UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické technologie

Biodegradabilní polymerní systémy s terbinafinem k topické aplikaci

Diplomová práce

Hradec Králové 2018 Tereza Pokorná

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. 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.

Tereza Pokorná

Ráda bych poděkovala PharmDr. Evě Šnejdrové, Ph.D. za odborné vedení a poskytnutí cenných připomínek a rad při vypracování diplomové práce. Také děkuji paní Romaně Nobilisové za praktické rady a pomoc při realizaci experimentálních prací.

OBSAH

1 ÚVOD 6

2 ABSTRAKT 7

3 ABSTRACT 8

4 ZADÁNÍ PRÁCE 9

5 SEZNAM ZKRATEK 10

6 TEORETICKÁ ČÁST 11

6.1 Dermatofytózy a jejich léčba 11

6.1.1 Terbinafin 12

6.1.2 Přípravky s obsahem terbinafinu 14

6.1.3 Topická aplikace terbinafinu 15

6.1.4 Transdermální aplikace terbinafinu 16

6.1.5 Metody testování transdermální permeace *in vitro* 17

6.2 Disoluční testy 20

6.2.1 Modifikované metody disolučních testů 20

6.2.2 Disoluční kapaliny 23

6.3 Tuhé disperze 25

6.3.1 Rozdělení tuhých disperzí 26

6.3.2 Uvolnění léčiva z tuhých disperzí 27

6.3.3 Metody přípravy tuhých disperzí 28

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 30

7.1 Použité přístroje 30

7.2 Použité suroviny 30

7.3 Charakterizace polyesterových nosičů 31

7.4 Příprava tuhých disperzí 31
7.5 Příprava terbinafinu baze 32
7.6 Disoluční testy 32
7.7 Stanovení množství uvolněného léčiva 33
7.7.1 Spektrofotometrické stanovení 33
7.7.2 UHPLC stanovení terbinafinu 35
8 VÝSLEDKY 37
8.1 Liberace terbinafinu z polyesteru 3T 37
8.1.1 Spektrofotometrické stanovení uvolněného léčiva 37
8.1.2 UHPLC stanovení uvolněného léčiva 40
8.2 Liberace terbinafinu z polyesteru 5P 43
9 DISKUZE 44
9.1 Příprava tuhých disperzí a tenkých filmů 44
9.2 Analýza množství uvolněného terbinafinu 45
9.3 Liberace terbinafinu z větvených polyesterů 47
10 ZÁVĚRY 52
11 LITERATURA 53

1 ÚVOD

Současná terapie plísňových onemocnění zahrnuje systémovou a lokální aplikaci antifungálních látek (flukonazol, mikonazol, ekonazol, ketokonazol, terbinafin). I když je klinická účinnost antimykotik dobrá, problémem terapie jsou zejména systémové nežádoucí účinky. Proto je pozornost zaměřena na lékové formy s modifikovaným uvolňováním a cílenou distribucí antimykotických léčiv (mukoadhezivní přípravky, tuhé disperze, mikroemulze, mikročástice, nanočástice, implantáty *in situ*).

Jako nosiče antifungálních léčiv se v současnosti používají nebo testují polymerní látky, mezi nimi i polyestery alifatických hydroxykyselin (větvené polyestery kyseliny D,L-mléčné a glykolové). Výhodou jsou biodegradabilní polymery, které se v organizmu postupně odbourávají a uvolňují léčivo. Prodloužené uvolňování léčiva umožňuje snížení frekvence dávkování a tím i zlepšení comliance pacienta, snížení výskytu nežádoucích účinků léčiva a zvýšení léčebného efektu.

V předložené práci byly použity větvené polyestery kyseliny mléčné a glykolové jako nosiče terbinafinu pro formulaci tenkých filmů k aplikaci na pokožku a sliznice. Práce metodicky navazuje na dřívější studie zaměřené na liberaci léčiv z degradabilních polymerů.[1,2,3]

2 ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ TECHNOLOGIE

Autorka:	Tereza Pokorná
Název diplomové práce:	Biodegradabilní polymerní systémy s terbinafinem k topické aplikaci
Školitelka:	PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

V předložené diplomové práci jsou studovány liberační vlastnosti tuhých disperzí s terbinafinem, založených na polyesterech kyseliny D,L-mléčné a glykolové, větvených pentaerythritolem a tripentaerythritolem. Teoretická část pojednává o tuhých disperzích, jejich rozdělení a metodách přípravy, disolučních testech, vlastnostech, účinku a použití terbinafinu a přípravcích terbinafin obsahujících. V experimentální části byly metodou tavení připraveny tuhé disperze. Do polyesterového nosiče bylo léčivo inkorporováno ve formě hydrochloridu nebo baze v koncentraci 10% nebo 20%. Některé soustavy byly plastifikovány 30 % triethyl citrátu. Z tuhých disperzí byly formulovány tenké filmy a provedeny disoluční testy léčiva do fosforečnanového pufru pH 7,4 při teplotě 37 °C. Stanovení uvolněného terbinafinu bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 223 nm a ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Na základě výsledků předložené diplomové práce je možno jednoznačně konstatovat, že vhodným nosičem terbinafinu pro formulaci tenkých filmů k topické aplikaci je oligoester větvený pentaerythritolem, plastifikovaný 30 % triethyl citrátu, s inkorporovaným terbinafinem ve formě baze a stanoveným metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Klíčová slova: tuhé disperze, tenké filmy, větvené polyestery, terbinafin, disoluce

3 ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

Author: Tereza Pokorná

Title of Diploma thesis: Terbinafine-loaded biodegradable polymeric systems for topical administration

Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, Ph.D.

In the diploma thesis the released properties of solid dispersions with terbinafine, based on polyesters of D,L-lactic acid and glycol acid, branched with pentaerythritol and tripentaerythritol are studied. The theoretical part deals with solid dispersions, their classification and methods of preparation, methods of drug dissolution testing, properties, effect, use of terbinafine and preparations containing terbinafine. In the experimental part, solid dispersions were prepared by the melting method. The drug was incorporated into the polyester in the form of a hydrochloride or a base in a concentration of 10 % or 20 %. Some systems were plasticized with 30% triethyl citrate. Thin layers were formulated from solid dispersions, and drug dissolution tests were performed on phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C. Assay of terbinafine released was performed spectrophotometrically at 223 nm and ultra-high performance liquid chromatography. Based on the results of this diploma thesis, it can be clearly stated that the suitable carrier of terbinafine for the topical formulation of thin layers is an oligoester branched with pentaerythritol, plasticized with 30% triethyl citrate, incorporating terbinafine in the form of a base and using ultra-high performance liquid chromatography for assay of the drug.

Key words: solid dispersion, thin layer, branched polyester, terbinafine, dissolution

4 ZADÁNÍ PRÁCE

Zadáním diplomové práce bylo studium liberace terbinafinu z tenkých filmů tvořených polyestery kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvených pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem.

