20	27,88
	0,178	1	0,167	2,69		
9	0,260	1	0,246	4,03	3,23	31,11
	0,161	1	0,151	2,43		
10	0,242	1	0,228	3,75	5,71	36,82
	0,499	1	0,476	7,67		
11	0,183	1	0,172	2,82	2,38	39,20
	0,130	1	0,121	1,95		
14	0,801	1	0,766	12,56	9,37	48,57
	0,403	1	0,383	6,18		
18	0,758	1	0,725	11,88	10,56	59,13
	0,600	1	0,573	9,24		
20	0,584	1	0,557	9,14	6,43	65,56
	0,245	1	0,231	3,73		
22	0,227	1	0,214	3,51	1,95	67,50
	0,029	1	0,024	0,38		

Tab. 15: Liberace terbinafinu z nosiče 8M plastifikovaného 30% triethylcitrátu

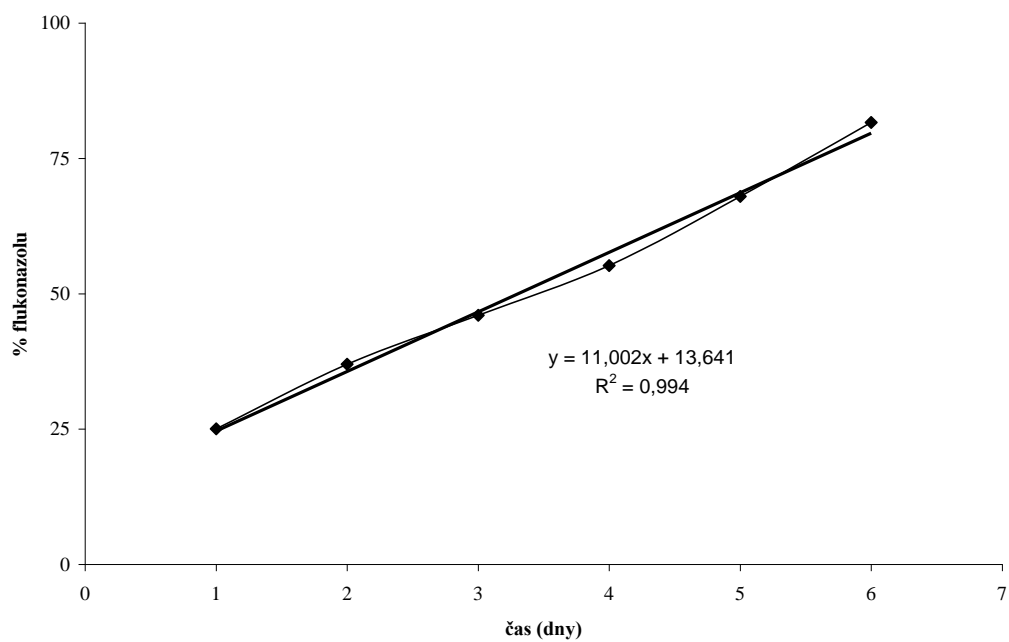
Čas (dny)	A	ředění	ACV	ACV [%]	průměr	kumulativní %
			[mg/15ml]			
0,083	0,022	1	0,017	0,27	0,24	0,24
	0,018	1	0,013	0,21		
0,25	0,024	1	0,019	0,30	0,38	0,62
	0,034	1	0,028	0,46		
1	0,072	1	0,065	1,05	1,29	1,91
	0,103	1	0,095	1,53		
2	0,160	1	0,150	2,41	2,49	4,40
	0,170	1	0,159	2,57		
3	0,210	1	0,198	3,19	3,36	7,76
	0,232	1	0,219	3,53		
4	0,211	1	0,199	3,20	3,51	11,28
	0,251	1	0,237	3,82		
5	0,199	1	0,187	3,02	3,34	14,61
	0,240	1	0,227	3,65		
6	0,163	1	0,153	2,46	2,89	17,50
	0,218	1	0,205	3,31		
7	0,206	1	0,194	3,13	3,93	21,42
	0,309	1	0,293	4,72		
8	0,195	1	0,183	2,96	3,84	25,26
	0,309	1	0,293	4,72		
10	0,217	1	0,204	3,30	4,62	29,88
	0,387	1	0,368	5,93		
15	0,292	1	0,277	4,46	4,26	34,14
	0,266	1	0,252	4,06		
17	0,235	1	0,222	3,58	3,82	37,96
	0,267	1	0,253	4,07		
20	0,236	1	0,223	3,59	4,11	42,07
	0,303	1	0,287	4,63		
22	0,274	1	0,259	4,18	4,16	46,23
	0,271	1	0,256	4,13		

## 6.2. Grafy

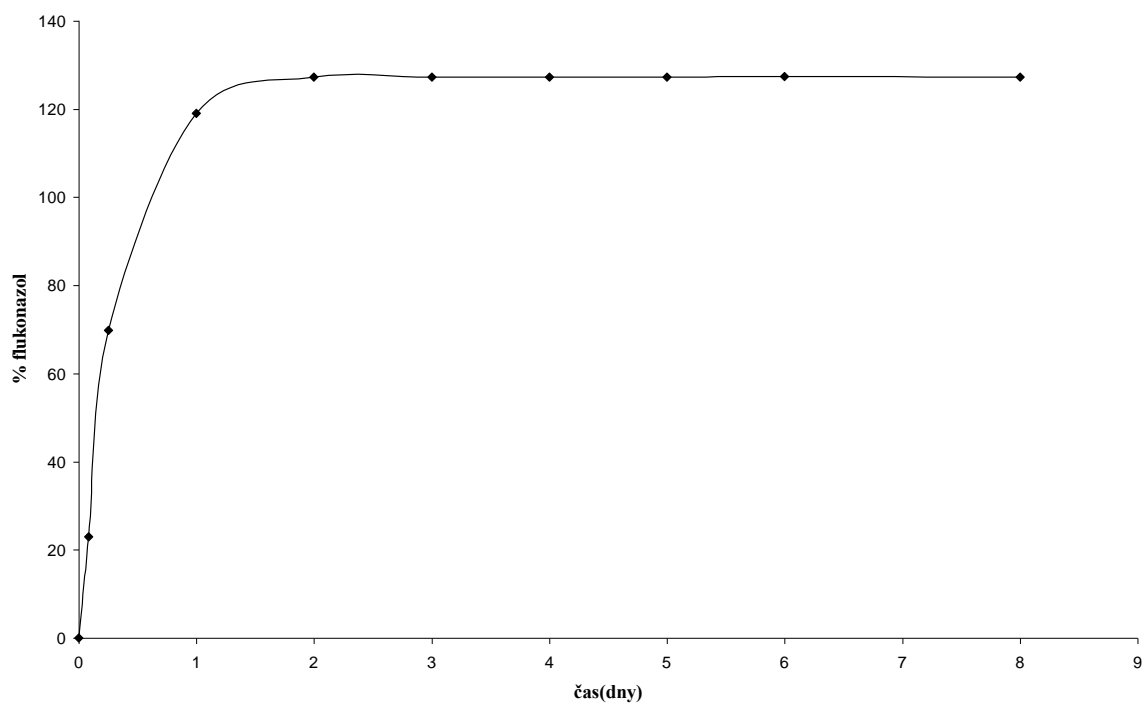
Graf 3: Liberace flukonazolu z nosiče větveného 3% dipentaerythritolu



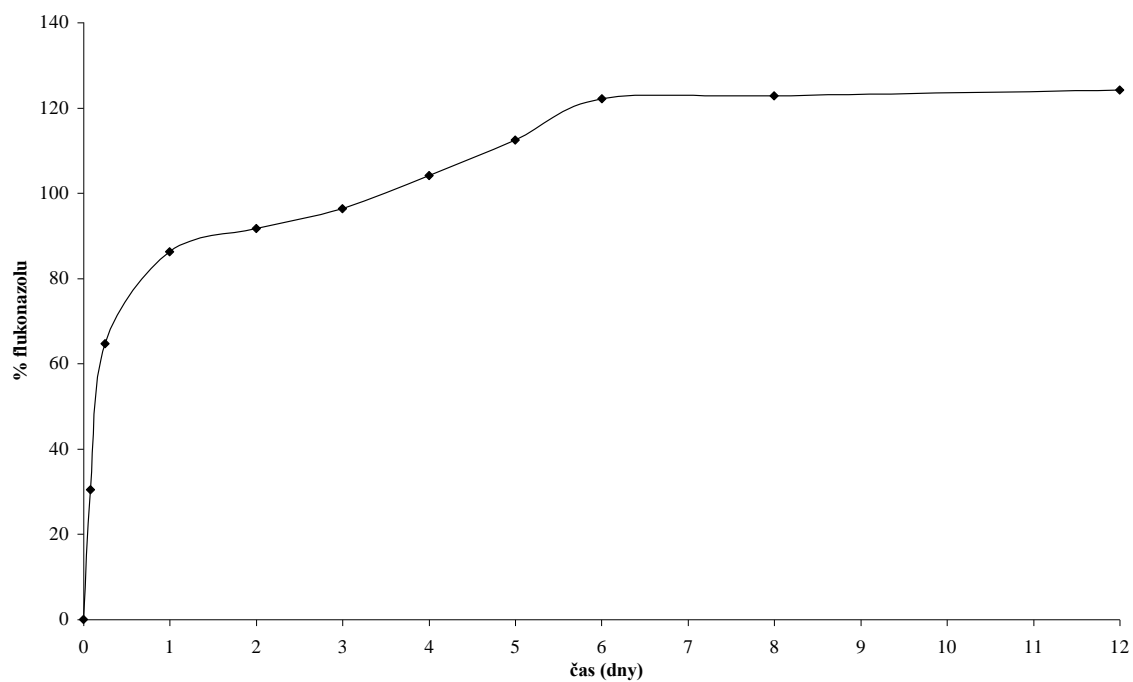
Graf 4: Lineární fáze uvolňování flukonazolu z nosiče větveného 3% dipentaerythritolu



Graf 5: Liberace flukonazolu z nosiče větveného 5% dipentaerythritolu

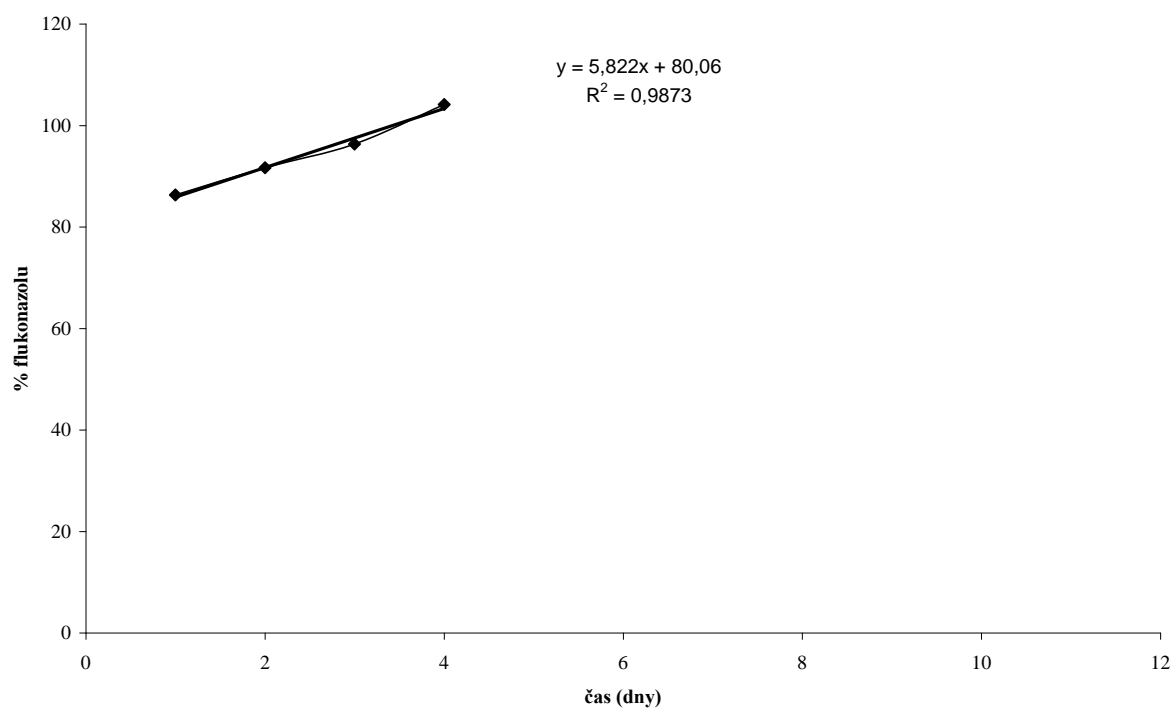


Graf 6: Liberace flukonazolu z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu

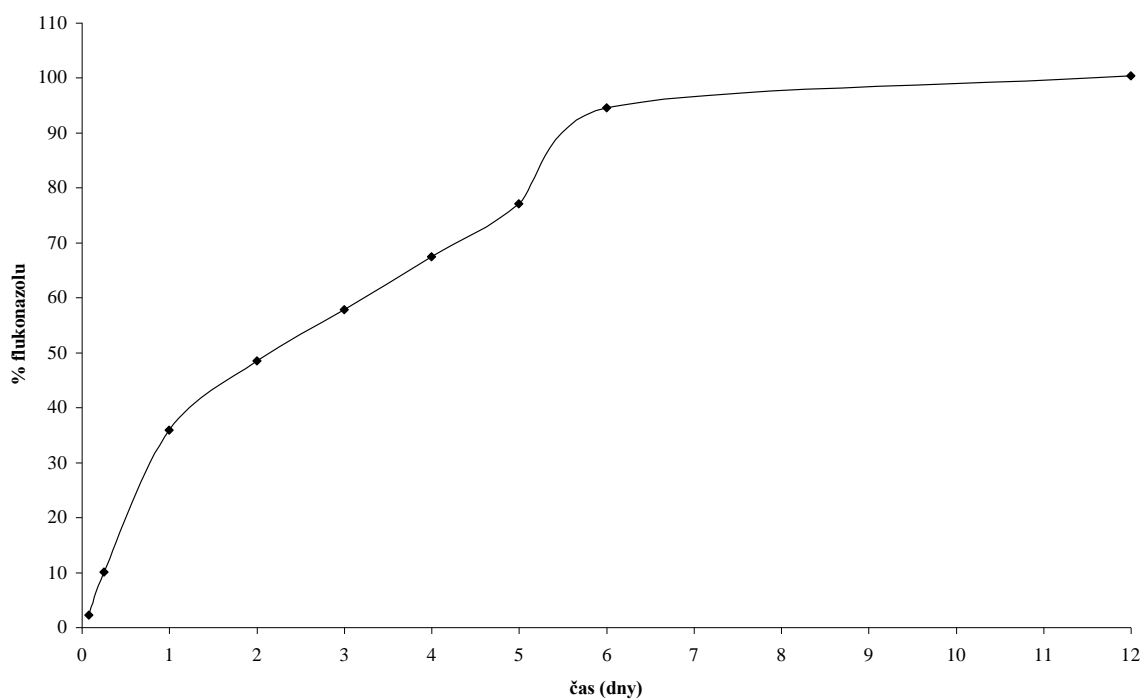




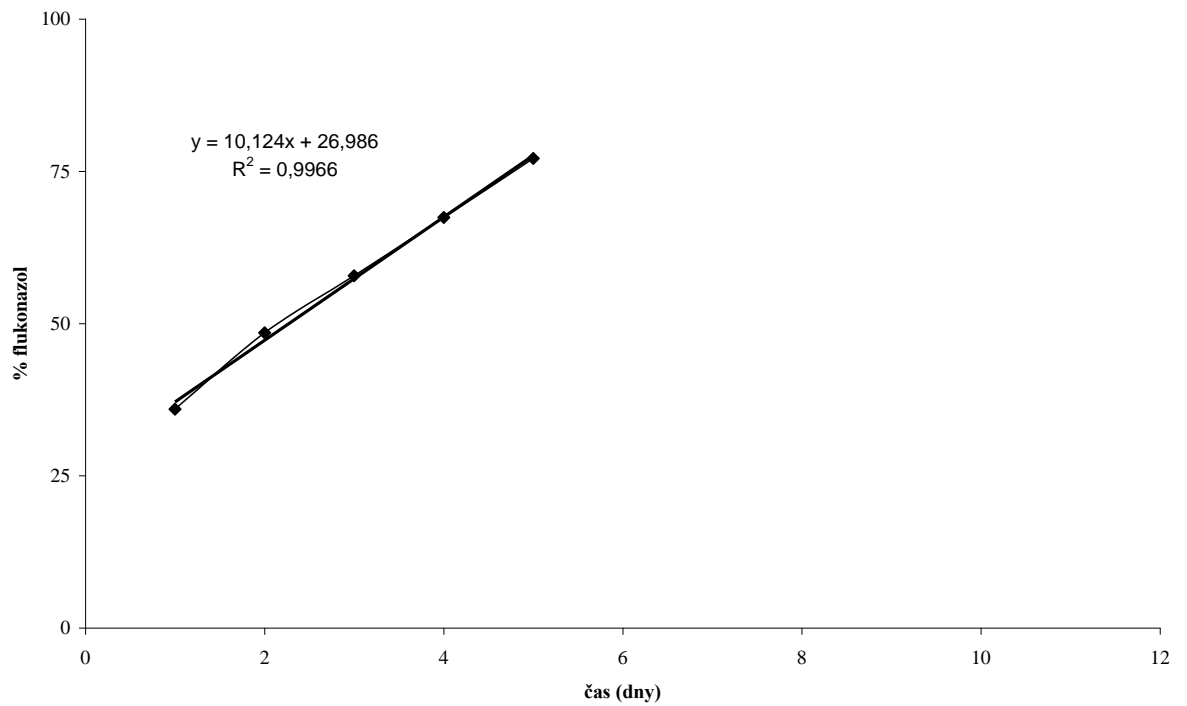
Graf 7: Lineární fáze uvolňování flukonazolu z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu



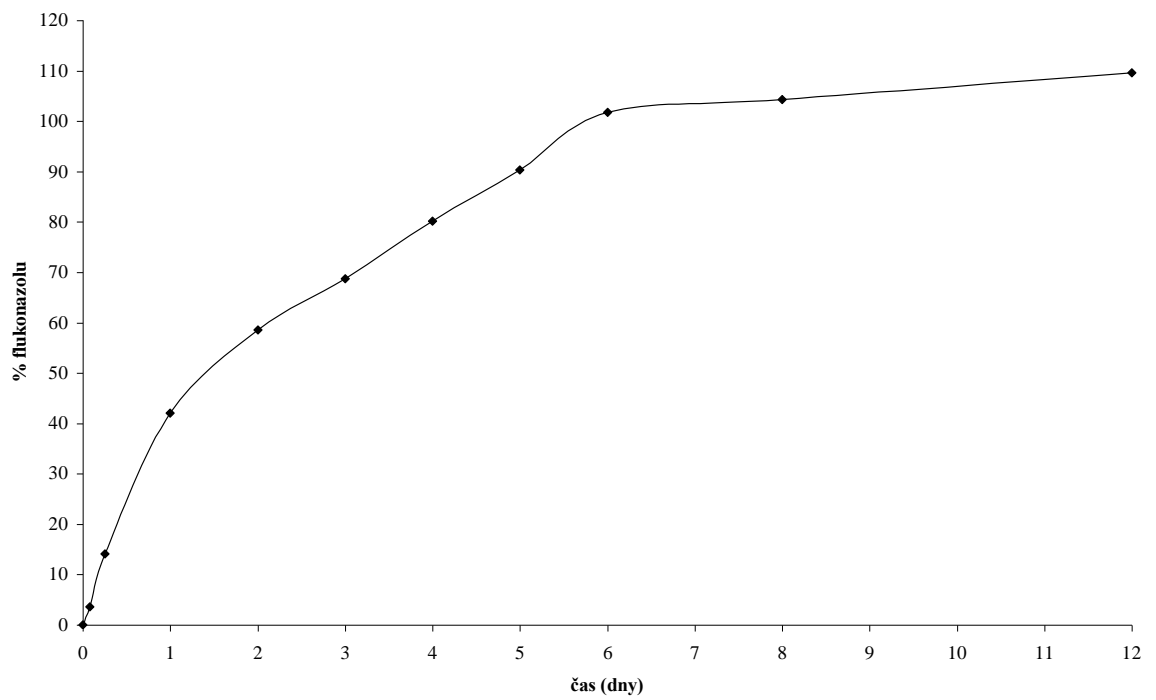
Graf 8: Liberace flukonazolu z nosiče větveného 3% mannitolu



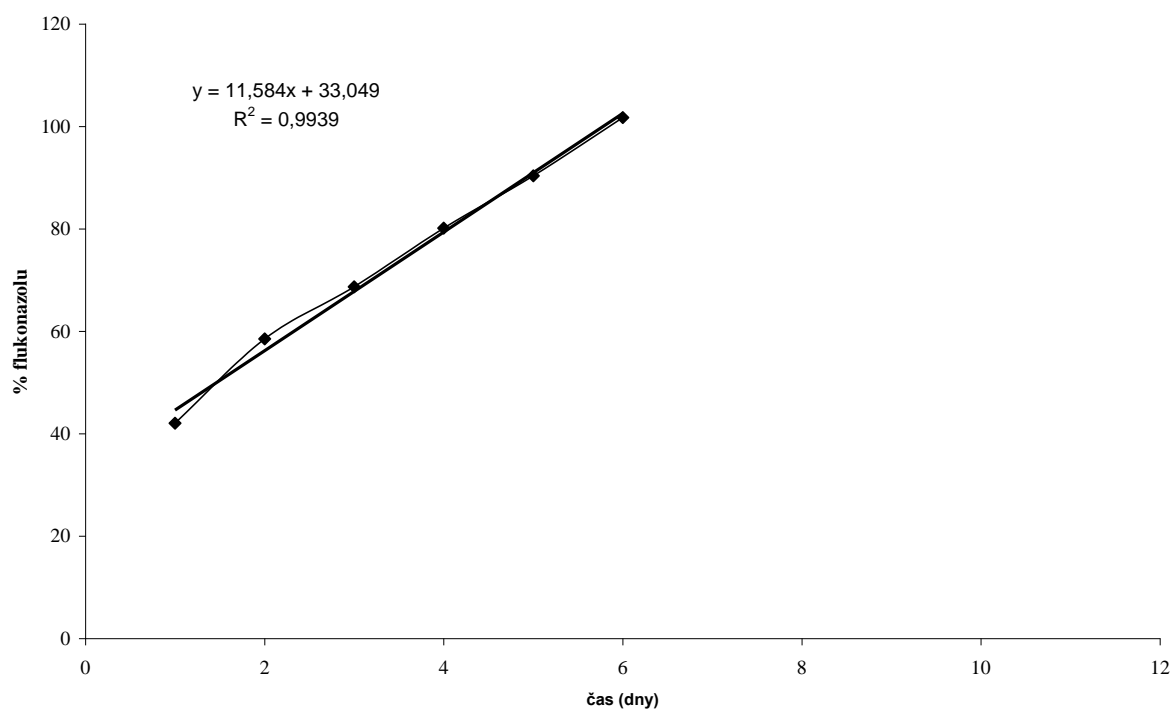
Graf 9: Lineární fáze uvolňování flukonazolu z nosiče větveného 3% mannitolu



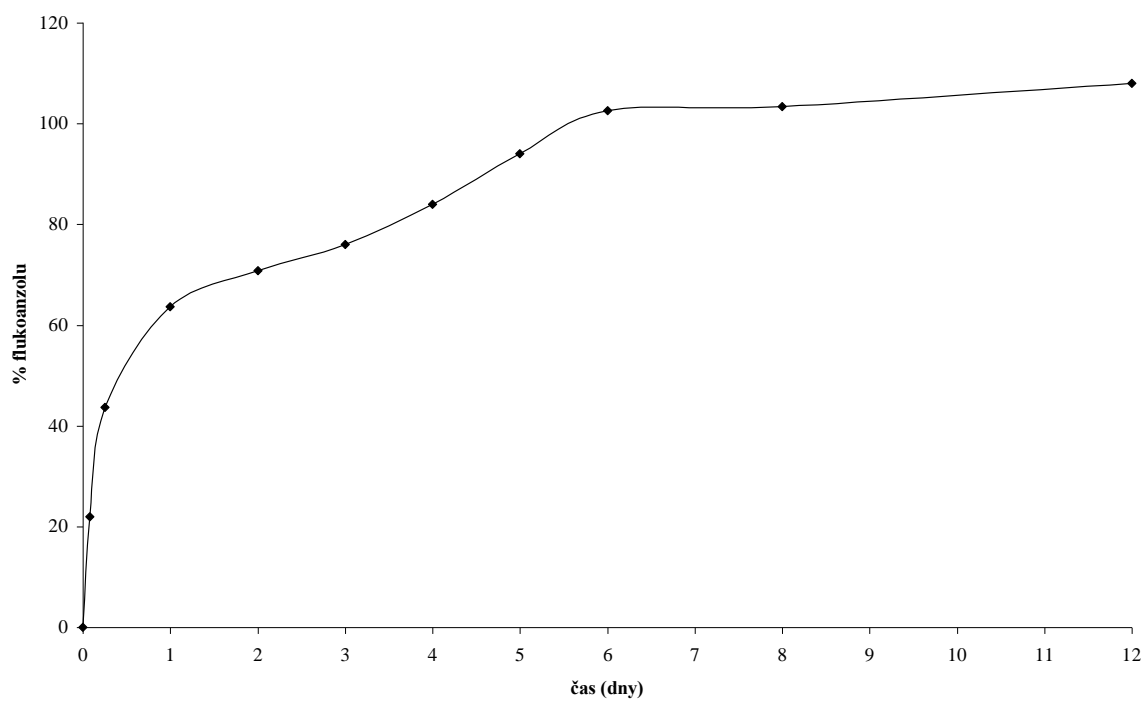
Graf 10: Liberace flukonazolu z nosiče větveného 5% mannitolu



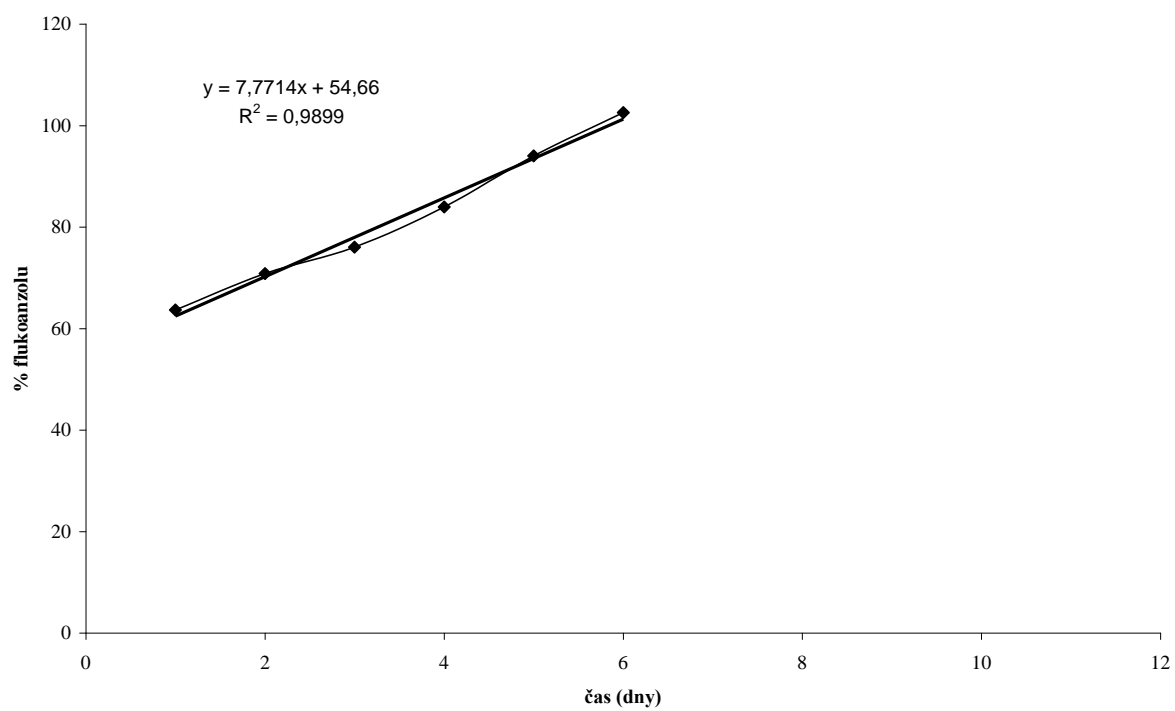
Graf 11: Lineární fáze uvolňování flukonazolu z nosiče větveného 5% mannitolu



