

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

*Katedra farmaceutické technologie*

TUHÉ DISPERZE S TERBINAFINEM

Diplomová práce

*Hradec Králové 2017*

*Nikola Hluchníková*

„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.“

Chtěla bych poděkovat PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za cenné rady a odborné vedení. Dále mé poděkování patří Mgr. Kateřině Kučerové a Ing. Martinu Drastíkovi, Ph.D. za stanovení terbinafinu metodou HPLC.

Nikola Hluchníková

# 1 OBSAH

<b>1</b>	<b>OBSAH.....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>ZADÁNÍ.....</b>	<b>7</b>
<b>5</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>6</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
6.1	ZVÝŠENÍ BIODOSTUPNOSTI TĚŽCE ROZPUSTNÝCH LÉČIVÝCH LÁTEK .....	9
6.1.1	<i>Modifikace léčivé látky.....</i>	10
6.2	SPECIÁLNÍ TECHNOLOGICKÉ POSTUPY UŽÍVANÉ PRO ZVÝŠENÍ ROZPUSTNOSTI LÉČIVÉ LÁTKY .....	11
6.3	UVOLŇOVÁNÍ LÉČIV Z TUHÉ DISPERZE .....	13
6.4	POLYMERY JAKO NOSIČE LÉČIVÝCH LÁTEK.....	14
6.5	TERBINAFIN .....	17
6.6	DIFERENCIÁLNÍ SKENOVACÍ KALORIMETRIE .....	19
6.6.1	<i>Příprava vzorku k analýze pomocí DSC .....</i>	19
6.6.2	<i>Vlastní měření .....</i>	20
6.6.3	<i>Skelný přechod .....</i>	20
6.6.4	<i>Teplota tání.....</i>	21
<b>7</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>22</b>
7.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	22
7.2	POUŽITÉ SUROVINY .....	22
7.3	PŘÍPRAVA BAZE TERBINAFINU .....	23
7.4	PŘÍPRAVA TUHÝCH DISPERZÍ.....	23
7.5	PŘÍPRAVA TLUMIVÉHO FOSFOREČNANOVÉHO ROZTOKU PH 5,5 .....	24
7.6	PŘÍPRAVA TLUMIVÉHO FOSFÁTOVÉHO ROZTOKU PH 7,4.....	24
7.7	KALIBRAČNÍ PŘÍMKA TERBINAFINU BAZE A TERBINAFINU HYDROCHLORIDU .....	25
7.8	PRŮBĚH DISOLUČNÍCH TESTŮ .....	27
7.9	STANOVENÍ MNOŽSTVÍ UVOLNĚNÉHO LÉČIVA.....	28
7.10	TERMICKÁ ANALÝZA.....	28
7.10.1	<i>Příprava vzorků.....</i>	28
7.10.2	<i>Měření na DSC.....</i>	28
7.10.3	<i>Vyhodnocení výsledků měření.....</i>	30
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>31</b>

8.1	DISOLUČNÍ TEST .....	31
8.2	TERMICKÁ ANALÝZA .....	41
<b>9</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
9.1	LIBERACE LÉČIV Z POLYMERU .....	45
9.2	TERMICKÁ ANALÝZA .....	46
<b>10</b>	<b>ZÁVĚRY.....</b>	<b>48</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>49</b>

## 2 ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické technologie

Jméno a příjmení: Nikola Hluchníková

Název diplomové práce: Tuhé disperze s terbinafinem

Školitel: PharmDr. Eva Šnejdrová, PhD.

Předložená diplomová práce se zabývá uvolňováním terbinafinu baze a terbinafinu hydrochloridu z degradabilního nosiče ve třech různých prostředích. Nosičem byl polyester kyseliny mléčné a glykolové větvený na kyselině polyakrylové. Teoretická část je zaměřena na popis vlastností léčivé látky a větveného polyesteru, zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných látek, druhy polymerních nosičů a uvolňování léčiv z tuhých disperzí, termickou analýzou polymeru, léčiv a matric s inkorporovaným léčivem. V experimentální části byly připraveny tuhé disperze metodou tavení, studována disoluce léčiva do vody, fosfátového pufru pH 5,5 a pH 7,4. Množství uvolněného léčiva bylo stanoveno spektrofotometricky při 223 nm a metodou HPLC. Byla provedena termická analýza polyesterových nosičů a tuhých disperzí metodou DSC. Z výsledku lze konstatovat, že množství uvolněného léčiva bylo ovlivněno pH prostředí. Prolongovaná liberace terbinafinu hydrochloridu probíhá v prostředí fosfátového roztoku pH 7,4. U terbinafinu baze to bylo prostředí fosforečnanového tlumivého roztoku pH 5,5. Nejrychleji se terbinafin hydrochlorid uvolnil do vody, terbinafin baze do fosfátového tlumivého roztoku. Termická analýza prokázala zvýšení teploty skelného přechodu polymeru vlivem léčivé látky. Obě formy terbinafinu byly v polyesteru rozpuštěny.

**Klíčová slova:** tuhé disperze, terbinafin, větvené polyestery, disoluce, DSC

### 3 ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical technology

Name of the student: Nikola Hluchníková

Title of diploma thesis: Solid dispersions with terbinafine

Consultant: PharmDr. Eva Šnejdrová, PhD.

The diploma thesis deals with the release of terbinafine base and terbinafine hydrochloride from degradable carrier in three different mediums. The carrier was polyester of lactic acid and glycolic acid branched on polyacrylic acid. The theoretical part is focused on the description of properties of drug substance and branched polyester, the bioavailability of poor soluble substances, the types of polymeric carriers and the release of drugs from solid dispersions, the thermal analysis of polymer, drug and the solid dispersion with the incorporated drug. In the experimental part, solid dispersions were prepared by the melting method, dissolution of the drug in water, phosphate buffer pH 5.5 and pH 7.4 were studied. The amount of released drug was determined spectrophotometrically at 223 nm and HPLC. A thermal analysis of polyester carriers and solid dispersions was performed by the DSC. The amount of drug released was affected by the pH of the environment. Prolonged release of terbinafine hydrochloride is carried out in a pH 7.4 phosphate solution. In case of terbinafine base in phosphate buffered saline pH 5.5. The release of terbinafine hydrochloride was the fastest in water, the terbinafine base in phosphate buffer. Thermal analysis showed an increase in the glass transition temperature of the polymer due to the drug incorporation. Both forms of terbinafine were dissolved in the polyester.

**Key words:** solid dispersions, terbinafine, branched polyesters, dissolution, DSC.

## 4 ZADÁNÍ

Zadáním diplomové práce je studium uvolňování terbinafinu hydrochloridu a terbinafinu baze z polymeru kyseliny mléčné a glykolové větveného kyselinou polyakrylovou, do prostředí o různém pH a termická charakterizace tuhých disperzí.

Následující body shrnují úkol práce:

1. Připravit tuhé disperze metodou tavení bez použití plastifikátoru.
2. Jako nosič použít polyester kyseliny mléčné a glykolové, větvený 4 % kyseliny polyakrylové.
3. Tuhé disperze o hmotnosti 200,0 mg s 5 % obsahem léčivé látky podrobit disolučnímu testu ve vodě, fosforečnanovém tlumivém roztoku pH 5,5 a fosfátovém tlumivém roztoku pH 7,4 při teplotě 37 °C.
4. Koncentraci uvolněného léčiva stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 223 nm a metodou HPLC.
5. Provést termickou analýzu tuhých disperzí a polyesterových nosičů a určit vliv léčivých látek na termické vlastnosti tuhých disperzí.
6. Vyhodnotit výsledky a jejich přínos pro další výzkum.

## 5 ÚVOD

Problematikou disoluce léčivých látek se v dnešní době zabývá mnoho vědeckých týmů po celém světě. Výsledky nám umožňují optimalizovat léčivý přípravek a podmínky pro uvolnění požadované koncentrace léčivé látky na správném místě lidského či zvířecího organismu. Cílem disolučních studií je získat informace o chování léčivého přípravku při použití v humánní a veterinární medicíně.

Polymery, které jsou používány jako nosiče léčiv, by měly být biodegradabilní a biokompatibilní, aby se po jejich aplikaci nerozvinula nežádoucí reakce organismu, v podobě zánětu, infekce či v neposlední řadě život ohrožujícího anafylaktického šoku. Základními jednotkami těchto polymerů by tedy měly být látky tělu vlastní, respektive biologicky odbouratelné materiály přírodního nebo syntetického původu, které jsou degradovány *in vivo*, a to buď enzymaticky, neenzymaticky nebo kombinací těchto způsobů.

Téma předložené diplomové práce navazuje na práce obhájené na katedře farmaceutické technologie v předešlých letech, kde byl použit jako polymerní nosič lineární kopolymer kyseliny DL- mléčné a kyseliny glykolové nebo terpolymer kyseliny DL- mléčné a kyseliny glykolové větvený na tripentaerythritolu. Do těchto nosičů byl inkorporován flukonazol nebo aciklovir. <sup>(1)</sup>



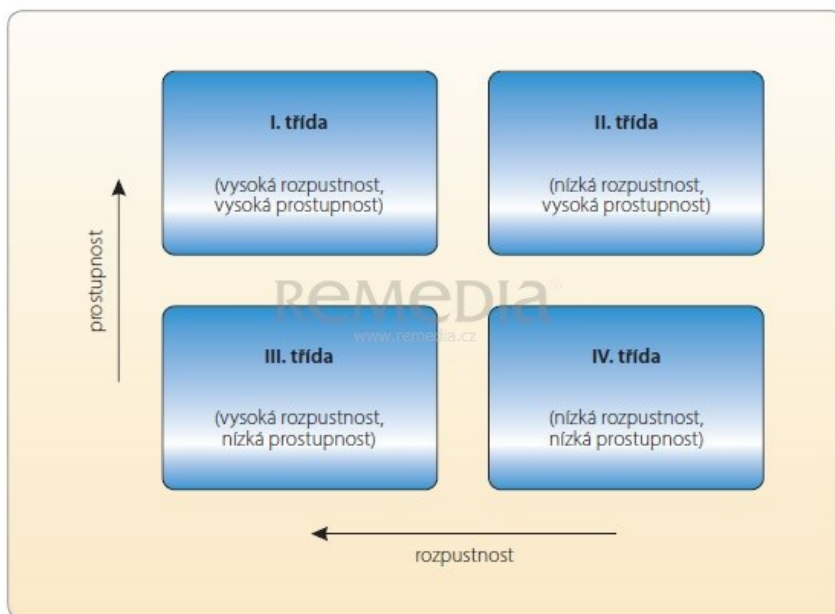
## 6 TEORETICKÁ ČÁST

### 6.1 Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek

Za těžce rozpustná jsou dle lékopisu považována léčiva, kdy je potřeba k rozpuštění 1 g této látky nejméně 100–1000 ml rozpouštědla. Rozpustnost terbinafinu je přibližně 5,32 µg/ml, což znamená, že tuto léčivou látku řadíme mezi prakticky nerozpustné. <sup>(2)</sup> Z těchto údajů vyplývá, že pro dosažení potřebné koncentrace po perorální aplikaci <sup>(3)</sup> je nutné buďto modifikovat léčivou látku nebo připravit speciální lékové formy. Právě vývojem lékových forem a speciálními technologickými postupy se zabývá mnoho vědeckých týmů po celém světě, jelikož většinu nově objevených léčiv řadíme do kategorie těžce rozpustných, případně je snaha o cílenou distribuci léčiv do postižené tkáně. <sup>(4)</sup>

Podle rozpustnosti ve vodném prostředí a intestinální permeability se člení léčiva do čtyř tříd. Jedná se o biofarmaceutický klasifikační systém. Toto rozdělení je uvedeno na obr. 1 Za vysoce rozpustné je považováno léčivo, jehož maximální terapeutická dávka se rozpustí ve 250 ml vodného pufru (pH 1-8) a vysoce vstřebatelné je tehdy, pokud dojde k absorpci nejméně 90 % podané dávky z gastrointestinálního traktu. <sup>(3)</sup>

Obr. 1 Biofarmaceutický klasifikační systém



### 6.1.1 Modifikace léčivé látky

Modifikace léčivé látky lze rozdělit na chemické a fyzikální.