Zadání práce lze konkretizovat do následujících dílčích kroků:

1. Tenké filmy tvořené biodegradabilním nosičem s terbinafinem připravit metodou tavení.
2. Jako nosič terbinafinu použít polyester kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvený pentaerythritolem (5P) nebo tripentaerythritolem (3T).
3. Terbinafin použít ve formě hydrochloridu nebo baze v koncentraci 10 % nebo 20 % v polymerním nosiči.
4. Provést disoluční testy terbinafinu z polymerního systému do fosforečnanového pufru pH 7,4 při teplotě 37 °C.
5. Množství uvolněného léčiva stanovit spektrofotometricky a ve spolupráci s Katedrou analytické chemie metodou UHPLC.
6. Zjistit vliv formulačních faktorů na průběh liberace terbinafinu z polymerních filmů.

5 SEZNAM ZKRATEK

3T	polyester PLGA větvený na tripentaerythritolu
5P	polyester PLGA větvený na pentaerythritolu
BCS	biofarmaceutický klasifikační systém
g´	stupeň větvení
MCC	mikrokrystalická celulosa
M_n	číselně střední molární hmotnost
M_w	hmotnostně střední molární hmotnost
M_w/M_n	index polydisperzity
SLN	pevné lipidové nanočástice
TEC	triethyl citrát
Ter-baze	terbinafin baze
Ter-HCl	terbinafin-hydrochlorid
T_g	teplota skelného přechodu
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

6 TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Dermatofytózy a jejich léčba

Dermatofytózy jsou akutní a chronické superficiální mykózy kůže, vlasů a nehtů. Hlavními původci dermatofytóz jsou plísně rodu Trichophyton, Microsporum a Epidermophyton[4]. Mezi nejčastější dermatofytózy patří dermatofytózy nohou (atletická noha), nehtů na nohou (onychomykóza), vlasaté části hlavy, třísel, trupu, obličeje a rukou. K přímému průkazu hub na kůži, nehtech či ve vlasech se používá hydroxid draselný. Lepšího výsledku se dosáhne přidáním dimethylsulfoxidu, který urychluje keratolýzu a umožňuje rychlejší vizualizaci. Kromě mikroskopického průkazu se diagnostika dermatofytóz opírá rovněž o kultivaci. K primární izolaci je možno použít Sabouraudův dextrosový agar s antibiotiky, dermatofytové testovací médium aj.[5]

Terapie dermatofytóz, zejména onychomykózy, je obtížná. Dermatofyty prostupují hluboko do nehtové ploténky, kam mají lokální antimykotika zhoršenou schopnost prostupu, proto je často doporučováno před aplikací léčivého přípravku strukturu nehtové ploténky mechanicky rozrušit. Účinnost topické léčby je omezena bariérovými vlastnostmi kůže a nehtové ploténky. Problémem jsou časté recidivy. S léčbou je nutno pokračovat i po zmizení příznaků. U některých infekcí (tinea capitis, tinea faciei) nebo u rezistentních forem se přistupuje k perorálnímu podání antimykotik. Mezi nejčastěji používaná antimykotika patří azoly (ketokonazol, flukonazol, itrakonazol), allylaminy (terbinafin), ciklopirox a amorolfin.

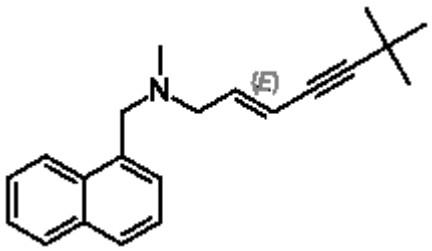
Při léčbě je vždy nutné zvolit vhodnou lékovou formu, která odpovídá postižené části těla. V oblasti třísel nebo mezi prsty není vhodné používat krémy, které mohou zvýšit zapaření v dané oblasti. Vhodnější jsou roztoky, gely nebo pudry. Na suché oblasti kůže jsou vhodnější masti a krémy, které kůži promastí a hydratují. Nejobtížnější je léčba vlasaté části hlavy a nehtů. V těchto případech se obvykle nevyhneme systémovému podávání antimykotik. Lokální léčba onychomykózy může být úspěšná v případě, že je postiženo méně než 25 % plochy nehtu. Problémem je prostup léčiva do struktury nehtu, proto musíme volit léčivo s dobrou penetrační

schopností ve formě laku či roztoku. Další možností je také odstranění postižené části nehtu, k čemuž využíváme chemickou keratolýzu. Používá se bifonazol a 40% urea. Aplikuje se dvakrát denně po obroušení rohoviny nehtu. V případě, že se efekt nedostaví do 6 měsíců, je postižen palec u nohy nebo 4 a více nehtů, přechází se na perorální léčbu. První volbou při léčbě onychomykózy je terbinafin, popřípadě itrakonazol. Léčba je dlouhodobá, až několik měsíců a vyžaduje vysoké dávky (250 mg denně).[6]

6.1.1 Terbinafin

Chemicky se jedná o (N-[(2E)-6,6-dimethylhept-2-en-4-ynyl]-N-methyl-N-(1-naftylmethyl)amin. Strukturou se liší od klasických antimykotik, zařazuje se tedy mezi ostatní antimykotika nebo také do skupiny allylaminových derivátů.[7] Používá se ve formě hydrochloridu.

Obr. 1: Chemická struktura terbinafinu[8]



Terbinafin je v rámci klasifikačního systému léčiv (BCS) zařazen do II. třídy (nízká rozpustnost, vysoká permeabilita).[9] Rychlost rozpouštění terbinafinu jako slabé zásady je závislá na hodnotě pH prostředí. Nejvyšší rychlost rozpouštění se dosahuje v kyselém prostředí žaludku. Při pH 2,0 je rozpustnost 2,7 mg/ml, při pH 8,0 pouze 0,0009 mg/ml. Hodnoty pH vyšší než 5,5 vedou tedy k rychlému vysrážení terbinafinu. Vysoká permeabilita léčiva a dlouhá doba průchodu střevem přispívají k tomu, že postupně rozpuštěné léčivo se úplně vstřebává.9

Terbinafin má široké spektrum účinku. V buněčné membráně hub působí tak, že selektivně interferuje s biosyntézou sterolů v raném stupni, a to jiným způsobem než je tomu u azolů. Terbinafin inhibuje skvalenovou epoxidázu. To vede k deficitu ergosterolu a hromadění skvalenu v buňkách hub, což způsobí jejich úhyn.[6] Fungicidní účinek má na dermatofyty, plísně a některé dimorfní houby

(Trichophyton sp. Microsporum sp. Epidermophyton sp.), malou účinnost vykazuje u rodu Candida.[6] Po podání se terbinafin koncentruje zejména ve vlasech a nehtech, proto se využívá hlavně v terapii těžko léčitelných onychomykóz.