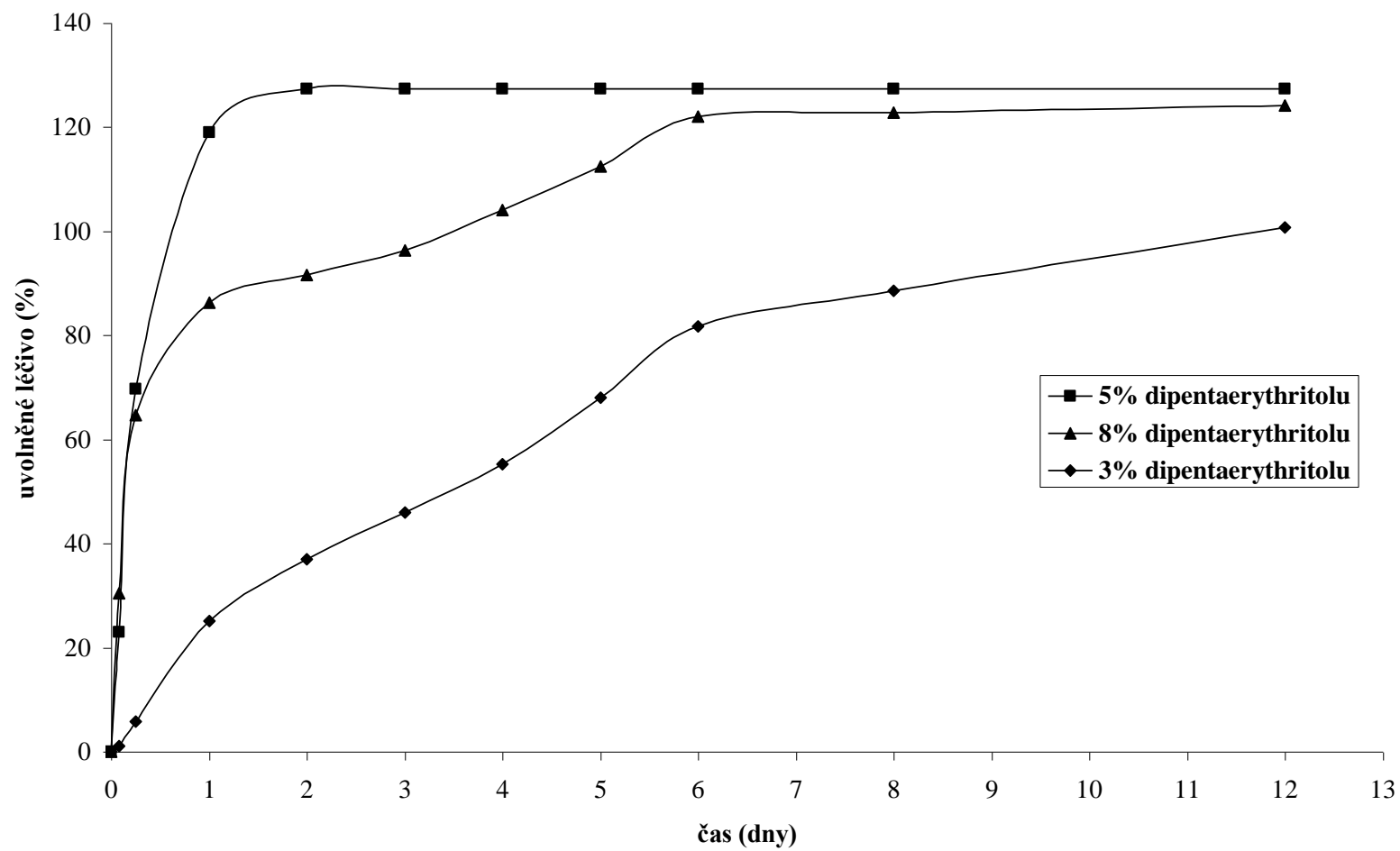
Graf 12: Liberace flukonazolu větveného 8% mannitolu



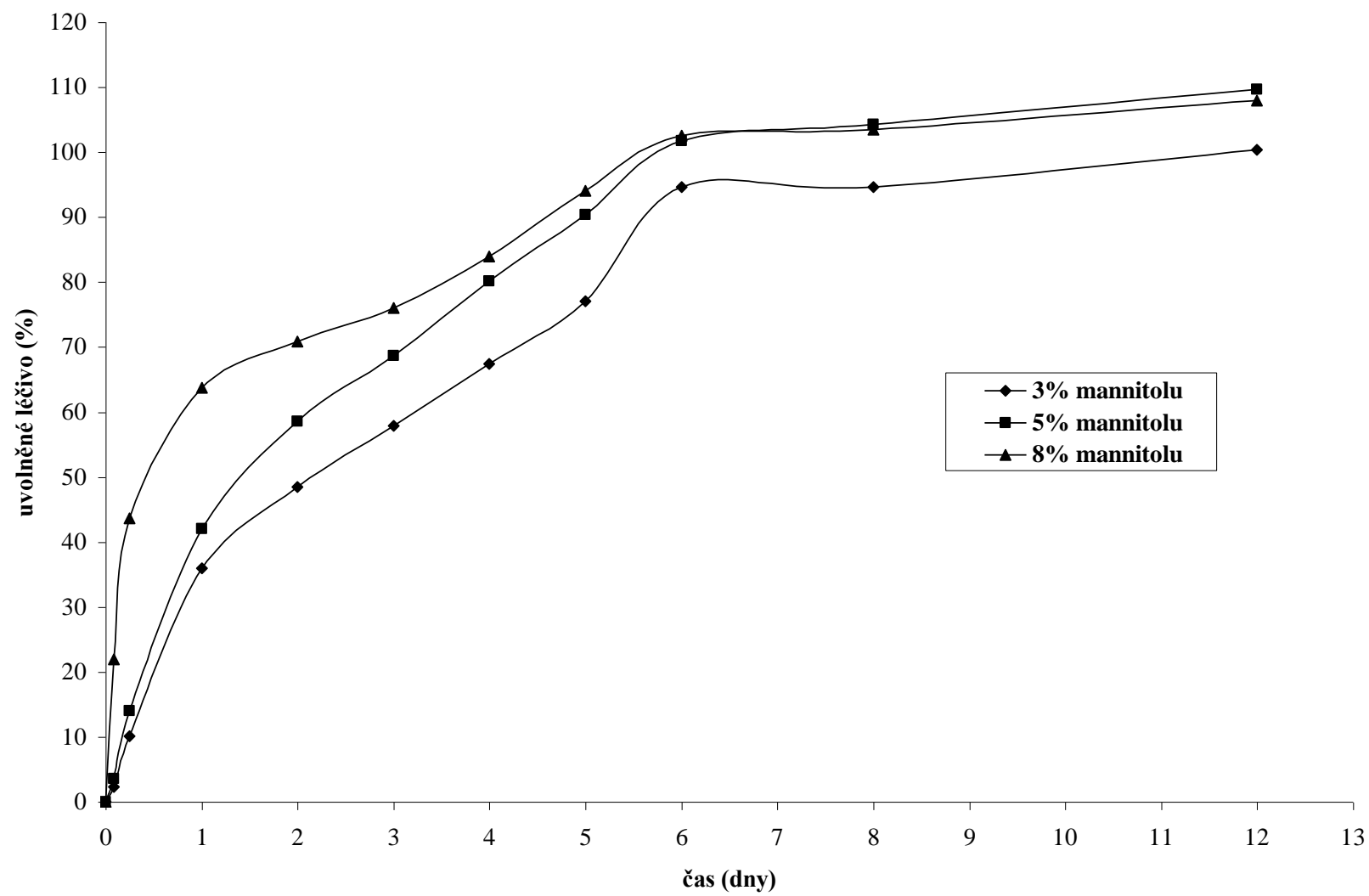
Graf 13: Lineární fáze uvolňování flukonazolu z nosiče větveného 8% mannitolu



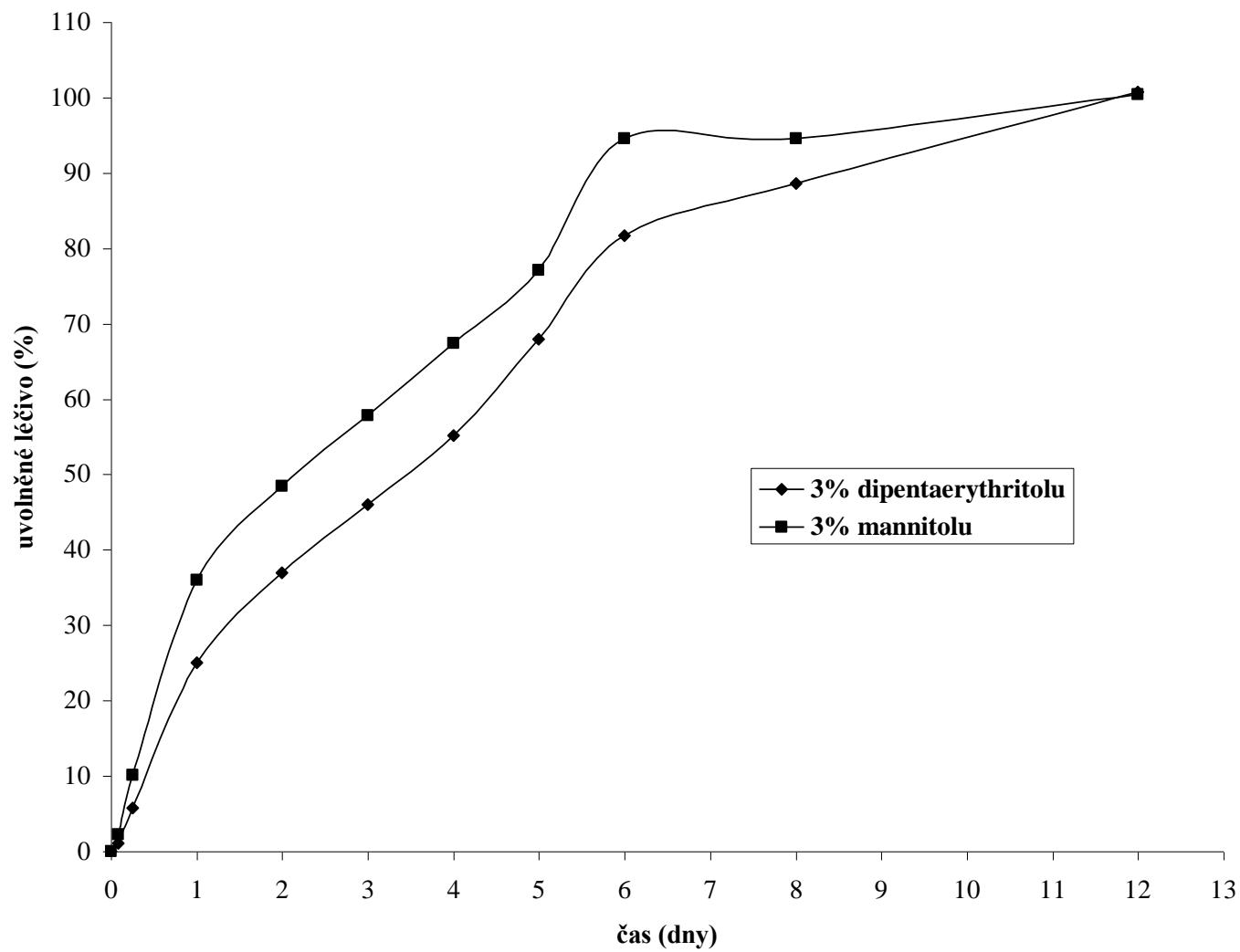
Graf 14: Liberace flukonazolu z nosičů větvených dipentaerythritolem



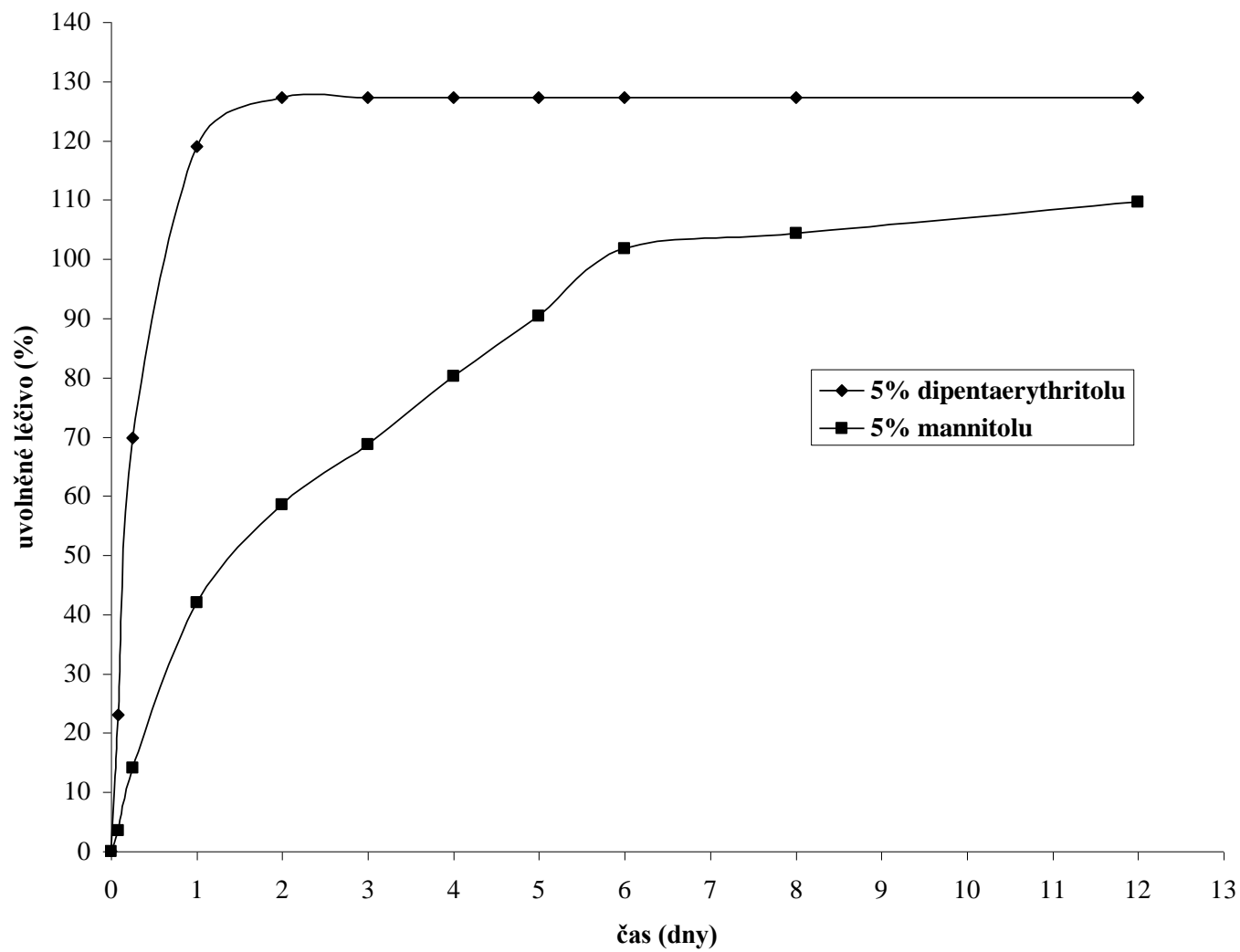
Graf 15: Liberace flukonazolu z nosičů větvených mannitolem