Chemické úpravy zahrnují například tvorbu *solí*, jejichž rozpustnost je ovlivněna hodnotou pH. Proto lze připravit lékové formy, ze kterých je léčivá látka uvolňována v různých částech trávicího traktu - v kyselém prostředí žaludku, či zásaditém prostředí tenkého střeva. <sup>(5)</sup> Další chemickou modifikací představují *hydráty*, v jejichž molekule je obsažena voda. Mohou se objevit výrazné rozdíly v rychlosti rozpuštění hydrátu a bezvodé formy, příkladem je makrolidové antibiotikum erytromycin. <sup>(6)</sup> Modernější úpravu představují *kokrystaly*, kdy si léčivá látka zachovává svou chemickou identitu, ale své vlastnosti změní v pevné fázi. Zde si jako příklad můžeme uvést kokrystal antiepileptika karbamazepinu se sacharinem v poměru 1:1. <sup>(4)</sup> V neposlední řadě sem můžeme zařadit *proléčiva*, což jsou molekuly, které jsou *in vivo* enzymaticky či chemicky změněny na vlastní aktivní látku. Z celkového množství celosvětově používaných léčiv tvoří proléčiva asi 5-7 %. <sup>(7)</sup>

Dále lze biodostupnost zvýšit správně zvoleným postupem přípravy léčivého přípravku. Tyto postupy lze souhrnně nazvat jako fyzikální úpravy a zahrnují např. *řízenou krystalizaci*, při které lze vlivem správně zvoleného tlaku, teploty a rozpouštědla získat krystaly pravidelného tvaru a velikosti. Požadované velikosti krystalů dosáhneme za pomoci *sonokrystalizace*, při které je používán ultrazvuk o frekvenci 20-100 kHz. Tímto způsobem jsou připravována některá antiastmatika, následně podávána inhalačně ve formě aerodisperze. Další fyzikální úpravu představuje *lyofilizace* neboli mrazové sušení. Při tomto procesu dochází k odpařování rozpouštědla ve vakuu a léčivá látka si zachovává speciální pórovitou strukturu. Novější přístupy zahrnují sprejové *sušení*, *mikronizace*, *kryogenní mletí* apod. <sup>(4)</sup>

## 6.2 Speciální technologické postupy užívané pro zvýšení rozpustnosti léčivé látky

Mezi speciální technologické postupy pro zvýšení rozpustnosti těžce rozpustných léčiv lze zahrnout tzv. *zprostředkované rozpouštění*, při kterém je k léčivé látce přidáno vhodné tenzid. Mezi používané tenzidy můžeme zařadit kationaktivní cetyltrimethylammonium-bromid, anionaktivní laurylsulfát sodný a neionogenní poly (oxyethylen) sorbitanmonooleát (Tween 80). Mechanismus účinku je snížení povrchového napětí. Jako solubilizéry se používají látky s vysokou hodnotou HLB.

Tato hodnota určuje hydrofilně lipofilní rovnováhu, která udává poměr vlivu hydrofilní a lipofilní části molekuly smáčedla na její vlastnosti. Je úměrná poměru rozpustnosti smáčedla ve vodné a olejové fázi. <sup>(8)</sup>

Tab. 1 Hodnoty hydrofilně-lipofilní rovnováhy látek a jejich použití. <sup>(9)</sup>

HLB	Použití
0-3	Protipěňivé přísady
4-6	Emulgátor voda/olej
7-9	Smáčedlo
8-18	Emulgátor olej/voda
13-15	Detergent
10-18	Solubilizátor

Dále lze mezi speciální technologické postupy zařadit *tvorbu komplexů*. Typickým příkladem je využití cyklodextrinu, což je ve vodě rozpustný, cyklický oligopolymer složený ze 6-8 jednotek D-glukosy vzájemně spojených  $\alpha$  (1,4) vazbami. Kromě zvýšení rozpustnosti hydrofobní léčivé látky zvyšují také její stabilitu a biodostupnost.

Vzájemným uspořádáním jednotek D-glukosy dochází ke vzniku hydrofobní dutiny, do které je inkorporováno léčivo.

Se zvyšujícím se počtem základních jednotek cyklodextrinu se zvětšuje i velikost dutiny, což umožňuje umístění větší molekuly léčiva. <sup>(10)</sup>

Obr. 2 Tvorba hydrofobní dutiny s využitím cyklodextrinu <sup>(10)</sup>



Komplexy mohou vznikat také spojením léčivé látky s dvojjaznými či trojjaznými ionty. Ačkoli je všeobecně známo, že *chelatace* ve většině případů vede ke snížení rozpustnosti a biodostupnosti léčivé látky, existují i výjimky. Například makrolidové antibiotikum azithromycin vykazuje ve spojení s bivalentními ionty zvýšenou účinnost proti bakteriím. <sup>(11)</sup>

Dále lze změnit rozpustnost léčiv přípravou gastrorezistentní lékové formy. Tímto způsobem jsou upraveny látky acidolabilní, např. ketoprofen. Ketoprofen je tedy upraven do podoby mikrosfér za použití acidorezistentních polymerů. Jako neúčinnější se jeví akrylové deriváty (Eudragit L a S), dále pak deriváty celulosy. Mikrosféry s léčivem přechází ze žaludku do tenkého střeva, kde dojde k jejich uvolnění. <sup>(13)</sup>

V neposlední řadě je nutné zmínit přípravu *tuhých disperzí*. Tuhé disperze jsou připravovány tavením nebo odpařováním rozpouštědla. Mezi používané tuhé disperze lze zařadit karbamazepin v polyvinylpyrolidinu <sup>(14)</sup>, norfloxacin v polyethylenglykolu <sup>(15)</sup> či takrolimus v hydroxymethylpropylcelulose. <sup>(16)</sup>

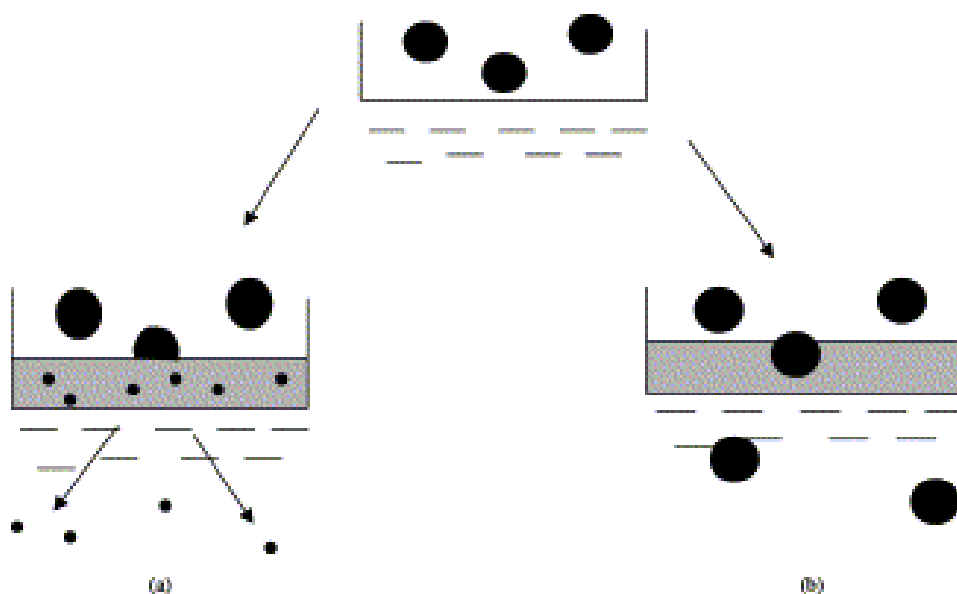
### 6.3 Uvolňování léčiv z tuhé disperze

Pro vysvětlení uvolňování léčiva z tuhé disperze existují dva základní mechanismy:

– částice léčiva difundují do vrstvy nasycené polymerem, zde dochází k jejich rozpuštění a následnému uvolnění do média. (a). V tomto případě hovoříme o nosičem řízeném uvolňování.

Jestliže je léčivo v polymeru nerozpustné, tak je uvolnění do média ovlivněno jeho chemickými, fyzikálními vlastnostmi a velikostí částic (b). Jedná se tedy o léčivem řízené uvolňování. <sup>(22)</sup>

Obr. 3 Uvolňování léčiva z pevné disperze <sup>(16)</sup>



Uvolňování léčiva je ovlivněno vlastnostmi polymeru i léčivé látky. Proto je důležitá již samotná příprava obou látek, s cílem získat malé částice a snížení rizika aglomerace. Těchto vlastností by mělo být dosaženo společně. Redukce velikosti částic je předpokladem pro úspěšnou přípravu eutektické směsi nebo tuhé disperze. Některé nosiče používané při tvorbě tuhých disperzí vykazují smáčecí vlastnosti, což vede ke snížení rizika aglomerace, a tudíž ke zvětšení povrchu.

Svou roli při uvolňování léčiva z nosiče hrají vlastnosti obou těchto látek. Je známo, že mnoho používaných nosičů může zvýšit rozpustnost léčiva. Ačkoliv při koncentracích polymeru použitých při pokusech in vitro se jedná pouze o nepatrné zvýšení rozpustnosti.

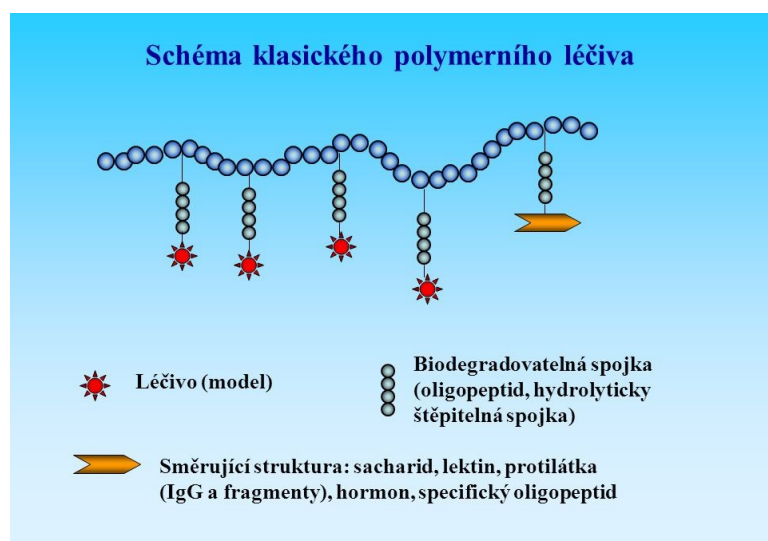
Některé polymery vytváří v kombinaci s léčivem rozpustný komplex, jako příklad lze uvést komplexy s cyklodextrinem. V neposlední řadě dochází při vzniku tuhé disperze k ovlivnění fyzikálních vlastností léčiva, jako je stupeň krystalinity a polymorfismus. <sup>(18)</sup>

## 6.4 Polymery jako nosiče léčivých látek

Biomateriály používané k transportu léčiv můžeme rozdělit do těchto základních skupin: *syntetické biodegradabilní polymery*-relativně hydrofobní materiály, jako jsou  $\alpha$ -hydroxy kyseliny, např. poly (laktidy-*co*-glykolidy), konvenčně označovány jako PLGA polyanhydridy a další. Druhou skupinu tvoří *přirozeně se vyskytující polymery*-složené cukry, např. hyaluronan, chitosan a anorganické látky, např. hydroxyapatit. <sup>(19)</sup> Přednostně jsou používány biodegradabilní a resorbovatelné polymery, které zatěžují organismus jen minimálně, jelikož se rozloží na látky tělu vlastní, a proto následně dochází k jejich přirozenému vyloučení. Tyto látky jsou využívány jako moderní nosiče léčiv, které zajišťují dopravu léčiv na místo působení. „Ideální polymerní nosič“ by měl splňovat následující požadavky:

- V průběhu transportu vykazuje stabilitu
- V místě působení (např. nádorová buňka) dochází k řízenému uvolňování léčiva
- Polymer je poté z organismu eliminován nebo dochází k degradaci při liberaci léčivé látky

Obr. 4 Klasické polymerní léčivo <sup>(40)</sup>



Rozsáhlé využití má *kyselina polyakrylová*. Ta byla použita pro přípravu hydrogelu, který vznikl zesítním dextrinu a polyakrylové kyseliny, za použití N.N'-methylen bis (akrylamidu) jako zesít'ovadla. Tento hydrogel je citlivý na různé hodnoty pH a je biodegradabilní. Taktéž nevykazuje toxické chování vůči lidským mesenchymální buňkám.

Při in vitro testech se ukázalo, že hydrogel uvolňuje ciprofloxacin a ornidazol stabilně po dobu 3 měsíců. Proto se jeví jako slibný nosič obou léčiv pro řízené uvolňování. <sup>(20)</sup> Kyselina polyakrylová v kombinaci s chitosanem tvoří základ nanosfér, které slouží jako nosiče antracyklinového protinádorového antibiotika doxorubicinu. Byly připraveny duté nanosféry o velikosti 118 nm, se 4,3 % obsahem léčivé látky. Při in vitro testech se ukázalo, že doxorubicin byl kontinuálně uvolňován po dobu 10 dnů, a navíc tento komplex působil cytotoxicky na rakovinné buňky jater. U myši byly nanosféry s léčivem vychytány játry a udržovány vysoké hladiny. Dále byly ukládány také ve slezině a mozku. <sup>(16)</sup>

Při přípravě nanočástic s obsahem estradiolu byl použit *poly (laktid-co-glykolid)*, což je polymer získaný polykondenzací kyseliny DL-mléčné a kyseliny glykolové. Konvenčně je nazýván PLGA. Na tento polymer byly navázány molekuly estradiolu a následně použita metoda iontoforézy. Jedná se o druh elektroléčby využívající stejnosměrného proudu k vpravování léčivé látky v iontové formě do organismu. Díky této metodě došlo k vyšší propustnosti kůže jak ex vivo, tak in vivo., což vedlo ke zvýšení minerální hustoty spongiozní kosti u zvířecího modelu osteoporózy. <sup>(22)</sup>

Početnou skupinu tvoří přírodní polymery, především pak *polysacharidy*. Ty jsou složeny z monosacharidů nebo disacharidů vzájemně spojenými glykosidickými vazbami. Zdroje polysacharidů jsou: řasy-alginát, rostliny-pektin, guarová guma, mikroorganismy-dextran, xanthanová guma, zvířata-chitosan, chondroitin. Díky obsahu různých funkčních skupin (např. hydroxylová, amino, karboxylová či aldehydická) jsou ideální pro přípravu široké škály nanočástic.

