

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické technologie

Mukoadhezivní polymerní systémy s aciklovirem

Rigorózní práce

Hradec Králové 2014

Mgr. Marie Líbenková

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

Děkuji PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení a poskytnuté rady při vypracování rigorózní práce. Poděkování patří rovněž PharmDr. Petru Kastnerovi, Ph.D. za provedení HPLC stanovení acikloviru.

Mgr. Marie Líbenková

OBSAH:

1	ABSTRAKT	5
2	ABSTRACT.....	6
3	ZADÁNÍ PRÁCE	7
4	ÚVOD.....	8
5	SEZNAM ZKRATEK	9
6	TEORETICKÁ ČÁST	10
6.1	Disoluce.....	10
6.1.1	Mechanismus disoluce	10
6.1.2	Faktory ovlivňující zkoušku disoluce	11
6.1.3	Disoluční médium.....	11
6.2	Testy disoluce.....	14
6.3	Disoluce v Českém lékopise	14
6.3.1	Zkouška disoluce pevných lékových forem.....	15
6.3.2	Zkouška disoluce transdermálních přípravků	19
6.3.3	Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum	21
6.3.4	Zkouška disoluce lipofilních tuhých lékových forem.....	21
6.4	Testování disoluce u speciálních lékových forem	22
6.5	Analytické metody používané pro stanovení množství uvolněného léčiva	25
6.6	Aciklovir	27
7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
7.1	Použité suroviny.....	29
7.2	Použité přístroje	29
7.3	Příprava fosfátcitrátového pufru o pH 7,4.....	30
7.4	Příprava substrátu pro test mukoadheze.....	30
7.5	Příprava polyesterových matric pro aplikaci na mucin.....	30
7.6	Mukoadhezivní test.....	31

7.7	Stanovení množství uvolněného acikloviru	32
7.8	Měření viskozity polymerních matric	33
8	VÝSLEDKY	35
8.1	Výsledky disolučních testů	35
8.1.1	Stanovení acikloviru spektrofotometricky	35
8.1.2	Stanovení acikloviru metodou HPLC	36
8.1.3	Grafy	37
8.2	Viskozita polymerních matric	42
9	DISKUZE	44
9.1	Vliv koncentrace polyesteru v mukoadhezivních matricích na dobu adheze ..	44
9.2	Liberace acikloviru z mukoadhezivních matric	45
9.3	Viskozita polyesterových matric	49
10	ZÁVĚRY	50
11	SEZNAM LITERATURY	51

1 ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické technologie

Jméno a příjmení: **Marie Líbenková**

Název rigorózní práce: **Mukoadhezivní polymerní systémy s aciklovirem**

Konzultantka: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

Cílem rigorózní práce bylo studium adhezivních vlastností tří polyesterů kyseliny mléčné a glykolové větvených dipentaerythritolem, mannitolem nebo tripentaerythritolem. V teoretické části jsou shrnuty poznatky o disoluci a disolučních testech. V experimentální části byl proveden mukoadhezivní test v třepací vodní lázni a byla měřena viskozita polyesterových matric. Jako plastifikátor pro získání vhodné viskozity polyesterových matric byl použit ethylpyruvát. Byly připraveny matrice s obsahem 40% polyesteru a matrice s obsahem 70% polyesteru (resp. 60% u polyesteru 3T). Mukoadhezivita polyesterů byla studována na základě disoluce acikloviru z matric aplikovaných na hydratovaný mucin z prasečích žaludků při teplotě 37°C v třepací vodní lázni. Disolučním médiem byl fosfát-citrátový pufr pH 7,4. Kvantitativní stanovení bylo provedeno spektrofotometricky a metodou HPLC. Zvýšením obsahu polyesteru v matrici se zvýšila adhezivní doba, což se v disolučním testu projevilo snížením množství uvolněného acikloviru. Adhezivita polyesterů 3M a 3D je nižší než u polyesteru 3T.

Klíčová slova: disoluce, disoluční testy, liberace acikloviru, polyester, mukoadheze

2 ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical technology

Name of student: **Marie Líbenková**

Title of rigorous thesis: **Mucoadhesive polymeric systems with aciclovir**

Consultant: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

The aim of this rigorous thesis was the study of the adhesive properties of three polyesters of lactic acid and glycolic acid branched with dipentaerythritol, mannitol and tripentaerythritol. Knowledge of dissolution and dissolution testing are summarized in theoretical part. In the experimental part test of mucoadhesivity was performed in shaking water bath and viscosity of polyesters matrices was measured. Ethylpyruvate as plasticizer to reach suitable viscosity of polyesters matrices was used. Matrices with content 40% polyesters and matrices with content 70% polyesters (or 60% in case of polyester 3T) were prepared. Mucoadhesiveness of polyesters was studied based on the aciclovir release from matrix applied on hydrated mucin from porcine stomachs at 37°C using shaking water bath. Dissolution medium was phosphate-citrate buffer pH 7,4. The quantitative determination was realized by spectrophotometry and HPLC method. The time of adhesion was increased with increasing content of polyester in matrix. It was proved by reduction of amount released aciclovir. Mucoadhesiveness of polyesters 3M a 3D is lower than of polyesters 3T.

Key words: dissolution, dissolution testing, aciclovir release, polyester, mucoadhesion

3 ZADÁNÍ PRÁCE

V rámci teoretické části rigorózní práce je zadáno shrnout základní poznatky o disoluci léčivých látek a disolučních testech. Shrnout metody disoluce uvedené v Českém lékopise. V experimentální části práce studovat mukoadhezivní vlastnosti plastifikovaných polyesterů kyseliny mléčné a glykolové, větvených mannitolem, dipentaerythritolem nebo tripentaerythritolem a liberaci acikloviru z těchto systémů.

Zadání experimentální části práce lze formulovat do následujících úkolů:

1. Připravit reotropní matrice tvořené polyesterem, plastifikátorem a léčivem. Použít 3 polyestery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové, větvené různým monomerem: mannitolem, dipentaerythritolem nebo tripentaerythritolem v koncentraci 3 % v reakční směsi. Koncentraci polyesteru v matrici zvolit 40 % a 70 %. Jako plastifikátor použít ethylpyruvát, jako léčivo inkorporovat aciklovir.
2. Provést mukoadhezivní testy tzv. „smývací“ technikou za využití třepačky s vodní lázní a hydratovaného mucinu z prasečích žaludků jako substrátu pro mukoadhezi. Test vyhodnotit stanovením množství acikloviru uvolněného z matric po jejich aplikaci na mukózní podklad měřením absorbance v absorpčním maximu acikloviru a metodou HPLC.
3. Měřit reologické vlastnosti matric při teplotě 37 °C na rotačním reometru Kinexus se softwarem *rSpace* pro vyhodnocení výsledků. Použít geometrii kužel-deska CP 2/20 (úhel 2°, průměr 20 mm). Výsledky vyhodnotit pomocí tabulky hodnot tečného napětí, rychlostního spádu a viskozity. Sestrojit reogramy.

4 ÚVOD

Testování disoluce patří mezi nezbytné testy používané při vývoji a výrobě lékové formy. Test disoluce je významným testem pro posouzení shodnosti produktu před a po změně ve výrobním procesu nebo při změně pomocných látek, které byly použity při výrobě. Proto se testu využívá při vývoji nové lékové formy, při její formulaci, kdy můžeme zjistit vliv různých pomocných látek a výrobního postupu na rychlost uvolňování léčiva. Disoluční testy se používají také k hodnocení kvality léčivých přípravků, kde se jejich pomocí hodnotí shodnost jednotlivých šarží. Pomocí disolučních testů lze také odhadovat biologickou dostupnost léčivé látky v *in vivo* prostředí a bioekvivalenci generických léků. Disoluční testy bývají často nezbytnou součástí registrační dokumentace léčivého přípravku.^{1,2}

Rigorózní práce navazuje problematikou na mou diplomovou práci³, ve které byly studovány adhezivní vlastnosti oligoesterů kyseliny mléčné a glykolové větvených mannitolem. Doba adheze v diplomové práci byla zjišťována na základě disoluce barviva, kterým byly studované oligoestery obarveny. Uvolňování barviva během disolučního testu bylo indikátorem množství oligoesteru adherovaného na substrátu. Experimentální část rigorózní práce je metodicky obdobná, s tím rozdílem, že namísto barviva bylo v testu použito léčivo. Adheze byla testována u polyesterů větvených mannitolem, dipentaerythritolem a tripentaerythritolem. Adhezivita polyesterů byla zjišťována na základě disoluce acikloviru.

5 SEZNAM ZKRATEK

3D	oligoester kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený 3% dipentaerythritolu
3M	oligoester kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený 3% mannitolu
3T	polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený 3% tripentaerythritolu
A	absorbance
ACV	aciklovir
EP	ethylpyruvát

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Disoluce

Disoluci lze chápat jako rychlost rozpouštění, rychlost uvolňování léčivé látky z lékové formy a její přechod do roztoku v čase. Princip disolučních testů spočívá v tom, že jednotka léčivého přípravku je vložena do rozpouštěcí kapaliny (disolučního média, disolučního roztoku). V určených časových intervalech se odebírají vzorky disolučního média a v odebraných vzorcích se stanovuje vhodnou analytickou metodou uvolněné množství léčivé látky. Množství uvolněné léčivé látky v časových intervalech se také nazývá disoluční profil léčiva. Zkoušku disoluce lze použít u perorálních, vaginálních, rektálních, implantačních i dermálních lékových forem.⁴

Poprvé se o disoluci zmínili *Noyes a Whitney* již v roce 1897. Popsali rychlost rozpouštění, při které pevná látka přechází do vlastního roztoku. Rychlost rozpouštění se s rostoucí koncentrací léčivé látky v rozpouštěcí kapalině snižuje podle vztahu

$$\frac{dw}{dt} = k(C_s - C) \quad (1)$$

kde poměr dw/dt udává množství látky, které se rozpustí za jednotku času, C je koncentrace rozpuštěné látky v celkovém objemu roztoku v čase, C_s je koncentrace nasyceného roztoku rozpouštěné látky, k je konstanta popsána vztahem

$$k = D \cdot S/h \quad (2)$$

kde D je difúzní koeficient rozpouštěné látky, S je celková plocha mezi rozpouštěnou látkou a roztokem a h je tloušťka difúzní vrstvy. V roce 1900 *Brunner a Tolloczko* prokázali, že rychlost rozpouštění je závislá na rychlosti míchání, teplotě, médiu a uspořádání disolučního přístroje. V roce 1970 byl přijat košíčkový test jako oficiální disoluční metoda v šesti monografiích Amerického lékopisu a Národního lékopisu.⁵

6.1.1 Mechanismus disoluce

Zjednodušeně se mechanismus disoluce popisuje dvěma kroky, počátečním rozkladem (desintegrací) lékové formy (1. krok) a následným přechodem léčiva

do kapalného média (2. krok). Rozpad lékové formy na částice léčiva může probíhat buď přímo, nebo prostřednictvím meziprojektu ve formě granulátu. Celková rychlost rozpouštění je limitována pomalejším z těchto dvou kroků. Pokud je limitujícím faktorem první krok, celková rychlost rozpouštění je úměrná rozpadu lékové formy a důležité jsou její kohezivní vlastnosti. Pokud je limitujícím faktorem druhý krok, mechanismus disoluce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva.⁵

Obr. 1: Mechanismus disoluce⁵



6.1.2 Faktory ovlivňující zkoušku disoluce

Zkouška disoluce je vždy ovlivněna podmínkami, za kterých probíhá. Pokud je třeba porovnávat výsledky testů, je třeba, aby byly dodrženy při testování stejné podmínky. Při stanovení disoluce léčivé látky je třeba specifikovat použitý přístroj, složení, objem a teplotu disolučního média, rychlost otáčení nebo rychlost průtoku disoluční kapaliny, dobu testu, čas a způsob odebrání a množství odebraného zkoušeného roztoku pro stanovení obsahu účinné látky, případně podmínky pro automatické vyhodnocování, metodu analýzy a kritéria přijatelnosti.¹

6.1.3 Disoluční médium

Důležitým faktorem, který ovlivňuje průběh disolučního testu, jsou vlastnosti disolučního média, jeho složení, teplota, viskozita, pH nebo přítomnost povrchově aktivních látek a enzymů.⁴

1. Složení

Obecně se jako médium používá vodné prostředí. Složení média se vybírá na základě fyzikálně-chemických vlastností léčivé látky a látek pomocných a také podle podmínek, kterým bude léková forma pravděpodobně vystavena po jejím podání.^{1,4}

2. Teplota

Čím se teplota zvyšuje, tím obvykle dochází ke zvyšování rychlosti rozpouštění léčivé látky. U perorálních, vaginálních, rektálních, očních a implantačních lékových forem se při testování používá teplota 37 °C. U dermálních lékových forem je obvyklá teplota pro testování 32°C.⁴

3. Disoluční médium a jeho viskozita

Disolučním médiem bývá obvykle čištěná voda nebo tlumivé roztoky. Disolučním médiem mohou být ale i například gely různé viskozity. Se vzrůstem viskozity klesá rychlost uvolňování léčiva.⁴

4. Hodnota pH

Hodnota pH je významným faktorem, který ovlivňuje rychlost rozpouštění slabých kyselin a zásad. Čím se hodnota pH zvyšuje, tím se zvyšuje rychlost rozpouštění u slabých kyselin a u slabých zásad rychlost rozpouštění klesá. Ideální disoluční kapalina by měla napodobovat fyziologické pH v organismu. Hodnota pH disolučního média se obvykle pohybuje v rozsahu pH 1 (0,1 M HCl) až 7,5 (fosfátové pufrы). Voda je doporučena jako disoluční médium pouze tehdy, když uvolňování léčivé látky nezávisí na pH.⁴

5. Povrchově aktivní látky a enzymy

Do disolučního média bývají někdy přidávány povrchově aktivní látky nebo enzymy. Povrchově aktivní látky zvyšují rychlost rozpouštění léčivých látek, proto se přidávají například k léčivům, která mají nízkou rozpustnost. Přidané látky však nesmí interagovat s rozpouštějícím se léčivem. Enzymy se také většinou podílejí na zvýšení rychlosti rozpouštění léčivých látek.^{1,4}

Český lékopis definuje několik druhů disolučních médií. Jedná se o média s kyselinou chlorovodíkovou, hydroxidem sodným, acetátové a fosforečnanové tlumivé roztoky o různém pH, dále je v lékopisu uvedena umělá střeční šťáva a umělá žaludeční šťáva.⁶