Graf 16: Liberace flukonazolu z nosičů větvených 3% větvicí složky

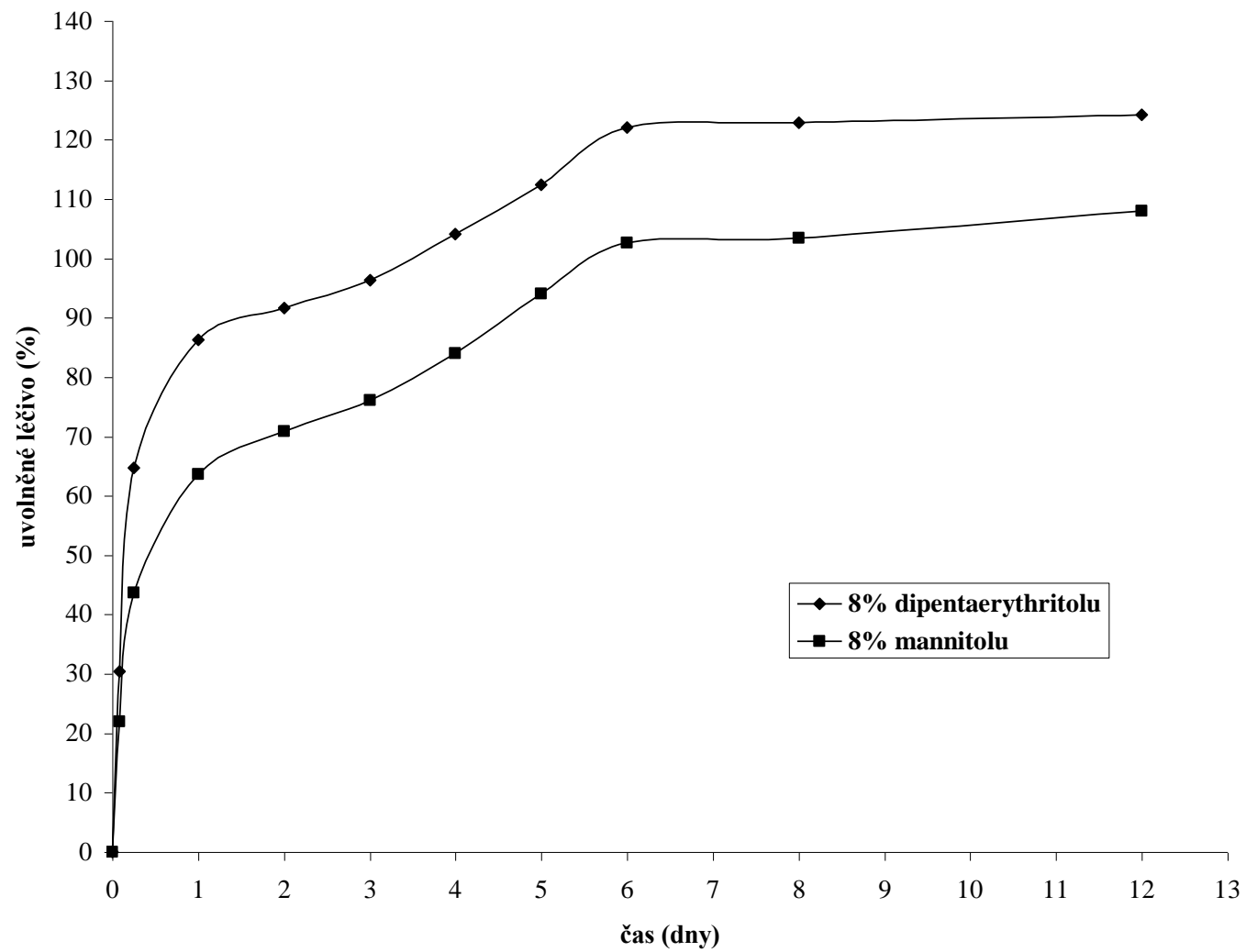


Graf 17: Liberace flukonazolu z nosičů větvených 5% větvicí složky

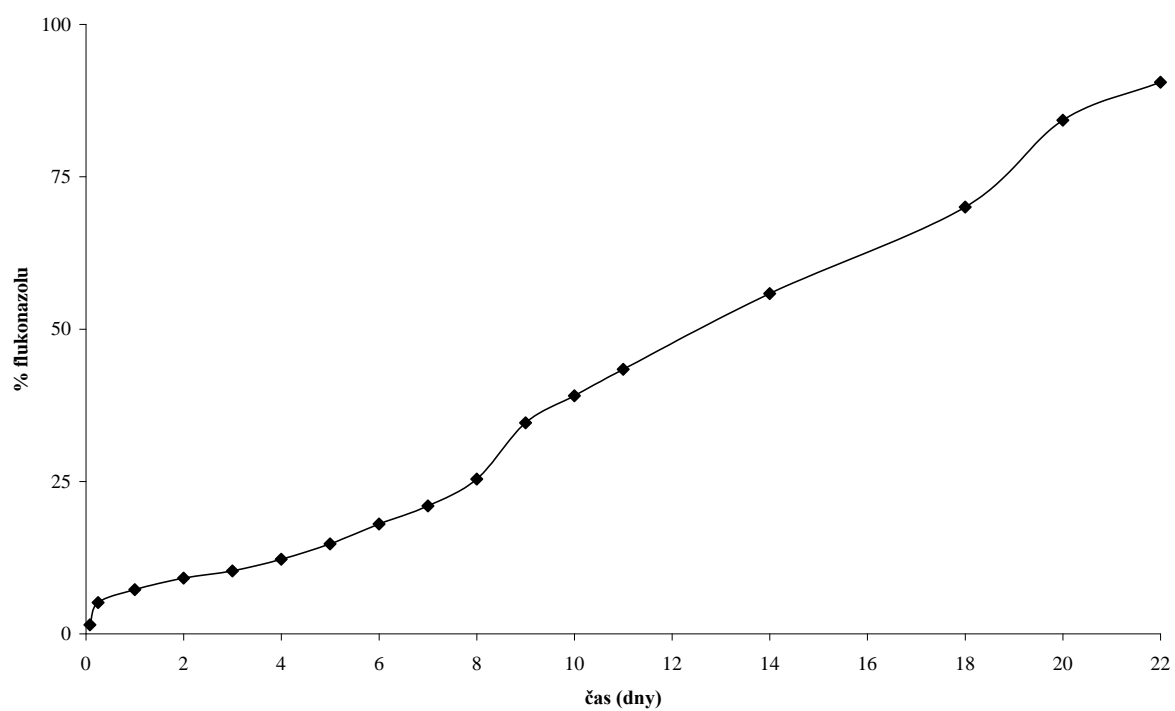




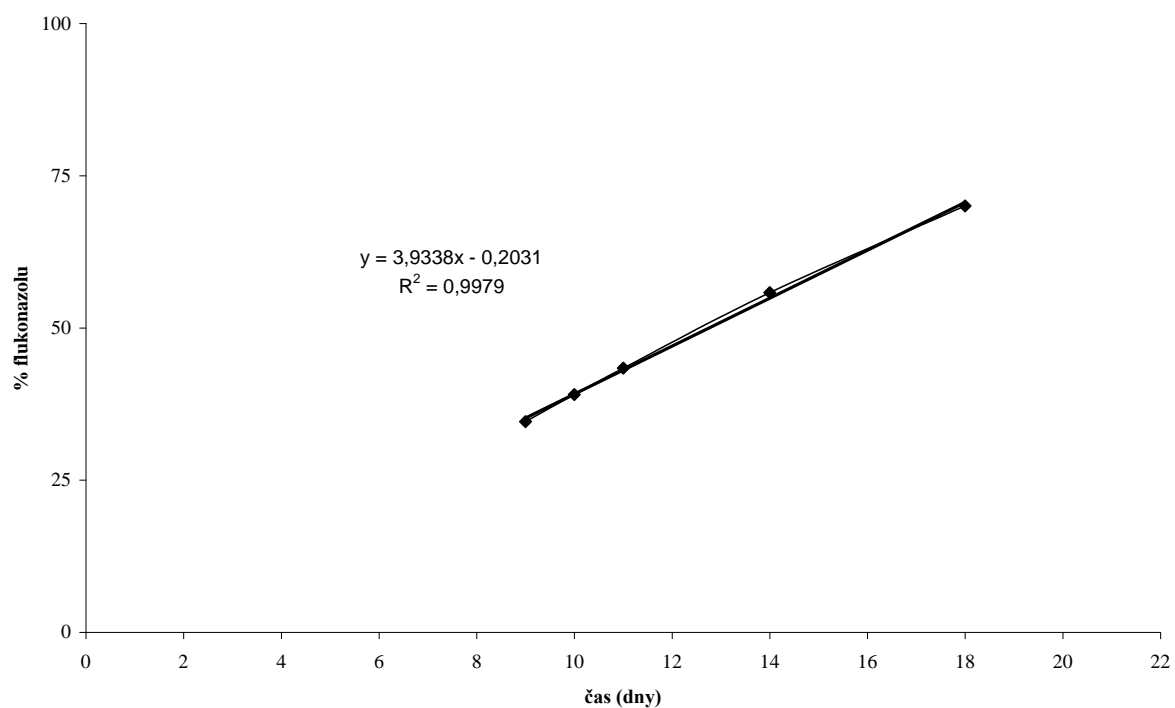
Graf 18: Liberace flukonazolu z nosičů větvených 8% větvicí složky:



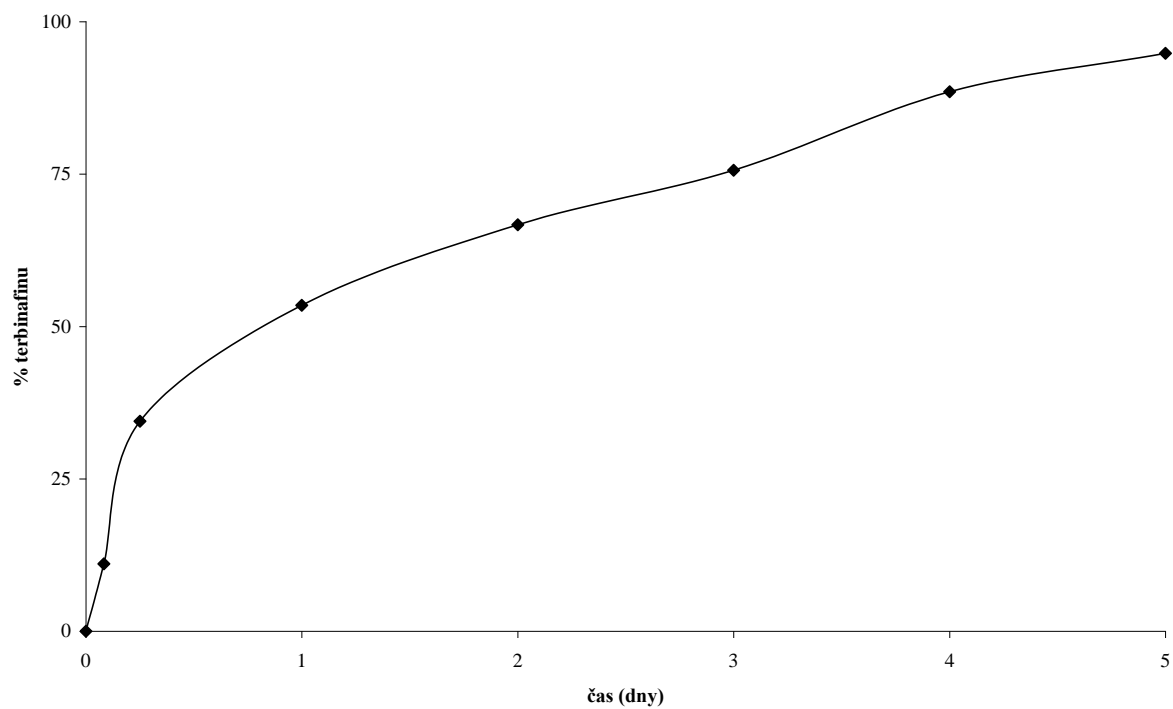
Graf 19: Liberace terbinafinu z nosiče větveného 3% dipentaerythritolu



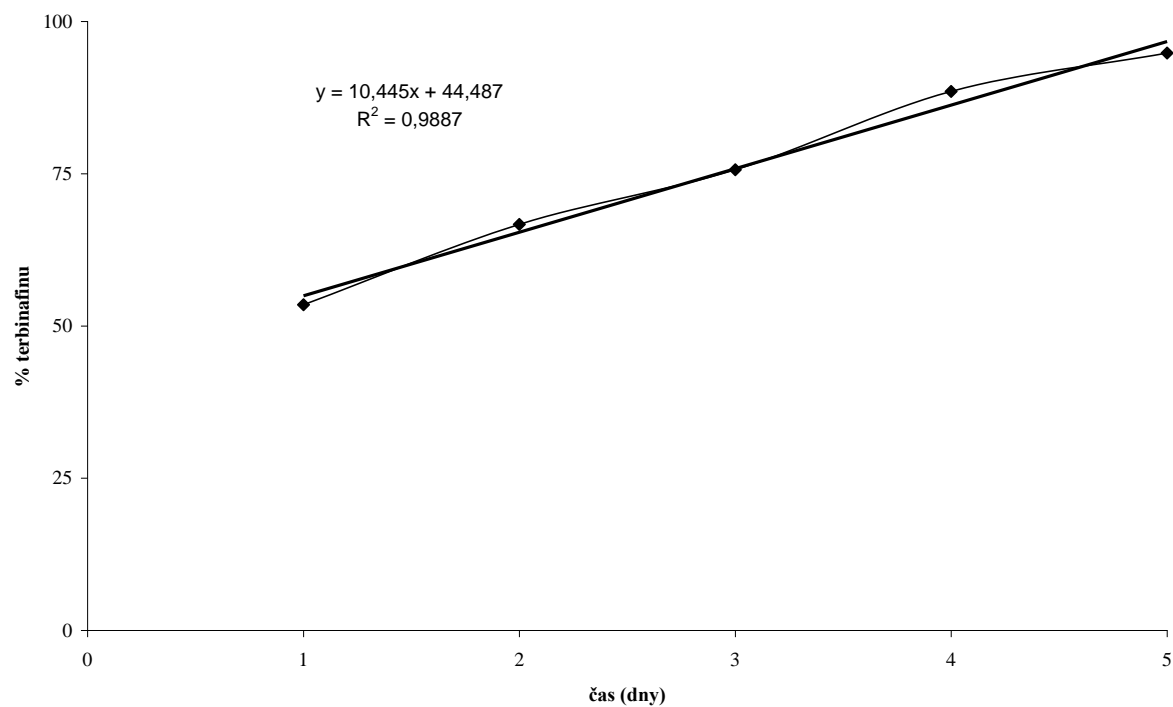
Graf 20: Lineární fáze uvolňování terbinafinu z nosiče větveného 3% dipentaerythritolu