Konkrétní příklady využití polysacharidů v praxi:

*Kyselina hyaluronová*-jedná se o lineární polysacharid, v jehož struktuře se střídají D- glukuronová kyselina a N-acetyl-D-glukosamin. Tento polymer byl použit pro cílenou distribuci paklitaxelu a doxorubicinu, které mají protinádorový účinek. Lékové nosiče potažené vrstvou kyseliny hyaluronové vykazovaly vyšší afinitu k nádorovým buňkám prsu, a především vynikající cytostatický účinek. <sup>(23)</sup>

*Dextran*-polysacharid syntetizován ze sacharózy bakteriemi mléčného kvašení, např. *Leuconostoc mesenteroides* a *Streptococcus mutans*. V přímém řetězci jsou molekuly glukosy spojeny  $\alpha$ -1,6 glykosidickými vazbami, zatímco větvení je navázáno  $\alpha$  1,3 vazbami. V jedné studii byl dextran použit jako nosič inzulínu. Přesněji byly připraveny polymersomy složené z amfifilních kopolymerů dextranu a poly (laktid-co-glykolidu), které byly použity pro enkapsulaci inzulínu. Výsledky ukázaly, že průměrná účinnost enkapsulovaného inzulínu byla >90 %. Experiment in vitro prokázal, že zatímco uvolnění inzulínu v žaludeční šťávě bylo zanedbatelné, většina inzulínu se uvolnila ve střevě. Navíc sekundární a terciární struktura byla srovnatelná se standardem inzulínu. Jedná se tedy o potenciální nosič pro orální aplikaci inzulínu. <sup>(24)</sup>

*Guarová guma*-polysacharid s velkou viskozitou, vyráběný z guarových bobů. Metodou radikálové polymerizace byly na síť hydrogelu složeného z guarové gumy a akrylové kyseliny napojeny řetězce polyanilinu. Tento hydrogel byl následně testován na antibakteriální aktivitu proti gram-pozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* a gram-negativní bakterii *Escherichia coli* a tato antibakteriální aktivita byla prokázána. <sup>(25)</sup>

Polymerní nosiče nám také umožňují způsoby aplikace, které doposud nebyly známé nebo nebyly používány. Jako příklad lze uvést nasální podání inaktivovaného viru chřipky, které představuje alternativní řešení pro běžnou vakcinaci. Pro tento účel se používá rozprašováním sušený, práškováný škrob v kombinaci se sesíťovanou kyselinou polyakrylovou. Na nosič je navázán teplem inaktivovaný virus chřipky. Mukozní aplikace je bezpečnější a vyvolává imunitní reakci prostřednictvím aktivace lymfoidní tkáně nacházející se ve sliznici (MALT-mucosal-associated lymphoid tissue). Může být aplikována i nelékařsky školeným personálem. Na druhé straně je absorpce po nasálním podání limitována mukozní vrstvou, mukociliární clearance a enzymatickou aktivitou. Právě použití polymerního nosiče vede ke zpomalení mukociliární clearance. <sup>(26)</sup>



## 6.5 Terbinafin

Terbinafin, jehož chemický název je (E)-N-(6,6-dimethyl-2-hepten-4-ynyl)-N-methyl-1-naftalenmetanamin hydrochlorid, je účinné antimykotikum patřící do třídy allylaminů se širokým spektrem účinku proti kvasinkám, dimorfním houbám, plísním a dermatofytům. <sup>(24)</sup> Inhibuje skvalenepoxidasu, která hraje hlavní roli při biosyntéze ergosterolu, který je důležitou součástí buněčné membrány hub. <sup>(25)</sup>

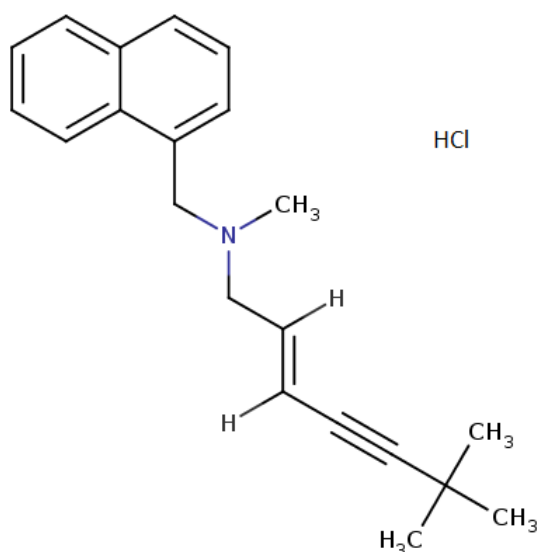
Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>ClN

Molekulová hmotnost: 327,896 g/mol

Teplota tání: 195-198 °C

Rozpustnost: rozpustný v metanolu, etanolu (30mg/ml), dimetylsulfoxidu (10mg/ml) <sup>(26)</sup>, ve vodě málo rozpustný (0,000738mg/ml) <sup>(27)</sup>

Obr. 5 Terbinafin hydrochlorid-strukturní vzorec <sup>(29)</sup>



Perorální aplikace je spojena s mnoha lékovými interakcemi, hepatotoxicitou, nízkou koncentrací léčiva v místě působení, gastrointestinálními a systémovými vedlejšími účinky. Lokální podání léku zvyšuje compliance pacientů, umožňuje okamžitý přístup léčiva k místu infekce a snižuje nežádoucí systémové účinky. <sup>(31)</sup>

Tab. 2 Přípravky s terbinafinem registrované SÚKL

Lamisil	Crm 30gmx10mg/gm I
	Crm 15gmx10mg/gm II
	Crm 7,5gm x 10mg/gm II
Lamisil 125 mg	Tbl nob 14x125 mg
Lamisil 1x kožní roztok 1%	Drm sol 1x4gm x 10 mg /gm
Lamisil 250 mg	Tbl nob 28x250 mg
	Tbl nob 14x250 mg
Lamisil sprej	Drm spr sol 1x30ml x 10 mg /gm
	Drm spr sol 1x15ml x 10 mg /gm
Terbinafin actavis 250 mg	Tbl nob 28x250 mg
	Tbl nob 10x250 mg
	Tbl nob 56x250 mg
Terbistad 1 % krém	Crm 1x15gm x10 mg /gm
	Crm 1x7,5gm x10 mg/ gm
Terfimed 250	Tbl nob 28x250 mg
	Tbl nob 14x250mg

Terbinafin se může vyskytovat také ve formě baze.

Sumární vzorec:  $C_{21}H_{25}N$

Molekulová hmotnost: 291,43

Rozpustnost: rozpustný v dimethylsulfoxidu ( $\geq 58$  mg/ml) při 25 °C, a v ethanolu ( $\geq 58$ mg/ml) při 25 °C <sup>(28)</sup>

## 6.6 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Metoda diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) nám umožňuje zkoumat chování látky při působení určité teploty. Jedná se o jednu z metod termické analýzy. Je využívána v mnoha oblastech, jako je například výzkum, vývoj a kontrola kvality. <sup>(29)</sup>

Zkoumaný vzorek může být podroben působení teplot širokého rozsahu a účinky tepla jsou rychle identifikovány a zpracovány. Obvyklý teplotní rozsah přístrojů je 100 až 600 °C, přičemž teplotu a rychlost ohřevu lze nastavit dle vlastní úvahy. Z naměřených hodnot lze zjistit tepelnou kapacitu, tepelný přechod, kinetické údaje, čistotu a teplotu skelného přechodu. Získané DSC křivky slouží k identifikaci látek, pro nastavení fázových diagramů a určení stupně krystalinity.

Principem této metody je udržení stejné teploty analyzovaného vzorku a standardu, jejichž zahřívání probíhá současně. Vzorky jsou umístěny vedle sebe. Pokud probíhá ve vzorku děj endotermní, je nutno k udržení stejné teploty obou látek, dodat energii do stanovovaného vzorku. Jestliže ve vzorku probíhá děj exotermní, dodává se energie do referenční látky. Díky rozdílům vlastností vzorků se bude lišit tepelný tok do jednotlivých nádob. Obecně lze říci, že pokud u vzorku probíhá exotermní reakce, snižuje se dodávka tepla do vzorku, což se projeví záporným píkem na grafu. Mezi exotermní děje lze zařadit krystalizaci a oxidaci. V opačném případě, při endotermickém procesu, se tepelný tok zvětšuje a pík na grafu je kladný. Jako příklad endotermického děje lze uvést tání, var, sublimaci, redukci, fázové přechody. <sup>(30)</sup>

### 6.6.1 Příprava vzorku k analýze pomocí DSC

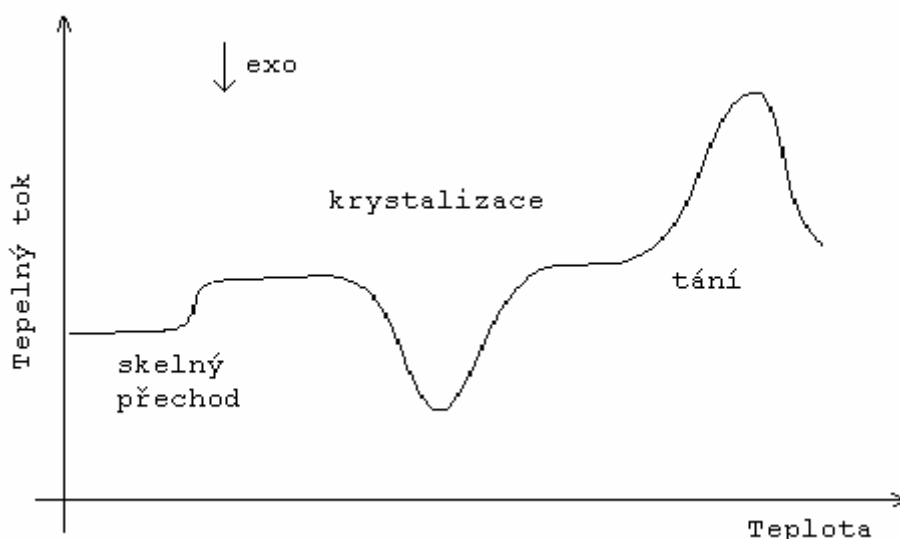
Analyzovaná látka se rozmělní na menší částice a za pomoci pinzety se vloží do hliníkového kelímku, který se následně zalisuje, aby nedošlo ke ztrátě vzorku. Prázdny kelímek se předem zváží na analytických vahách s přesností alespoň čtyři desetinná místa. Hmotnost vzorku se pohybuje v rozmezí 4 až 10 mg. K zalisování kelímku musí být použita přiměřená síla. Pokud by byla použita síla nadměrná, mohlo by dojít k deformaci kelímku i vzorku. Naopak při slabém přitlačení by mohlo dojít ke ztrátě víčka a vysypání vzorku. Připravený kelímek se vzorkem se ještě jednou zváží. <sup>(29)</sup>

### 6.6.2 Vlastní měření

Za pomoci pinzety se kelímeček se vzorkem vloží do měřicí cely, vedle něj se umístí kelímeček s referenční látkou. Ani jeden z kelímečků se nesmí dotýkat stěny cely, jinak by došlo ke zkreslení naměřených výsledků. V počítači se nastaví rozsah teplot pro měření a rychlost ohřívání. Po dokončení nastaveného měření se výsledky vyhodnotí.

Pokud se jedná o krystalické látky, na grafu se projeví vysoký pík značící teplotu tání. Jestliže analyzovaným vzorkem je látka amorfnní, na grafu se nachází mělký pík, který představuje teplotu skelného přechodu. <sup>(29)</sup>

Obr. 6 DSC křivka <sup>(33)</sup>



### 6.6.3 Skelný přechod

O skelném přechodu, respektive teplotě skelného přechodu ( $T_g$ ) hovoříme v souvislosti s amorfnními polymery. Každý polymer je charakterizován jinou teplotou skelného přechodu. Pokud se polymer nachází pod hranicí této teploty, stává se tvrdým a křehkým. Nad touto teplotou nabývá kaučukovité pružnosti. Při skelném přechodu se nemění jen mechanické vlastnosti, ale také tepelná kapacita, čehož se využívá právě při měření pomocí DSC. Dochází ke změně tepelného toku, což se v grafu projeví jako plynulý nárůst křivky. Vzhledem ke změně mechanických vlastností polymeru při teplotě skelného přechodu je tato teplota mezníkem použitelnosti dané látky. <sup>(31)</sup>

#### 6.6.4 Teplota tání

Obdobou teploty skelného přechodu je u krystalických látek teplota tání ( $T_m$ ). Dochází k rozpadu krystalické struktury a látka přechází z pevného skupenství do kapalného. Jedná se o děj, kdy látka spotřebovává energii. Kontinuální ohřev při DSC však zajistí konstantní teplotu vzorku. V grafu je teplota tání znázorněna výrazným píkem. U monodisperzních systému se nachází jeden pík, zatímco u polydisperzních systémů se vyskytuje více oblastí teplot tání. <sup>(30)</sup>

Rozlišují se dva typy DSC: s tepelným tokem (heat-flux) nebo s kompenzací příkonu

Analyzovaný a referenční vzorek jsou umístěny ve stejné peci a spojeny tepelným mostem. Při zahřívání nebo ochlazování obou vzorků dochází ke změnám endotermickým či exotermickým, a rozdíl jejich teplot se odráží v síle tepelného toku. Tepelný tok lze považovat za úměrný rozdílu teplot. Každý vzorek má své vlastní teplotní čidlo.