Terbinafin se podává perorálně i topicky a obě aplikace jsou obecně dobře tolerovány. Nicméně přibližně 40 % dávky terbinafinu je metabolizováno při prvním průchodu játry. Terbinafin je značně vázán na plazmatické proteiny.[10] Obvyklá terapeutická dávka je 250 mg 1x denně. Maximální plazmatické koncentrace (0,97μg/ml) je dosaženo za dvě hodiny po perorálním podání jednorázové dávky. Kumuluje se v lipofilním stratum corneum. Vylučuje se mazem, proto se také dosahuje vysokých koncentrací ve vlasových váčcích a částech kůže bohatých na mazové žlázy. V prvních týdnech terapie vstupuje také do nehtové ploténky. Eliminační poločas je 17 hodin. U pacientů se sníženou funkcí jater či ledvin je značně zpomalena rychlost eliminace, následně dochází ke zvýšení koncentrace terbinafinu v plazmě. Terbinafin se metabolizuje izoenzymy cytochromu P450 (CYP2C9, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C19), induktory a inhibitory těchto izoenzymů mají vliv na plazmatickou koncentraci terbinafinu. Terbinafin je silný inhibitor izoenzymu CYP2D6. Může tak zvyšovat plazmatickou koncentraci sloučenin, které jsou primárně tímto izoenzymem metabolizovány, například léčiva s nízkým terapeutickým indexem ze skupiny beta-blokátorů (metoprolol), antiarytmik (propafenon), tricyklických antidepresiv, inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu a inhibitorů monoaminooxidázy. Na ostatní izoenzymy cytochromu P450 má zanedbatelný inhibiční potenciál.[11]

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří zvýšená teplota, bolesti hlavy, bolest kloubů a svalů, kožní projevy (kopřivka, vyrážka), nauzea, zvracení, průjem, ztráta chuti k jídlu, zvýšení ALT, AST, velmi vzácně hematologické poruchy (neutropenie, agranulocytóza, trombocytopenie).[6] V některých případech se během léčby mohou objevit jaterní poruchy, hepatitida, (primárně cholestatické nebo smíšené cholestaticko-hepatocelulární poranění). Tyto problémy obvykle odezní do několika měsíců po ukončení léčby. Závažné kožní reakce jako jsou Stevens-Johnson syndrom, erythema multiform, nebo toxická epidermální nekrolýza jsou obvykle léčeny topickým nebo perorálním podáním kortikoidů.[12]

6.1.2 Přípravky s obsahem terbinafinu

V České republice je na trhu terbinafin dostupný ve formě tablet a krému (Tab. 1). Dříve byl na trhu také kožní sprej (Lamisil sprej), který se aplikoval 1x denně po dobu jednoho týdne, a kožní roztok (Lamisil 1x kožní roztok 1%), který se aplikoval jednorázově na obě nohy. Uvádění léčivého přípravku na trh bylo ukončeno v srpnu 2016.[11]

Tab. 1: Léčivé přípravky s obsahem terbinafinu dostupné v České republice

Název přípravku	**Pomocné látky**	**Indikace**	**Dávkování**
Lamisil krém	NaOH, benzylalkohol, sorbitan-stearát, cetyl-palmitát, cetylalkohol, stearylalkohol, polysorbát 60, isopropyl-myristát, čištěná voda	mykózy kůže	1-2 týdny 1-2xdenně
Lamisil tbl.	MCC, Na^+ karboxymethylškrobu, koloidní bezvodý SiO_2, hypromelosa, magnesium-stearát	onychomykóza infekce kůže	6-12 týdnů 1xdenně 2-4 týdny 1xdenně
Terbinafin Actavis tbl. 250MG	MCC, Na^+ kroskarmelosy, koloidní bezvodý SiO_2, hypromelosa, magnesium-stearát	onychomykóza infekce kůže	6-12 týdnů 1xdenně 1-2 týdny 1xdenně
Terfimed 250 tbl.	Na^+ karboxymethylškrobu, MCC, hypromelosa, koloidní bezvodý SiO_2, magnesium-stearát	onychomykóza infekce kůže	6-12 týdnů 1x denně 1-2 týdny 1x denně
Terbistad 1% krém	NaOH, benzylalkohol sorbitan-stearát, cetyl-palmitát, cetylalkohol, cetylstearylalkohol, polysorbát 60, isopropyl-myristát, čištěná voda	mykózy kůže	1-2 týdny 1-2xdenně

6.1.3 Topická aplikace terbinafinu

Při topické aplikaci se léčivý přípravek nanese přímo na postižené místo, systémová absorpce je nežádoucí. Léčivé přípravky musí být formulovány tak, aby se terbinafin dostal do místa působení v požadovaném množství a zajistil tak dostatečnou léčbu.

Výhodné vlastnosti mají hydrogely tvořené chitosanem, karbomery (Karbopol 974) nebo hyetelosou (Natrosol 250) s obsahem 1 % terbinafin-hydrochloridu. Vykazují stejnou antifungální účinnost jako komerční krém Lamisil. Nejvyšší množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu vykazoval gel tvořený Natrosolem 250. Uvolněné množství terbinafin-hydrochloridu bylo vyšší než u krému Lamisil.[13]

Natrosol 250 je bílý granulovaný prášek hyetelosy, který je snadno rozpustný v teplé i studené vodě a vytváří čiré roztoky o různé viskozitě, které vykazují pseudoplastický tok. Má neionogenní charakter, jeho viskozita může být ovlivněna kyselinami a zásadami. Je vysoce kompatibilní s ostatními materiály. Ovlivňuje viskozitu a reologické vlastnosti léčivých přípravků. Používá se jako stabilizátor očních a topických přípravků, lubrikant, pojivo v tabletách a při potahování tablet.[14] Léčivé přípravky s terbinafinem obsahující Natrosol 250 nejsou na trhu zatím dostupné.

Další vhodnou aplikační formou je kožní roztok, obsahující 1 % terbinafin-hydrochloridu, akrylatooktylakrylamidový kopolymer, hyprolosu, střední nasycené triacylglyceroly a ethanol 96%. Po nanesení na postižené místo vytvoří na kůži tenký film. Ethanol se rychle vypaří a na kůži zůstane film o vysoké koncentraci terbinafinu. Terbinafin postupně penetruje do kůže. V kůži se terbinafinu kumuluje po dobu až 13 dnů, pravděpodobně se váže v lipidových složkách stratum corneum. Zajistí se tím dlouhodobá léčba i po jedné aplikaci.[11]

Mezi systémy s modifikovaným uvolňováním, které se využívají při topické aplikaci terbinafin-hydrochloridu, patří nanočástice ve formě lipozomů, mikroemulzí, pevných lipidových částic,[20] aj.