Pokud je disoluční testování používáno k odhadnutí chování léčivého přípravku v prostředí *in vivo*, je rozhodující, aby test prováděný v prostředí *in vitro* napodoboval podmínky v prostředí *in vivo* co nejdůvěrněji. K napodobení podmínek *in vivo* se v některých studiích doporučuje přidat do médií látky, které napodobují určité složky potravy nebo přirozeně se vyskytující tenzidy. Povrchově aktivní látky se např. přidávají k léčivům s nízkou rozpustností k napodobení účinků žlučových solí.¹ Důležité je také zohlednit pH prostředí. Pokud se jedná o pevné perorální lékové formy, je důležité, aby pH média co možná nejpřesněji napodobovalo podmínky v gastrointestinálním traktu. Proto u lékových forem s modifikovaným uvolňováním léčiva je vhodné využívat disoluční metodu, v jejímž průběhu se budou pH hodnoty disolučního média měnit a simulovat tak průchod léčiva jednotlivými částmi

gastrointestinálního traktu.⁷ Některá střevní zánětlivá onemocnění, jako jsou ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba, mají za následek snížení fyziologického pH prostředí na hodnoty 4-6, což je důležité při disolučním testování zohlednit.¹

Skupina vědců, vedená doktorem Jenniferem Dressmanem z univerzity J.W. Goethe v Německu, vyvinula gastrointestinální média, která simulují stav nalačno a stav po příjmu potravy. Média napodobují tekutinu nacházející se v tenkém střevě z hlediska pH, pufrovací kapacity, osmolality a také koncentrace žlučových solí a fosfolipidů. Tato média byla použita ke zkoušení disoluce u několika druhů léčiv zahrnující špatně rozpustné slabé baze a lipofilní léčiva k přispění předvídání absorpce v prostředí *in vivo*. Disoluční testování za použití těchto médií je užitečné pro zkoumání vlivu potravy na disoluci a dostupnost orálně podaných léčiv. Kromě médií simulujících podmínky *in vivo* ve střevě, byla vyvinuta také disoluční média simulující podmínky stavu nalačno a stav po příjmu potravy v žaludku. Bylo pozorováno, že tato tzv. biorelevantní média mohou poskytnout přesnější napodobení farmakokinetického profilu oproti umělé žaludeční tekutině nebo umělé střevní tekutině.^{8,9,10,11}

Tab. 1: Rozdíly mezi disolucí perorálních lékových forem v *in vitro* prostředí a v podmínkách *in vivo*^{12,13}

	Disoluce in vitro	Disoluce in vivo
Disoluční médium	lékopisná média biorelevantní média	gastrointestinální tekutiny
Objem disolučního média	variabilní podle použitého přístroje a simulovaného stavu (nalačno nebo po jídle)	variabilní podle fyziologického stavu (nalačno nebo po jídle)
Rychlost disoluce	variabilní podle použitého přístroje, lékové formy a simulovaného stavu (nalačno nebo po jídle)	variabilní podle lékové formy a fyziologického stavu (nalačno nebo po jídle)
Hydrodynamika	daná testovacím přístrojem	určená gastrointestinální motilitou
Místo	konstantní	mění se v čase
Množství léčiva v disolučním médiu	konstantní v uzavřených systémech klesající v otevřených systémech	klesající v závislosti na absorpci léčiva

6.2 Testy disoluce

Prvotní disoluční testy byly zaměřeny pouze na pevné perorální lékové formy s bezprostředním uvolněním léčivé látky, poté se testování disoluce začalo využívat u pevných orálních přípravků s modifikovaným uvolňováním a v nedávné době se aplikace disolučního testování začala rozšiřovat i na ostatní lékové formy (v literatuře označovány jako nové nebo speciální) jako jsou suspenze, tablety rozpadající se v ústech, žvýkácké tablety, žvýkácké gumy, transdermální náplasti, polotuhé topické přípravky, čípky, implantáty, injekční mikročásticové přípravky nebo liposomy. U orálních pevných přípravků s bezprostředním uvolněním léčivé látky se obvykle mluví o testu jako o *testu disolučním*, jelikož léčivo se rychle rozpouští v testovacím médiu. U lékových forem, které se nepodávají ústně, jako jsou přípravky topické a transdermální, čípky a jiné by se mělo spíše mluvit o testu jako o *testu uvolňování léčiva*. Díky značným rozdílům ve složení speciálních lékových forem, v jejich rozdílných fyzikálně chemických charakteristikách a charakteristikách uvolňování léčiva, není možné navrhnout jediný testovací systém, který by se mohl používat ke studiu uvolňování léčiva u všech lékových forem univerzálně. Jsou proto využívány různé aparáty a techniky případ od případu.¹⁴

Postupy pro disoluční testování pevných orálních lékových forem, s bezprostředním uvolněním nebo s modifikovaným uvolňováním léčiva, byly značně propracovány a standardizovány v uplynulém čtvrtstoletí a jsou řádně uvedeny v lékopise. Existují ale i některé lékové formy, pro které postup disolučního testování v lékopise stále není uveden (tj. většina tzv. speciálních lékových forem). Mezinárodní farmaceutická federace (FIP) s americkou asociací farmaceutických vědců (AAPS) vydaly pokyny pro testování disoluce u těchto lékových forem.¹⁴

6.3 Disoluce v Českém lékopise

Lékopis definuje pravou disoluci a disoluci zdánlivou. Dále obsahuje zkoušku disoluce pevných lékových forem, zkoušku disoluce transdermálních přípravků, zkoušku disoluce léčivých žvýkáckých gum a zkoušku disoluce lipofilních tuhých lékových forem.

Pravá disoluce

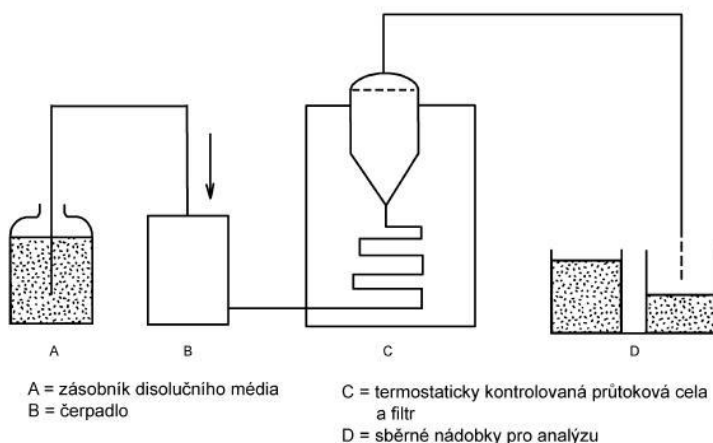
Tato zkouška se používá pro stanovení rychlosti pravé disoluce čisté látky v pevném stavu po jejím slisování. Rychlost pravé disoluce se definuje jako rychlost rozpouštění

čistých látek po slisování za podmínek konstantní plochy povrchu. Stanovení pravé disoluce je užitečné pro charakterizaci léčivých látek a látek pomocných. Stanovení rychlosti pravé disoluce pevných látek zahrnuje nejprve přípravu výlisku a poté působení disolučního média na slisovanou látku o konstantní ploše, při konstantní rychlosti míchání, konstantní teplotě, iontové síle a hodnotě pH. Zkouška se provádí za specifikovaných experimentálních podmínek. Rychlost pravé disoluce se vyjadřuje jako množství látky uvolněné za jednotku času z jednotky povrchu [$\text{mg} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$].⁶

Zdánlivá disoluce

Zkouška se používá ke stanovení zdánlivé disoluční rychlosti čistých pevných látek. Lze jí stanovit zdánlivou disoluční rychlost léčivých látek z přípravků ve formě prášků nebo granulí. Přístroj, který se při zkoušce používá, se skládá ze zásobníku pro disoluční médium, z čerpadla, průtokové cely a vodní lázně (Obr. 2). Měřený vzorek se umístí na systém sítěk a filtrů do spodního dílu průtokové cely a zároveň se vzorek v cele také zvaží. Disoluční médium, vytemperované na zvolenou teplotu, se přivádí přes dno průtokové cely. Vzorky disolučního média se odebírají při výstupu z cely a ihned se filtrují přes filtr. Filtrát se analyzuje předepsanou metodou. Výsledky se vyjadřují jako množství rozpuštěné látky za jednotku času.⁶

Obr. 2: Průtokový přístroj⁶



6.3.1 Zkouška disoluce pevných lékových forem

V lékopise je tato zkouška určena pro pevné lékové formy podávané perorálně, stanovuje se jí shoda s požadavky na disoluci. Jednotka lékové formy, která se zkouší je v lékopise definovaná jako jedna tableta, jedna tobolka, nebo specifikované množství. Existují čtyři metody provedení tohoto testu u pevných lékových forem. Metoda

míchadlová, metoda košíčková, metoda s vratným válcem a metoda průtoková. Disoluce se stanovuje u tablet s běžným, prodlouženým a zpožděným uvolňováním.⁶

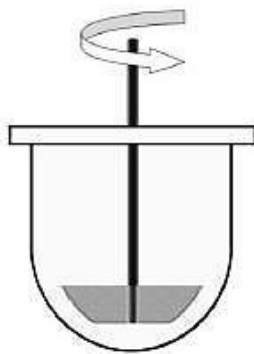
1. Metoda míchadlová

K provedení se používá přístroj s pádlem (Obr. 3). Název přístroje je odvozen od míchací jednotky (páidla), která je tvořena hřídelí s lopatkovým míchadlem, které slouží k pohybu disoluční kapaliny a k rozptýlení uvolněné léčivé látky do celého objemu kapaliny. Přístroj je tvořen válcovitou nádobou, která má kulaté dno a využitelný objem je 1000 ml. Nádoba je opatřena víkem, které má v sobě otvory pro hnací hřídel a teploměr. Nádoba je částečně ponořena ve vodní lázni, nebo je opatřena zařízením, které umožní zahřívání. Vodní lázeň nebo vyhřívací zařízení slouží k tomu, aby zkouška mohla být provedena za určené teploty. Zkouška probíhá při teplotě $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorek se vkládá na dno zkušební nádoby. Tablety, které nedrží u dna, ale plavou, se u dna přidrží inertním drátkem nebo spirálou z drátku nebo se použije metoda košíčková. Ve stanovených časových intervalech se odebírají vzorky disoluční kapaliny a zjišťuje se množství léčiva, které se uvolnilo do roztoku. Přístroj se skládá ze šesti jednotek a zkouška se provádí se šesti tabletami současně.^{4,6}

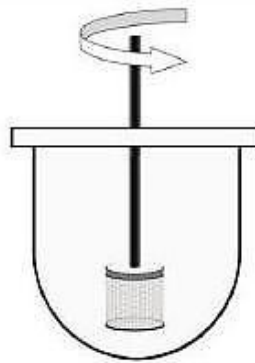
2. Metoda košíčková

K provedení se používá přístroj s košíčkem (Obr. 4). Přístroj je stejný jako u metody míchadlové s rozdílem, že namísto míchadla je na hnací hřídeli umístěn košíček z nerezového pletiva. Košíček, který má tvar válce, zde zajišťuje míchání. Dávková jednotka se na začátku každé zkoušky vkládá vždy do suchého košíčku. Zkouška probíhá při teplotě $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.^{4,6}

Obr. 3: Přístroj s pádlem¹⁵



Obr. 4: Přístroj s košíčkem¹⁵



3. Metoda s vratným válcem

K provedení se používá přístroj s vratným válcem. Přístroj je tvořen ze sady válcovitých skleněných nádob s plochým dnem, sady vratných válců, motoru a hnacího zařízení, které umožňuje vratný pohyb válců. Horní a dolní části válců jsou opatřeny sítky. Válcovitá skleněná nádoba je naplněna disoluční tekutinou. Nádoby jsou z části ponořené ve vodní lázni, která zajišťuje během zkoušky teplotu na teplotu $37 \pm 0,5$ °C. Testovaná dávková jednotka se vkládá do vratného válce. Válec se pohybuje ve skleněné nádobě svislým směrem.⁶

4. Metoda průtoková

K provedení se používá přístroj s průtokovou celou. Zařízení se skládá ze zásobní nádoby a pumpy na disoluční médium, průtokové cely a vodní lázně, která udržuje disoluční médium při teplotě $37 \pm 0,5$ °C. Léková forma je uchycena v zařízení, kterým disoluční kapalina protéká. Disoluční médium je vytlačováno pomocí pumpy přes průtokovou celu nahoru. Průtoková cela je spojena s filtračním systémem, který zabraňuje odplavování nerozpuštěných částic z horní části cely. Dolní část cely má kuželovitý tvar. Tato dolní část je naplněna skleněnými kuličkami o průměru 1 mm a jednou kuličkou o průměru 5 mm, která je umístěna ve špičce kužele. Zabraňuje se tak vstupu tekutiny do cely.^{4,6}

PEVNÉ LÉKOVÉ FORMY S BĚŽNÝM UVOLŇOVÁNÍM

U *metody košíčkové* a *míchadlové* probíhá odběr vzorku disoluční tekutiny z místa uprostřed mezi hladinou disolučního média a horní hranou rotujícího košíčku nebo míchadla, nesmí to být méně než jeden centimetr od stěny nádoby. U *metody s vratným válcem* se v určeném časovém intervalu vratný válec vytáhne a odebere se vzorek disoluční tekutiny z místa uprostřed mezi hladinou disolučního média a dnem nádoby. Pokud u těchto tří metod dochází k vícenásobným odběrům, nahradí se vždy odebraný objem stejným objemem čerstvého disolučního média o teplotě 37 °C nebo se koriguje změna objemu výpočtem. U *metody s průtokovou celou* je léková forma stále vystavena čistému rozpouštědлу. V časových intervalech se odebírají vzorky disolučního média a vyhodnocuje se. Ke stanovení obsahu se používají vhodné analytické metody. Pokud není uvedeno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, pokud množství léčivé látky uvolněné ze zkoušených dávkových jednotek odpovídá údajům uvedeným v tabulce 2.9.3-1. v Českém lékopise 2009 - doplňku 2012. Zkouší se ve třech stupních. Pokud výsledky neodpovídají v prvním (6 tablet), ani ve druhém stupni (dalších 6 tablet), pokračuje se ve třetím stupni zkoušení (12 tablet), hodnotí

se dle kritérií přijatelnosti, která jsou vztažena k veličině Q, což je specifikované množství uvolněné léčivé látky vyjádřené v procentech deklarovaného obsahu.⁶

PEVNÉ LÉKOVÉ FORMY S PRODLOUŽENÝM UVOLŇOVÁNÍM

Zkouška disoluce u lékových forem s prodlouženým uvolňováním se provádí stejně jako u lékových forem s běžným uvolňováním. Časy pro odběr vzorků se liší. Jsou vyjádřeny v hodinách a jsou obvykle tři. Pokud není uvedeno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce, pokud množství léčivé látky uvolněné ze zkoušených dávkových jednotek odpovídá údajům uvedeným v tabulce 2.9.3-2. v Českém lékopise 2009 - doplnku 2012. Zkouší se ve třech stupních. Pokud výsledky neodpovídají v prvním (6 tablet), ani ve druhém stupni (dalších 6 tablet), pokračuje se ve třetím stupni zkoušení (12 tablet). Limity množství uvolněné léčivé látky jsou vyjádřeny v procentech deklarovaného obsahu.⁶

PEVNÉ LÉKOVÉ FORMY SE ZPOŽDĚNÝM UVOLŇOVÁNÍM

Zkouška disoluce léčivé látky z pevných lékových forem se zpožděným uvolňováním probíhá nejprve v kyselé fázi a poté ve fázi tlumivého roztoku. Český lékopis definuje pro pevné lékové formy se zpožděným uvolňováním zkoušku disoluce metodou A nebo metodou B. Tyto metody se od sebe liší způsobem výměny kyselé fáze za fázi tlumivého roztoku.