Cílem této metody je udržet konstantní teplotu obou vzorků s nulovým rozdílem, přičemž je měřen elektrický příkon, potřebný k zachování stejné teploty. Vzorky jsou umístěny v samostatných celách, zcela izolovány, aby se jejich teploty vzájemně neovlivňovaly. Každý z nich má vlastní snímač teploty i zdroj tepla.

Jestliže ve vzorku probíhá děj, který energii spotřebovává, dochází ke snížení jeho teploty. K opětovnému vyrovnání teplot je nutné dodat energii.

U exotermického děje je tomu naopak, dodávaná energie musí být nižší, aby došlo k vyrovnání teplot obou vzorků. <sup>(33)</sup>

## **7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **7.1 Použité přístroje**

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

Analytické váhy CAHN 26

Biologický termostat BT 50

Digitální stolní pH metr HANNA HI 221

Digitální váhy KERN 440–53, max. 6000 g, d = 1g

DSC 200 F3 Maia NETZSCH

Horkovzdušná sušárna Memmert

Spektrofotometr SPECORD 205 Analytik Jena

Třepací vodní lázeň SW22 Julabo

Ultrazvuková lázeň SONOREX SUPER Bandelin

Vakuová sušárna BINDER

### **7.2 Použité suroviny**

Čištěná voda, FaF HK

Dihydrogenfosforečnan draselný, KULICH PHARMA, HK

Fosforečnanový tlumivý roztok pH 7,4 - tablety, Sigma Life Science

Hydrogenfosforečnan sodný KULICH PHARMA, HK

Polyester kyseliny mléčné a glykolové A4, FaF HK

Terbinafin hydrochlorid, Herbacos - bofarma s.r.o.

Terbinafin baze, FaF HK

### 7.3 Příprava baze terbinafinu

Baze terbinafinu (TBF B) byla připravena z terbinafinu hydrochloridu (TBF HCl). Nejprve bylo naváženo 12,0 g TBF HCl. Čištěná voda o objemu 3000,0 ml byla zahřáta na 80 °C a následně byl přidán TBF HCl a míchán do rozpuštění. Roztok léčiva se nechal vychladnout a poté byl zfiltrován, aby byly odstraněny chloridové ionty. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7 postupným přidáním amoniaku. Poté byl roztok umístěn do lednice, po vychladnutí se opět zfiltroval. Získaná baze terbinafinu byla umístěna do vakuové sušárny a vysušena.

### 7.4 Příprava tuhých disperzí

Tuhé disperze byly připraveny metodou tavení. Použitým polymerem byl polyester větvený kyselinou polyakrylovou, označen A4. Charakteristika nosiče je uvedena v tabulce 3.

Tab. 3 Charakteristika polyesteru <sup>(42)</sup>

Polyester	GA/LA/PAK (%)	M <sub>n</sub> (g/mol)	M <sub>w</sub> (g/mol)	PDI	[η] (ml/g)	g'
A4	48/48/4	7 600	20 600	2,7	8,3	0,31

GA	kyselina glykolová
LA	kyselina D,L-mléčná
PAK	kyselina polyakrylová 2000 g/mol
M <sub>n</sub>	číselně střední molekulová hmotnost
M <sub>w</sub>	hmotnostně střední molekulová hmotnost
PDI	polydisperzita (M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> )
[η]	vnitřní viskozita
g'	stupeň větvení

Do polyesterového nosiče bylo inkorporováno 5 % TBF B nebo TBF HCl. Do čtyř kádinek o objemu 25 ml bylo naváženo 9,0 g polymeru A4 a tyto kádinky byly umístěny do horkovzdušné sušárny zahřáté na teplotu 90 °C po dobu cca 30 minut. Při této teplotě došlo k roztavení polymeru, což umožnilo inkorporaci léčivé látky. Z připravené směsi byly odebrány vzorky ke stanovení teploty skelného přechodu metodou diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a byly připraveny vzorky ke stanovení disoluce léčivé látky v různém prostředí.

### **7.5 Příprava tlumivého fosforečnanového roztoku pH 5,5**

Tlumivý roztok byl připraven dle Českého lékopisu 2009 následujícím způsobem: Roztok I- 13,61 g dihydrogenfosforečnanu draselného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 1000,0 ml. Roztok II- 35,81 g hydrogenfosforečnanu sodného R se rozpustí ve vodě R a zředí se jí na 1000,0 ml. 96,4 ml roztoku I a 3,6 ml roztoku II se smíchají. Po důkladném smíchání a kontroly pH pomocí digitálního pH-metru byla hodnota pH upravena přidávkem jedné z látek.<sup>(30)</sup>

### **7.6 Příprava tlumivého fosfátového roztoku pH 7,4**

Fosfátový tlumivý roztok pH 7,4 byl připraven rozpuštěním 1 tablety ve 200,0 ml čištěné vody. Hodnota pH byla zkontrolována pomocí digitálního stolního pH metru. Následně byl použit jako jedno z prostředí pro testování disoluce terbinafinu.



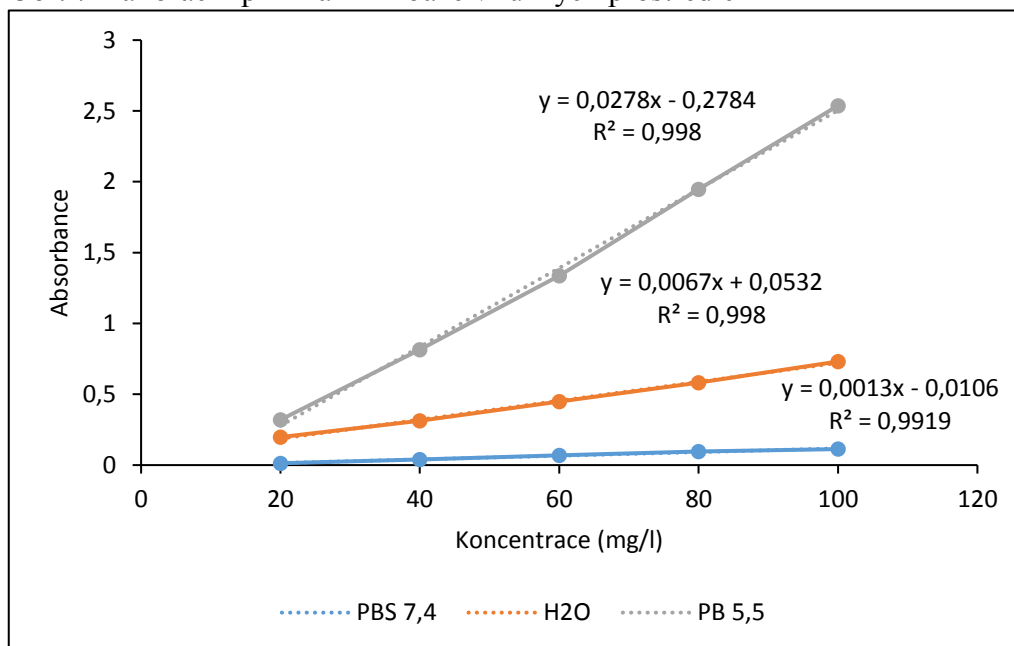
## **7.7 Kalibrační přímka terbinafinu baze a terbinafinu hydrochloridu**

Byly připraveny zásobní roztoky o různé koncentraci léčiva v médiích, jež byla následně použita při disolučním testu. Do šesti odměrných baněk bylo naváženo 5 mg TBF B, respektive TBF HCl. První vzorky TBF B a TBF HCl byly zality čištěnou vodou, další dva vzorky byly zality fosforečnanovým tlumivým roztokem pH 5,5 (PB 5,5) a poslední dva vzorky fosfátovým pufrům (PBS). Poté byly vzorky umístěny do ultrazvukové lázně po dobu 20 minut. Následně byly baňky doplněny danými médii po rysku a umístěny do termostatu vytemperovaného na 37 °C do následujícího dne. Postupně byly zásobní roztoky ředěny na nižší koncentrace a měřena absorbance. Jako slepý vzorek bylo použito čisté médium. Z koncentrace roztoků a naměřených hodnot absorbance byly sestrojeny kalibrační přímky, získány jejich rovnice a hodnoty korelačního koeficientu.

Tab. 4 Koncentrace a absorbance roztoků TBF baze pro kalibrační přímku

c (mg/l)	Absorbance		
	PBS 7,4	PB 5,5	H <sub>2</sub> O
100	0,1131	2,5372	0,7312
80	0,0964	1,9458	0,5818
60	0,0698	1,3374	0,4478
40	0,0394	0,8158	0,3125
20	0,0132	0,3196	0,1976

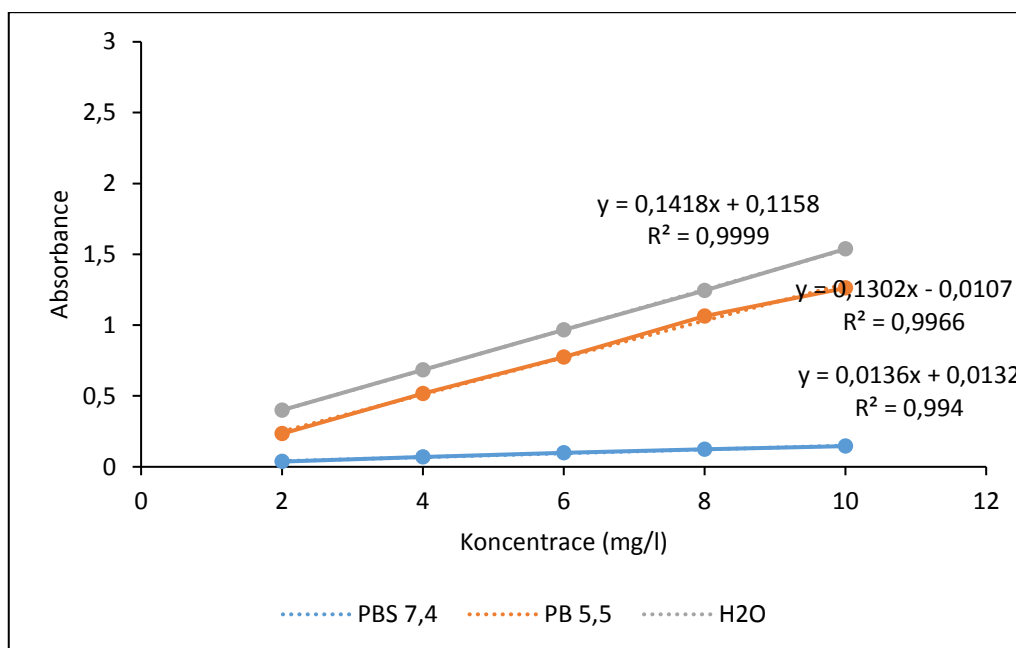
Obr. 7 Kalibrační přímka TBF baze v různých prostředích



Tab. 5 Koncentrace a absorbance roztoků TBF HCl pro kalibrační přímku

c (mg/l)	Absorbance		
	PBS 7,4	PB 5,5	H <sub>2</sub> O
100	0,1131	2,5372	0,7312
80	0,0964	1,9458	0,5818
60	0,0698	1,3374	0,4478
40	0,0394	0,8158	0,3125
20	0,0132	0,3196	0,1976

Obr. 8 Kalibrační přímku TBF HCl v různých prostředích



## 7.8 Průběh disolučních testů

Na dno vialek bylo naváženo 200,0 mg polyesteru s inkorporovaným léčivem a zahřátím dna vilka bylo dosaženo tenké vrstvy standardního povrchu. Takto vytvořené tuhé disperze byly zality 50,0 ml disolučního média (čištěná voda, fosfátový pufr pH 7,4 nebo fosforečnanový pufr pH 5,5). Vialky byly umístěny do třepací vodní lázně vytemperované na 37 °C, která se pohybuje frekvencí 50 kmitů/min s amplitudou 22 mm. V intervalech 3 hod, 6 hod, 1 den, 3 dny, 6 dnů a 8 dnů bylo disoluční médium odebráno a k tuhým disperzím bylo přidáno nové médium.

## **7.9 Stanovení množství uvolněného léčiva**

V disolučním médiu odebraném v jednotlivých časových intervalech bylo stanoveno množství uvolněné léčivé látky bylo stanoveno spektrofotometricky při vlnové délce 223 nm. Vzorky byly měřeny vždy proti médiu, ve kterém probíhala disoluce. Z rovnice kalibrační přímky bylo vypočteno množství uvolněného léčiva v jednotlivých časových intervalech. Byl vypočten procentuální podíl uvolněného léčiva z celkového množství ve vzorku a kumulativní procenta. Liberace léčivé látky byla stanovena také metodou HPLC ve spolupráci s Katedrou analytické chemie a Katedrou biofyziky a fyzikální chemie.