Jednou z forem topické aplikace nanočástic jsou lipozomy s enkapsulovaným terbinafin-hydrochloridem, které mají bioadhezivní vlastnosti, a setrvají tak déle na kůži či nehtu, čímž se prodlouží doba působení. Terbinafin se zkoušel inkorporovat do lipozomů tvořených fosfatidylcholiny ze sojových bobů (Phosholipon 90 G® a Lipoid S 100®), které se suspendovaly do chitosanového, poloxamerového

a methylmetakrylátového gelu. Potvrdilo se, že takto připravený gel zůstává déle na kůži a prodlouží tak působení léčiva.[15]

Mikroemulze jsou tvořeny s terbinafin-hydrochloridem, olejovou fází (6%), směsí tenzidů a kotenzidů (54%), vodnou fází (39,5%) a karbomerem (0,5%). Ve finálním gelu je velikost vnitřní olejové fáze 18 nm. Gel zabezpečí lepší penetraci a retenci léčiva na kůži. Aplikuje se mezi nehtovou ploténku a nehtové lůžko.[16]

Další možností je zpracování terbinafin-hydrochloridu do pevných lipidových nanočástic (SLN). Při přípravě SLN se využívá mikroemulzní technika. Pevnou lipidovou fázi tvoří glycerolmonostearát, glycerolbehenát a glycerolpalmitostearát, jako tenzid se mohou použít polysorbáty 80, 60, 40 a 20, polyethoxylovaný ricinový olej (Cremophor®) a propylenglykol. Jako nejvhodnější byla vybrána kombinace, ve které lipidová fáze představuje 4 % systému a skládá se z glycerolmonostarátu a glycerolbehenátu v poměru 1:1. Tato kombinace zabezpečí stabilní a dostatečné množství terbinafin-hydrochloridu ve všech vrstvách kůže po dobu 12 hodin.[17] Výhodou nanostrukturovaných lipidových systémů je zvýšení biodostupnosti a stability léčivých látek a možnost řízeného uvolňování léčiva. Díky svým okluzním vlastnostem je zvýšena penetrace léčiva do kůže.[18]

Pokud jsou pevné lipidové částice 50-1000 nm inkorporované do gelového základu, mluvíme o nanolipidových gelech. Jako základ se používá karbomerový gel. K tvorbě gelu dochází po zvýšení pH na hodnotu 6,0 triethylaminem a je použit methylparaben jako konzervant.[19,20]

6.1.4 Transdermální aplikace terbinafinu

Formulací transdermálních terapeutických systémů se vyřeší vysoký first-pass metabolismus, což umožní snížení dávkování při systémové aplikaci terbinafinu. Omezí se možné interakce s potravou či jinými léčivy podanými perorálně, sníží se nežádoucí účinky, hladina plazmatické koncentrace je stabilnější. Terbinafin má pro transdermální podání vhodné farmakokinetické parametry. Nejčastější aplikační formou jsou transdermální náplasti, které se jednoduše aplikují a ukončení podávání léčiva je snadné. Další výhodou je také snížená frekvence dávkování. Nevýhodou je, že léčivo musí nejprve překonat kožní bariéru, čímž se zpomaluje nástup efektu léčiva [21]

Kůže je tvořena třemi vrstvami, pokožkou, škárou a podkožím. Pokožka se dále dělí ještě na pět vrstev- stratum basale, stratum spinosum, stratum, granulosum, stratum lucidum a stratum corneum. Nejsvrchnější vrstva kůže (stratum corneum) má pro průnik léčiva do organismu největší význam. Tvoří ji korneocty, ploché zrohovatělé bezjaderné buňky sestavené do 15-25 vrstev.[22] V mezibuněčných prostorech se nachází lipidová matrix.[21]

Propustnost kůže lze zvýšit různými fyzikálními metodami. Lze využít například elektroporaci, při které na kůži působíme elektrickými výboji, které vytvoří mikropóry. Další metodou je využití zvláštních aplikátorů, pomocí kterých se do podkoží vstřelí mikronizované částice. Tyto fyzikální metody mají značnou nevýhodu, zařízení pro aplikaci jsou složitá, tedy i finančně náročná.[21]

K zlepšení propustnosti lze využít i chemické metody. Princip spočívá v tom, že se léčivo podává s látkou, která dočasně sníží funkci kožní bariéry. Takové látky se nazývají akceleranty transdermální penetrace. Vhodné akceleranty musí působit na kůži jen dočasně, nesmí být toxické a dráždivé, musí být kompatibilní s léčivem a ostatními složkami léčivého přípravku. Nejdéle známe akceleranty jsou derivancia (kapsaicin) a keratolytika (kyselina salicylová, močovina), která působí nespecificky tím, že vyvolávají překrvení v oblasti aplikace, nebo rozrušují strukturu kůže. Moderní akceleranty interagují přímo s lipidovou částí stratum corneum. Ovlivňují tmel vyplňující intercelulární prostor, nebo působí přímo na korneocyty tak, že je hydratují, nebo denaturují obsahující keratin. Příkladem jsou laktamy (kaprolaktam), substituované amidy karboxylových kyselin (dodecylamid kyseliny isomaselné), estery ω-aminokyselin (estery 6-aminohexanové kyseliny), které jsou díky své podobnosti se sloučeninami lidského organismu biodegradabilní.[21]

6.1.5 Metody testování transdermální permeace *in vitro*

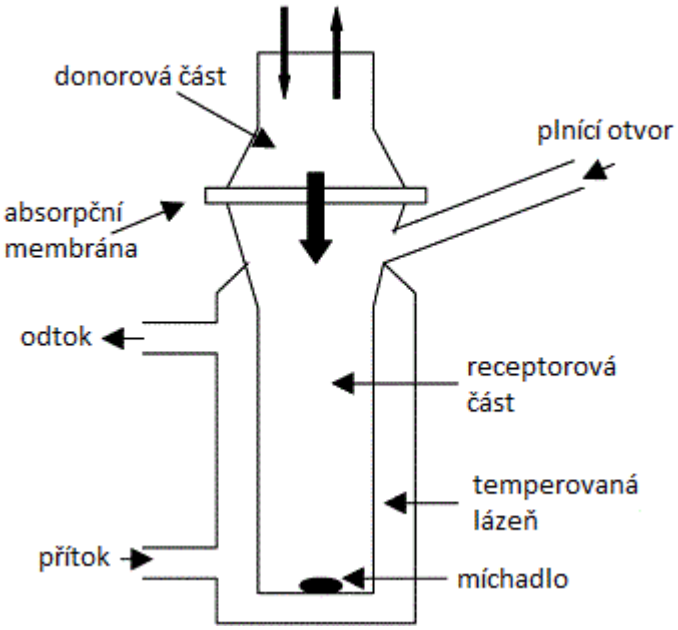
Nejčastěji využívanou metodou jsou difuzní cely. Lze využít permeaci ve směru vertikálním i horizontálním. V praxi se obvykle využívá permeace ve směru vertikálním.[23] Cely jsou tvořeny z inertních materiálů a skládají se ze dvou částí. Horní část se nazývá donorová a spodní receptorová. Absorpční membrána (kůže) s aplikovaným testovaným léčivem je napnutá mezi horní a dolní částí. Spodní strana kůže se nachází na receptorové části.