Metoda A

Kyselou fází tvoří 750 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l. Po dvou hodinách průběhu zkoušky se odebere alikvotní vzorek tekutiny. Poté se přidá 250 ml roztoku fosforečnanu sodného dodekahydrátu 0,2 mol/l. Pokud je to nutné, upraví se pH kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným na hodnotu $6,8 \pm 0,05$. Ve zkoušce se potom pokračuje 45 minut nebo jinou určenou dobu. Poté se odebere alikvotní vzorek tekutiny a vhodnou metodou se stanoví obsah účinné látky.

Metoda B

Kyselou fází tvoří 1000 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l. Po dvou hodinách průběhu zkoušky se odebere alikvotní vzorek tekutiny. Dále se ve zkoušce pokračuje tak, že se nádoba s kyselou fází zcela vyprázdní a naplní se 1000 ml tlumivého roztoku fosforečnanového o pH 6,8, který je směsí tří dílů kyseliny chlorovodíkové 0,1 mol/l a jednoho dílu roztoku fosforečnanu sodného dodekahydrátu 0,2 mol/l. Ve zkoušce se pokračuje 45 minut, nebo jinou určenou dobu. Poté se odebere alikvotní vzorek tekutiny a vhodnou metodou se stanoví obsah účinné látky.

Pokud není uvedeno jinak, přípravek vyhovuje zkoušce v kyselé fázi, pokud množství léčivé látky uvolněné ze zkoušených dávkových jednotek odpovídá údajům uvedeným v tabulce 2.9.3-3. v Českém lékopise 2009 - doplňku 2012. Zkouší se ve třech stupních. Ve zkoušení se pokračuje třetím stupněm, v případě, že výsledky obou fází, kyselé i v tlumivém roztoku, nevyhovují v předchozích stupních. Přípravek musí odolávat kyselému prostředí, kterému je zprvu vystaven a nesmí se z něho uvolnit více než 10% léčivé látky. U fáze v tlumivém roztoku přípravek vyhovuje zkoušce, pokud množství léčivé látky uvolněné ze zkoušených dávkových jednotek odpovídá údajům uvedeným v tabulce 2.9.3-4. v Českém lékopise 2009 - doplňku 2012. Množství uvolněného léčiva ve fázi v tlumivém roztoku nesmí být nižší než 75%.⁶

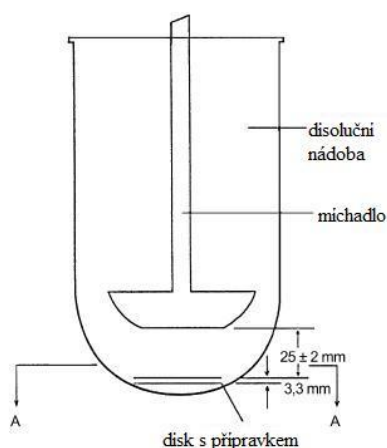
6.3.2 Zkouška disoluce transdermálních přípravků

Zkouškou se stanovuje rychlost disoluce léčivých látek z transdermálních náplastí. Lékopis rozlišuje tři metody provedení testu. Metodu diskovou, metodu s extrační celou a metodu rotujícího válce. Transdermální přípravky se testují těmito metodami při teplotě $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Množství léčivé látky uvolněné z náplasti v určeném čase se vyjadřuje jako množství na jednotku plochy povrchu náplasti za jednotku času.

1. Disková metoda

K provedení se používá přístroj s pádlem (Obr. 5) pro pevné perorální lékové formy. Součástí navíc je disk z nerezové oceli ve formě sítky s otvory. Disk přidržuje náplast u dna nádoby, náplast má být co nejvíce narovnaná. Náplast se přilepuje na disk pomocí předepsaného lepidla nebo oboustrannou lepicí páskou. Za předpokladu, že přípravek bude homogenní, se nemusí používat celá náplast, ale pouze oddělená část náplasti o přesně změřené velikosti. Dělení je zakázáno u transdermálních přípravků membránového typu. Povrch, ze kterého se uvolňují léčivé látky, je orientován nahoru. Vzorek disoluční tekutiny se odebírá z místa mezi hladinou disolučního média a horní částí listu míchadla, ve vzdálenosti, která je větší než 1 cm od stěny nádoby.⁶

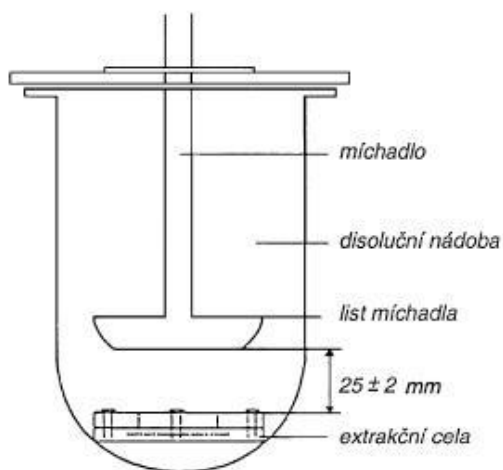
Obr. 5: Přístroj pro diskovou metodu⁶



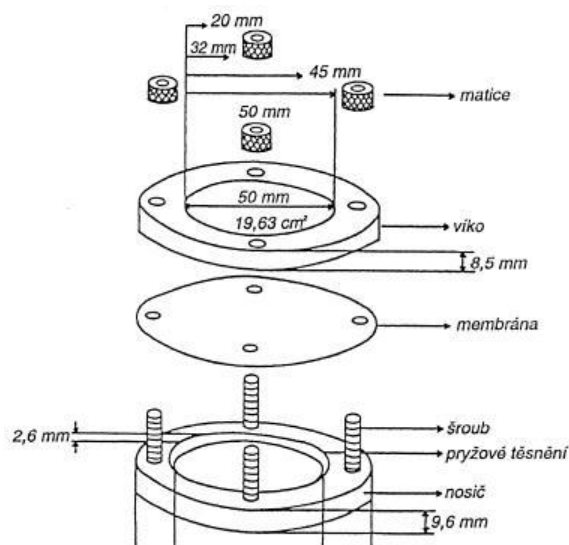
2. Metoda s extrakční celou

K provedení se používá přístroj s pádlem (Obr. 6) pro pevné perorální formy, který je navíc vybaven extrakční celou (Obr. 7). Cella se skládá z nosiče, víka a někdy také membrány, která odděluje náplast od média. Náplast je zde opět narovnaná a povrch náplastí, ze kterého dochází k uvolňování léčivé látky, je orientován nahoru. Náplast se umísťuje do středu dutiny extrakční cely. Vzorek disoluční tekutiny se odebírá z místa mezi hladinou disolučního média a horní částí listu míchadla, ve vzdálenosti, která je větší než 1 cm od stěny nádoby.⁶

Obr. 6: Přístroj s extrakční celou⁶



Obr. 7: Extrakční cela⁶



3. Metoda rotujícího válce

K provedení se používá přístroj s pádlem, ale míchadlo s hřídelí jsou nahrazeny válcem z nerezové oceli. Při této zkoušce se náplast umísťuje na válec. Náplast se přilepí adhezivní vrstvou na inertní porézní membránu, která na všech stranách musí přesahovat náplast nejméně o jeden centimetr. Náplast se takto umístí na válec, okraje membrány musí být ve styku s povrchem válce. Vzorek disoluční tekutiny se odebírá z místa mezi hladinou disolučního média a horní částí rotujícího válce, ve vzdálenosti, která je větší než 1 cm od stěny nádoby.⁶

6.3.3 Zkouška disoluce léčivých žvýkacích gum

Zkouškou se stanovuje rychlost disoluce léčivé látky ze žvýkací gumy, pomocí mechanického hnětení, které má simulovat žvýkání kousku gumy. Pro zkoušku se používá tzv. žvýkací přístroj, lékopis definuje dva typy žvýkacích přístrojů, přístroj A a přístroj B. Guma se vkládá do žvýkací komůrky.

Přístroj A se skládá ze žvýkací komůrky, vertikálního pístu a dvou pístů horizontálních. Horizontální písty napodobují žvýkání gumy, píst vertikální zajišťuje správné umístění gumy při žvýkání.

Přístroj B je tvořen žvýkací komůrkou, horní a dolní žvýkací plochou a otočným zařízením, které se otáčí kolem vertikální osy.

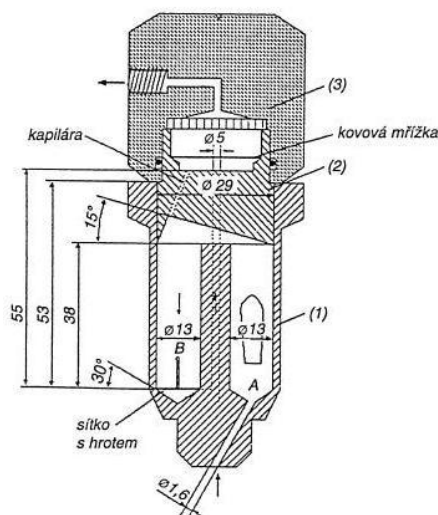
Do komůrky se umístí daný objem disolučního média, zkouška probíhá při teplotě $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Přístroj se v předepsaném čase zastaví a odebere se zbytek gumy, nebo vzorek disolučního média a stanoví se obsah léčivé látky. Zkouška se postupně provede se šesti žvýkacími gumami. Množství léčivé látky uvolněné za určenou dobu se vyjadřuje jako procenta z obsahu uvedeného v označení na obalu.⁶

6.3.4 Zkouška disoluce lipofilních tuhých lékových forem

Zkouška je určena pro lipofilní tuhé lékové formy, jako jsou některé čípky a měkké želatinové tobolky. Přístroj se skládá ze zásobní nádoby na disoluční médium, z průtokové cely (Obr. 8) a z pumpy, která vytlačuje disoluční médium přes průtokovou celu. Cela se skládá ze tří vzájemně spojitelných, průhledných částí. Dolní část cely (1) má dvě sousedící komůrky, které jsou napojené na průtokové zařízení. Disoluční médium protéká přes komůrku A a horem přetéká do komůrky B a proudí opět vzhůru k filtračnímu zařízení. Ve střední části cely (2) je dutina, kde se hromadí lipofilní pomocné látky. Kovová mřížka představuje hrubý filtr, horní část cely (3) obsahuje

filtrační jednotku pro filtry papírové, ze skelných vláken nebo celulosy. Zkouška probíhá při teplotě $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Vzorky se odebírají při výstupu z cely. Množství uvolněné léčivé látky v předepsaném čase se vyjadřuje v procentech deklarovaného množství uvedeného v označení na obalu.⁶

Obr. 8: Průtoková cela⁶



6.4 Testování disoluce u speciálních lékových forem

Testování disoluce speciálních lékových forem vyplývá z pokynů, které vydala Mezinárodní farmaceutická federace (FIP) s americkou asociací farmaceutických vědců (AAPS). Použitá disoluční technika by měla být založena na vlastnostech lékové formy a zohledňovat zamýšlený způsob podání.¹⁴

Orální suspenze (pro systémové použití)

Pro disoluční testování suspenzí je doporučenou metodou metoda rotujícího míchadla využívající vodné disoluční médium. U málo viskózních suspenzí může být přesná dávka aplikována na dno disoluční nádoby za použití odměrné pipety. Obecně je určeno pro málo viskózní suspenze pomalé míchání s rychlostí míchadla 25 otáček za minutu. U vysoce viskózních suspenzí je potřeba určit hmotnost, která se bude vnášet do disoluční nádoby. Více viskózní suspenze by se měly míchat rychleji při rychlosti míchadla 50 nebo 75 otáček za minutu, aby se předešlo kupení zkoušeného vzorku na dně nádoby.^{14,16}

Tablety dispergovatelné v ústech

Tablety dispergovatelné v ústech vytváří po aplikaci suspenze díky jejich rychlému rozpadu, který nastává typicky do 1 minuty od podání. Podávání těchto tablet nemusí mít za následek rychlejší terapeutický nástup účinku, ale jejich použitím

se mohou obcházet problémy jako obtížnost při polykání tradičních orálních lékových forem, jako jsou tablety a kapsle. *In vitro* disoluční testování tablet dispergovatelných v ústech by mělo vyplývat z postupů disolučního testování klasických pevných perorálních lékových forem nebo suspenzí.^{14,17}

Žvýkácí tablety

Zkušební postup pro testování disoluce používaný pro žvýkácí tablety by měl být shodný s postupem používaným u běžných tablet. Tento koncept je založen na možnosti, že pacient může spolknout lékovou formu, aniž by ji rozžvýkal. V tomto případě bude potřeba, aby se léčivá látka uvolnila i po spolknutí k zajištění požadovaného farmakologického účinku.^{14,16}

Polotuhé lékové formy

Mezi polotuhé lékové formy patří krémy, masti, gely. Substance léčiva podaná skrz polotuhé přípravky musí pro dosažení účinku prostupovat vrstvami kůže. Pro testování uvolňování účinné látky z polotuhých přípravků se využívají různé typy difúzních systémů označované jako difúzní cely. Tyto přístroje napodobují permeační kinetiku kůže. Zjednodušeně celu můžeme označit jako nádobku, která má část donorovou a akceptorovou, mezi těmito částmi je umístěna membrána. Membrána musí být vyrobena z inertního nereaktivního materiálu, aby neinteragovala s testovanou látkou. Obvykle se používají membrány z celulózy, nylonu, teflonu nebo polykarbonátů.¹⁸ Před zahájením experimentu je doporučováno nasáknutí membrány v akceptorovém médiu. Testovaný přípravek se rovnoměrně aplikuje na horní stranu membrány v donorové části cely. Při testování je teplota obvykle nastavena na 32°C, což odpovídá přibližné teplotě kůže. Pokud je polotuhý přípravek určen pro specifické místo k aplikaci, může být teplota při zkoušení jiná, např. vaginální krémy by se měly testovat při 37°C. Stálá teplota je zajišťována vodní lázní, pomocí vodního pláště, případně vyhřívaným blokem.¹⁴