## **7.10 Termická analýza**

### ***7.10.1 Příprava vzorků***

Byly připraveny jak vzorky samotného polymeru, samotného léčiva v obou formách, tak polymeru s 5 % TBF B a TBF H. Látky byly umístěny do třenky a rozetřeny. Váhy byly zapnuty a kalibrovány. Vzorky byly váženy do kelímků. Nejprve byla zaznamenána hmotnost samotného kelímku s víčkem. Následně byly naváženy asi 3 mg vzorku a opatrně umístěny do kelímku, který byl uzavřen víčkem a zalisován. Kelímek s léčivem se zvažil. Rozdílem hmotnosti kelímku s léčivem a prázdného kelímku jsme zjistili přesnou hmotnost vzorku.

### ***7.10.2 Měření na DSC***

DSC přístroj byl zapnut hodinu před měřením. Do měřicí cely byl vložen kelímek s referenční látkou a kelímek se zkušební vzorkem. V počítačovém programu byly nastaveny požadované parametry. Nejprve se zaznamenala hmotnost prázdného kelímku a navážka vzorku. Teplotní režimy jsou shrnuty na obrázcích 9-13.

Obr. 9 Teplotní režim polyesteru A4

Num	Mode	°C	K/min	pts/min	hh:mm	STC	Co
---	Initial	21.2				1	1
1	Isothermal	21.2		50.00	00:05	1	1
2	Dynamic	60.0	10.000	300.00	00:04	1	1
3	Isothermal	60.0		150.00	00:02	1	1
4	Dynamic	-20.0	10.000	300.00	00:08	1	1
5	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
6	Dynamic	60.0	10.000	600.00	00:08	1	1
7	Dynamic	20.0	10.000	600.00	00:04	1	1
8	Emergency	100.0					0
---	StdBy Heat.	20.0	20.000		00:00	1	1
---	StdBy Iso	20.0			00:20	1	0

Obr. 10 Teplotní režim terbinafinu baze

Num	Mode	°C	K/min	pts/min	hh:mm	STC	Co
---	Initial	26.5				1	1
1	Isothermal	26.5		50.00	00:05	1	1
2	Dynamic	-20.0	5.000	300.00	00:09	1	1
3	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
4	Dynamic	80.0	10.000	300.00	00:10	1	1
5	Isothermal	80.0		150.00	00:02	1	1
6	Dynamic	-50.0	10.000	300.00	00:13	1	1
7	Isothermal	-50.0		50.00	00:05	1	1
8	Dynamic	80.0	20.000	600.00	00:07	1	1
9	Dynamic	25.0	10.000	600.00	00:06	1	1
10	Emergency	100.0					0
---	StdBy Heat.	25.0	20.000		00:00	1	1
---	StdBy Iso	25.0			00:20	1	0

Obr. 11 Teplotní režim terbinafinu hydrochloridu

Num	Mode	°C	K/min	pts/min	hh:mm	STC	Co
---	Initial	24.4				1	1
1	Isothermal	24.4		50.00	00:05	1	1
2	Dynamic	-20.0	5.000	300.00	00:09	1	1
3	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
4	Dynamic	220.0	10.000	300.00	00:24	1	1
5	Isothermal	220.0		150.00	00:02	1	1
6	Dynamic	-20.0	10.000	300.00	00:24	1	1
7	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
8	Dynamic	220.0	10.000	600.00	00:24	1	1
9	Dynamic	25.0	10.000	600.00	00:20	1	1
10	Emergency	230.0					0
---	StdBy Heat.	25.0	20.000		00:00	1	1
---	StdBy Iso	25.0			00:20	1	0

Obr. 12 Teplotní režim polyesteru s terbinafinem bazi

Num	Mode	°C	K/min	pts/min	hh:mm	STC	Co
---	Initial	19.2				1	1
1	Isothermal	19.2		50.00	00:05	1	1
2	Dynamic	-20.0	5.000	300.00	00:08	1	1
3	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
4	Dynamic	80.0	10.000	300.00	00:10	1	1
5	Isothermal	80.0		150.00	00:02	1	1
6	Dynamic	-20.0	10.000	300.00	00:10	1	1
7	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
8	Dynamic	80.0	20.000	600.00	00:05	1	1
9	Dynamic	25.0	10.000	600.00	00:06	1	1
10	Emergency	100.0					0
---	StdBy Heat.	25.0	20.000		00:00	1	1
---	StdBy Iso	25.0			00:20	1	0

Obr. 13 Teplotní režim polyesteru s terbinafinem hydrochloridem

Num	Mode	°C	K/min	pts/min	hh:mm	STC	Co
---	Initial	24.7				1	1
1	Isothermal	24.7		50.00	00:05	1	1
2	Dynamic	-20.0	5.000	300.00	00:09	1	1
3	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
4	Dynamic	230.0	10.000	300.00	00:25	1	1
5	Isothermal	230.0		150.00	00:02	1	1
6	Dynamic	-20.0	10.000	300.00	00:25	1	1
7	Isothermal	-20.0		50.00	00:05	1	1
8	Dynamic	230.0	20.000	600.00	00:13	1	1
9	Dynamic	25.0	10.000	600.00	00:21	1	1
10	Emergency	240.0					0
---	StdBy Heat.	25.0	20.000		00:00	1	1
---	StdBy Iso	25.0			00:20	1	0

### 7.10.3 Vyhodnocení výsledků měření

Výsledky měření DSC byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu Netzsch Proteus® Software, Version 5.2.0. Teploty tání byly vyhodnoceny z prvního ohřevu, teploty skelného přechodu v inflexním bodě křivky druhého ohřevu.

## 8 VÝSLEDKY

### 8.1 Disoluční test

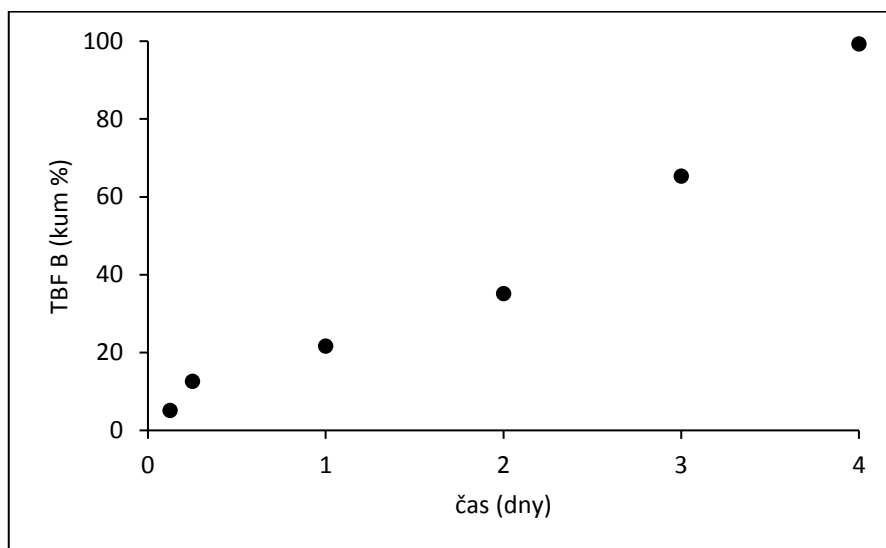
Tab. 6 Výsledky analýzy tuhých disperzí s 10 % inkorporovaného léčiva

Polyester	Léčivo	Forma	Obsah léčiva (%)
A4	Terbinafin HCl	tavenina	8,35
		prášek	7,22
	Terbinafin baze	tavenina	5,60
		prášek	6,24

Tab. 7 Množství TBF B uvolněné do vody stanovené spektrofotometricky

čas [dny]	A	ředění	TBF B [mg/50ml]	TBF B [%]	průměr	kumulativní [%]
0,125	0,1921	1	0,5183	5,13	5,13	5,13
	0,2442	1	0,7127	6,99		
	0,141	1	0,3276	3,28		
0,25	0,2584	1	0,7657	7,58	7,44	12,57
	0,2887	1	0,8787	8,62		
	0,2174	1	0,6127	6,13		
1	0,2937	1	0,8974	8,89	9,03	21,60
	0,3154	1	0,9784	9,59		
	0,2840	1	0,8612	8,61		
2	0,4595	1	1,5160	15,01	13,54	35,14
	0,4112	1	1,3358	13,10		
	0,3882	1	1,2500	12,50		
3	0,9771	1	3,4474	34,13	30,14	65,28
	0,8541	1	2,9884	29,30		
	0,7764	1	2,6985	26,99		
4	0,9445	1	3,3257	32,93	34,03	99,30
	1,0155	1	3,5907	35,20		
	0,963	1	3,3948	33,95		

Obr. 14 Průběh liberace TBF B do vody, stanoveno spektrofotometricky

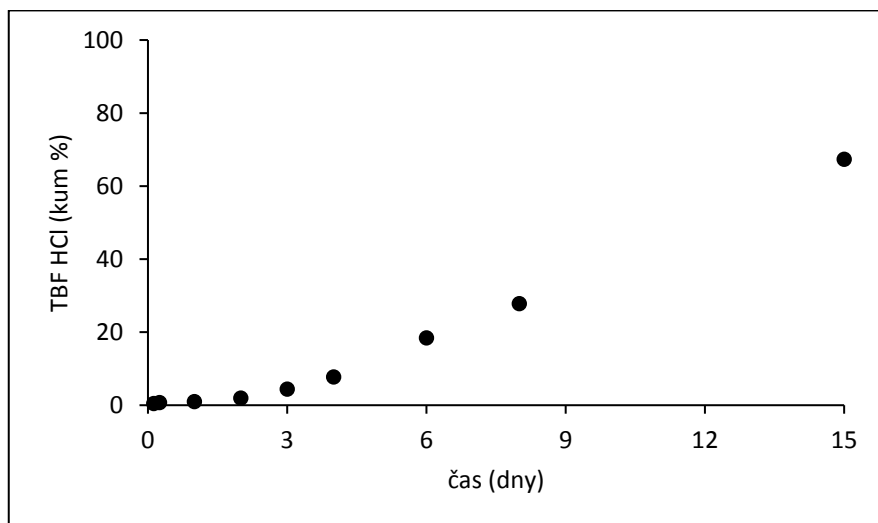




Tab. 8 Množství TBF HCl uvolněné do vody stanovené spektrofotometricky

čas [dny]	A	ředění	TBF HCl [mg/50ml]	TBF HCl [%]	průměr	kumulativní [%]
0,125	0,3425	1	0,0799	0,77	0,50	0,80
	0,0802	1	0,0836	0,80		
	0,3596	1	0,0860	0,84		
0,25	0,1914	1	0,0267	0,26	0,24	1,04
	0,2237	1	0,0380	0,36		
	0,1421	1	0,0093	0,09		
1	0,1547	1	0,0137	0,13	0,23	1,44
	0,0639	1	0,0354	0,34		
	0,3261	1	0,0742	0,73		
2	0,4569	1	0,1203	1,16	0,98	2,42
	0,1633	1	0,0167	0,16		
	0,5849	1	0,1654	1,62		
3	0,9265	1	0,2859	2,75	2,49	4,91
	0,4892	1	0,1317	1,26		
	1,1160	1	0,3527	3,46		
4	0,8001	1	0,2413	2,32	3,32	8,23
	0,4035	5	0,5072	4,85		
	0,2778	5	0,2856	2,80		
6	0,839	5	1,2750	12,26	10,70	18,94
	0,6991	5	1,0284	9,84		
	0,6949	5	1,0210	10,01		
8	0,9581	5	1,4850	14,28	9,38	28,32
	0,6032	5	0,8593	8,22		
	0,4423	5	0,5756	5,64		
15	1,2301	10	3,9291	37,78	39,49	67,81
	1,3137	10	4,2239	40,42		
	1,2808	10	4,1079	40,27		

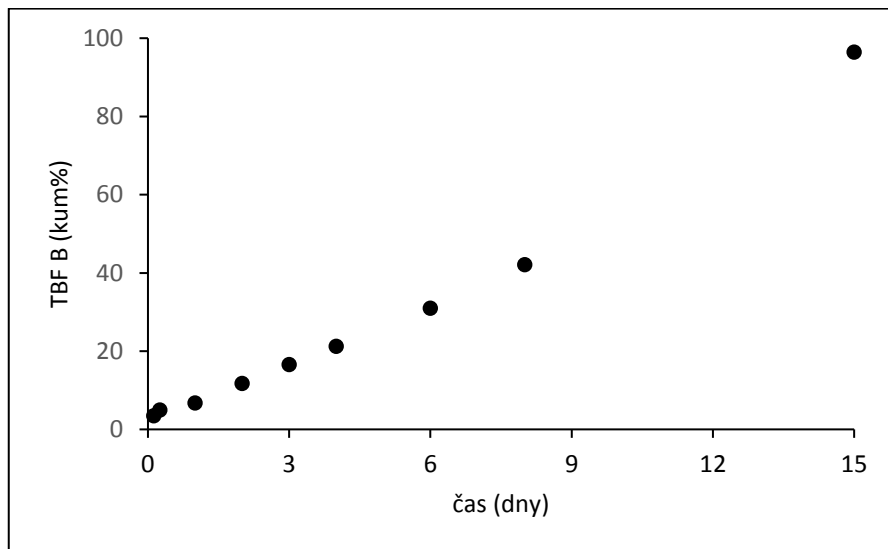
Obr. 15 Průběh liberace TBF HCl do vody stanoven spektrofotometricky