Dávka léčiva se aplikuje dvěma způsoby. První možností je aplikace léčiva v množství, které stačí akorát na pokrytí kůže. Povrch není nijak krytý, může tedy docházet k odpařování, jsou tak lépe napodobeny podmínky skutečné aplikace v reálném životě. Druhou možností je tzv. „nekonečná dávka“, léčivo je aplikováno ve větším množství než je třeba a povrch kůže je překryt, aby se zamezilo odpařování vzorku.[23]

Existují dva základní typy difuzních cel. Široce využívaným typem je Franzova cela. Receptorová část obsahuje 2 až 20 ml tekutiny. Tato tekutina musí být neustále míchána a periodicky odebírána a analyzována. Receptorová tekutina nesmí ovlivňovat vlastnosti kůže a složení se musí volit s ohledem na fyziologické prostředí a s přihlédnutím na chemické vlastnosti látky. Obvykle se pro hydrofilní látky používají roztoky solí či pufry pH 7,4. Při testování lipofilních látek se přidává ještě sérový albumin, nebo organická rozpouštědla, která nepoškozují kůži. Druhým typem je průtoková vertikální difuzní cela, která se od Franzovy cely liší tím, že tekutiny v receptorové části je obvykle méně (0,1-5 ml) a je odstraňována kontinuálně pomocí peristaltické pumpy.[23]

Pro správný průběh experimentu je důležité udržovat konstantní teplotu, která je pro testování transdermální permeace 32°C. Klíčové je také místo odběru receptorové tekutiny.

Obr. 2: Schéma Franzovy cely[24]



6.2 Disoluční testy

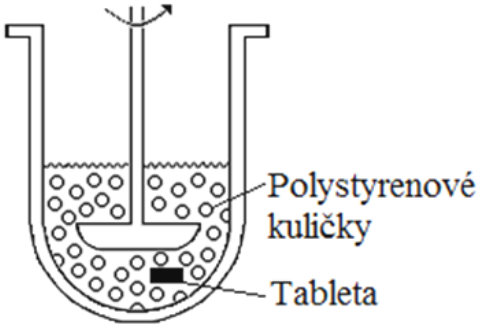
Disoluční testy jsou široce využívány při vývoji a kontrole léčivých přípravků. Slouží k hodnocení uvolňování léčiva z pevných nebo polotuhých lékových forem. Lékopis definuje metody disolučních zkoušek pro pevné lékové formy, transdermální přípravky, lipofilní tuhé lékové formy a léčivé žvýkací gumy. Specifikuje přístroje, postupy provedení a hodnocení výsledků disolučních zkoušek. Tyto zkoušky se používají ke stanovení shody s požadavky na disoluci pevných lékových forem podávaných perorálně a stanovení rychlosti disoluce léčivých látek z transdermálních náplastí.[25]

Provedení disolučních testů často neodpovídá situaci, která nastane po podání léčiva do organismu. V případě hodnocení složitějších léčivých přípravků se přistupuje k modifikaci podmínek testování nebo se vyvíjejí nové metody disolučních testů. Klasické lékopisné metody jsou jednokompartmentové, což pro simulaci *in vivo* prostředí není zcela vhodné. Abychom mohli napodobit *in vivo* podmínky, je třeba znát celou řadu faktorů, které působí na léčivý přípravek v gastrointestinálním traktu, například motilita, složení žaludečních a střevních šťáv, doba setrvání látky v žaludku a v tenkém střevě, frekvence a tlak žaludečních kontrakcí a střevní peristaltiky.[26,27] Na základě těchto poznatků se zavádějí biorelevantní disoluční tekutiny obsahující např. tenzidy běžně se vyskytující ve střevních tekutinách (soli žlučových kyselin, fosfolipidy). Mezi tato média řadíme gastroduodenální tekutiny simulující stav na lačno nebo stav po jídle. Vyvíjejí se přístroje, které napodobují fyziologické prostředí gastrointestinálního traktu.[28]

6.2.1 Modifikované metody disolučních testů

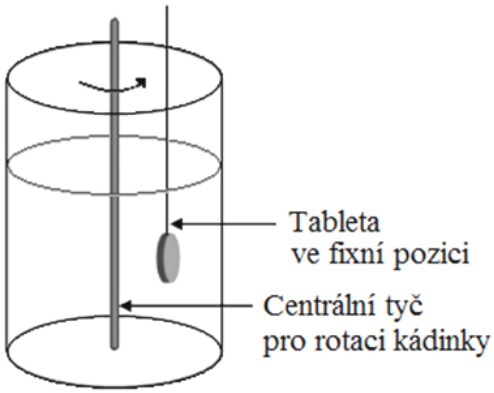
Disoluční přístroje lze rozdělit na statické přístroje a dynamické přístroje.[28] Mezi statické disoluční přístroje patří pádelko-kuličkový systém (Obr. 3), vzniklý obměnou disolučního zařízení s míchadlem. V disoluční nádobě jsou kromě disolučního média a testovaného léčivého přípravku také polystyrenové kuličky, obsah nádoby je klasicky promícháván míchadlem. Tímto novým způsobem můžeme získat informace o mechanické odolnosti léčivého přípravku.

Obr. 3: Pádélko-kuličková metoda[28]



Dalším statickým disolučním přístrojem je model rotující kádinky (Obr. 4). Metoda spočívá v tom, že tableta je pevně fixována v daném místě nádoby a nádoba s disolučním médiem se otáčí kolem své osy, čímž na tabletu působí tečné napětí. Jsou tak simulovány hydrodynamické podmínky v gastrointestinálním traktu.

Obr. 4: Metoda rotující kádinky[27]



Dynamické disoluční testy napodobují fyziologické podmínky lépe než přístroje statické. Jedná se o vícekompartmentové modely. Nádoby jsou spojeny, takže léčivý přípravek prochází kontinuálně jednotlivými kompartmenty, ve kterých se mění podmínky. Základní model je tvořen dvěma kádinkami napodobující žaludek a dvanáctník. Léčivý přípravek je vložen do první nádoby, odkud je obsah transportován pomocí peristaltické pumpy do druhé nádoby. Používá se nižší objem

disolučního média (400 ml v první nádobě a 50 ml v druhé nádobě).[25] Nevýhodou je, že střevo představuje jen jedna nádoba. V těle je střevo rozděleno na tři části, kde se mění i složení střevní tekutiny. V jednotlivých nádobách je odlišné složení média, které představuje žaludeční a střevní tekutinu. Ani v jedné z nádob nedochází k ustanovení rovnováhy, protože zde probíhá neustálý transport tekutin a přísun nového disolučního média. Odvod média z dvanáctníkové komory zabezpečuje stálý objem kompartmentů.[29] Tím, že tento model využívá biorelevantní média, může napodobit biochemické podmínky přechodu léčiva z žaludku do dvanáctníku. Neumí však napodobit hydrodynamické a mechanické vlivy žaludečních kontrakcí a střevní peristaltiky, kvůli kontinuálnímu promíchávání, které bylo převzato z disolučního přístroje s míchadlem.[28]