Mezi první používanou difúzní celu patří tzv. Franzova cela, kterou sestrojil v sedmdesátých letech Dr. Thomas Franz. Je to vertikální difúzní systém. Cela je skleněná a skládá se z akceptorové komory, donorové komory, otvorů pro odběr vzorku a výměnu disolučního média, pláště, který reguluje teplotu a míchadla. Systém odebírání vzorků může být ruční nebo automatický.¹⁹ Tzv. vertikální difúzní cela představuje zdokonalenou verzi původní Franzovy cely. Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA - *Food and Drug Administration*) vydal směrnice, ve kterých doporučuje vertikální difúzní celu pro hodnocení změn v topických přípravcích.¹⁴ Další celou

využívanou pro hodnocení uvolňování léčiv z topických přípravků je cela označovaná v anglické literatuře jako tzv. „Enhancer cell“. Je vyrobena z teflonu. Oproti Franzově cele se jedná o cenově výhodnější alternativu. Cela se používá ve spojení s disolučním míchadlovým přístrojem, do kterého se cela vkládá. Srovnávací studie ukazují, že tato cela a vertikální difúzní cela (Franzova cela) poskytují podobné výsledky.^{14,16,20}

Čípky

U hydrofilních čípků, které uvolňují léčivo tím, že dochází k jejich rozpuštění v rektální tekutině, může být pro testování disoluce použit přístroj s košíčkem, míchadlem nebo průtoková cela. Lipofilní čípky uvolňují léčivo po roztavení v rektální dutině, což je ovlivňováno rektální teplotou, která odpovídá 36-37,5°C. Teplota použitá při testování by měla zohledňovat fyziologické podmínky v místě aplikace, nicméně v některých případech se pro testování disoluce u čípků může použít i teplota vyšší a to v rozmezí od 37 do 38,5°C. Zvýšená teplota při testování se používá u čípků, které se aplikují pacientům s horečkou. Pro lipofilní čípky jsou zkoušky uvedeny v lékopise.^{14,16}

Prášky a granuláty

Průtokový přístroj nabízí specifické cely pro studium uvolňování léčivých látek z prášků a granulí. Je však důležité si uvědomit, že disoluce může být značně ovlivněna jejich smáčivostí, plochou povrchu a distribucí velikosti částic, proto je potřeba tyto vlastnosti charakterizovat. V případě prášků a to zejména pokud vykazují špatnou smáčivost, může být nutné přidat k disolučnímu médiu povrchově aktivní látku. V některých případech se používá směs prášku se skleněnými korálky nebo jinými látkami, které podporují smáčení.^{14,16}

Parenterální: implantáty a mikročasticové lékové formy

U implantátů a mikročasticových formulací se pro testování disoluce používá modifikovaná průtoková metoda. Lékopisný přístroj s průtokovou celou je upraven tak, že je změněn vnitřní průměr, aby byly vytvořeny specifické podmínky pro testování parenterálií, tj. malý objem kapaliny. Průtok média musí být nastaven na velmi pomalou rychlost. K průtoku média mohou být použita HPLC čerpadla, která poskytují potřebnou přesnost při velmi nízkých rychlostech průtoku. Možností může být i použití přerušovaného toku. Protože testy trvají často dlouhé časové období (např. několik týdnů až měsíců), měla by být zajištěna kompenzace odpařování. Mohou být přidány vhodné konzervační látky, aby se zabránilo mikrobiální kontaminaci. Mezi standartní konzervační látky, které mohou být použity, patří např. cetylammmonium-bromid,

benzalkonium-chlorid, parabeny nebo deriváty fenolu. Konzervační látky musí být kompatibilní s léčivem stejně jako s ostatními pomocnými látkami. Jako atraktivní se jeví možnost provedení testu za zrychlených podmínek. Úspěšně toho bylo dosaženo prostřednictvím zvýšených zkušebních teplot a při použití pH hodnot nabízejících rychlejší uvolňování léčiva.^{14,16}

Inhalanda

Zatímco pro testování disoluce zejména pevných perorálních lékových forem existuje v současné době několik propracovaných lékopisných metod, vývoj testování disoluce u inhalačních lékových forem je stále ještě na začátku. Plíce mají několik unikátních vlastností, které jsou v podmínkách testování *in vitro* obtížně napodobitelné, jako je např. velmi malé množství vodné kapaliny, které představuje 10 – 20 ml/100 m² a přítomnost plicního surfaktantu. Přesné složení vodných tekutin a surfaktantu, který lemuje dýchací cesty, také není zcela přesně známé a tím se komplikuje výběr disolučního média. Analýza je dále komplikována skutečností, že při inhalačním podávání léků jen část dávky vstupuje do plic. Testování disoluce celé dávky je proto nevhodné. Lepším cílem je získat disoluční profil jen těch částic, které se budou ukládat v plicích.²¹ Hluboko do plic se dostávají velmi jemné částice o velikosti v rozmezí 1 – 5 μm. *Davies a Feddah* studovali disoluci inhalačních glukokortikoidních částic za použití průtokového disolučního přístroje, který byl zhotovený na objednávku. Disoluční médium o teplotě 37°C bylo čerpáno vzhůru přes disoluční celu prostřednictvím HPLC čerpadla s nastavenou rychlostí průtoku 0,7 ml / min. Disoluční médium protékalo skrz glukokortikoidní částice, které byly shromážděny a imobilizovány na předfiltru ze skleněných vláken. Jako disoluční médium použili vodu, umělou plicní tekutinu a modifikovanou plicní tekutinu s L- α -fosfatidylcholinem. Dosud byly zveřejněny čtyři různé plicní tekutiny, které se přibližují složením extracelulární tekutiny v plicích. Jedná se o umělý ultrafiltrát séra, umělou plicní tekutinu, Ringerův roztok a modifikovanou plicní tekutinu s L- α -fosfatidylcholinem.^{18,22,23}

6.5 Analytické metody používané pro stanovení množství uvolněného léčiva

Analytické metody používané pro stanovení množství uvolněného léčiva při disolučních testech můžeme rozdělit do čtyř kategorií na metody

spektrofotometrické, chromatografické, hmotnostně spektrometrické a potenciometrické. Mezi nejčastěji používané metody patří UV/VIS spektrofotometrie a metoda HPLC. Ostatní detekční metody, jako je elektrochemická detekce, detekce pomocí fluorescence nebo hmotnostní spektrometrie, by měly být zvažovány pokud UV/VIS spektrofotometrie nebo HPLC separační metoda nejsou z určitého důvodu vhodné. Fluorescenční metody se s výhodou dají použít v případě, pokud je stanovovaná látka přirozeně fluorescenční, nebo pokud ji lze udělat fluoreskující prostřednictvím derivátů nebo ozářením.²⁴

UV/VIS spektrofotometrie

UV/VIS spektrofotometrie, neboli spektrofotometrie v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti je tradiční analytická metoda využívaná pro stanovení množství uvolněného léčiva při disoluci. Měří se absorbance, na základě níž se počítá množství uvolněného léčiva. Léčiva, která absorbují v UV části spektra, mají ve své molekule tzv. chromofory, tj. skupiny s dvojnými nebo trojnými vazbami. Je-li v molekule několik konjugovaných dvojných vazeb, posouvá se absorpce do oblasti vyšších vlnových délek, tedy do viditelné oblasti. Výhodou spektrofotometrického stanovení je rychlost a jednoduchost metody.

Při použití metody UV/VIS spektrofotometrie může docházet k rušení stanovení obsahu účinné látky na základě jiných složek obsažených v měřeném vzorku, které mohou absorbovat při podobné vlnové délce, při které má stanovovaná látka absorpční maximum. Díky tomu nelze snadno určit množství stanovované látky, protože absorbance při zvolené vlnové délce je součtem absorbancí obou absorbujících látek. Stanovení mohou rušit pomocné látky, ostatní léčivé látky ve vícesložkové lékové formě nebo jejich degradační produkty, na zkrácení výsledků se může podílet i např. samotné disoluční médium. Tyto problémy při stanovení lze odstranit za použití jiné analytické metody. Množství uvolněného léčiva u vícesložkových přípravků se nejlépe stanoví metodou HPLC.²⁴

Metoda HPLC

HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie, patří mezi separační metody. Při této metodě dochází k separaci jednotlivých složek analyzované směsi na základě interakcí dělených látek mezi stacionární a mobilní fází. Díky chromatografické separaci může být stanovovaná látka detekována a kvantifikována i v přítomnosti degradačních produktů, pomocných látek a disolučního média. *Yang a kol.* použili iontovýměnou HPLC k monitorování disoluce pentamidinu

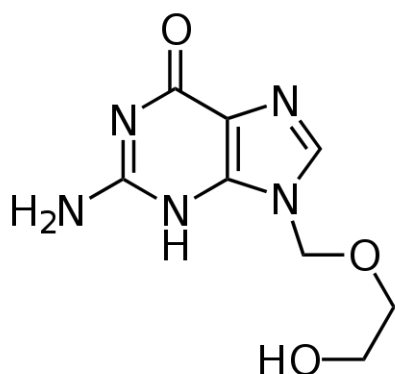
z polymerní matrice. Předpokládali, že při použití spektrofotometrické metody by polymerní matrice mohla vytvářet podstatnou odchylku při stanovení. *Mariappan a kol.* provedli souběžné monitorování disoluce rifampicinu, isoniazidu a pyrazinamidu za použití metody HPLC. Stanovení metodou HPLC bylo přesné u všech tří analyzovaných léčiv i v přítomnosti pomocných látek a degradačních produktů.²⁵

Metoda HPLC poskytuje oproti spektrofotometrickým metodám vyšší citlivost a je často používána pro detekci množství uvolněného léčiva při testech disoluce u lékových forem, ve kterých je obsah léčiva ve velmi nízké koncentraci. *Swartz a kol.* testovali disoluci u perorální kontracepce, která obsahovala 1mg norethisteronu a 0,05 mg ethinylestradiolu. Jako analytická metoda k určení obsahu léčiva byla pro svou citlivost použita metoda HPLC. Naměřený obsah účinné látky byl u norethisteronu 1,7 µg/ml a u ethinylestradiolu 0,06 µg/ml.²⁴

6.6 Aciklovir

Aciklovir (2-amino-9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-1,9-dihydro-6H-purin-6-on)⁶ patří do skupiny tzv. acyklických analog nukleosidů, kde je k bázi vázán alifatický vícesytný alkohol (polyol), který simuluje část cukerného kruhu. Aciklovir je derivátem guaninu, který v molekule místo ribosy obsahuje 2-hydroxyethoxymethylový zbytek.²⁶ Vzhledově to je bílý krystalický prášek.²⁷

Obr. 9: Chemická struktura acikloviru²⁸



Aktivní formou acikloviru je trifosfát. K připojení prvního fosfátového zbytku dochází za spoluúčasti enzymu tymidinkinázy, který je kódován herpetickým virem. Z toho vyplývá, že aciklovir působí selektivně pouze na virem napadené buňky a jako léčivo je velmi dobře snášen. V buňkách napadených viry ve formě aktivního trifosfátu

inhibuje virem kódovanou DNA polymerázu. Používá se u těžkých infekcí vyvolaných herpetickými viry jako je Herpes simplex a Varicella zoster. V České republice je aciklovir je dostupný v přípravcích pro perorální podání a v přípravcích pro místní aplikaci. Aciklovir se nachází například v léčivech Zovirax (tablety, krém) nebo Herpesin (tablety, krém).²⁹

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité suroviny

Aciklovir (Zentiva a.s., Praha)

Čištěná voda (Faf UK HK)

Ethylpyruvát 98% (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Dr. Kulich Pharma, s.r.o., HK)

Kyselina citronová monohydrát (Lachema, Brno)

Mucin z prasečího žaludku typ III (Sigma-Aldrich, USA)

Oligoester kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený 3% dipentaerythritolu (Faf UK HK)

Oligoester kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený 3% mannitolu (Faf UK HK)

Polyester kyseliny DL-mléčné a glykolové větvený 3% tripentaerythritolu (Faf UK HK)

7.2 Použité přístroje

Analytické digitální váhy KERN ABS 220-4, max. 220 g, d = 0,1 mg

Centrifuga, EBA 20 Hettich

Digitální stolní pH metr, HANNA HI 221

Digitální váhy KERN 440-35N, max. 400 g, d = 0,01 g

Horkovzdušná sušárna, Memmert

Rotační reometr Kinexus, Malvern Instruments, Worcestershire, U. K.

Spektrofotometr Specord 205 UV VIS, Analytik Jena, SRN

Třepačka s vodní lázní, GFL 1083, Analytik Jena, SRN

7.3 Příprava fosfátcitrátového pufru o pH 7,4

Bylo připraveno 2000 ml fosfátcitrátového pufru pH 7,4 smícháním 0,1 M roztoku kyseliny citronové monohydrátu (roztok A) s 0,2 M roztokem hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu (roztok B). Roztok A o objemu 196 ml obsahoval 4,12 g kyseliny citronové monohydrátu rozpuštěné v čištěné vodě. Roztok B o objemu 1804 ml obsahoval 129,16 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu rozpuštěného v čištěné vodě. Po smíchání obou roztoků byla hodnota pH ověřena pomocí pH metru.

7.4 Příprava substrátu pro test mukoadheze

Jako modelový substrát pro adhezivní test byl použit mucin z prasečích žaludků, který byl hydratován. K 3,0 g mucinu bylo přidáno 12,0 ml fosfátcitrátového pufru pH 7,4. Pufr se přidával postupně za stálého míchání. Na takto hydratovaný mucin byly při mukoadhezivním testu nanášeny polyesterové matrice s inkorporovaným aciklovirem.

7.5 Příprava polyesterových matric pro aplikaci na mucin

Byly připraveny matrice z polyesterů 3D, 3M a 3T s inkorporovaným aciklovirem. Při přípravě byl použit ethylpyruvát jako plastifikátor. Procentuální zastoupení jednotlivých složek ve směsi je uvedeno v tabulce (Tab. 2). Polyestery byly nejprve roztaveny v horkovzdušné sušárně při teplotě do 80 °C, poté k nim byl po částech přidáván ethylpyruvát a směsi byly důkladně zhomogenizovány. Nakonec byl do plastifikovaného polyesteru přidán aciklovir. Směs musela být opět důkladně zhomogenizována. Matrice obsahující 40 % polyesteru byly připraveny v množství 20 g. Matrice s vyšším podílem polyesterového nosiče (60%, 70%) byly připraveny v množství 10 g.

Tab. 2: Složení polyesterových matric

Polyester	Ethylpyruvát [%]	Aciklovir [%]
3D	55	5
	27,5	2,5
3M	55	5
	27,5	2,5
3T	55	5
	37	3

7.6 Mukoadhezivní test

Doba mukoadheze polyesterových matric byla zjišťována na základě průběhu liberace acikloviru z matric aplikovaných na hydratovaný mucin, který sloužil jako modelový substrát pro mukoadhezivní test *in vitro*. Bylo testováno celkem šest matric různého složení (Tab. 2). Disoluční test byl proveden v třepací vodní lázni, která se nechala vyhřát na 37°C.