Tab. 9 Množství TBF B uvolněné do fosforečnanového pufru pH 5,5 stanovené spektrofotometricky

čas [dny]	A	ředění	TBF B [mg/50ml]	TBF B [%]	průměr	kumulativní [%]
0,125	0,6311	1	0,6927	6,79	3,44	3,44
	0,0777	1	0,1951	1,94		
	0,0358	1	0,1574	1,58		
0,25	0,0358	1	0,1574	1,54	1,52	4,95
	0,0261	1	0,1487	1,48		
	0,0296	1	0,1518	1,53		
1	0,0658	1	0,1844	1,81	1,76	6,71
	0,0460	1	0,1665	1,66		
	0,0602	1	0,1793	1,80		
2	0,5569	1	0,6260	6,14	5,00	11,71
	0,2983	1	0,3934	3,91		
	0,4069	1	0,4911	4,94		
3	0,4736	1	0,5511	5,40	4,82	16,53
	0,3125	1	0,4062	4,04		
	0,4172	1	0,5004	5,03		
4	0,4303	1	0,5121	5,02	4,66	21,19
	0,2792	1	0,3763	3,74		
	0,4389	1	0,5199	5,22		
6	0,9386	1	0,9692	9,50	9,79	30,98
	0,8728	1	0,9101	9,06		
	1,0564	1	1,0752	10,81		
8	0,7322	1	0,7836	7,68	11,15	42,13
	1,3799	1	1,3661	13,59		
	1,2066	1	1,2103	12,16		
15	0,4563	10	5,3552	52,50	54,27	96,39
	0,5005	10	5,7527	57,24		
	0,4478	10	5,2788	53,05		

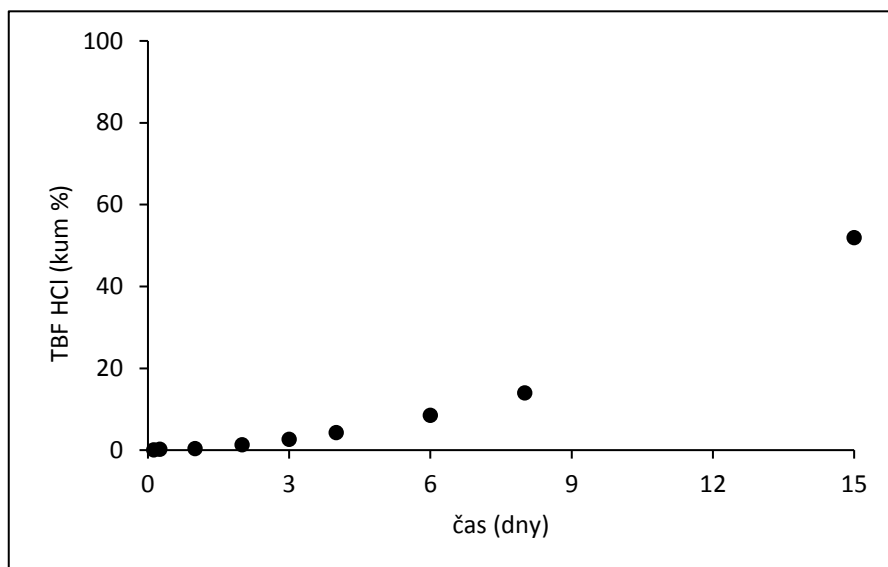
Obr. 16 Liberace TBF B do fosforečnanového pufu pH 5,5 stanovené spektrofotometricky



Tab. 10 Množství TBF HCl uvolněné do fosforečnanového pufru pH 5,5 stanovené spektrofotometricky

čas [dny]	A	ředění	TBF HCl [mg/50ml]	TBF HCl [%]	průměr	kumulativní [%]
0,125	0,0095	1	0,0078	0,08	0,11	0,11
	0,0411	1	0,0199	0,20		
	0,0031	1	0,0053	0,05		
0,25	0,022	1	0,0126	0,12	0,11	0,21
	0,0128	1	0,0090	0,09		
	0,0169	1	0,0106	0,11		
1	0,0390	1	0,0191	0,19	0,23	0,44
	0,0649	1	0,0290	0,29		
	0,0425	1	0,0204	0,20		
2	0,2184	1	0,0880	0,86	0,90	1,34
	0,3317	1	0,1315	1,30		
	0,1284	1	0,0534	0,53		
3	0,3305	1	0,1310	1,28	1,33	2,66
	0,3839	1	0,1515	1,50		
	0,3016	1	0,1199	1,20		
4	0,2700	1	0,1078	1,05	1,63	4,29
	0,6346	1	0,2478	2,45		
	0,3463	1	0,1371	1,37		
6	1,0815	1	0,4194	4,09	4,24	8,53
	1,2035	1	0,4663	4,62		
	1,0324	1	0,4006	4,01		
8	0,3259	5	0,6463	6,31	5,52	14,05
	0,2907	5	0,5787	5,73		
	0,2246	5	0,4518	4,52		
15	1,0823	10	4,1974	40,95	37,88	51,92
	0,9657	10	3,7496	37,12		
	0,9153	10	3,5561	35,56		

Obr. 17 Liberace TBF HCl do fosforečnanového tlumivého roztoku pH 5,5 stanoveno spektrofotometricky



Tab. 11 Množství TBF HCl uvolněné do PBS 7,4 stanovené HPLC – vzorek 1

Čas (dny)	mg/ml	mg/15ml	mg. kum.	%	% kum
0	0	0	0	0,00	0,00
1	0,157	2,356	2,356	11,78	11,78
2	0,071	1,058	3,414	5,29	17,07
3	0,079	1,192	4,605	5,96	23,03
7	0,137	2,062	6,667	10,31	33,33
10	0,077	1,149	7,816	5,74	39,08
14	0,057	0,861	8,677	4,30	43,38
17	0,057	0,855	9,532	4,28	47,66
21	0,008	0,113	9,645	0,56	48,22
24	0,033	0,489	10,133	2,44	50,67

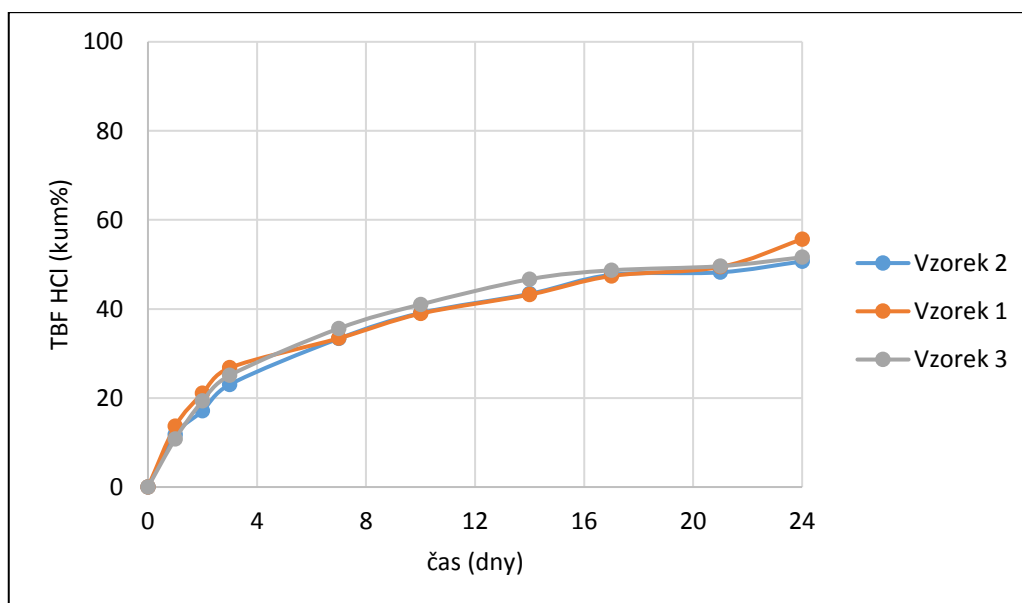
Tab. 12 Množství TBF HCl uvolněné do PBS 7,4 stanovené HPLC. – vzorek 2

Čas (dny)	mg/ml	mg/15ml	mg. kum.	%	% kum
0	0	0	0	0,00	0,00
1	0,182	2,729	2,729	13,65	13,65
2	0,098	1,477	4,206	7,38	21,03
3	0,077	1,150	5,356	5,75	26,78
7	0,088	1,325	6,681	6,63	33,41
10	0,074	1,107	7,789	5,54	38,94
14	0,057	0,855	8,644	4,28	43,22
17	0,056	0,837	9,481	4,18	47,40
21	0,027	0,407	9,887	2,03	49,44
24	0,083	1,244	11,131	6,22	55,66

Tab. 13 Množství TBF HCl uvolněné do PBS 7,4 stanovené HPLC – vzorek 3

Čas (dny)	mg/ml	mg/15ml	mg. kum.	%	% kum
0	0	0	0	0,00	0,00
1	0,144	2,160	2,160	10,80	10,80
2	0,114	1,704	3,863	8,52	19,32
3	0,077	1,153	5,016	5,76	25,08
7	0,140	2,107	7,123	10,53	35,61
10	0,072	1,077	8,200	5,39	41,00
14	0,076	1,135	9,335	5,68	46,68
17	0,027	0,399	9,735	2,00	48,67
21	0,012	0,186	9,920	0,93	49,60
24	0,027	0,400	10,320	2,00	51,60

Obr. 18 Liberace TBF HCl do PBS 7,4 stanoveno HPLC



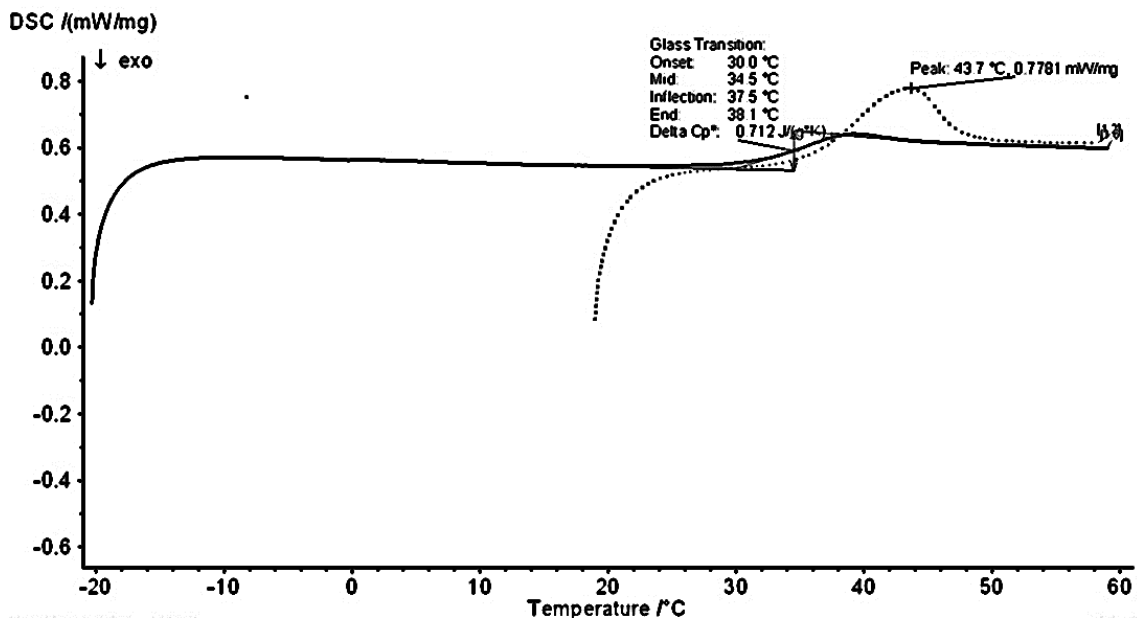


## 8.2 Termická analýza

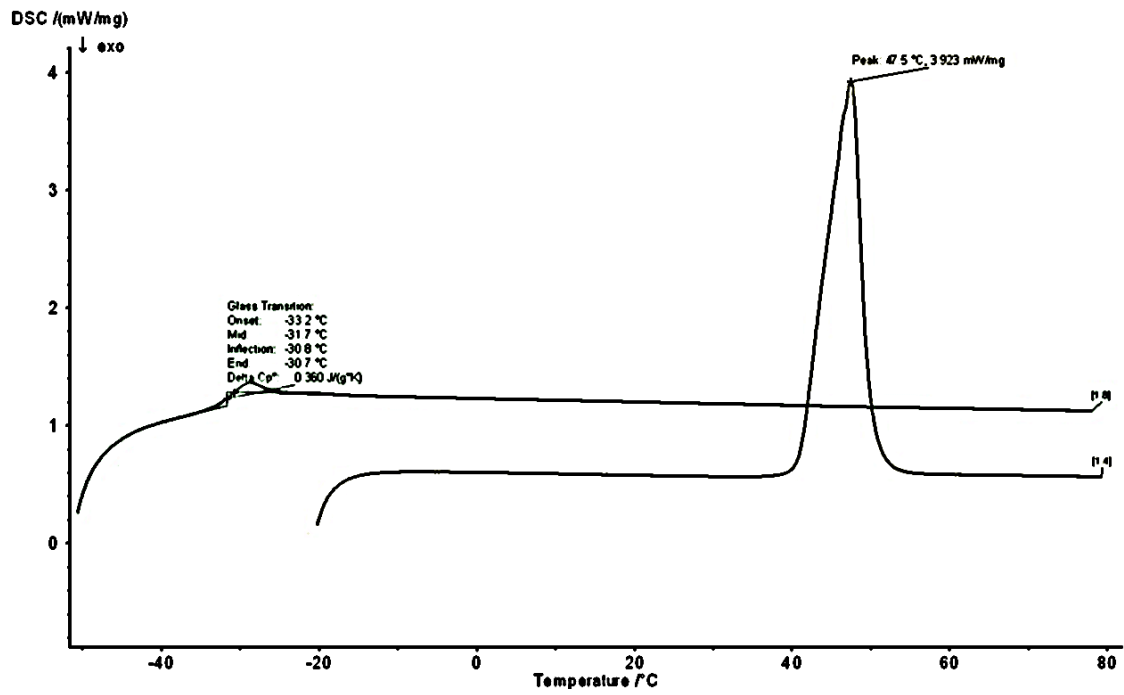
Tab. 14 Teplota skelného přechodu polymeru A4, teploty tání léčiv