Sofistikovanějšími metodami dynamických disolučních testů jsou čtyřkompartmentový gastrointestinální model a dynamický model žaludku.[28] Jednotlivé části čtyřkompartmentového gastrointestinálního modelu, představují žaludek, dvanáctník, lačník a kyčelník. Nádoby jsou dvouplášťové. Vnější stěna je skleněná a vnitřní je silikonová.[30] Prostor mezi vnitřní a vnější stěnou je naplněn vodou. Tlak vody, kterým působí na stěny nádob, je 0,5 barů. Díky tomu jsou simulovány peristaltické pohyby gastrointestinálního traktu. Mezi jednotlivými nádobami jsou dialyzační membrány. Simuluje se pasivní transport léčivé látky. V jednotlivých nádobách je odlišné složení disolučního média s různou hodnotou pH, obsahující potřebné enzymy a další kofaktory pro simulaci fyziologického prostředí. Odběr vzorků lze provádět z jakékoliv části přístroje. Někdy může být problematický průchod přes ventily. Tento model je považován za doposud nejkomplexnější disoluční zařízení.[28]

Dynamický model žaludku se používá zejména v potravinářství, ale díky možnosti simulace fyziologického prostředí žaludku (složení žaludečních šťáv, síla kontrakcí žaludku, čas průchodu) by mohl najít uplatnění i ve farmacii. V první části modelu (fundus) je obsah nádoby promícháván pomocí kontrakcí, které vyvolává tlak vody mezi vnější a vnitřní horní části přístroje. Enzymy a žaludeční kyseliny jsou přidávány dávkovačem, který plave na hladině. Následně prochází obsah nádoby přes antrum, kde je mechanicky rozmělňován a odchází přes elastický prstenec z antra systémem ventilů. Celý systém je řízen počítačem.[28]

V literatuře je popsána řada disolučních modelů napodobujících v různé míře fyziologické prostředí gastrointestinálního traktu. Tyto nové modely mají uplatnění především ve výzkumu a vývoji. Disoluční testy by však měly zůstat standardním *in vitro* testem disoluce léčivých látek z léčivého přípravku. Pro kontrolu kvality léčivých přípravků zůstávají závazné lékopisné disoluční metody.

6.2.2 Disoluční kapaliny

Obvykle se jako disoluční médium používá vodné prostředí. Čištěná voda se může použít jen v případě, že na disoluci nemá vliv hodnota pH. Složení použité disoluční kapaliny je dáno fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčivých, ale i pomocných látek. Disoluční kapalina má co nejvíce napodobovat fyziologické prostředí, zejména hodnotu pH a vliv trávicích šťáv. Po perorálním podání léčivý přípravek prochází gastrointestinálním traktem s proměnlivou hodnotou pH, proto je nejvhodnější využívat disoluční metody s měnícími se hodnotami pH.[31] V opodstatněných případech se kromě látek, které upravují pH, přidávají k disolučnímu médiu i látky vykazující enzymovou aktivitu, látky povrchově aktivní, nebo i další anorganické a organické látky.

Mezi média doporučená lékopisem patří roztoky kyseliny chlorovodíkové a chloridu sodného, fosforečnanové nebo acetátové tlumivé pufry s různými hodnotami pH (Tab. 2). Dále se používá simulovaná střevní tekutina pH 6,8 a simulovaná žaludeční tekutina.[25]

Tab. 2: Doporučená disoluční média dle Českého lékopisu 2017 [25]

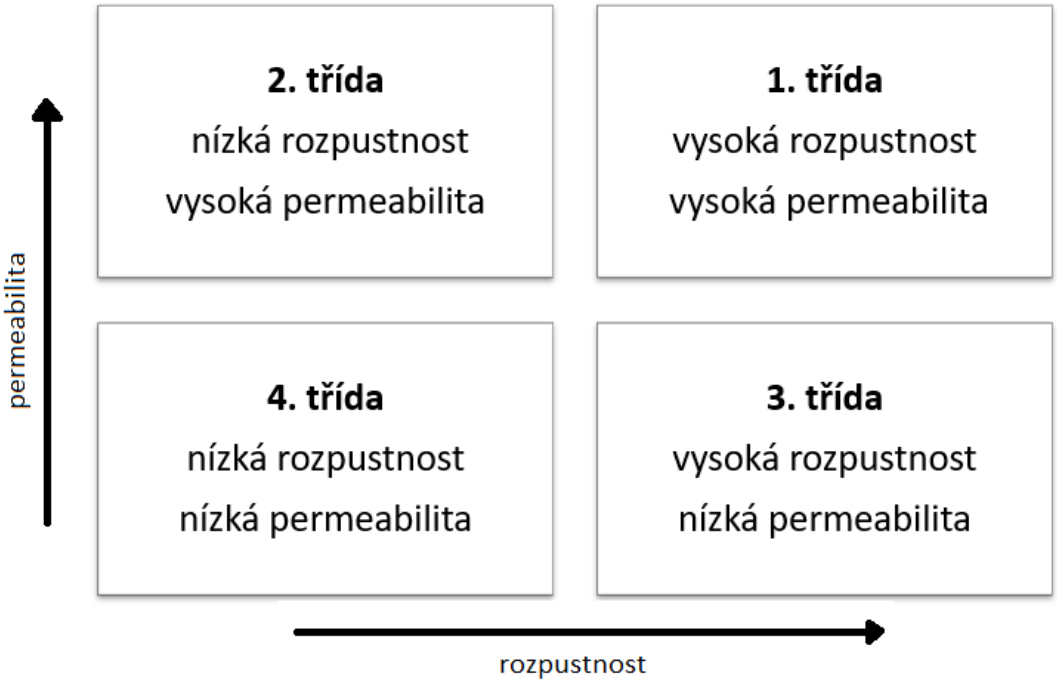
pH	Disoluční médium
1,0	HCl
1,2	NaCl, HCl
1,5	NaCl, HCl
4,5	Tlumivý roztok fosforečnanový nebo acetátový
5,5 a 5,8	Tlumivý roztok fosforečnanový nebo acetátový
6,8	Tlumivý roztok fosforečnanový
7,2 a 7,5	Tlumivý roztok fosforečnanový