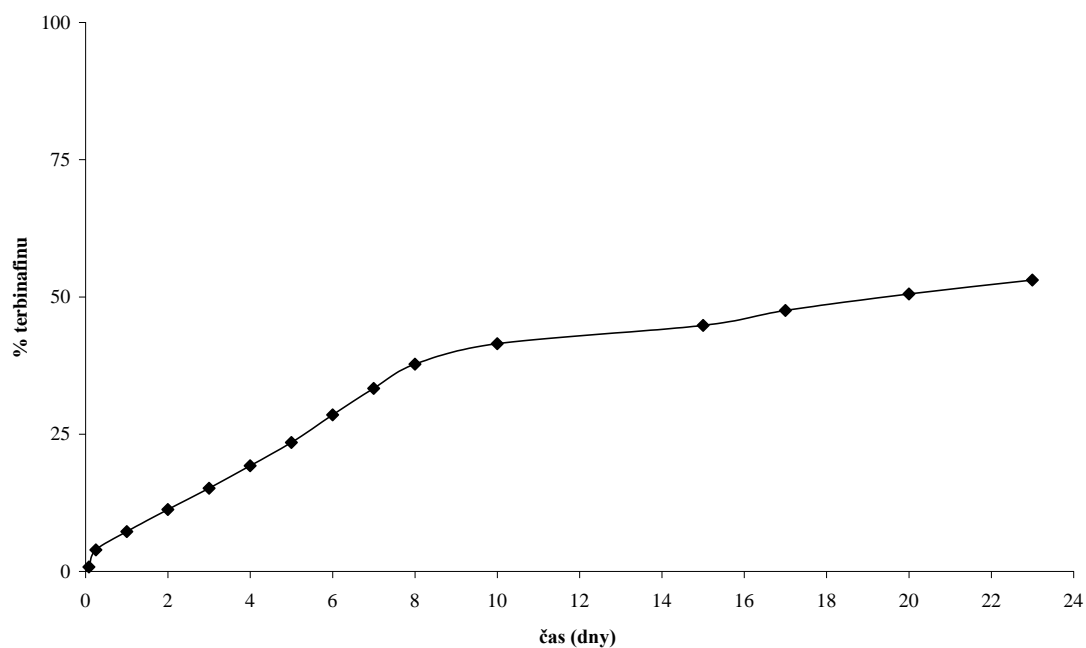
Graf 21: Liberace terbinafinu z nosiče větveného 5% dipentaerythritolu



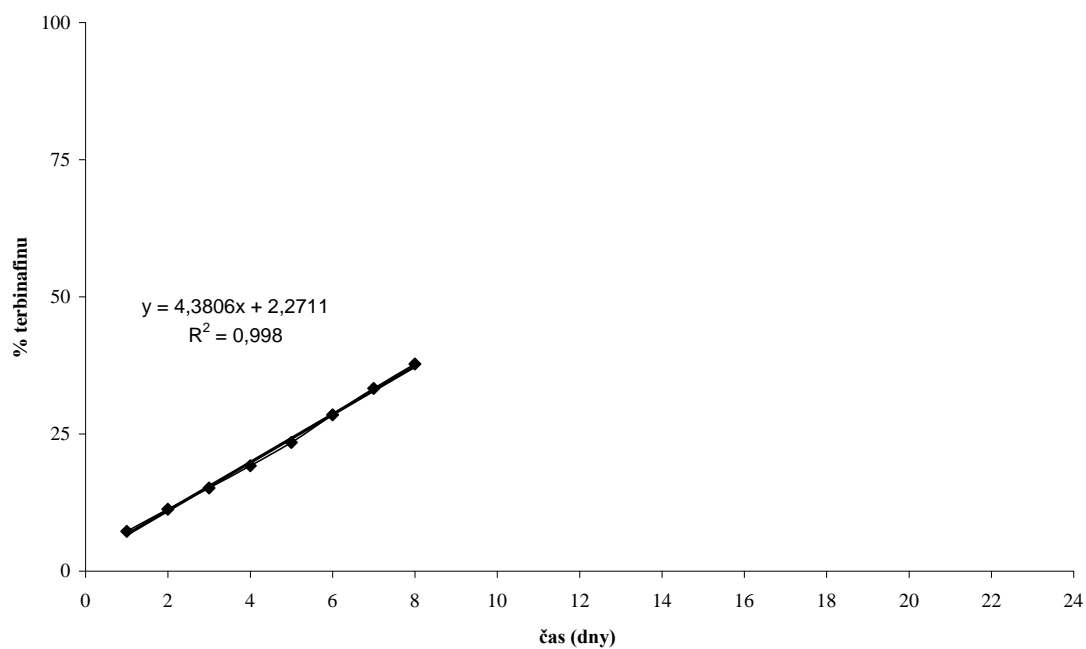
Graf 22: Lineární fáze uvolňování terbinafinu z nosiče větveného 5% dipentaerythritolu



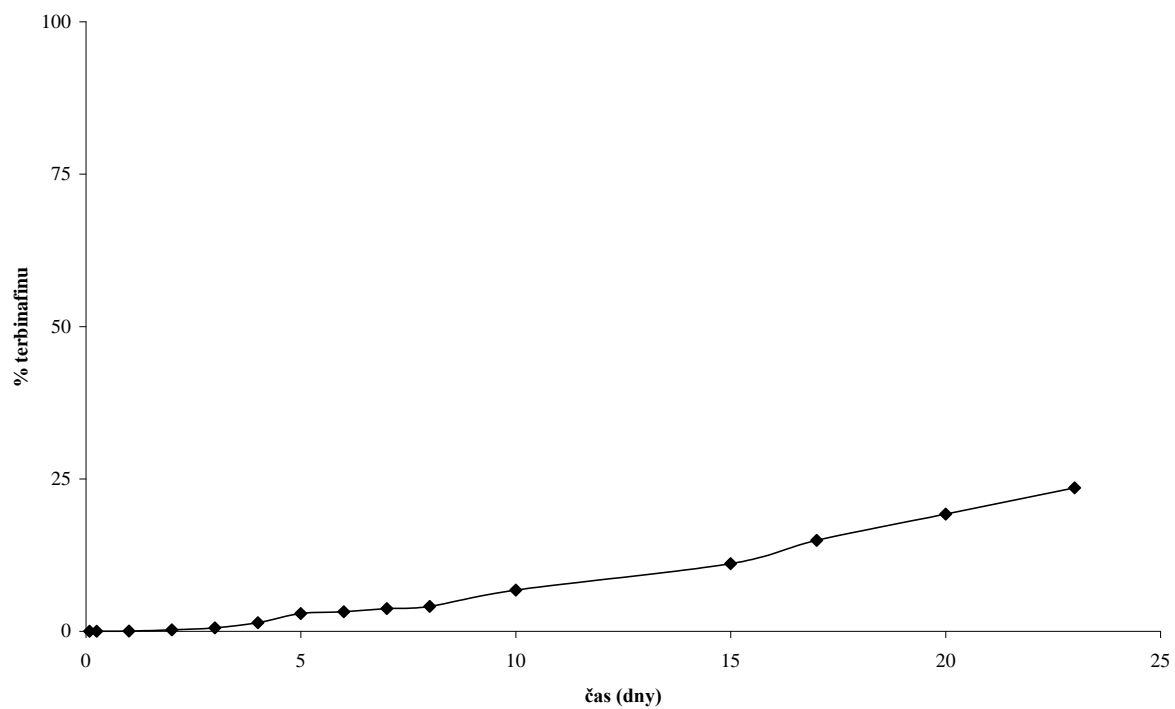
Graf 23: Liberace terbinafinu z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu



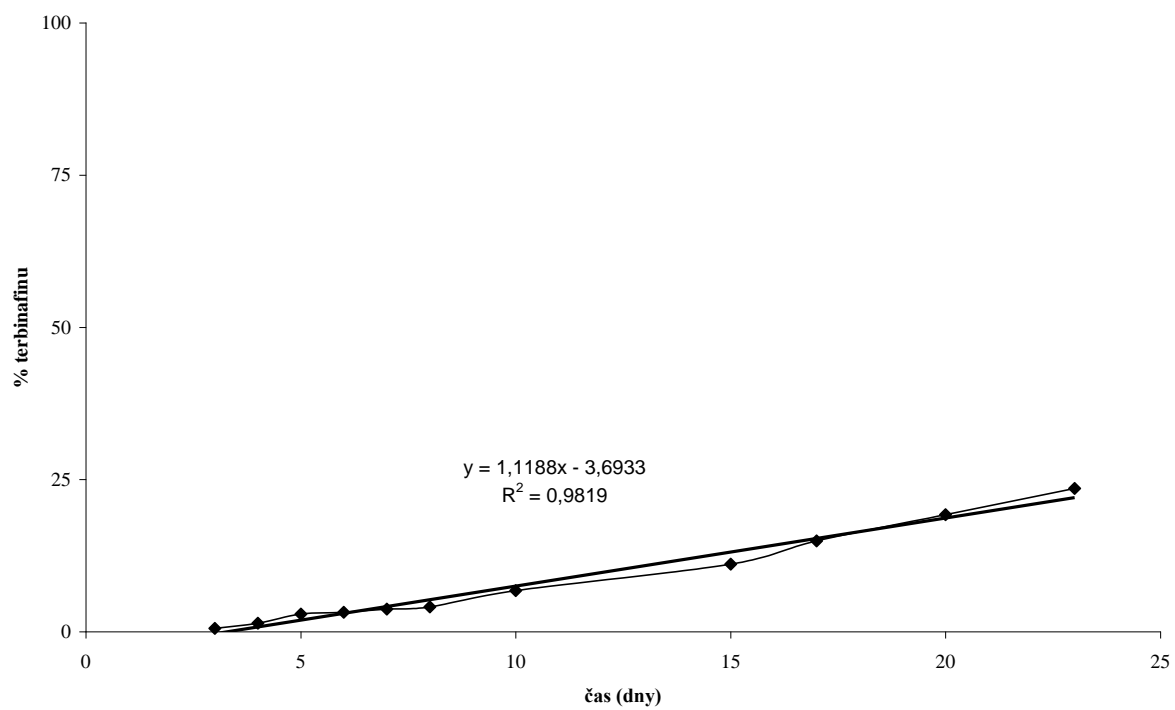
Graf 24: Lineární fáze uvolňování terbinafinu z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu



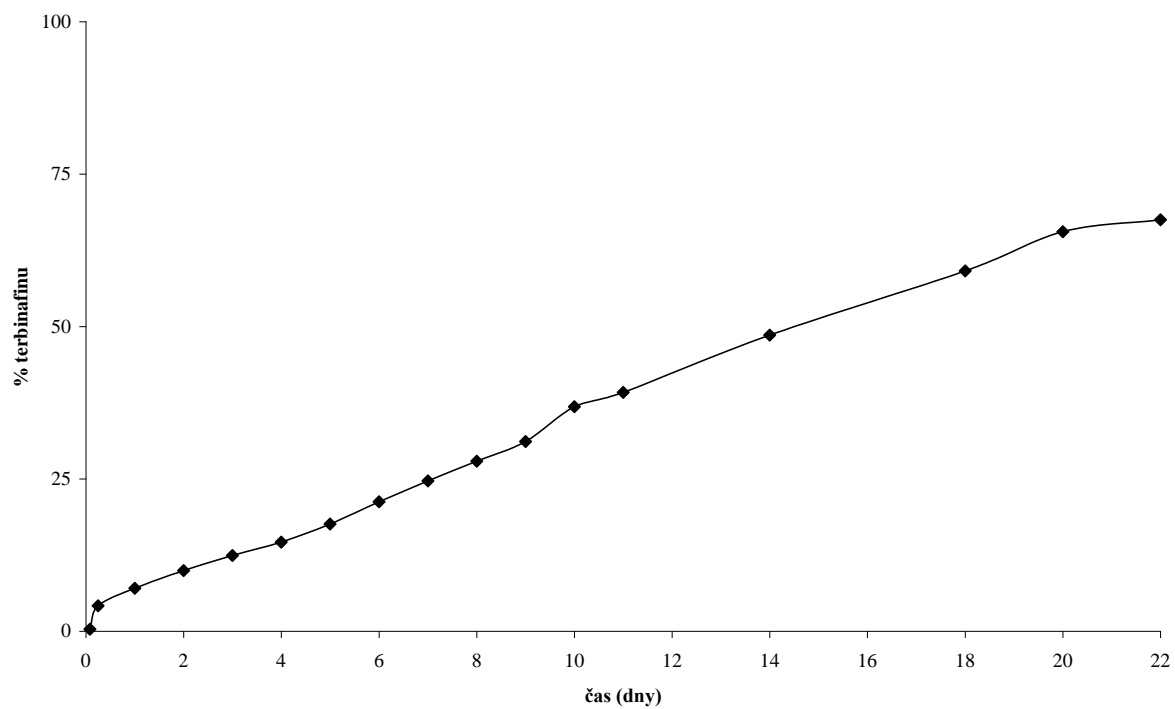
Graf 25: Liberace terbinafinu z nosiče větveného 3% mannitolu



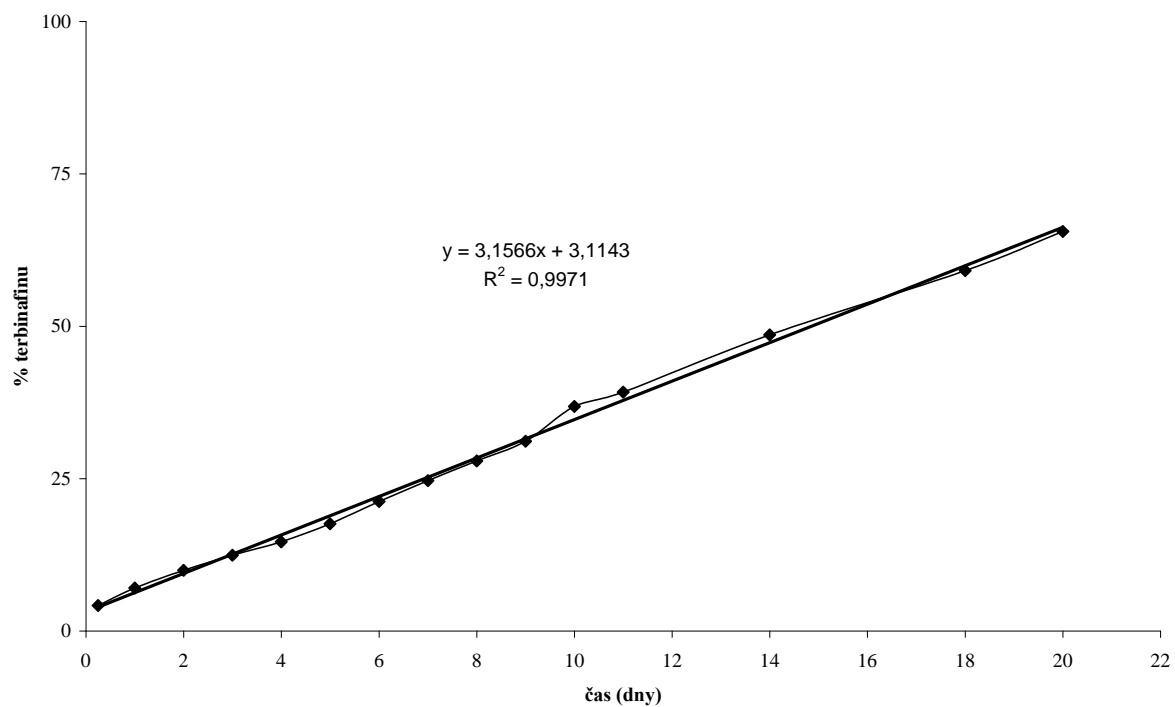
Graf 26: Lineární fáze uvolňování terbinafinu z nosiče větveného 3% mannitolu