	(°C)	Průměr ± SD
T <sub>g</sub> A4	32,4	37,5 ± 4,3
	39,8	
	39,8	
T <sub>m</sub> TER HCl	206,5	212,5±5,2
	215,6	
	215,3	
T <sub>m</sub> TER B	48,1	47,5±1,2
	46,2	
	48,3	

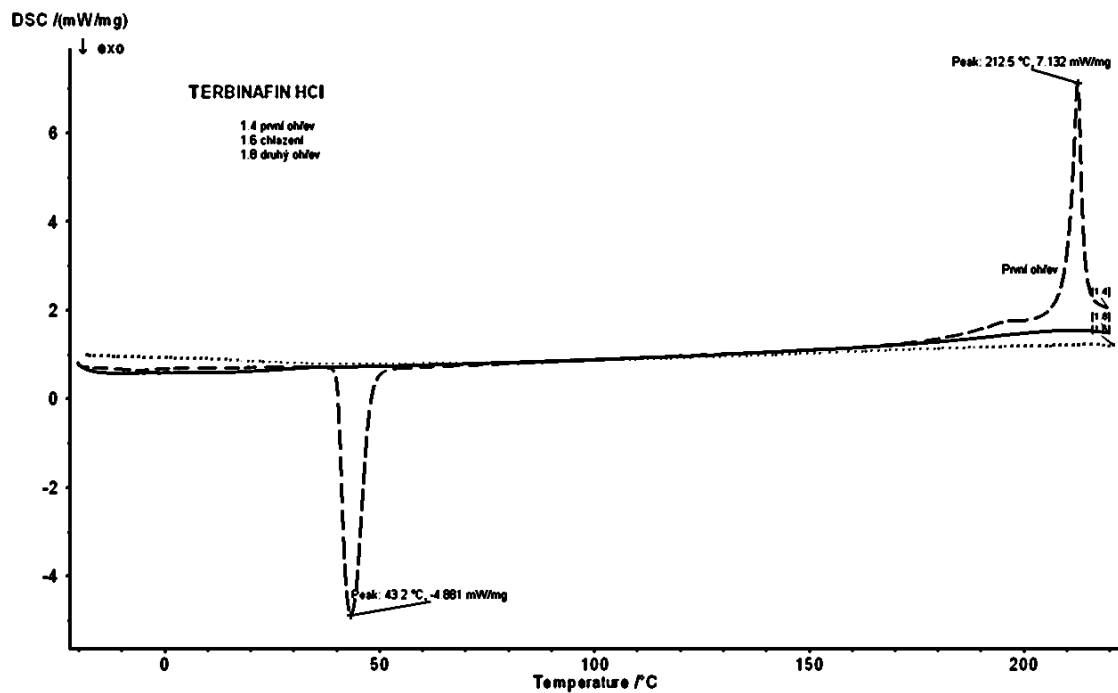
Obr. 19 Termogram polyesteru A4



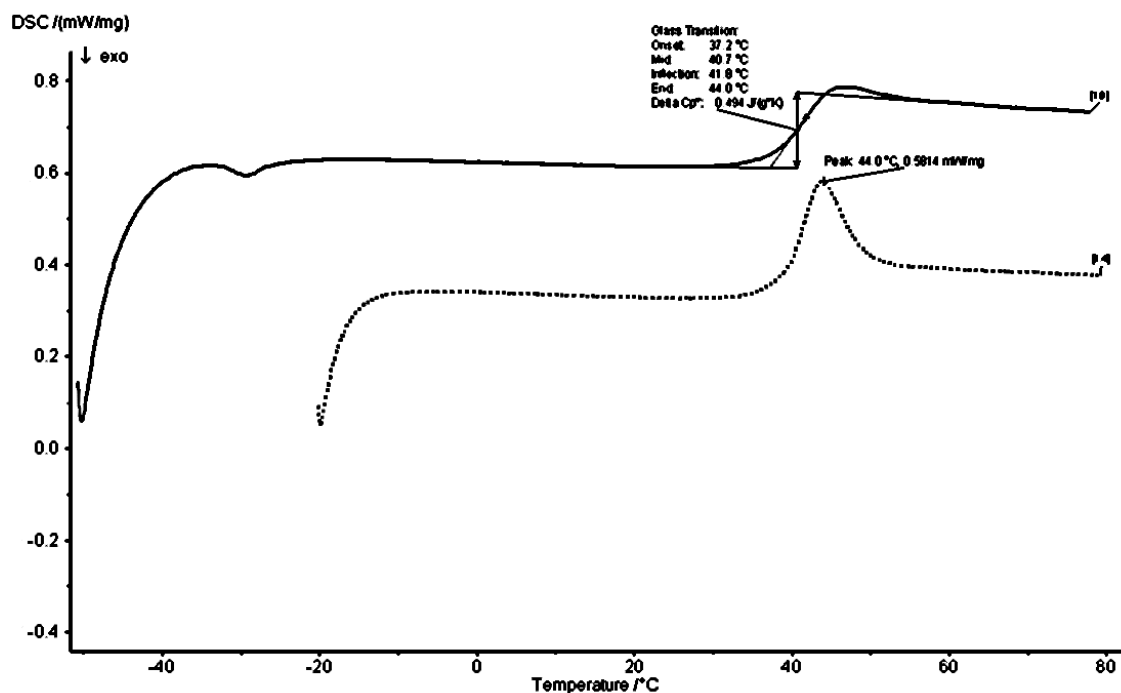
Obr. 20 Termogram terbinafinu baze



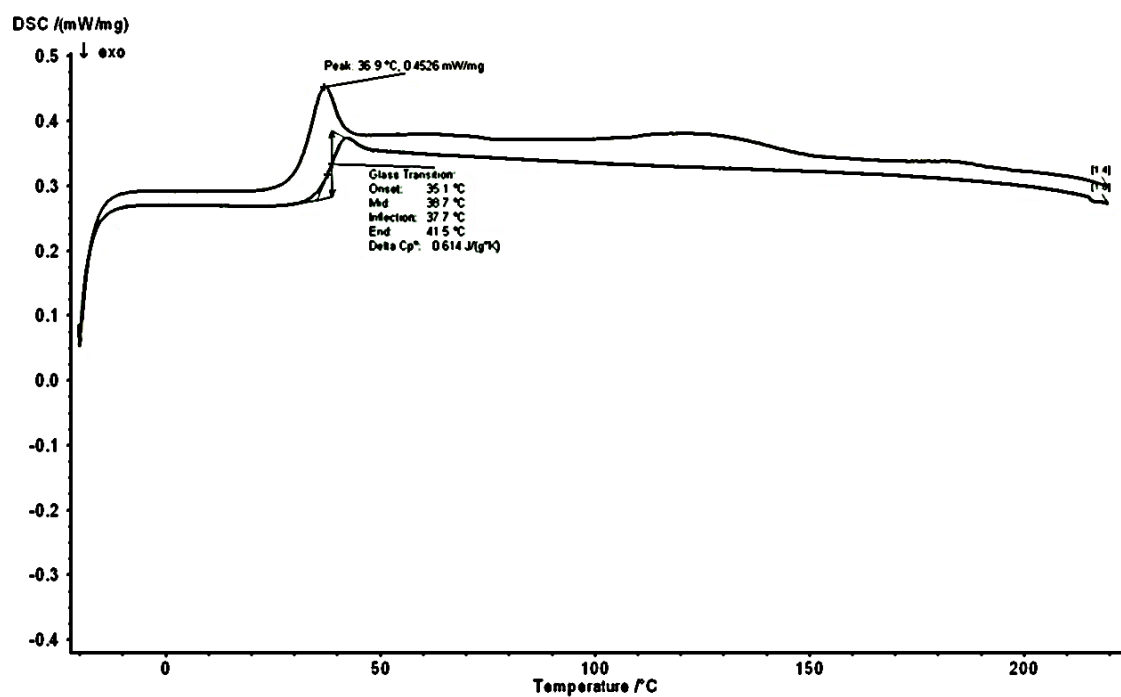
Obr. 21 Termogram terbinafinu hydrochloridu



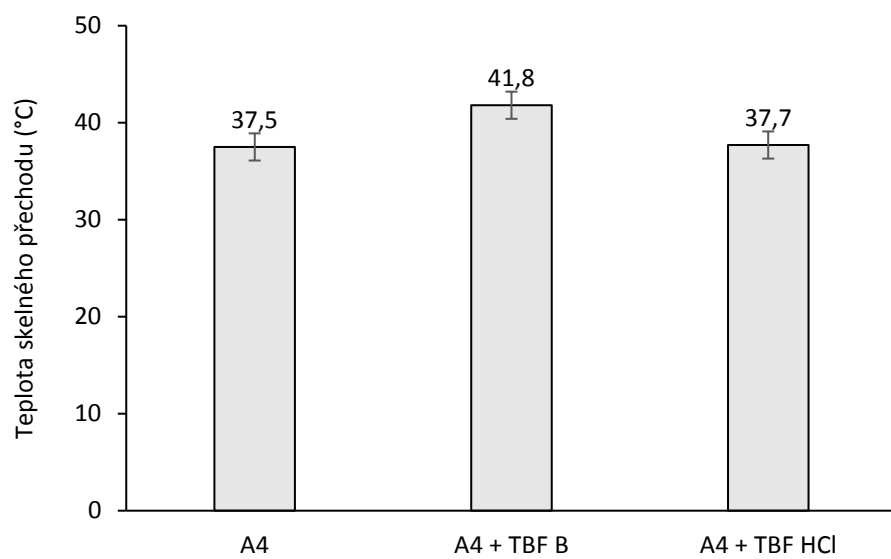
Obr. 22 Termogram tuhé disperze polymeru A4 s 5 % terbinafinu baze



Obr. 23 Termogram tuhé disperze polymeru A4 s 5 % terbinafinu hydrochloridu



Tab. 15 Vliv inkorporace léčiva na teplotu skelného přechodu



## 9 DISKUZE

V diplomové práci byly připraveny tuhé disperze, založené na biodegradabilním větveném polyesteru kyseliny mléčné a glykolové, větveném kyselinou polyakrylovou. Metodou tavení byl inkorporován terbinafin ve formě hydrochloridu, nebo baze. Bylo testováno uvolňování léčiva do vodného prostředí, do pufru pH 5,5 a pH 7,4. Druhou částí experimentu byla termická analýza tuhých disperzí a studium vlivu inkorporovaného léčiva na teplotu skelného přechodu tohoto polymeru. Tab. 3 uvádí charakteristiky polyesterového nosiče. Jedná se o větvený polyester s relativně vysokou molární hmotností  $M_w$ , vysokou polydisperzitou a stupněm větvení.

### 9.1 Liberace léčiv z polymeru

Byla sledována liberace terbinafinu baze a terbinafinu hydrochloridu z nosiče A4. Celková doba liberace byla dána především stabilitou polymeru v daném prostředí, jelikož docházelo k současnému hydrolytickému rozkladu nosiče. Z tohoto důvodu probíhal disoluční test po různě dlouho dobu, a to v rozmezí od jednoho do 24 dnů. Dalším problémem při experimentu byla velmi nízká rozpustnost terbinafinu hydrochloridu ve vodě ( $0,738\mu\text{g/ml}$ ),<sup>(27)</sup> což přinášelo potíže při přípravě roztoků k sestavení kalibrační křivky. Byla provedena kvantitativní analýze množství terbinafinu v tuhé disperzi. Byl zjištěn nižší obsah léčiva, než bylo do polyesteru inkorporováno (viz. Tab. 6). Toto bylo zohledněno při výpočtu množství uvolněného terbinafinu v průběhu disolučního testu.