Obr. 10: Třepací vodní lázeň ³⁰



Princip provedení byl takový, že na pevnou kruhovou podložku o průměru 4 cm potaženou hydrofilní gázou bylo nanášeno 0,8 g mucinu, který se po podkladu rozetřel do tenké rovnoměrné vrstvy. Podložka s nanášenou vrstvou mucinu byla vytárována a kopistkou byla v tenké vrstvě aplikována polyesterová matrice s aciklovirem o hmotnosti 0,500 g u matric plastifikovaných 55 % ethylpyruvátu. U matric plastifikovaných nižší koncentrací ethylpyruvátu musela být navážka 0,600 g z důvodu

vyšší viskozity polymerní soustavy. Přesná navážka vzorku byla zaznamenána pro výpočet množství uvolněného léčiva.

Matrice nanesená na mucin byla vložena na dno kádinky a byla zalita disolučním médiem, kterým byl fosfátcitrátový pufr pH 7,4 o objemu 20,0 ml. Kádinka byla následně vložena do vodní lázně a současně bylo zapnuto třepání frekvencí 50 kmitů/min a amplitudou 22 mm. Časové intervaly jednotlivých odběrů disolučního média byly 5, 15, 30, 45, 60 a 90 minut. Mukoadhezivní test byl koncipován jako destruktivní, na začátku testu muselo být nasazeno tolik vzorků, kolik bylo naplánováno odběrů.

7.7 Stanovení množství uvolněného acikloviru

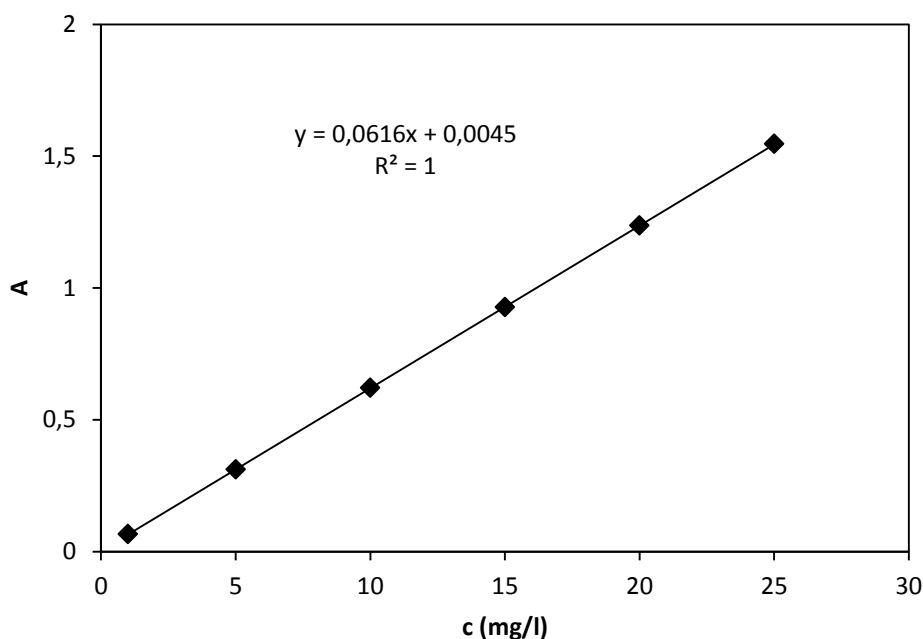
Byla sestrojena kalibrační přímka pro aciklovir, který byl inkorporován do větvených polyesterů. Na základě stanovení množství uvolněného acikloviru byla posuzována doba adheze polyesteru na modelovém podkladu.

Byly připraveny roztoky acikloviru v pufru v koncentracích 25, 20, 15, 10, 5 a 1 mg/l. Bylo zjištěno absorpční maximum acikloviru. Na základě toho byla měřena absorbance roztoků acikloviru při vlnové délce 256 nm proti pufru. Z naměřených hodnot absorbancí byla sestrojena kalibrační přímka pro aciklovir.

Tab. 3: Absorbance roztoků acikloviru při 256 nm

Koncentrace acikloviru (mg/l)	Absorbance
1,0	0,067
5,0	0,312
10,0	0,621
15,0	0,927
20,0	1,236
25,0	1,546

Obr. 11: Kalibrační přímka acikloviru



Disoluční médium odebrané v jednotlivých časových intervalech bylo centrifugováno při otáčkách 6000/min po dobu 20 min, aby se odstranil mucin uvolněný do disolučního média a byl získán čirý roztok. Poté byla měřena absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 256 nm. Na základě naměřené absorbance bylo z kalibrační přímky vypočteno množství acikloviru v mg/l. To bylo přepočteno na použitý objem disolučního média (tj. 20 ml). Výsledek byl vztažen k obsahu acikloviru v polymerní matrici. Kumulativní procenta uvolněného acikloviru byla vztažena k době disolučního testu a byl získán časový průběh liberace acikloviru.

7.8 Měření viskozity polymerních matric

Byla měřena viskozita u matric složených z polyesterového nosiče, plastifikátoru a léčiva (Tab. 4).

Tab. 4: Matrice pro měření viskozity

Polyester	Ethylpyruvát [%]	Aciklovir [%]
3D	27,5	2,5
3M	27,5	2,5
3T	37	3

Měření viskozity bylo provedeno na rotačním reometru Kinexus (Obr. 12) se softwarem *rSpace* pro vyhodnocení výsledků. Byla použita geometrie kužel-deska CP 2/20 (úhel 2°, průměr 20 mm). Postupovalo se dle návodu výrobce.^{31,32} Pro měření byla zvolena sekvence *Shear rate table*, nastavena teplota 37°C a rychlostní spád v rozsahu 0,1000 s⁻¹ až 40,0 s⁻¹. Měřený vzorek byl nanesen na spodní desku pomocí kopistky. Pro správné změření musí být vzorek nanesen v odpovídajícím množství, pokud tomu tak není, nelze zaručit přesné měření (Obr. 13). Pokud se nanese malé množství vzorku, je třeba ho doplnit. Pokud bylo vzorku nanášeno více, je třeba odstranit přebytečné množství pomocí plastové kopistky. Povrch geometrie se nesmí poškrábat.

Výsledkem měření byly hodnoty posuvného napětí a dynamické viskozity uvedené v Tab. 14 – 16. Byly sestrojeny reogramy (Obr. 23).

Obr. 12: Reometr Kinexus



Obr. 13: Nanášení vzorku



8 VÝSLEDKY

8.1 Výsledky disolučních testů

8.1.1 Stanovení acikloviru spektrofotometricky

Tab. 5: Liberace acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 55 % ethylpyruvátu

čas (min)	A	ředění	aciklovir (mg/ml)	aciklovir (%)
15	0,9138	40	11,8091	47,18
30	0,9743	40	12,5948	49,59
45	0,9288	70	21,0068	83,48
60	0,9702	70	21,9477	86,07

Tab. 6: Liberace acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 55 % ethylpyruvátu

čas (min)	A	ředění	aciklovir (mg/ml)	aciklovir (%)
15	0,9933	40	12,8416	50,35
30	0,9633	60	18,6779	73,67
45	0,9822	70	22,2205	87,81
60	0,9003	80	23,2675	91,28

Tab. 7: Liberace acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 55 % ethylpyruvátu

čas (min)	A	ředění	aciklovir (mg/ml)	aciklovir (%)
15	0,541	40	6,9675	27,61
30	0,6696	50	10,7971	41,94
45	0,7384	70	16,6795	65,29
60	0,8576	70	19,3886	76,12

Tab. 8: Liberace acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu

čas (min)	A	ředění	aciklovir (mg/ml)	aciklovir (%)
5	0,1163	40	1,4519	9,59
15	0,2107	40	2,6779	17,59
30	0,3114	40	3,9857	26,08
45	0,4053	40	5,2052	34,42
60	0,4158	40	5,3416	34,92
90	0,5699	40	7,3429	48,55

Tab. 9: Liberace acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu

čas (min)	A	ředění	aciklovir (mg/ml)	aciklovir (%)
5	0,1089	30	1,0169	6,73
15	0,1914	30	1,8205	11,94
30	0,2188	30	2,0873	13,68
45	0,4261	30	4,1065	26,56
60	0,4506	30	4,3451	28,60
90	0,5616	30	5,4263	36,15

Tab. 10: Liberace acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 37 % ethylpyruvátu

čas (min)	A	ředění	aciklovir (mg/ml)	aciklovir (%)
5	0,1022	40	1,2688	6,29
15	0,1963	40	2,4909	12,39
30	0,2956	40	3,7805	18,79
45	0,3218	40	4,1208	20,39
60	0,3896	40	5,0013	24,74
90	0,5807	40	7,4831	37,37

8.1.2 Stanovení acikloviru metodou HPLC

Stanovení provedeno ve spolupráci s Katedrou farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Tab. 11: Liberace acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu

hmotnost matrice (mg)	množství ACV v matrici (mg)	čas (min)	ACV (µg/ml)	ACV (mg/20 ml)	ACV (%)
605,3	15,1	5	46	0,927	6,12
608,9	15,2	15	88	1,753	11,51
611,3	15,3	30	133	2,657	17,39
604,9	15,1	45	163	3,267	21,60
611,8	15,3	60	165	3,296	21,55
605,0	15,1	90	225	4,500	29,75

Tab. 12: Liberace acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu

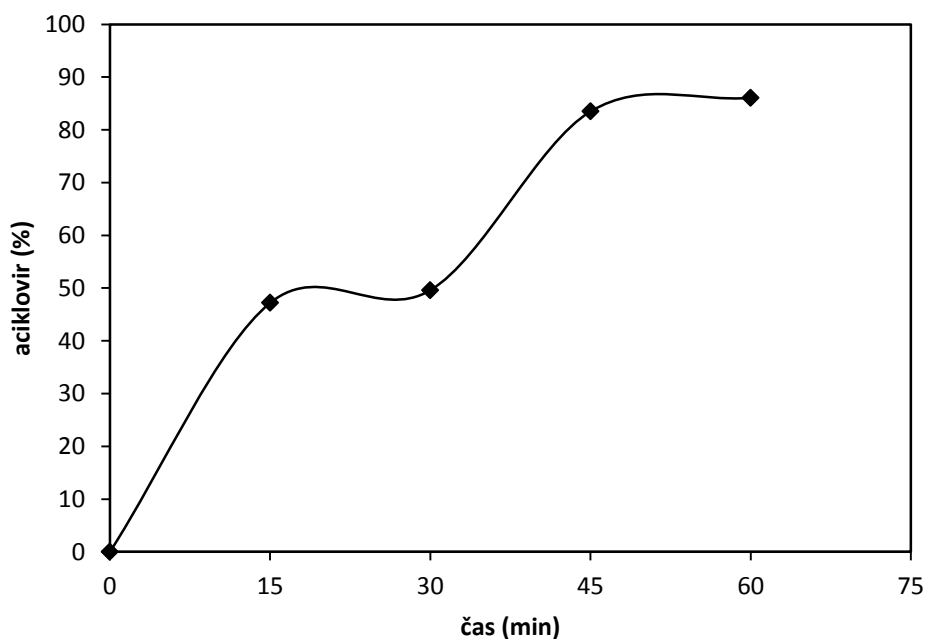
hmotnost matrice (mg)	množství ACV v matrici (mg)	čas (min)	ACV ($\mu\text{g/ml}$)	ACV (mg/20 ml)	ACV (%)
604,8	15,1	5	29	0,577	3,82
610,0	15,3	15	49	0,985	6,46
610,2	15,3	30	56	1,129	7,40
618,5	15,5	45	118	2,355	15,23
607,8	15,2	60	133	2,650	17,44
600,4	15,0	90	142	2,835	18,89

Tab. 13: Liberace acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 37 % ethylpyruvátu

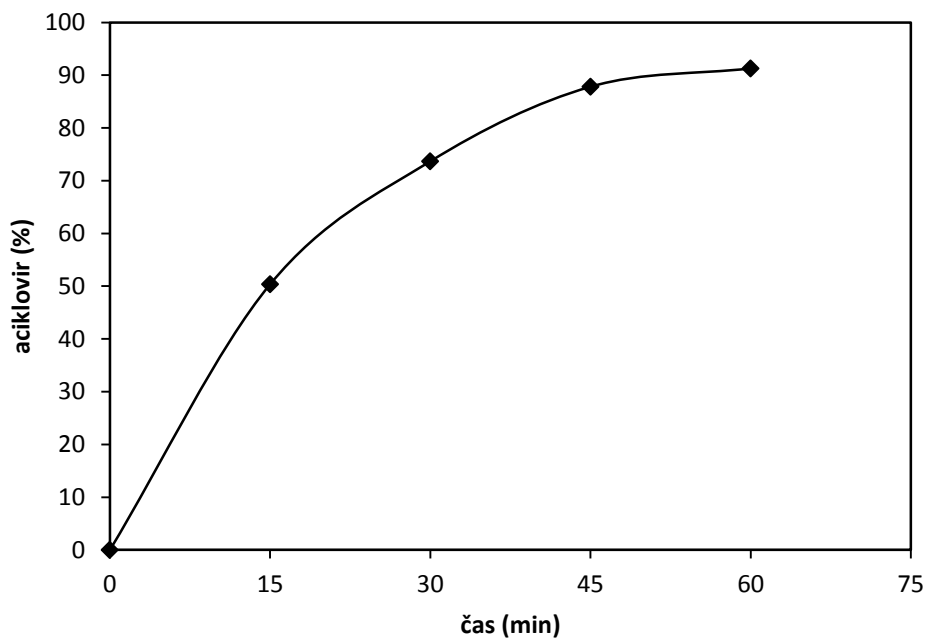
hmotnost matrice (mg)	množství ACV v matrici (mg)	čas (min)	ACV ($\mu\text{g/ml}$)	ACV (mg/20 ml)	ACV (%)
605,1	20,2	5	29	0,577	2,86
603,3	20,1	15	55	1,103	5,49
603,7	20,1	30	90	1,805	8,97
606,2	20,2	45	121	2,417	11,96
606,4	20,2	60	113	2,253	11,15
600,7	20,0	90	213	4,252	21,24