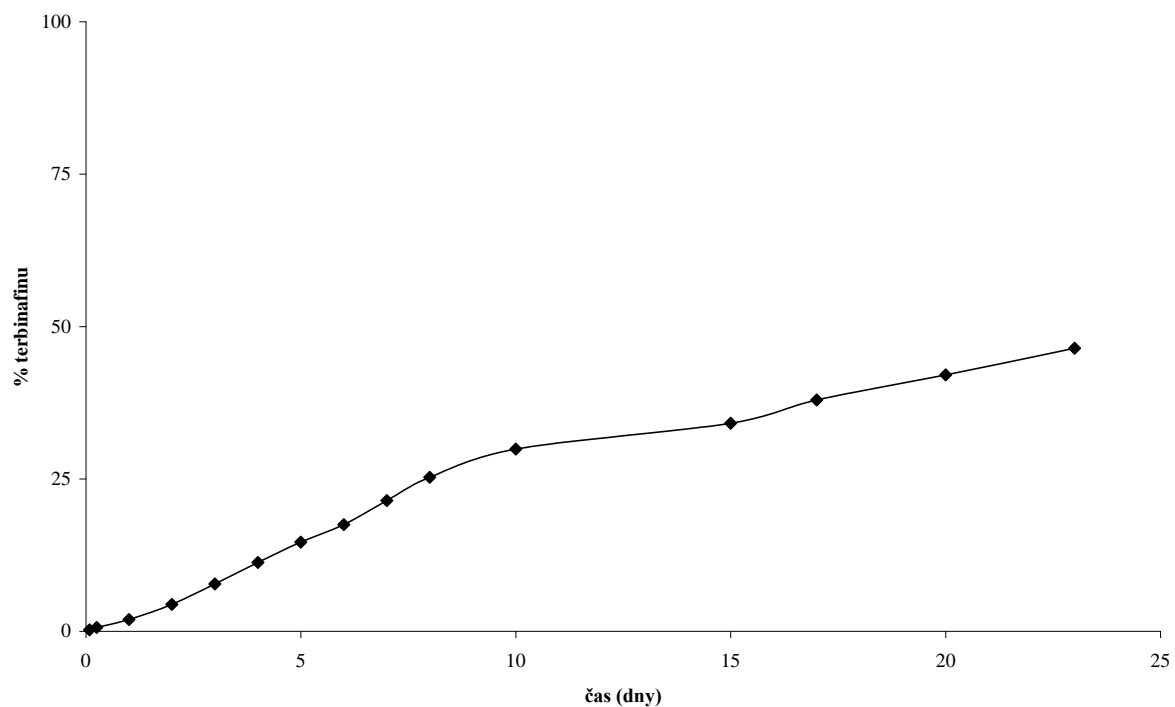
Graf 27: Liberace terbinafinu z nosiče větveného 5% mannitolu



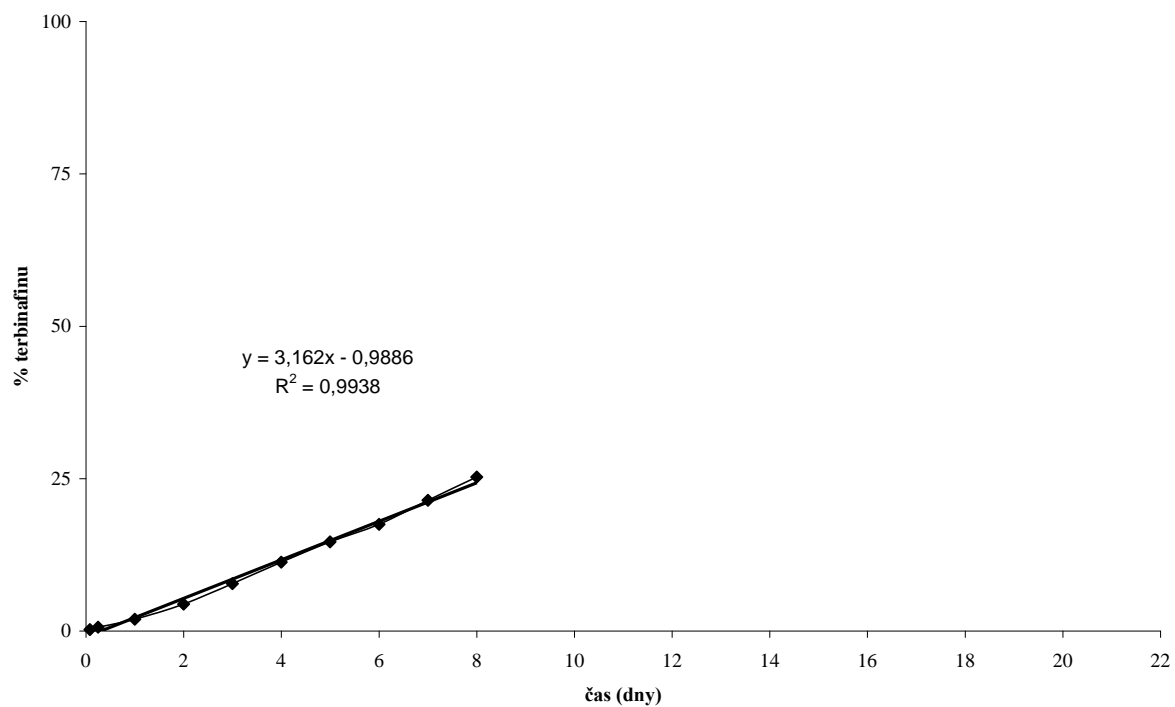
Graf 28: Lineární fáze uvolňování terbinafinu z nosiče větveného 5% mannitolu



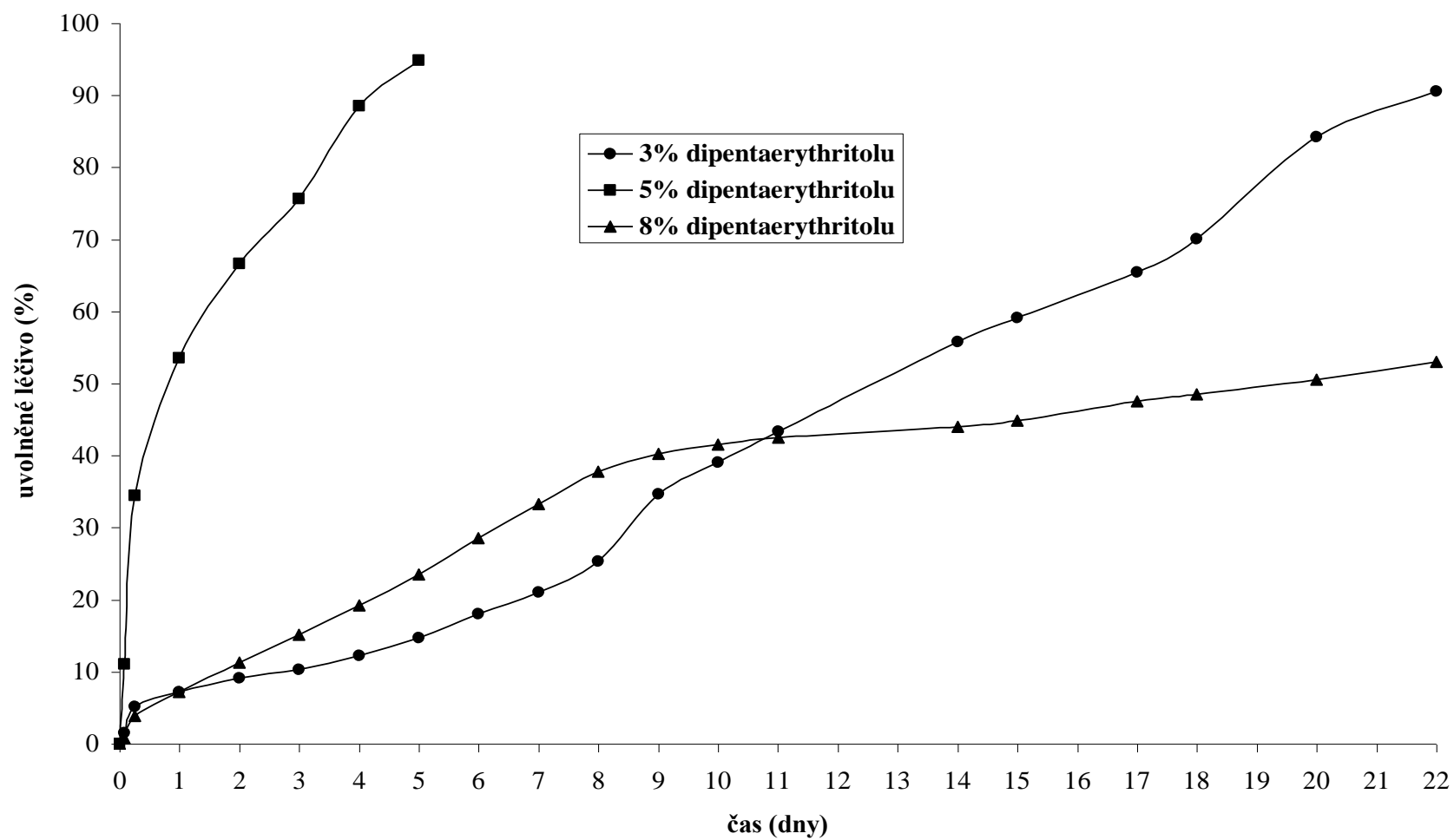
Graf 29: Liberace terbinafinu z nosiče větveného 8% mannitolu