Vliv na rychlost a množství uvolněného léčiva mají tenzidy. Míra vlivu tenzidu na rychlost zaleží na jeho chemické struktuře a HLB hodnotě. Do disolučního média se přidávají nejčastěji cetyltrimethylamonium bromid, laurylsulfát sodný, polysorbát 80. Při disoluci kyselých léčiv jako ibuprofen, nimesulid a mefenámová kyseliny mají největší efekt kationaktivní tenzidy. Cetyltrimethylamonium bromid zvýší uvolnění léčiva až několikanásobně v porovnání s pufrem bez tenzidu.[32] Při disolučních testech lékových forem s terbinafin-hydrochloridem, se jako vhodné disoluční médium uvádí fosforečnanový pufr pH 7,4 obsahující 0,8% polysorbátu 80.[18,19] Pro zlepšení disoluce terbinafinu byl použit ethanol v poměru 1:1 s fosforečnanovým pufrem pH 7,4.[15] Při disolučních testech tablet s polysacharidovým obalem byla do disolučního média přidána β-glukosidáza pro zrychlení štěpení obalu tablety.[31]

6.3 Tuhé disperze

Většina v praxi používaných léčiv patří do první nebo druhé třídy biofarmaceutického klasifikačního systému léčiv (Obr. 5).

Obr. 5: Biofarmaceutický klasifikační systém (BCS)



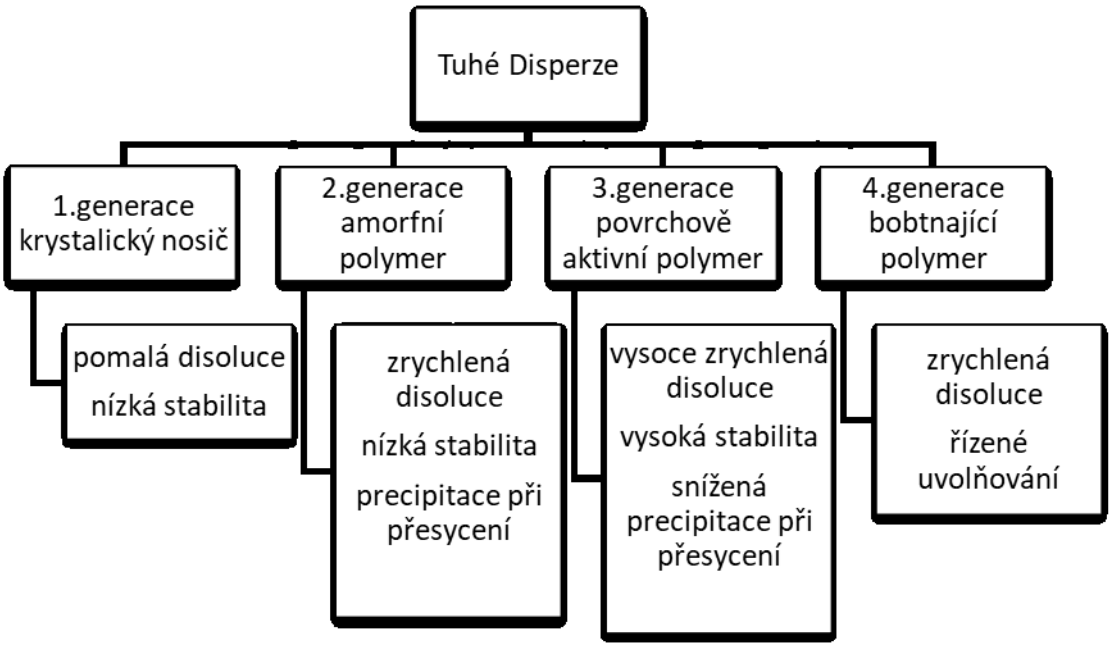
Při formulaci léčivých přípravků s léčivy z druhé třídy BSC systému je třeba hledat způsoby zvýšení jejich rozpustnost za fyziologických podmínek. Pokud není léčivá látka dostatečně rozpustná, nedochází k jejímu vstřebání, není dosaženo terapeutické hladiny léčiva v krvi a tím ani účinku. Vědecké práce realizované v oblasti zvyšování rozpustnosti léčiv přinesly mnoho možností, jak problém řešit, např. nové metody tvorby rozpustných solí, příprava proléčiv, použití nových kosolventů a tenzidů, redukce velikosti částic (mikronizace a příprava nanosytémů). Technologickým řešením špatné rozpustnosti léčiva ve vodném prostředí je i formulace tuhých (pevných) disperzí (solid dispersion).[33] Jedná se o disperze jedné nebo více biologicky aktivních látek v inertním nosiči v pevném stavu, připravené rozpouštěním, tavením nebo kombinací obou procesů. Nosičem může být krystalická nebo amorfní, v současnosti obvykle polymerní látka. Léčivo je v nosiči

dispergováno ve formě krystalických nebo amorfních částic, nebo je molekulárně dispergováno (rozpuštěno).[34] Zvýšení rozpustnosti metodou přípravy tuhých disperzí bylo realizováno již u mnoha léčiv (sulfathiazol, chloramfenikol, paracetamol, tenoxikam, flukonazol, aciklovir aj.).[35] Přes převažující pozitivní vlastnosti tuhých disperzí lze najít i některá negativa. Hlavní nevýhodou je patrně fyzikální nestabilita disperzí, která může nastat již během výrobního procesu nebo později v průběhu skladování. Jedná se zejména o fázovou separaci a krystalizaci léčivých látek ze soustavy.

6.3.1 Rozdělení tuhých disperzí

Na základě složení, zejména typu použitého nosiče léčiv, jsou tuhé disperze rozdělovány do čtyř generací.

Obr. 6: Rozdělení tuhých disperzí[36]



První generace jsou krystalické tuhé disperze obsahující ureu[37] nebo cukry jako je sorbitol nebo mannitol.[38] Tyto nosiče mají vysokou teplotu tání, pro přípravu tuhých disperzí není vhodné použít metodu tavení. Hlavní nevýhodou krystalických tuhých

disperzí je jejich vysoká termodynamická stabilita, která je příčinou nižší disoluční rychlosti léčiv v porovnání s amorfními tuhými disperzemi.[39]

Druhou generaci představují amorfní tuhé disperze, které se dále dělí na amorfní tuhé roztoky a amorfní tuhé suspenze. Nosičem je obvykle polymer buď zcela syntetický (povidon[40], polyethylenglykol, kopolymer polyvinylpyrrolidonu a vinylacetátu[41], krospovidon[42] a polymethakryláty[43]) nebo polymery založené na přírodních produktech (hydroxymethylcelulosa[44], další deriváty celulosy, kukuřičný nebo bramborový škrob[45], sacharosa, trehalosa, inulin[46]). Léčivo je v nosiči dispergováno ve formě velmi malých částic a je v supersaturovaném stavu. Nízká termodynamická stabilita amorfních tuhých disperzí zvyšuje rychlost disoluce léčiv.[39]