8.1.3 Grafy

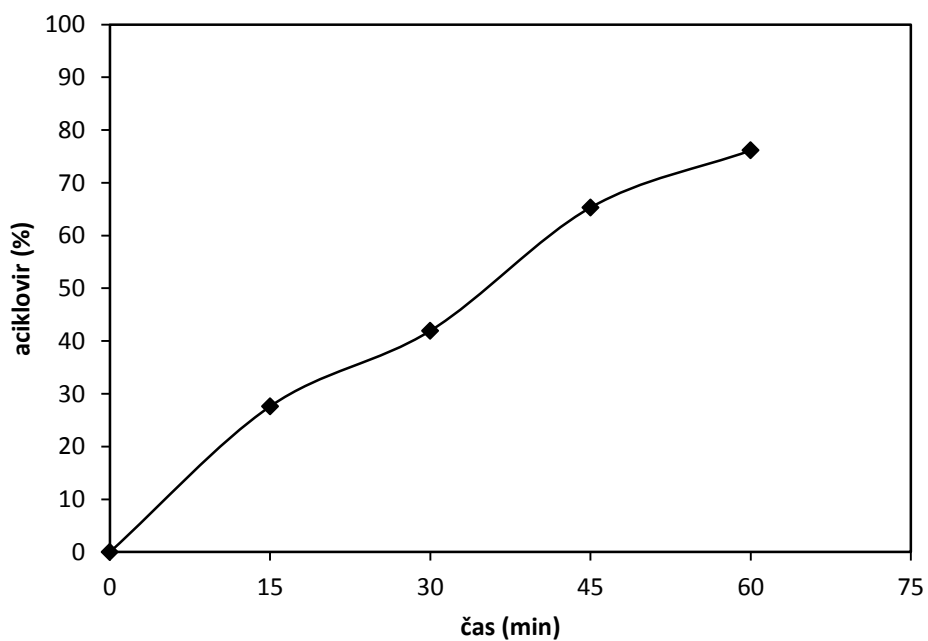
Obr. 14: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 55 % ethylpyruvátu



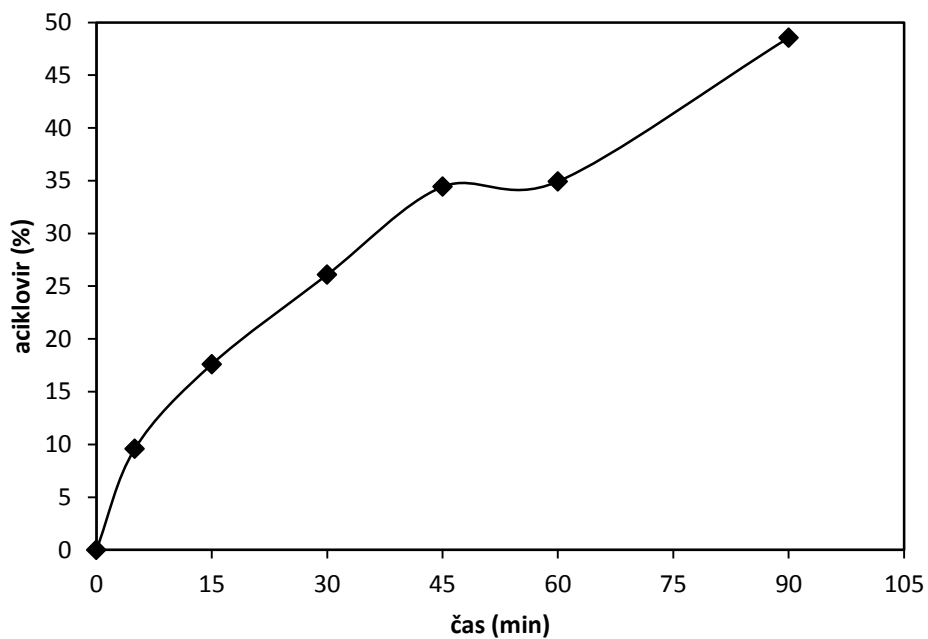
Obr. 15: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 55 % ethylpyruvátu



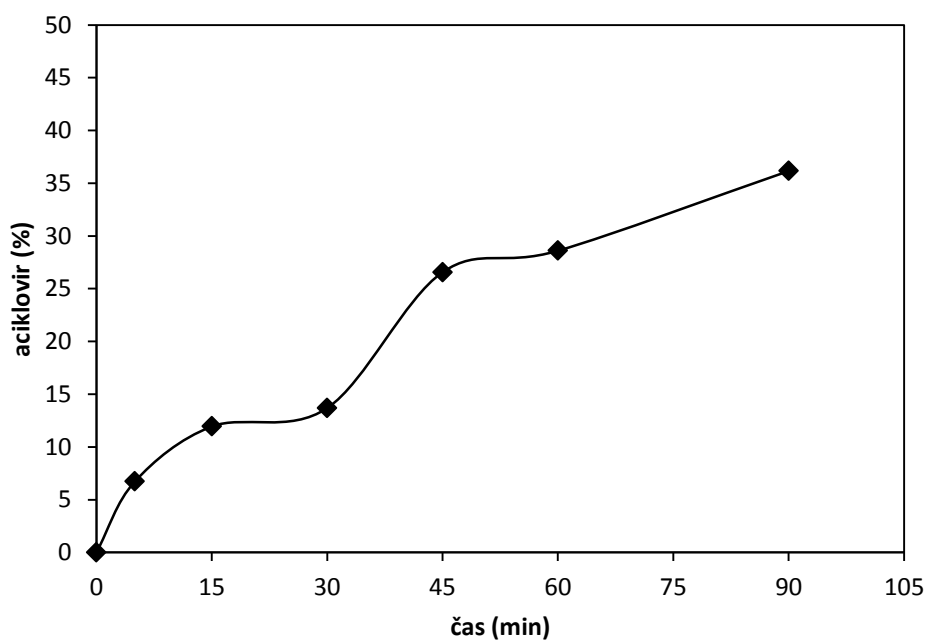
Obr. 16: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 55 % ethylpyruvátu



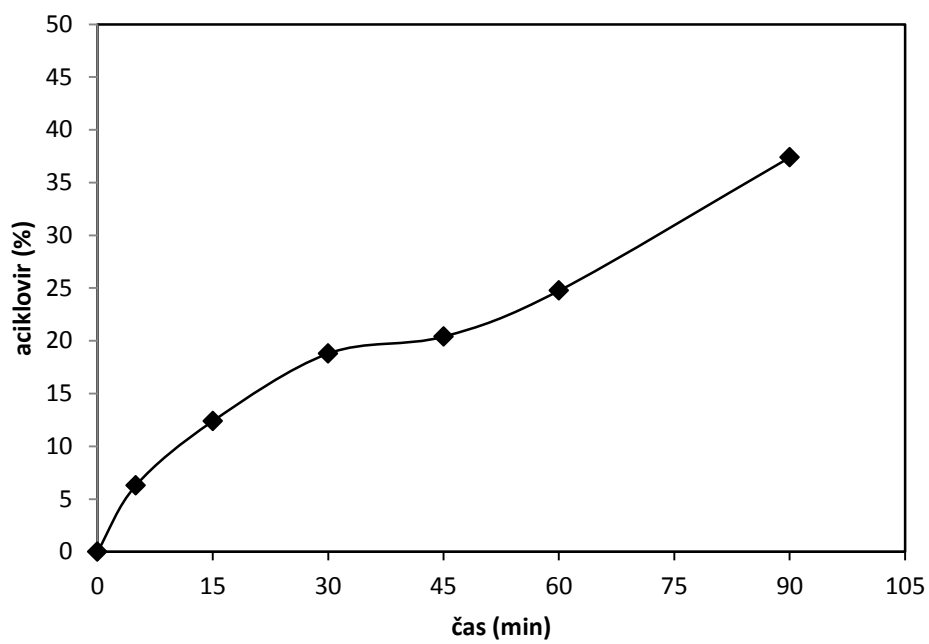
Obr. 17: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu



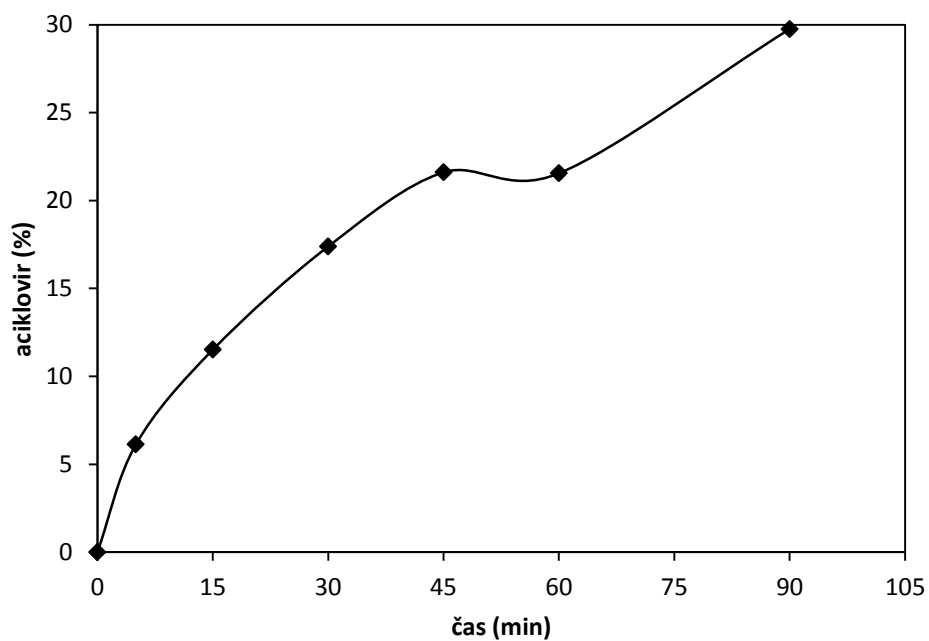
Obr. 18: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu



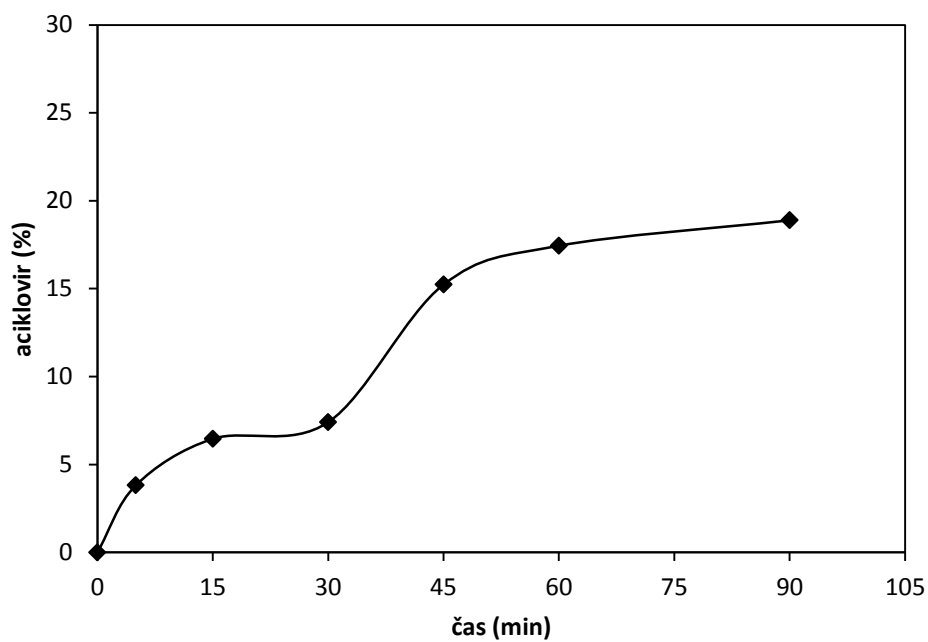
Obr. 19: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 37 % ethylpyruvátu



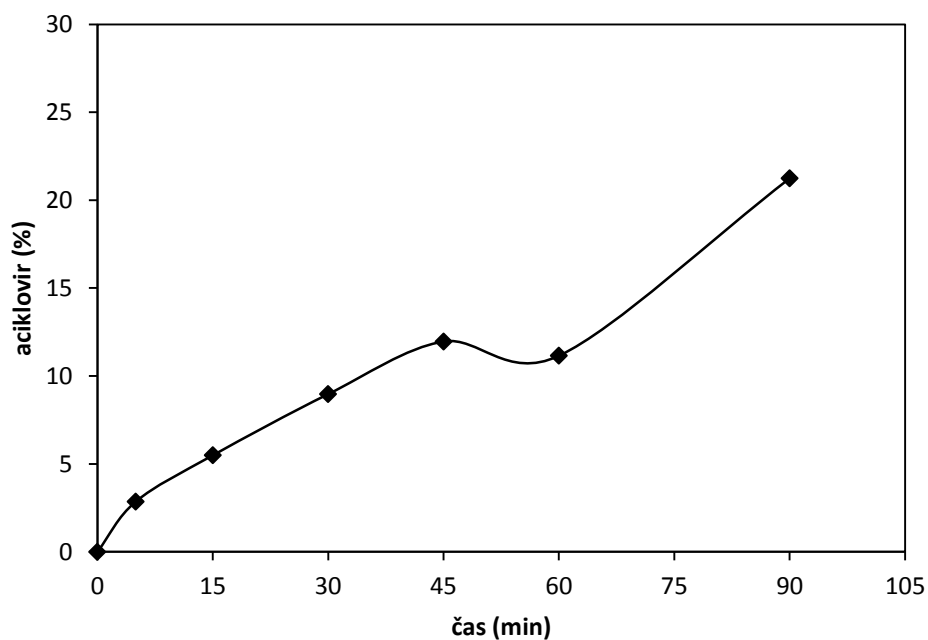
Obr. 20: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu dle HPLC



Obr. 21: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu dle HPLC



Obr. 22: Průběh uvolňování acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 37 % ethylpyruvátu dle HPLC



8.2 Viskozita polymerních matric

Tab. 14: Matrice tvořená polyesterem 3M plastifikovaným 27,5 % ethylpyruvátu

Posuvné napětí (Pa)	Rychlostní spád (s ⁻¹)	Dynamická viskozita (Pa·s)
1,232	0,09988	12,34
1,880	0,1584	11,87
2,665	0,2511	10,61
4,543	0,3979	11,42
6,472	0,6311	10,26
10,12	1,001	10,11
16,86	1,583	10,65
24,65	2,512	9,812
38,97	3,981	9,789
61,70	6,310	9,778
96,17	10,00	9,617