Graf 30: Lineární fáze uvolňování terbinafinu z nosiče větveného 8% mannitolu

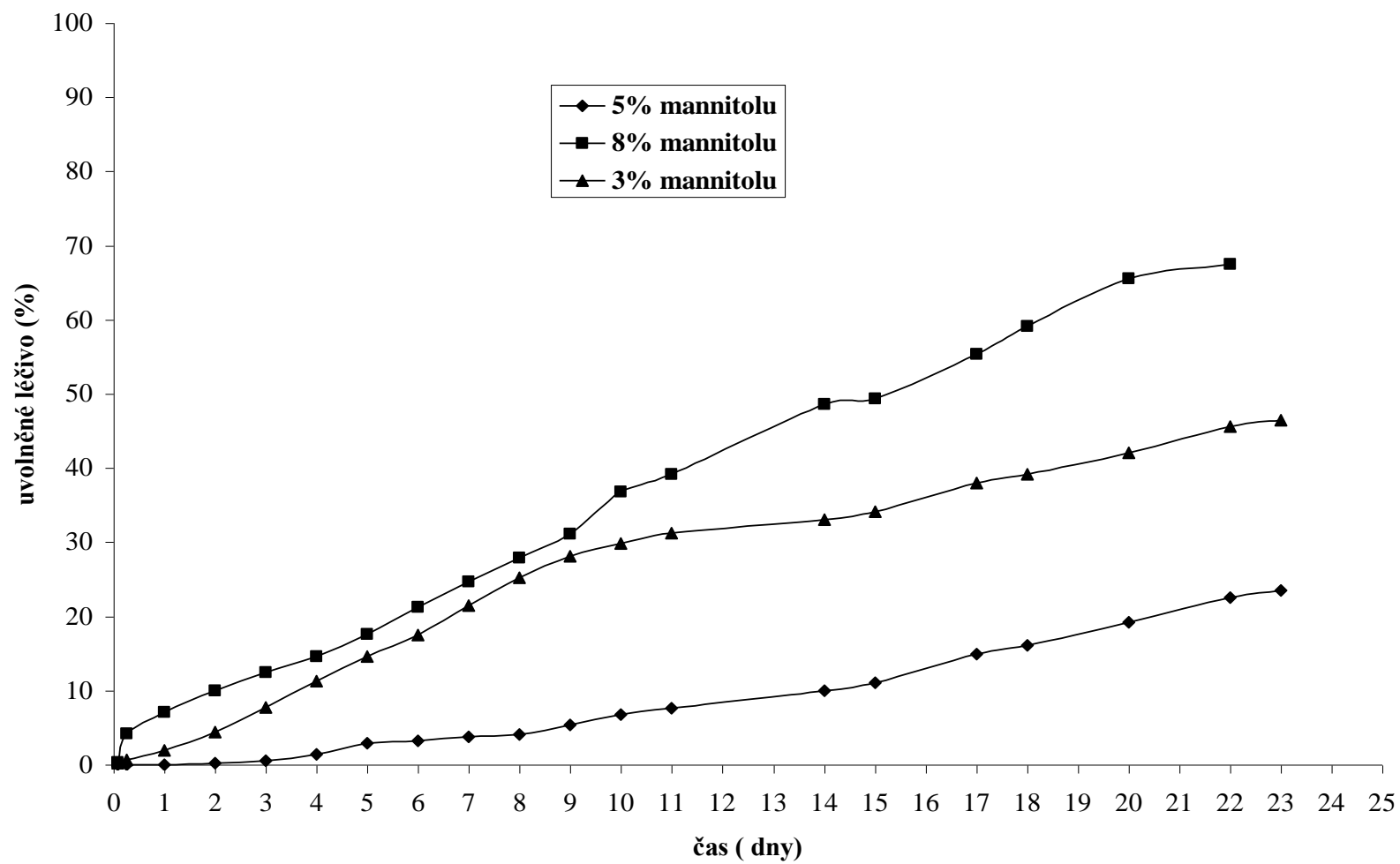


Graf 31: Liberace terbinafinu z nosičů větvených dipentaerythritolem

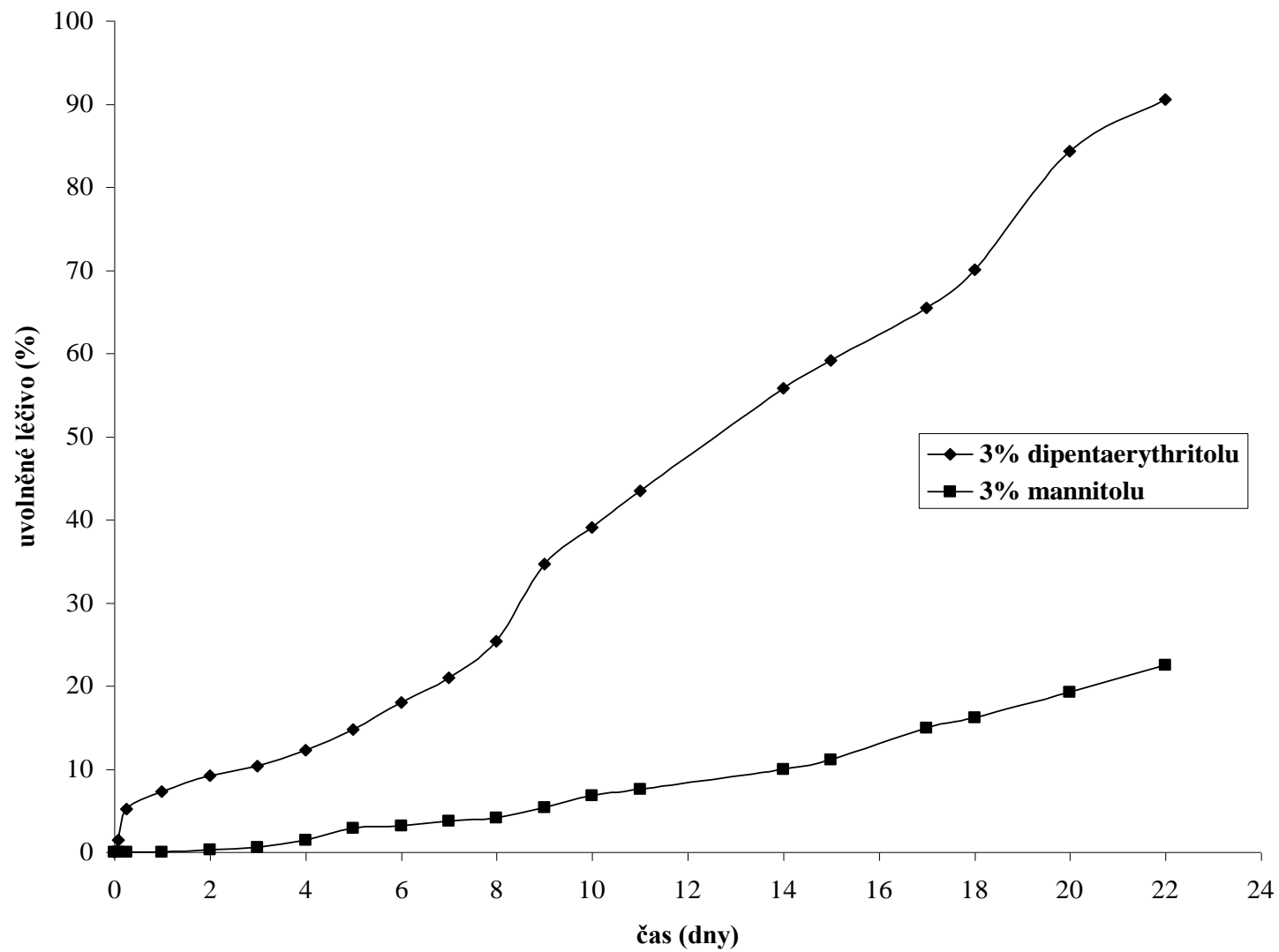




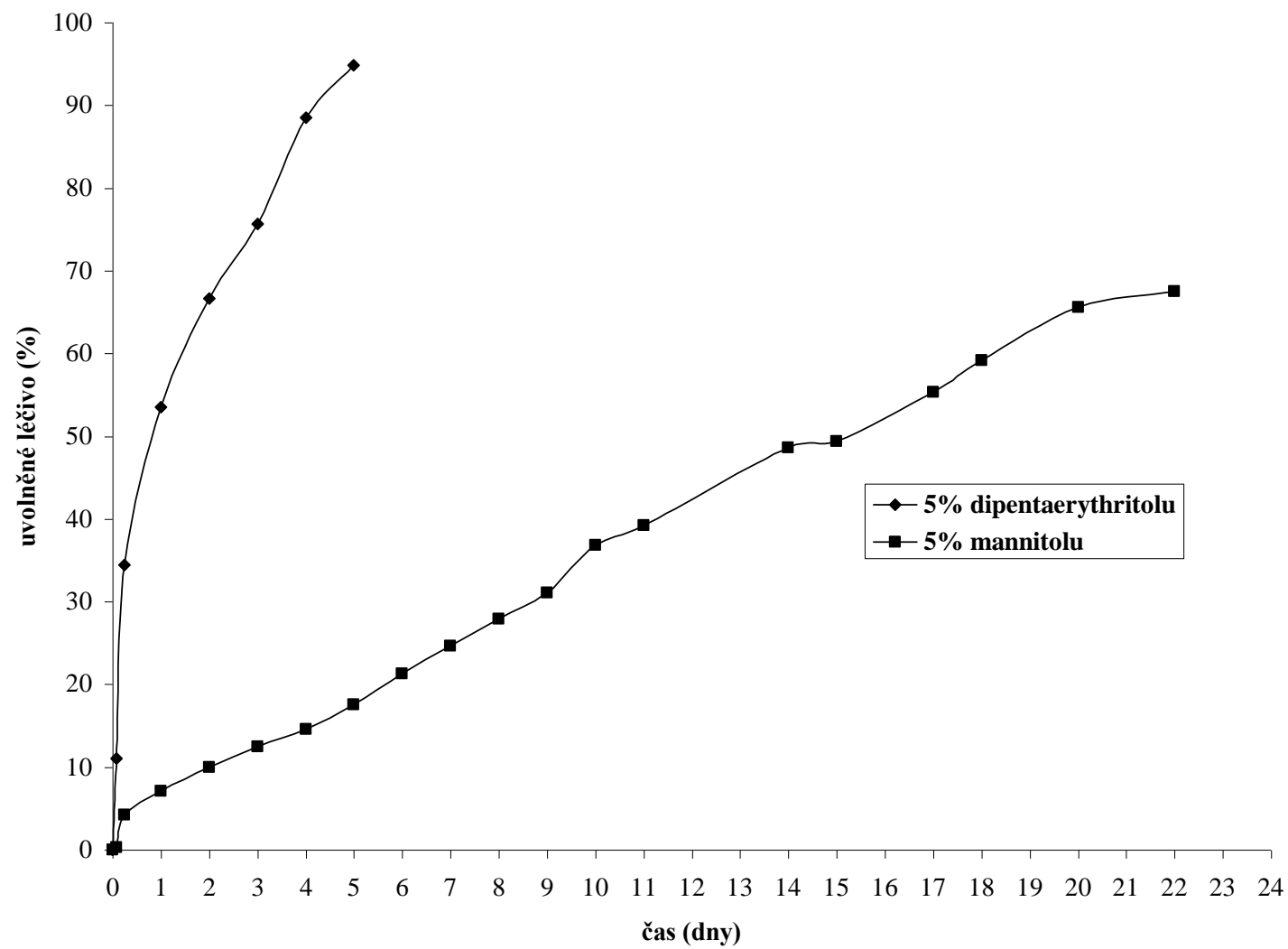
Graf 32: Liberace terbinafinu z nosičů větvených mannitolem



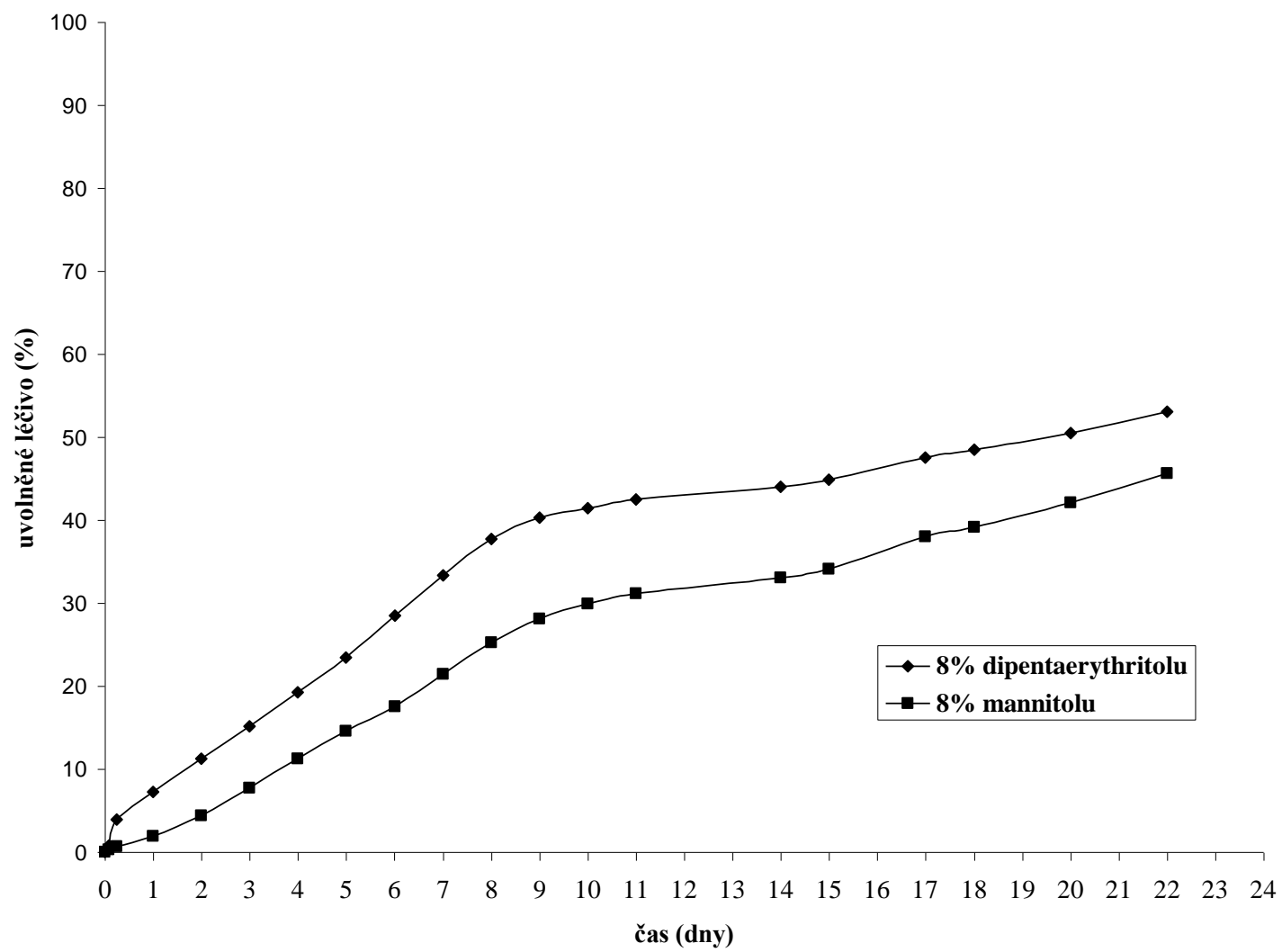
Graf 33: Liberace terbinafinu z nosičů větvených 3% větvicí složky



Graf 34: Liberace terbinafinu z nosičů větvených 5% větvicí složky



Graf 35: Liberace terbinafinu z nosičů větvených 8% větvicí složky



## 7. Diskuse

V předložené diplomové práci byly pro liberaci flukonazolu a terbinafinu použity oligoesterové nosiče označené pracovními značkami 3M, 5M, 8M, 3D, 5D, 8D. Nosiče byly syntetizovány na katedře farmaceutické technologie v roce 2004. Jedná se o kopolymery kyseliny mléčné a glykolové v poměru 1:1 obsahující jako větvičí složku mannitol (M) nebo dipentaerythritol (D) v koncentraci 3%, 5% nebo 8%.

Ve firmě Synpo a.s. Pardubice bylo provedeno stanovení molární hmotnosti oligoesterů metodou SEC-MALS. V tabulce 16 jsou uvedeny číselné ( $M_n$ ) a hmotnostní ( $M_w$ ) průměry molární hmotnosti a poměr hmotnostního průměru stanoveného pomocí konvenční SEC,  $M_w(\text{SEC})$  ku skutečné hodnotě stanovené pomocí SEC-MALS. Poměr  $M_w(\text{SEC})/M_w$  klesá s rostoucím stupněm větvení (pro kyselinu poly-DL-mléčnou byla stanovena hodnota 1,50). Výsledky analýzy naznačují, že molární hmotnost nosičů klesá s rostoucím obsahem větvičí složky. To je dáno vzrůstajícím přebytkem hydroxylů. U nosičů obsahujících mannitol klesá stupeň větvení s rostoucím obsahem mannitolu. V případě nosičů obsahujících dipentaerythritol stupeň větvení výšemolekulárních frakcí s rostoucím obsahem dipentaerythritolu vzrůstá, v oblasti nižších molárních hmotností naopak klesá.

Tab.16 : Molární hmotnosti a poměr  $M_w(\text{SEC})/M_w$  oligoesterových nosičů

Označení nosiče	$M_n$ [g/mol]	$M_w$ [g/mol]	$M_w(\text{SEC})/M_w$
3M	2 600	3 800	1,08
5M	1 600	2 200	1,36
8M	1 400	1 600	1,38
3D	3 600	5 300	1,19
5D	1 900	2 300	1,04
8D	1 400	1 700	0,94

Matrice byly připraveny již dříve vyzkoušenou metodou tavení nosičů s plastifikátorem, nikoli však v horkovzdušné sušárně nebo v silikonové lázni, ale v mikrovlnné troubě. Tavení probíhalo při středním výkonu (600 W) vždy několik minut v závislosti na hmotnosti polymerní směsi. Jako plastifikátor byl použit triethylcitrát (TEC) v koncentraci 30%. Jedná se o běžně používaný plastifikátor polymerů, jehož

výhodou je neškodnost prověřená dlouhodobým používáním a vysoká účinnost při snižování teploty skelného přechodu alifatických oligoesterů.<sup>22,23</sup> TEC je mísitelný s většinou oligoesterových nosičů a může být použit téměř bez omezení.

K plastifikovanému nosiči bylo přidáno léčivo (terbinafin nebo flukonazol) v koncentraci 4% z celkové hmotnosti matrice. Matrice o hmotnosti 150,0 mg byly studovány jako tvarově shodné tenké disky na dně scintilačních lahvíček. Shodný povrch všech matric byl zajištěn nahřátím dna scintilační lahvičky, čímž se matrice rovnoměrně rozprostřely po dně scintilační lahvičky. Disolučním médiem pro liberaci flukonazolu a terbinafinu byl zvolen fosfát citrátový pufr pH 5,0.

V časových intervalech vhodně zvolených tak, aby byl zachycen celý průběh uvolňování léčiv, byly odebírány vzorky disolučního média a spektrofotometricky stanoveno množství uvolněného léčiva. Absorbance flukonazolu byla měřena při 261 nm, absorbance terbinafinu při 283 nm.

## 7.1.Liberace flukonazolu z nosičů řady D

Liberace flukonazolu z nosiče větveného 3% dipentaerythritolu (3D) probíhala ve třech fázích (graf 3). V počáteční fázi se za 24 hodin uvolnilo 25% flukonazolu. V časovém intervalu od 1. dne do 6. dne probíhala liberace lineárně dle vztahu:  $\% \text{ flukonazolu} = 11,002 \times t + 13,641$ , při  $R^2 = 0,994$  a uvolnilo se 82% flukonazolu (graf 4). Zbýlé množství flukonazolu se uvolnilo ve třetí fázi od 6. do 12. dne od počátku disolučního testu.

Liberace flukonazolu z nosiče větveného 5% dipentaerythritolu (5D) byla rychlá. Inkorporované množství léčiva se uvolnil během 24 hodin (graf 5). Z tohoto důvodu by byl oligoester 5D jako nosič flukonazolu patrně nevhodný.

Průběh liberace flukonazolu z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu (8D) byl podobný jako liberace z nosiče 3D (graf 6). Liberace však byla rychlejší. V první fázi se za 24 hodin uvolnilo 42% flukonazolu. V druhé fázi od 1. dne do 4. dne probíhala liberace dle rovnice  $\% \text{ flukonazolu} = 5,822 \times t + 80,06$  při  $R^2 = 0,9873$  (graf 7) a uvolnil se všechen flukonazol inkorporovaný v matrici.