Koncentrace uvolněného léčiva byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 223 nm. Vzhledem k současné degradaci polymeru byly některé vzorky zakalené a nebylo možné je změřit spektrofotometricky, respektive kumulativní procenta přesáhla hodnotu 100 %. Proto byla koncentrace terbinafinu hydrochloridu uvolněná do prostředí fosfátového pufru pH 7,4 stanovena také metodou HPLC.

Liberace terbinafinu baze do prostředí PBS proběhla během 24 hodin, kdy již první den hodnoty dosáhly 100 % a test byl tedy ukončen.

Liberace terbinafinu baze do vody měla následující průběh. Z polymeru se uvolnilo během prvního dne 21,60 % léčiva, za 3 dny 65,28 % a celková doba liberace byla 4 dny, kdy kumulativní procenta dosáhla hodnoty 99,30 %. (Tab. 7)

Terbinafin baze se uvolňoval v prostředí fosforečnanového pufru 5,5 po dobu 15 dnů. Průběh liberace lze označit jako lineární. Za 24 hodin se uvolnilo 6,71 % léčiva. Za 8 dnů to bylo 42,13 % a 15. den bylo uvolněno 96,39 % a test byl ukončen. (Tab. 9)

Terbinafin hydrochlorid se do vody v počátku disolučního testu významně neuvolňoval. Za tři dny se uvolnilo 4,91 % léčiva, což lze označit jako lag-time. Poté liberace probíhala lineárně a 15. den se uvolnilo 67,81 % látky. Dál nebyla liberace pozorována. (Tab. 8).

V prostředí fosforečnanového pufru pH 5,5 probíhala liberace terbinafinu hydrochloridu podobně jako ve vodě. Po 4 dnech došlo k uvolnění 4,29 % léčiva. Hovoříme tedy o lag-time. Následoval lineární průběh liberace a 15. den testu bylo uvolněno 51,92 % léčiva. (Tab. 10)

V prostředí PBS pH 7,4 se za 24 hodin uvolnilo průměrně 12,08 % terbinafinu hydrochloridu. V počáteční fázi se za 3 dny uvolnilo 25 %, poté se liberace zpomalila a probíhala přibližně konstantní rychlostí do 17. dne. Disoluce byla sledována 24 dnů a uvolnilo se asi 50 % léčiva. (Tab. 11)

Terbinafin baze se v porovnání s terbinafinem hydrochloridem uvolňoval rychleji.

## 9.2 Termická analýza

Touto metodou byly stanoveny termické vlastnosti studovaných látek, tj. polyesteru kyseliny mléčné a glykolové větveného 4 % kyseliny polyakrylové, terbinafinu hydrochloridu, terbinafinu baze a připravených tuhých disperzí. Teplota skelného přechodu polyesteru A4 byla odečtena z druhého ohřevu v inflexním bodě je 37,5 °C (Obr. 19), což znamená, že při pokojové teplotě je látka sklovitá, těžce zpracovatelná a není možné inkorporovat léčivo. Teplota tání terbinafinu baze je 47,5 °C (Obr. 20) a terbinafinu hydrochloridu je 212,5 °C (Obr. 21), což je o 14 °C víc, než je uvedeno v literatuře (195-198 °C). Zvýšení teploty tání může být způsobenou přítomností nečistot. Inkorporované léčivo vedlo v obou případech ke zvýšení teploty skelného přechodu polymerního nosiče (Tab. 14). Proto je lze označit jako antiplastifikátory

Hlavním cílem měření DSC bylo zjistit, zda je léčivo v polymeru dispergováno v krystalickém stavu, amorfním stavu či rozpuštěno. Na obr. 18 je patrné, že při druhém ohřevu není patrný pík krystalické fáze. Terbinafin baze je v polyesteru rozpuštěn. Z obr. 19 lze vyvodit, že terbinafin hydrochlorid je v polymeru rozpuštěn.

## 10 ZÁVĚRY

Z výsledků experimentální části práce lze vyvodit tyto závěry:

1. Terbinafin hydrochlorid vykazoval při liberaci do vody a fosforečnanového tlumivého roztoku pH 5,5 lag time. Následoval lineární průběh disoluce.
2. Terbinafin baze se uvolňoval lineárně a rychleji než terbinafin hydrochlorid.
3. Pro vyhodnocení koncentrace uvolněného léčiva je vhodné použít metodu HPLC, vzhledem k probíhající degradaci polymeru a následného vzniku zákalu, který ruší spektrofotometrické stanovení.
4. Analýzou kvantitativního množství terbinafinu baze v tuhé disperzi bylo zjištěno pouze poloviční množství této látky.
5. Termická analýza ukázala, že inkorporace 5 % léčivé látky vede ke zvýšení teploty skelného přechodu polymeru A4. Lze je označit za antiplastifikátory.
6. Terbinafin ve formě hydrochloridu i ve formě baze je v polyesterovém nosiči rozpuštěn.



## 11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. KRÁČALÍKOVÁ, Markéta. *Inkorporace léčiv do polyesterových nosičů*. Hradec Králové, 2013.
2. KUMAR, Narendra a a col. Development, characterization and solubility study of solid dispersion of terbinafine hydrochloride by solvent evaporation method. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2008.
3. YAZDANIAN M., BRIGGS K, JANKOVSKY C, HAWI A. The "High solubility" Definition of the Current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. *Pharmaceutical Research*. 2, 2004, Sv. 21.
4. OKÁČOVÁ, LADISLAVA ET AL. *Zvýšení biodostupnosti těžce rozpustných léčivých látek jejich modifikací*. místo neznámé : Chemické listy, 2010.
5. KAWAKAMI, KOHSAKU. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1. May 2012.
6. KETAN T., ET AL. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*. 2012, Sv. Volume 10.
7. RAUTIO, JARKKO ET AL. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008.
8. KOMÁREK P., RABIŠKOVÁ M. *Technologie léků*. Praha : Galén, 2006.
9. ROWE, RAYMOND C., PAUL J. SHESKEY A PAUL J. WELLER. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 4th ed. / edited by Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Paul J. Weller. Washington, DC: American Pharmaceutical Association, 2003. ISBN 0853694729.
10. YING-HUA ZHOU, , LI-QING CHEN, JUN TAO, JUN-LI SHEN, DAO-YU GONG, RUI-RUI YUN, YONG CHENG. Effective cleavage of phosphodiester promoted by the zinc(II) and copper(II) inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. October 2016.
11. SLOBODAN DJOKIC, ZLATKO VAJTNER, HRVOJE KRNJEVIC, NEVENKA LOPOTAR, LIDIJA KOLACNY-BABIC,. *US 08/022,398* 1996.
12. G. F. PALMIERI, G. BONACUCINA, P. DI MARTINO & S. MARTELLI. Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen. *Journal of Microencapsulation*. 29. September 2008.

13. S SETHIA, E SQUILLANTE. Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvent evaporation and supercritical methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004, Sv. 272.
14. GORAJANA A, KIT WW, DUA K. Characterization and solubility study of norfloxacin-polyethylene glycol, polyvinylpyrrolidone and carbopol 974p solid dispersions. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* . 2015.
15. HIROYUKI KOJIMA, HIROMU KONDO, KEIICHI YOSHIHARA, YUKO TAKETANI, TAKUYA ISHII. *Controlled Release Dosage Form of Tacrolimus. US 20110142933 A1* Tokyo, 16. June 2011.
16. CRAIG, DUNCAN Q.M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 14. January 2002.
17. NAIR, L.S. A LAURENCIN. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*. 2007.
18. DIPANKAR DAS, PAULOMI GHOSH, SANTANU DHARA, ASIT BARAN PANDA, AND SAGAR PAL. Dextrin and Poly(acrylic acid)-Based Biodegradable, Non-Cytotoxic, Chemically Cross-Linked Hydrogel for Sustained Release of Ornidazole and Ciprofloxacin. *ACS Appl. Mater. Interfaces*,. 5. February 2015.
19. YONG HU, YIN DING ,DAN DING ,MINGJIE SUN ,LEYANG ZHANG ,XIQUAN JIANG , AND CHANGZHENG YANG. Hollow Chitosan/Poly(acrylic acid) Nanospheres as Drug Carriers. *Biomacromolecules*. 28. February 2007.
20. ISSEI TAKEUCHIA, SHIORI KOBAYASHIA, YUKARI HIDA, KIMIKO MAKINO. Estradiol-loaded PLGA nanoparticles for improving low bone mineral density of cancellous bone caused by osteoporosis: Application of enhanced charged nanoparticles with iontophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017.
21. DIVYA DHEER, DIVYA ARORA, SUNDEEP JAGLAN, RAVINDRA K. RAWAL & RAVI SHANKAR. Polysaccharides based nanomaterials for targeted. *Journal of Drug Targeting*. 19. April 2016.
22. MONA ALIBOLANDIA, FATEMEH ALABDOLLAHB, FATEMEH SADEGHIC, MARZIEH MOHAMMADID, KHALIL ABNOUSA, MOHAMMAD RAMEZANIA,, Dextran-b-poly(lactide-co-glycolide) polymersome for oral delivery of insulin: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*. 10. April 2016.

23. REENA SHARMAA, BALBIR S. KAITHB, SUSHEEL KALIAC, , , D. PATHANIAA, AMIT KUMARA, NEHA SHARMAD, REVA M. STREETE, CAROLINE SCHAUERE. Biodegradable and conducting hydrogels based on Guar gum polysaccharide for antibacterial and dye removal applications. *Journal of Environmental Management*. 1. October 2015.
24. D. COUCKEA, 1, M. SCHOTSAERTB, C, 1, C. LIBERTB, C, E. PRINGELSA, C. VERVAETA, P. FOREMAND, X. SAELENSB, C, J.P. REMONA,. Spray-dried powders of starch and crosslinked poly(acrylic acid) as carriers for nasal delivery of inactivated influenza vaccine. *Vaccine*. 18. February 2009, Sv. 27, 8.
25. VAMSI KRISHNA PENMATSA, KANAKAPURA BASAVIAH. Stability Indicating UV-Spectrophotometric Assay Of. *International Journal of ChemTech Research, ISSN : 0974-4290*. July-Sept 2013, pp. Vol.5, No.5, pp 2645-2655,.
26. Terbinafine hydrochlorid. *PubChem* [online]. U.S. National Library of Medicine, 2005 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbinafine\\_hydrochloride#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Terbinafine_hydrochloride#section=Top).
27. *Santa Cruz* [online]. Santa Cruz biotechnology [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <https://www.scbt.com/scbt/product/terbinafine-hydrochloride-78628-80-5>.
28. *Drug bank* [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00857>.
29. MA, Y., CHEN, X., GUAN, S. Terbinafine: Novel formulations that potentiate antifungal activities. *Drugs of today*. 2015.
30. HÖHNE, G.W.H., HEMMINGER, W., FLAMMERSHEIM, H.-J. *Differential Scanning Calorimetry*. 1996.
31. *Fchi.vscht.cz* [online]. Fakulta chemicko-inženýrská [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/cwl2js87vLAsPwUA.pdf?redirected>
32. *Petrpilny.cz* [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.petrpilny.cz/?kapitola-1-o-cem-to-cele-je-sklo-dsc,25>.
33. Publi.cz. [Online] <https://publi.cz/books/180/06.html>.
34. HÖHNE, G.W.H., HEMMINGER, W. F., FLAMMERSHEIM, H.-J. *Differential Scanning Calorimetry*. 2003. 3-540-00467-X.
35. *Český lékopis*. Praha: Grada publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
36. BUCHAROVÁ, Mgr. Veronika. *Vliv inkorporace léčiv na teplotu skelného přechodu větvených polyesterů*. Hradec Králové, 2014. Rigorozní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

37. doc. Ing. Lída Bartovská, CSc. a doc. Ing. Marie Šišková, CSc. [Online] [http://147.33.74.135/knihy/uid\\_es-001/hesla/hydrofilne-lipofilni\\_rovnovaha\\_hlb-.html](http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/hydrofilne-lipofilni_rovnovaha_hlb-.html).
38. *Ipl.vscht* [online]. 2015 [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: [http://ipl.vscht.cz/files/uzel/0024309/Ulbrich\\_Biomaterialy2015.pdf?redirected](http://ipl.vscht.cz/files/uzel/0024309/Ulbrich_Biomaterialy2015.pdf?redirected).
39. MGR. BARBORA VRANÍKOVÁ, PHARMDR. MGR. ALEŠ FRANC, PH.D., PHARMDR. JAN GAJZIOK, PH.D. Inovativní lékové formy pro těžce rozpustná léčiva. *Remedia*. Zář 2014.
40. CRAIG, DUNCAN Q.M. The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 14. January 2002.
41. SIEGEL, HIRENKUMAR K. MAKADIA AND STEVEN J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. Issue 3, 2011, Sv. Volume 3.
42. PODZIMEK, S. Charakterizace větvených polyesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem, Synpo a.s., Pardubice, 2016, 3