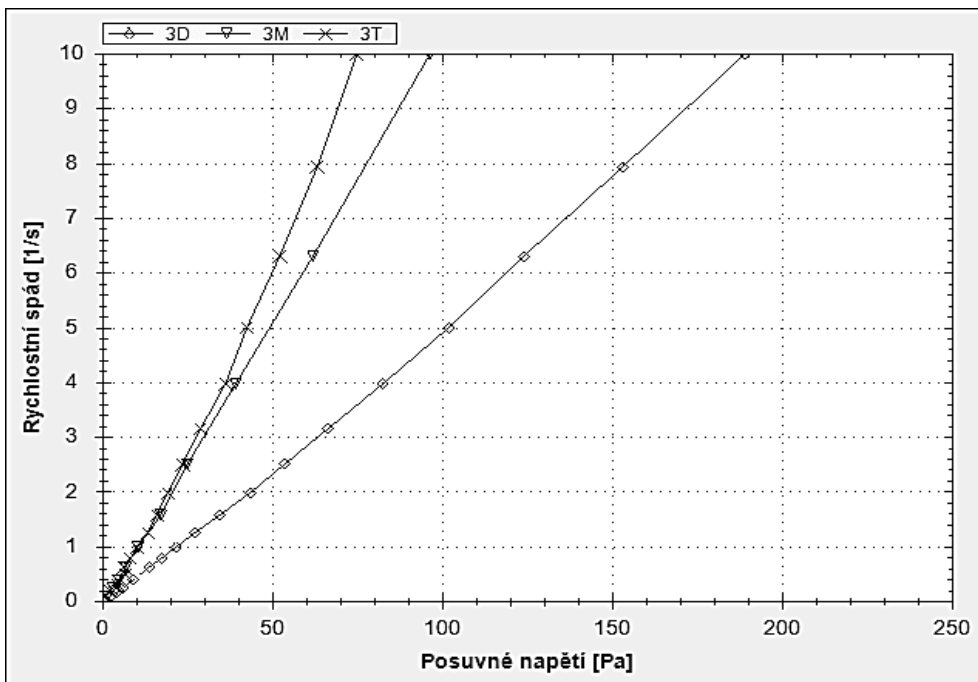
Tab. 15: Matrice tvořená polyesterem 3D plastifikovaným 27,5 % ethylpyruvátu

Posuvné napětí (Pa)	Rychlostní spád (s ⁻¹)	Dynamická viskozita (Pa·s)
2,069	0,1006	20,57
2,543	0,1259	20,20
3,745	0,1589	23,56
4,366	0,1997	21,86
5,683	0,2523	22,52
6,784	0,3164	21,44
8,847	0,3978	22,24
10,77	0,5013	21,48
13,41	0,6309	21,26
17,16	0,7941	21,60
21,35	1,000	21,35
26,86	1,259	21,33
34,26	1,585	21,61
43,28	1,996	21,68
53,32	2,512	21,23
66,20	3,162	20,93
82,34	3,981	20,68
101,8	5,012	20,31
123,8	6,310	19,62
153,0	7,944	19,26
188,9	10,00	18,89

Tab. 16: Matrice tvořená polyesterem 3T plastifikovaným 37 % ethylpyruvátu

Posuvné napětí (Pa)	Rychlostní spád (s ⁻¹)	Dynamická viskozita (Pa·s)
0,7452	0,1069	6,969
1,129	0,1256	8,989
1,413	0,1589	8,891
2,014	0,1986	10,14
2,651	0,2503	10,59
4,033	0,3200	12,60
4,193	0,3977	10,54
6,383	0,5005	12,75
6,079	0,6307	9,640
8,020	0,7945	10,09
9,850	0,9993	9,856
12,92	1,258	10,27
15,66	1,586	9,872
18,92	1,996	9,480
23,26	2,512	9,257
28,65	3,161	9,063
35,91	3,982	9,019
42,30	5,012	8,440
51,90	6,310	8,225
62,93	7,944	7,921
74,68	10,00	7,467

Obr. 23: Reogramy



9 DISKUZE

9.1 Vliv koncentrace polyesteru v mukoadhezivních matricích na dobu adheze

Polyestery 3M, 3D a 3T, které byly použity k formulaci matric s aciklovirem, jsou oligoestry, resp. polyestery kyseliny mléčné a glykolové, větvené vícesytnými alkoholy. Tab. 17 uvádí základní charakteristiky.

Tab. 17: Charakteristiky polyesterů větvených různou větvící složkou

Označení polymeru	Poměr LA/GA/monomer [%]	M_n [g/mol]	M_w [g/mol]	T_g [°C]	$M_w(SEC)/M_w$	g'
3M	48,5/48,5/3,0	2600	3800	23,7	1,08	-
3D	48,5/48,5/3,0	3 600	5300	27,3	1,19	-
3T	48,5/48,5/3,0	7 900	20600	21,7	-	0,31

M_n [g/mol] je číselně střední molární hmotnost

M_w [g/mol] je hmotnostně střední molární hmotnost

T_g [°C] je teplota skelného přechodu

$g' = (\eta_{br}/\eta_{lin})$ je větvící poměr stanovený z vnitřní viskozity lineárního (lin) a větveného (br) polymeru při shodné molární hmotnosti (lineární PLGA má $g' = 1,0$)

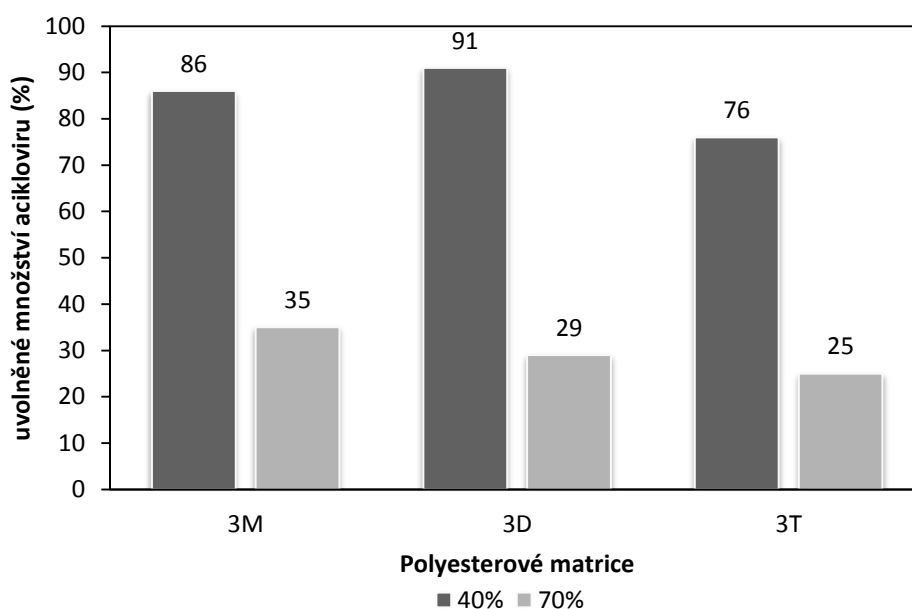
poměr $M_w(SEC)/M_w$ vyjadřuje stupeň větvení (nižší hodnota znamená vyšší stupeň větvení, lineární PLGA má hodnotu 1,5)

Aby byla umožněna inkorporace léčiva a aplikace matric na modelový mukózní substrát, musela být jejich viskozita snížena. Toho bylo dosaženo plastifikací. Jako plastifikátor byl použit ethylpyruvát. Nejprve byly připraveny matrice, které obsahovaly 55 % plastifikátoru. Matrice s tímto složením měly vhodnou viskozitu pro to, aby se daly aplikovat na mucinový podklad v tenké vrstvě rozetřením pomocí kopistky. Snížením podílu polyesteru v matrici došlo ovšem i ke snížení mukoadhezivních vlastností matric. Proto byly pro účely testování mukoadhezivní připraveny matrice s vyšším podílem polyesteru. Byly připraveny matrice s obsahem 70% polyesterů 3M a 3D, jejichž viskozita ještě umožňovala aplikaci na mucinový podklad v tenké vrstvě. Polyester 3T s molární hmotností $M_w = 20600$ g/mol mohl být použit nejvýše

v koncentraci 60%, a to z toho důvodu, že soustava více koncentrovaná byla již hodně viskózní a na mucinovou vrstvu nešla v tenké vrstvě aplikovat.

Zvýšením podílu polyesteru v matrici došlo ke zvýšení adhezivní doby, což se v disolučním testu projevilo snížením množství uvolněného acikloviru za dobu 60 minut (Obr. 24). Zatímco z matric tvořených pouze 40 % polyesteru se po 60 minutách uvolnilo přibližně 75 % až 90 % acikloviru v závislosti na typu polyesteru, z matric se 70 % (resp. 60 % v případě polyesteru 3T) se uvolnilo pouze 25 % až 35 % acikloviru.

Obr. 24: Množství uvolněného acikloviru z mukoadhezivních matric za dobu 60 minut

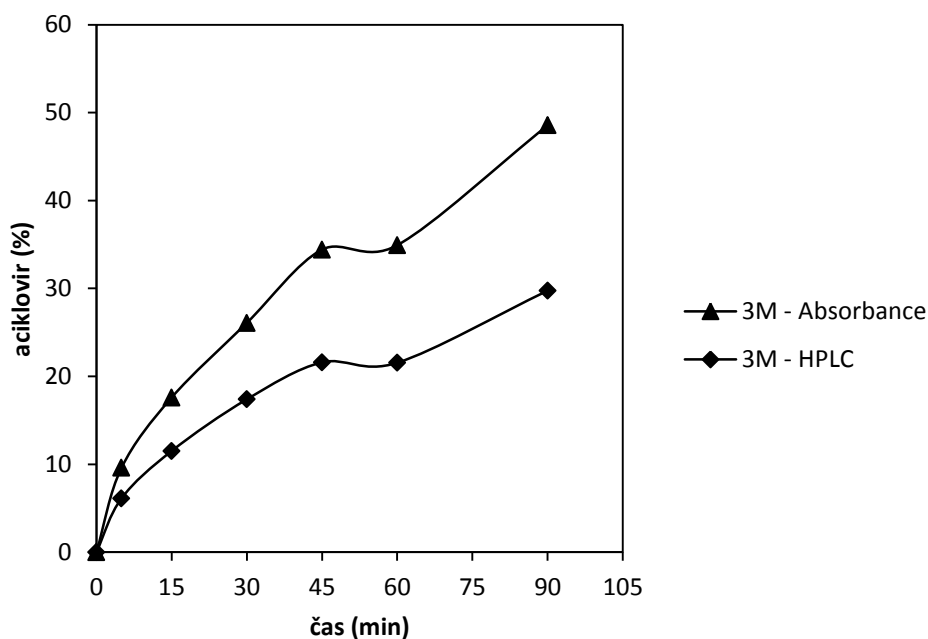


9.2 Liberace acikloviru z mukoadhezivních matric

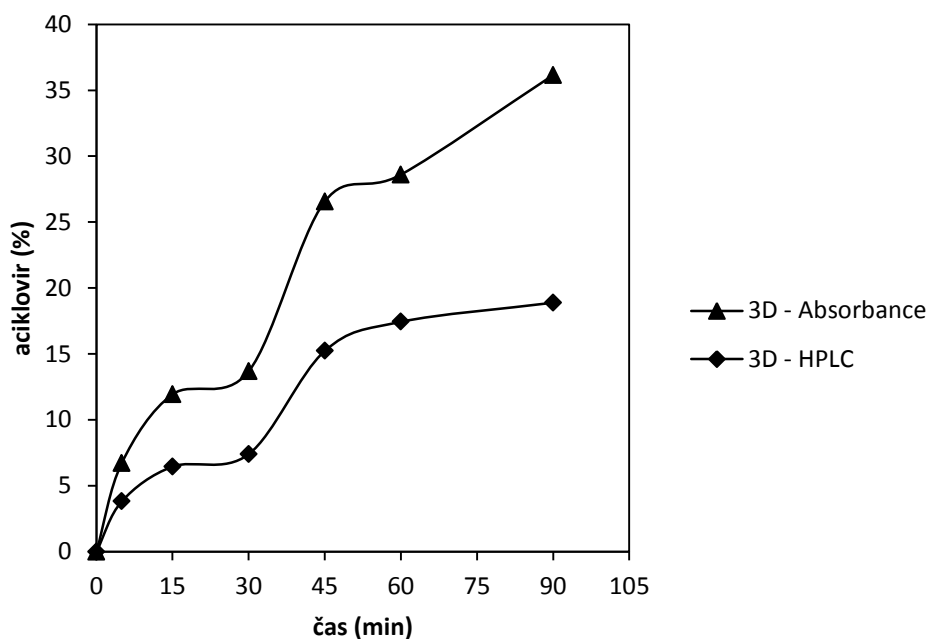
Množství uvolněného acikloviru bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 256 nm. Současně u matric s vyšším podílem polyesterového nosiče (60%, 70%) bylo provedeno stanovení metodou HPLC ve spolupráci s PharmDr. Petrem Kastnerem, Ph.D. z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Při porovnání výsledků obou metod bylo zjištěno, že množství uvolněného acikloviru, které bylo vypočtené na základě hodnot naměřených absorbancí, se neshoduje s hodnotami uvolněného množství acikloviru, které bylo naměřeno pomocí metody HPLC. Hodnoty naměřené metodou HPLC jsou vždy nižší než hodnoty vypočtené na základě naměřené absorbance. Nicméně průběh liberace acikloviru, daný

tvarem disolučních křivek, je víceméně shodný (Obr. 25-27). Z toho lze usuzovat, že při měření absorbancí, bylo stanovení rušeno nějakou jinou látkou, která absorbovala při podobné vlnové délce jako aciklovir. Může se jednat o produkty degradace polyesteru nebo ethylpyruvát. Teoreticky by rušivý vliv mohl být eliminován měřením absorbance proti disoluční tekutině z placebo matrice bez acikloviru. Ovšem v praxi se tato metoda neosvědčila.