Průběh liberace flukonazolu z nosičů větvených různým množstvím dipentaerythritolu je znázorněn v grafu 14. Velice rychlý průběh liberace z nosiče 5D neodpovídá původnímu předpokladu, že s rostoucím množstvím větvicí složky se bude zvyšovat rychlost liberace léčiva.

## **7.2. Liberace flukonazolu z nosičů řady M**

Uvolňování flukonazolu z nosičů větvených mannitolem probíhalo ve třech fázích (grafy 8, 10 a 12). V počáteční fázi do 24 hodin se v závislosti na množství větvicí složky uvolnilo 36% flukonazolu z nosiče 3M, 42% flukonazolu z nosiče 5M a 64% flukonazolu z nosiče 8M. V druhé, lineární fázi liberace flukonazolu probíhala od 1. dne do 6. dne (grafy 9, 11 a 13). Z porovnání směrnic přímk vyplývá, že nejrychlejší liberace flukonazolu v této fázi byla u nosiče 5M, potom u nosiče 3M a nejpomalejší u nosiče 8M. To samozřejmě souvisí v množství flukonazolu uvolněného v první fázi do 24 hodin. Množství flukonazolu, které se uvolnilo do 6. dne od počátku disoluce, bylo v případě nosiče 3M 94% a z nosičů 5M a 8M se uvolnil všechno inkorporovaný flukonazol.

Průběh liberace z nosičů větvených různým množstvím mannitolu je porovnán v grafu 15. V případě použití mannitolu jako větvicí složky se potvrdil předpoklad, že s rostoucí koncentrací větvicí složky poroste rychlost liberace léčiva.

## **7.3. Vliv typu větvicí složky na liberaci flukonazolu**

Byl porovnán průběh liberace flukonazolu v nosičů 3D a 3M (graf 16), 5D a 5M (graf 17), 8D a 8M (graf 18). Tedy z nosičů se stejnou koncentrací větvicí složky, ale jiným typem (dipentaerythritol nebo mannitol). V případě 5% a 8% koncentrace větvicí složky je liberace flukonazolu rychlejší z nosičů větvených dipentaerythritolem. Při koncentraci větvicí složky 3% je liberace flukonazolu rychlejší u mannitolu.

## **7.4. Liberace terbinafinu z větvených oligoesterů**

Liberace terbinafinu z oligoesterů větvených mannitolem nebo dipentaerythritolem byla studována již v diplomové práci Davida Mrázka.<sup>24</sup> Z důvodu špatné rozpustnosti a stability terbinafinu ve fosfát citrátovém pufru pH 6,0 a 7,0 byla v jeho práci použita čištěná voda jako disoluční médium, přičemž byly sledovány změny pH během liberace. Z testovaných nosičů se uvolnilo veškeré množství inkorporovaného terbinafinu, ovšem pokles hodnoty pH v průběhu liberace byl značný, někde téměř k hodnotě 3,0.

Úkolem předkládané diplomové práce bylo testovat liberaci terbinafinu do fosfát citrátového pufru pH 5,0 a zjistit, zda při této hodnotě aktuální acidity bude možné spektrofotometricky stanovovat uvolněný terbinafin.

## 7.5. Liberace terbinafinu z nosičů řady D

Liberace terbinafinu z nosiče 3D (graf 19) probíhala rovnoměrně v průběhu více než tří týdnů. Bez výrazného burst efektu se za prvních 8 dní uvolnilo 25% terbinafinu. Z 8. na 9. den je na disoluční křivce patrný skok, který představuje 10% uvolněného léčiva. Od 9. do 18. dne probíhala liberace dle rovnice:  $\% \text{ terbinafinu} = 3,9338 \times t - 0,2031$ , při  $R^2 = 0,9979$  (graf 20). Do 22. dne disoluce se uvolnilo celkem 90% inkorporovaného terbinafinu.

Z nosiče 5D se inkorporovaný terbinafin uvolnil za dobu 5 dní (graf 21). Po vysokém 24-hodinovém burstu, kdy se uvolnilo 53% léčiva, probíhala liberace lineárně dle rovnice  $\% \text{ terbinafinu} = 10,445 \times t + 44,487$  při  $R^2 = 0,9887$  (graf 22). Tato rychlá a úplná liberace terbinafinu z nosiče 5D nebyla u ostatních nosičů pozorována, ale na druhou stranu koresponduje s rychlou liberací flukonazolu z nosiče 5D (graf 5).

Liberace terbinafinu z nosiče 8D (graf 23) probíhala po dobu 8 dní kinetikou 0. řádu (graf 24). Poté nastalo zpomalení liberace a za dobu 24 dní od počátku disolučního testu se uvolnilo celkově pouze 53% terbinafinu.

Porovnání průběhu liberace terbinafinu z nosičů větvených různým množstvím dipentaerythritolu znázorňuje graf 31.

## 7.6. Liberace terbinafinu z nosičů řady M

Liberace terbinafinu z nosiče 3M byla sledována po dobu 22 dnů (graf 25). Za první tři dny se uvolnilo pouze 0,5% terbinafinu. Potom se terbinafin uvolňoval kinetikou 0. řádu (graf 26). Celkově se však uvolnilo pouze 24% inkorporovaného léčiva. Liberace terbinafinu z nosiče 5M byla rychlejší, bez počátečního lag time, naopak s mírným burst efektem (4,2 % terbinafinu za 6 hodin). I celkové množství léčiva uvolněného za 22 dnů bylo vyšší – 67,5% (graf 27). V intervalu od 6. hodiny do 22. dne probíhala liberace kinetikou nultého řádu dle rovnice:  $\% \text{ terbinafinu} = 3,1566 \times t + 3,1143$  při  $R^2 = 0,9971$  (graf 28). Z nosiče 8M se terbinafin uvolňoval od počátku rovnoměrně, bez výrazného burst efektu i lag time, a to až do 8. dne od počátku disolučního testu, kdy se uvolnilo 25% inkorporovaného léčiva. Poté nastalo



zpomalení liberace. Za 22 dní se celkově uvolnilo pouze 46% inkorporovaného terbinafinu (grafy 29 a 30). Porovnání průběhu liberace terbinafinu z nosičů větvených různou koncentrací mannitolu uvádí graf 32.

### **7.7. Vliv typu a koncentrace větvicí složky na liberaci terbinafinu**

Byl porovnán průběh liberace terbinafinu v nosičů 3D a 3M (graf 33), 5D a 5M (graf 34) , 8D a 8M (graf 35). Tedy z nosičů se stejnou koncentrací větvicí složky, ale jiným typem (dipentaerythritol nebo mannitol). Liberace terbinafinu je rychlejší z nosičů větvených dipentaerythritolem.

## 8. Závěry

Z výsledků předložené diplomové práce je možno vyvodit následující závěry:

1. Flukonazol inkorporovaný do větvených oligoesterových nosičů se uvolňoval do fosfát citrátového pufru pH 5,0 v závislosti na typu a koncentraci větvicí složky.
2. Z nosičů větvených dipentaerythritolem se flukonazol uvolnil nejrychleji z nosiče s 5% dipentaerythritolu, a to již za 24 hodin.
3. Liberace flukonazolu z nosičů se 3% a 8% dipentaerythritolu probíhala ve třech fázích. V počáteční fázi byl zaznamenán burst efekt, při 3% koncentraci dipentaerythritolu v nosiči se za 24 hodin uvolnilo 25% flukonazolu, při 8% koncentraci dipentaerythritolu v nosiči se za 24 hodin uvolnilo 42% flukonazolu. V druhé fázi probíhala liberace kinetikou 0. řádu, flukonazol se rychleji uvolňoval z nosiče s 8% dipentaerythritolu. Ve třetí fázi došlo ke zpomalení liberace a uvolnění zbylého léčiva inkorporovaného v matrici.
4. Z nosičů větvených mannitolem se flukonazol uvolňoval v závislosti na koncentraci mannitolu. S rostoucí koncentrací mannitolu se rychlost liberace zvyšovala.
5. Terbinafin podobně jako flukonazol se nejrychleji uvolnil z nosiče větveného 5% dipentaerythritolu, a to za 5 dnů. Z nosiče se 3% dipentaerythritolu se uvolnil za 22 dnů a z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu se za tuto dobu uvolnilo pouze 53% terbinafinu.
6. Terbinafin inkorporovaný do oligoesterových nosičů větvených mannitolem se do fosfát citrátového pufru neuvolnil kompletně, i když za dobu trvání disolučního testu došlo k degradaci nosičů. Důvodem byly problémy se stabilitou a rozpustností terbinafinu v tomto prostředí.
7. Z nosiče s 5% mannitolu se za 22 dní uvolnilo 67,5% terbinafinu, z nosiče se 8% mannitolu 46% terbinafinu a z nosiče s 3% mannitolu se terbinafin uvolňoval až po třídních lag time a celkově se uvolnilo pouze 24% terbinafinu.

## 9. Souhrn

V teoretické části předložené diplomové práce je shrnut význam systémů s řízeným uvolňováním léčiv. Tyto systémy umožňují orgánově specifickou terapii. Teoretická část popisuje podmínky spojení makromolekul s biologickou tkání a faktory, které tento proces ovlivňují.

V experimentální části byla studována liberace flukonazolu a terbinafinu z terpolymerů kyseliny mléčné a glykolové v poměru 1:1 větvených 3%, 5% a 8% dipentaerythritolu (D) nebo mannitolu (M). Matrice o hmotnosti 150 mg tvořené nosičem (oligoester), plastifikátorem (30% triethylcitrátu) a léčivem (flukonazol nebo terbinafin) byly připraveny tavením v mikrovlnné troubě při středním výkonu. Vzniklá směs byla velmi důkladně homogenizována. Liberačním médiem pro obě léčiva byl zvolen fosfát citrátový pufr pH 5,0. Po dobu disolučního testu byly matrice umístěny v termostatu vytemperovaném na 37°C. V daných časových intervalech byly odebrány vzorky disolučního média pro stanovení uvolněného léčiva. Pro flukonazol probíhalo měření při 261 nm. Absorbance u terbinafinu byla měřena při 283 nm.

Z nosičů větvených dipentaerythritolem se flukonazol uvolnil nejrychleji z nosiče s 5% dipentaerythritolu, a to již za 24 hodin. Liberace flukonazolu z nosičů se 3% a 8% dipentaerythritolu probíhala ve třech fázích. V počáteční fázi byl zaznamenán burst efekt, v druhé fázi probíhala liberace kinetikou 0. řádu, ve třetí fázi došlo ke zpomalení liberace a uvolnění veškerého léčiva inkorporovaného v matrici. Z nosičů větvených mannitolem se flukonazol uvolňoval v závislosti na koncentraci mannitolu. S rostoucí koncentrací mannitolu se rychlost liberace zvyšovala.

Terbinafin podobně jako flukonazol se nejrychleji uvolnil z nosiče větveného 5% dipentaerythritolu, a to za 5 dnů. Z nosiče se 3% dipentaerythritolu se uvolnil za 22 dnů a z nosiče větveného 8% dipentaerythritolu se za tuto dobu uvolnilo pouze 53% terbinafinu. Terbinafin inkorporovaný do oligoesterových nosičů větvených mannitolem se do fosfát citrátového pufru neuvolnil kompletně, i když za dobu trvání disolučního testu došlo k degradaci nosičů. Důvodem byly problémy se stabilitou a rozpustností terbinafinu v tomto prostředí.

## 10. Literatura

---

1. Mathiowitz, E., Chickering, D., Jakob, J.S., Santos, C.: Bioadhesive drug delivery systems. In: Mathiowitz, E. (Eds.), *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, 1999, vol. 1. Wiley, New York, pp. 9- 44.
2. Ahuja, A., Khar, R.K., Ali, J.: Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1997, 23, 489- 515.
3. Albertsson, A.C., Karlsson, S.: Chemistry and biochemistry of polymer biodegradation. In: *Chemistry and technology of biodegradable polymers*, Blackie academic & Professional, Glasgow, 1994, Chap. 2, pp. 7-17.
4. Seal, K. J.: Test methods and standards for biodegradable plastics. In: *Chemistry and technology of biodegradable polymers*, Blackie academic & Professional, Glasgow, 1994, Chap 6, 116- 34
5. Scott, G.: *Polym. Age*, 1995, 6, 54.
6. Oppenheimer, B.S. et al.: *Cancer Res.*, 1995, 15, 335- 340.
7. Rybníkář, F.: *Makromolekulární chemie*, Vysoké učení technické v Brně, 2000.
8. Göpferlich, A.: Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*, 1996, 17, 103- 14.
9. Murray, R.K.: *Harperova biochemie*, překlad L. Fialová, Praha: H&H, 1998, ISBN 80-85787-38-5, s. 201.
10. Kawaciuk, I.: *Urologie*, Praha, 2000, H&H, Kap. 12, ISBN 80-86022-60-9.
11. Vasir, J.K., Tambwekar, K., Garg, S.: Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *Int. J.Pharm.*, 2003, 255, 13- 32.
12. Bero, M., Kasperczik, J., Jedlinami, J.: Coordination polymerization of lactides. I. Structure determination of obtained polymers. *Macromol. Chem.*, 1990, 181, 2287-2296.
13. Vert, M., Schwach, G., Engel, R.: Something new in the field of PLA/GA bioresorbable polymers. *J. Controlled Release*, 1998, 53, 85- 92.
14. Ginde, R.M., Gusta, R.K.J.: *Appl. Polym. Sci.*, 1987, 33, 2411- 29.
15. Ogawa, Y., Akiyama, Y., Okada, H., Yashiki, T., Shimamoto, T.: A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactid acid or copoly(lactic/glycolic) acid. *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, 36, 1095- 1103.

- 
16. Mathiowitz, E., Langer, R.: Polyanhydride microspheres as drug carriers I. Hot melt encapsulation. *J. Control. Rel.*, 1987, 5, 13-22.
  17. [www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/vyuka/resp.trakt/mykoticke.htm#\\_Up](http://www.lfhk.cuni.cz/klinmikrob/vyuka/resp.trakt/mykoticke.htm#_Up)
  18. Lincová, D., Farghali, H., et. al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2002, Galén, str. 430- 478, ISBN 80- 7262- 168- 8.
  19. *Pharmazeutische Stoffliste*, 9. Auflage, Arzneibüro der ABDA Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände, Eschborn/Taunus, 1994, Flu- G, S. 9
  20. *Pharmazeutische Stoffliste*, 9. Auflage, ABDATA Pharma- Daten Service, Eschborn/Taunus, 1995, T- Tril, S. 131.
  21. *Tables for the laboratory*, Merck, s. 57- 59 .
  22. Schode, A., Niwa, T, Takeuchi, H., Hino, T., Kawashima, Y.: Aqueous colloidal polymers dispersions of biodegradable DL-lactide/glycolide copolymer as basis for latex films: a new approach for the developement of biodegradable depot systems. *Int. J. Pharm.*, 1995, 117, 209-217.
  23. Wu ,Ch., McGinity, J.W.: Non- traditional plasticization of polymeric films. *Int. J. Pharm*, 1999, 177, 15- 27.
  24. Mrázek, D.: *Biodegradabilní systémy s protimikrobními léčivy*, Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické technologie, 2005.