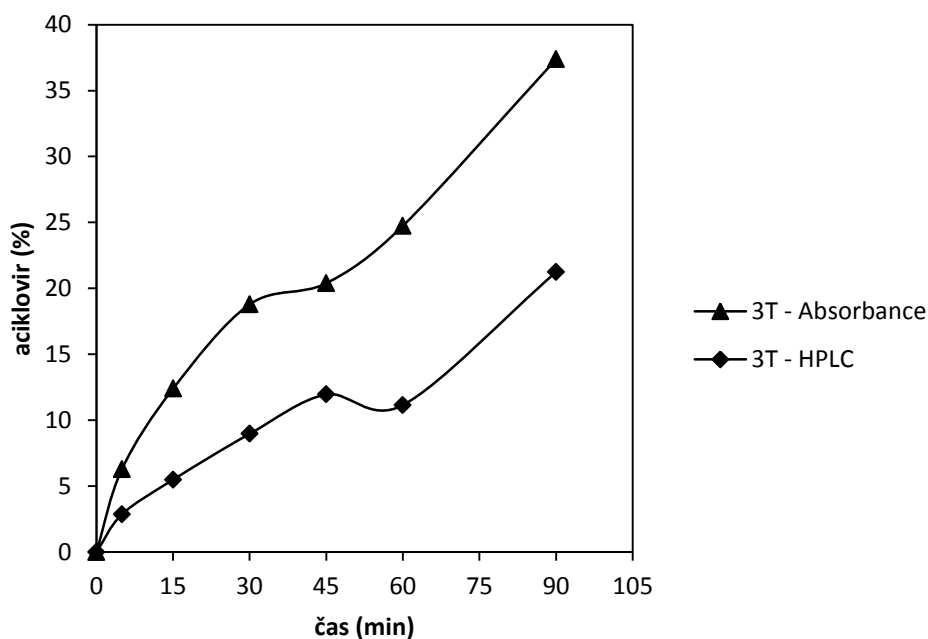
Obr. 25: Liberace acikloviru z polyesteru 3M plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu



Obr. 26: Liberace acikloviru z polyesteru 3D plastifikovaného 27,5 % ethylpyruvátu



Obr. 27: Liberace acikloviru z polyesteru 3T plastifikovaného 37 % ethylpyruvátu

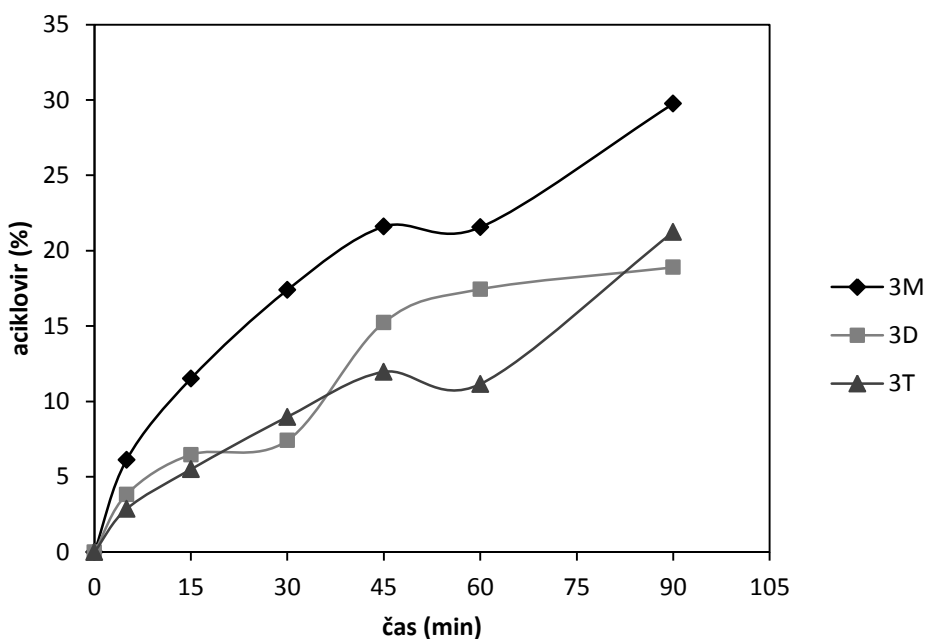


Na Obr. 28 je znázorněn průběh liberace acikloviru z matric 3M, 3D a 3T dle výsledků z HPLC. Z matrice 3M bylo v 15. minutě uvolněno 12% acikloviru, poté se aciklovir uvolňoval téměř lineárně do 45. minuty, kde došlo ke zpomalení liberace. Na konci testu v 90. minutě bylo uvolněno 30 % acikloviru. Z matrice 3D se po 15 minutách uvolnilo 6% acikloviru, mezi 15. a 30. minutou došlo ke zpomalení. Výraznější liberace probíhala mezi 30. a 45. minutou, ve 45. minutě bylo uvolněno

15 % acikloviru, poté došlo opět ke zpomalení liberace. Na konci testu v 90. minutě bylo uvolněno 19% acikloviru. Z matrice 3T se po 15. minutách uvolnila 3% acikloviru, do 45. minuty probíhala liberace téměř lineárně. Po 90. minutách testu bylo uvolněno 21% acikloviru.

Z Obr. 28 je patrné, že tvar disolučních křivek u matrice tvořené polyesterem 3M a 3T je víceméně shodný. Liberace probíhá ve dvou fázích, do 45. minuty probíhá liberace acikloviru téměř lineárně, mezi 45. a 60. minutou dochází ke zpomalení a mezi 60. a 90. minutou je liberace opět výraznější. Disoluční křivka u matrice tvořené polyesterem 3D má průběh jiný. V jejím průběhu dochází ke zpomalení liberace acikloviru dvakrát, mezi 15. a 30. minutou a ve 45. minutě.

Obr. 28: Liberace acikloviru z matric 3M, 3D, 3T stanovená metodou HPLC



Adhezivita polyesterů byla studována na základě disoluce acikloviru z matric aplikovaných na hydratovaný mucin. Uvolňování acikloviru z polyesterové matrice se odvíjí od typu použitého polyesteru a jeho charakteristik. Na základě liberace acikloviru je patrné, že polyester 3M s molární hmotností $M_w = 3800$ g/mol vykazoval k mucinu nižší adhezi, uvolňoval se z mucinu rychleji než polyester 3D a 3T. Polyester 3T vykazoval největší adhezivitu. Polyester 3T byl v matrici zastoupen v nižší koncentraci než polyester 3M a 3D, proto nelze adhezivitu úplně přesně porovnat s polyester 3M a 3D.

9.3 Viskozita polyesterových matric

Byla měřena viskozita u matric s vyšším podílem polyesterového nosiče. (Tab. 4) pomocí rotačního reometru Kinexus. Pro měření viskozity byl nastaven rychlostní spád v rozsahu $0,1 \text{ s}^{-1}$ až $40,0 \text{ s}^{-1}$. Byly získány hodnoty posuvného napětí. (Tab. 14. – 16.) U matrice tvořené polyesterem 3M byly získány hodnoty posuvného napětí od 1 do 96 Pa. U matrice tvořené polyesterem 3D byly získány hodnoty posuvného napětí od 2 do 189 Pa. U matrice tvořené polyesterem 3T byly získány hodnoty posuvného napětí od 1 do 75 Pa. Přestože u matrice tvořené polyesterem 3M byl zaznamenán v průběhu měření nepatrný pokles viskozity z hodnoty $12,34 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ na $9,6 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ a u matric tvořených polyesterem 3D a 3T byla zaznamenána tendence poklesu viskozity, ale ne v celém rozsahu rychlostního spádu, lze vypočítat průměrnou hodnotu viskozity, neboť rozdíly hodnot jsou malé. Průměrná hodnota viskozity byla u matrice tvořené polyesterem 3M $11 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, 3D $21 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ a 3T $9,5 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. Byly sestrojeny reogramy (Obr. 23). Z jejich průběhu vyplývá, že matrice tvořené polyesterem a ethylpyruvátém ve funkci plastifikátoru jsou newtonské soustavy. Hodnoty dynamické viskozity nejsou závislé na rychlostním spádu, jsou konstantní (resp. s minimálními změnami).

10 ZÁVĚRY

Z experimentu, provedeného v rámci předložené rigorózní práce, je možno učinit následující závěry.

1. Liberace acikloviru z polyesterových matric probíhala ve třech fázích; fáze pozvolného uvolňování acikloviru, fáze zpomalení, ke které došlo v závislosti na typu polyesterového nosiče v intervalu 15 min nebo 45 min od začátku disolučního testu a fáze zrychlení liberace.
2. Po aplikaci matric na modelový mukózní substrát se během disolučního testu probíhajícího 90 min uvolnilo 20 % až 30 % inkorporovaného léčiva.
3. Zvýšením podílu polyesteru v matrici došlo ke zpomalení liberace acikloviru.
4. Spektrofotometricky byly zjištěny vyšší hodnoty množství uvolněného acikloviru než metodou HPLC. Při měření absorbancí bylo stanovení rušeno jinou látkou, která absorbovala při podobné vlnové délce jako aciklovir. Tvar disolučních křivek je však pozoruhodně shodný.
5. Reotropní matrice tvořené polyesterovým nosičem, plastifikátorem a léčivem jsou newtonské soustavy s viskozitou od 9 Pa·s do 21 Pa·s dle typu nosiče. Nezávislost viskozity na rychlostním spádu se jeví jako výhodná při zpracování a aplikaci matric. Požadovaného snížení viskozity lze dosáhnout volbou vhodné koncentrace plastifikátoru. Současně s tím ovšem dochází k ovlivnění mukoadhezivity a liberace inkorporovaného léčiva.

11 SEZNAM LITERATURY

-
- ¹ DVOŘÁČKOVÁ, Kateřina, Tereza BAUTZOVÁ, Miloslava RABIŠKOVÁ. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. *Chemické Listy*. 2011, vol. 105, s. 50-54. ISSN 0009-2770.
- ² KOTLA, Niranjana Goud, Monica GULATI, Sachin Kumar SINGH, Ashwini SHIVAPOOJA. Facts, fallacies and future of dissolution testing of polysaccharide based colon-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release*. March 2014, vol. 178, no. 1, s. 55 – 62. ISSN 0168-3659.
- ³ LÍBENKOVÁ, Marie. *Testování bioadheze sprejově aplikovaných roztoků větvených oligoesterů*. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.
- ⁴ RABIŠKOVÁ, Miloslava, Pavel KOMÁREK a kol. *Technologie léků*. Třetí vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-423-7.
- ⁵ PHILLIPS, Daniel J., Samuel R. PYGALL, V. Brett COOPER, a James C. MANN. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*. November 2012, vol. 64, no. 11, s. 1549–1559. ISSN 2042-7158.
- ⁶ Ministerstvo zdravotnictví ČR. *Český lékopis 2009 - Doplněk 2012*. První vydání. Praha: Grada Publishing a.s., 2012. ISBN: 978-80-247-4242-7.
- ⁷ GARBACZ, Grzegorz, Bartosz KOŁODZIEJ, Mirko KOZIOLEK, Werner WEITSCHIES, a Sandra KLEIN. A dynamic system for the simulation of fasting luminal pH-gradients using hydrogen carbonate buffers for dissolution testing of ionisable compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. January 2014, vol. 51, s. 224 – 231. ISSN 0928-0987.
- ⁸ MARQUES, Margareth. Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States. *Dissolution Technologies*. May 2004, vol. 11, no. 2, s. 16. ISSN 1521-298X.
- ⁹ JANTRATID, Ekarat, a Jennifer DRESSMAN. Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. *Dissolution Technologies*. August 2009, vol. 16, no. 3, s. 21 – 25. ISSN 1521-298X.
- ¹⁰ DOKOUMETZIDIS, Aristides, Panos MACHERAS. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System.

International Journal of Pharmaceutics. September 2006, vol. 321, no. 1-2, s. 1 – 11. ISSN 0378-5173.

¹¹ ARNDT, Marcel, Hitesh CHOKSHI, Kin TANG, Neil J. PARROTT, Christos REPPAS, a Jennifer B. DRESSMAN. Dissolution media simulating the proximal canine gastrointestinal tract in the fasted state. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. August 2013, vol. 84, no. 3, s. 633 – 641. ISSN 0939-6411.

¹² WANG, Qingxi, Nikoletta FOTAKI, and Yun MAO. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development. *Dissolution Technologies*. August 2009, vol. 16, no. 3, s. 6 – 12. ISSN 1521-298X.

¹³ DRESSMAN, J. B.; C. REPPAS. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. October 2000, vol. 11, no. 2, s. 73 – 80. ISSN 0928-0987.

¹⁴ SIEVERT, Martin, Jennifer DRESSMAN, Cynthia BROWN, Vinod SHAH. FIP/AAPS Guidelines for Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. *Dissolution Technologies*. February 2003, vol. 10, no. 1, s. 6 - 15. ISSN 1521-298X.

¹⁵ UDDIN, Riaz, Nadia SAFOON, a Kumar Bishwajit SUTRADHAR. Dissolution and Dissolution Apparatus: A Review. *International Journal of Current Biomedical and Pharmaceutical Research*. 2011, vol. 1, no. 4, s. 201 – 207. ISSN 2231 – 6264.

¹⁶ SHAH, Vinod P., Martin SIEWERT, Jennifer DRESSMAN, Helga MOELLER, a Cynthia K. BROWN. Dissolution/In Vitro Release Testing of Special Dosage Forms. *Dissolution Technologies*. February 2002, vol. 9, no. 1, s. 1 – 5. ISSN 1521-298X.

¹⁷ KLANCKE James. Dissolution Testing of Orally Disintegrating Tablets. *Dissolution Technologies*. May 2003, vol. 10, no. 2, s. 6 – 8. ISSN 1521-298X.

¹⁸ AZARMI, Shirzad, Wilson ROA, and Raimar LÖBENBERG. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*. Januar 2007, vol. 328, no. 1, s. 12 – 21. ISSN 0378-5173.

¹⁹ HANSON, Royal. A Primer on Release-Rate Testing of Semisolids. *Dissolution Technologies*. November 2010, vol. 17, no. 4, s. 33 - 35. ISSN 1521-298X.

²⁰ CRIST, G. Bryan. *Dissolution Theory, Methodology, And Testing*. First edition. Hockessin: Allen Press, 2007. ISBN 0-9761519-1-X.

²¹ MAY, Sabine, Birte JENSEN, Markus WOLKENHAUER, Marc SCHNEIDER, a Claus Michael LEHR. Dissolution Techniques for In Vitro Testing of Dry Powders for

Inhalation. *Pharmaceutical Research*. August 2012, vol. 29, no. 8, s. 2157 – 2166. ISSN 0724-8741.

²² DAVIES, N.M., M.I. FEDDAH. A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products. *International Journal of Pharmaceutics* . April 2003, vol. 255, no. 1-2, s. 175–187. ISSN 0378-5173.

²³ SON, Yoen-Ju, Michelle HORNG, Mark COPLEY, and Jason T. McCONVILLE. Optimization of an In Vitro Dissolution Test Method for Inhalation Formulations. *Dissolution Technologies*. May 2010, vol. 17, no. 2, s. 6 – 13. ISSN 1521-298X.

²⁴ WANG, Qingxi, Decheng MA, a John P. HIGGINS. Analytical Method Selection for Drug Product Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. August 2006, vol. 13, no. 3, s. 6 – 13. ISSN 1521-298X.

²⁵ MARIAPPAN, T.T., Baljinder SINGH, a Saranjit SINGH. A Validated Reversed-Phase (C₁₈) HPLC Method for Simultaneous Determination of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide in USP Dissolution Medium and Simulated Gastric Fluid. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. August 2000, vol. 6, no. 8, s. 345–349. ISSN 2042-7158.

²⁶ HARTL, Jiří, Martin DOLEŽAL, Miroslav MILETÍN, Veronika OPLETALOVÁ. *Farmaceutická chemie IV*. 2. vydání. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 9788024621296.

²⁷ KLIMEŠ, Jiří a kolektiv. *Kontrolně – analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. 1. vydání. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 978-80-87009-29-1.

²⁸ Wikimedia commons [online]. [vid. 29. ledna 2014]. Dostupné z <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aciclovir.svg>

²⁹ LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR, Martin WEHLING. *Farmakologie a toxikologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 2009. ISBN 80-247-0836-1.

³⁰ HELAGO-CZ s.r.o. [online]. [vid. 27. února 2014]. Dostupné z <http://www.helago-cz.cz/product/gfl-1083-trepaci-vodni-lazen/>

³¹ AdMaS [online]. [vid. 20. února 2014]. Dostupné z <http://www.admas.eu/pressd.php?id=2>

³² Anamet s.r.o. [online]. [vid. 20. února 2014]. Dostupné z http://www.anamet.cz/vyrobci_a_techniky/malvern