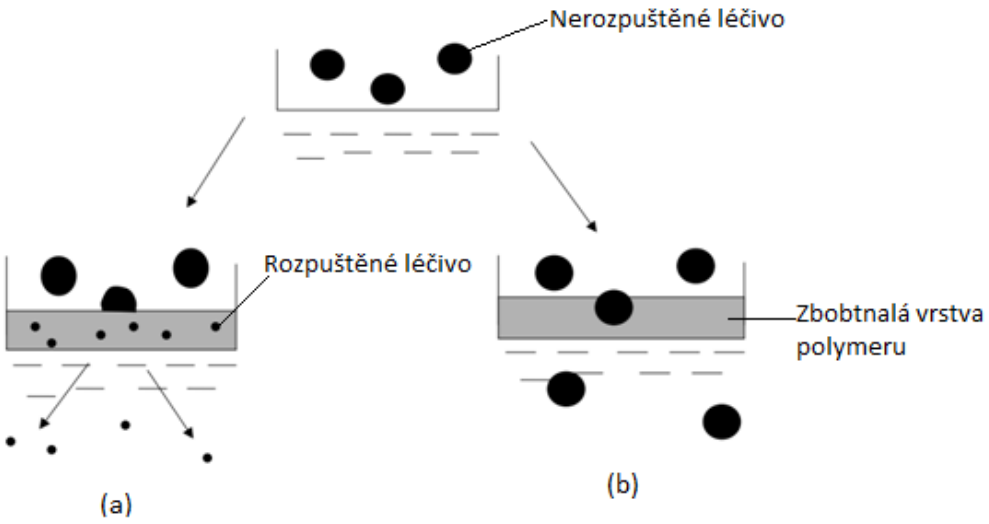
Pro třetí generaci tuhých disperzí je charakteristická přítomnost tenzidu. Povrchově aktivní může být nosič nebo je přidán tenzid jako stabilizátor. Tím se zlepší disoluční profil a fyzikální a chemická stabilita léčiva. Rovněž se sníží riziko precipitace a rekrystalizace léčiva během přípravy nebo skladování. Jedním z nejčastěji používaných tenzidů je poloxamer.[47] laurylsíran sodný [48], polysorbát 80 [49] aj.

Čtvrtá generace představuje tuhé disperze s řízeným uvolňováním léčiva. Tyto tuhé disperze obsahují ve vodě špatně rozpustná léčiva s krátkým biologickým poločasem, proto je třeba nejen zlepšit rozpustnost léčiva, ale také prodloužit uvolňování léčiva. Jako nosiče se používají ve vodě nerozpustné polymery (ethylcelulosa,[50] polyethylenglykol a karbomery [51]), které prodlouží uvolňování léčiva. Tím můžeme snížit frekvenci dávkování, sníží se vedlejší nežádoucí účinky a zlepšuje se tak i pacientova compliance.

6.3.2 Uvolnění léčiva z tuhých disperzí

Uvolňování léčiva z tuhých disperzí je určeno buď chováním polymerního nosiče, anebo vlastnostmi léčiva. Nosičem řízené uvolňování se uplatňuje u tuhých disperzí, jejichž nosič se v hydrofilním prostředí rozpouští nebo bobtná, léčivo se ve zbobtnalém polymeru rozpouští a difunduje do okolního prostředí. Pokud léčivo není rozpustné ve zbobtnalém polymeru, je uvolňování léčiva z tuhé disperze ovlivněno vlastnostmi léčiva (velikost částic, rozpustnost léčiva, polymorfní vlastnosti). Často se uplatňují oba mechanismy současně.[52]

Obr. 7: Schematické znázornění nosičem řízeného uvolňování (a) a léčivem řízeného uvolňování (b).[52]



6.3.3 Metody přípravy tuhých disperzí

Existují tři základní metody přípravy: tavením, rozpouštěním a metoda kombinovaná. Příprava tavením je založena na společném roztavení léčiva a nosiče při nejnižší teplotě, kdy vzniká eutektická směs, poté je tekutina ochlazena různými technikami, například mícháním v ledové lázni,[53] rozprostřením v tenké vrstvě na nerezovou ocel a ochlazením vzduchem či vodou,[54] vložením do desikátoru v Petriho misce[55] nebo ponořením do tekutého dusíku.[56] Výhodou této metody je, že k jejímu provedení nepotřebujeme rozpouštědlo. Naopak hlavní nevýhoda pramení z principu metody. Nutné je, aby léčivo a nosič byly kompatibilní a mísitelné a mohla tak vzniknout homogenní směs. Vhodný nosič tak musí mít obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako léčivo. Nejčastěji používané nosiče jsou polyethylenglykol a poloxamer. Další limitací metody je také nutná termodynamická stabilita léčiva a nosiče při vyšší teplotě.[39]

Druhou metodou je metoda rozpouštění. Tuhá disperze se získá evaporací rozpouštědla z roztoku obsahujícího nosič a léčivo. Oproti předchozí metodě zde

není riziko rozpadu léčiva či nosiče při vyšší teplotě, protože evaporace nemusí probíhat za vysoké teploty. Při této metodě je důležitý výběr vhodného rozpouštědla, ve kterém se rozpouští léčivo i nosič. Nejčastěji používaná rozpouštědla jsou methanol, ethanol, ethylacetát, methylen chlorid, aceton, voda a jejich směsi.[57] Nevýhodou této metody jsou právě rozpouštědla, která nikdy nelze z tuhé disperze úplně odstranit. Zbytková rozpouštědla mohou snížit biokompatibilitu přípravku. Dalšími nevýhodami jsou zátěž životního prostředí a vysoká cena přípravy. Stejně jako u přípravy tavením, i zde je klíčovou fází tuhnutí disperze. Tato fáze by měla být co nejrychlejší, aby byl zachován amorfní stav léčiva. Je několik metod odstranění rozpouštědla, například zahřívání,[50] sušení ve vakuu,[58] evaporace,[59] sprejové sušení,[60] lyofilizace,[61] sprejové sušení mrazem,[44] ultra rychlé mrazení.[62]

Třetí metoda přípravy je kombinací dvou předchozích. Léčivo rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle je smíseno s roztaveným nosičem. Následuje odstranění rozpouštědla a zformování do tuhé disperze. Smísení léčiva a nosiče je možné realizovat při nižší teplotě. Vzniká tak menší riziko tepelné degradace. Mísitelnost rozpouštědla je lepší s roztaveným nosičem než s neroztaveným. Nejvhodnější metoda přípravy tuhé disperze je vždy vybrána na základě fyzikálně-chemických vlastností léčiva a nosiče.[39]

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Použité přístroje

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

Biological termostat BT 50

Digitální stolní pH metr HANNA HI 221

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

Horkovzdušná sušárna Memmert

Lázně s integrovanou třepací platformou SW 22 (Julabo)

Spektrofotometr SPECORD 205 Analytik Jena

UHPLC systém Liquid Chromatograph – Nexera X2 – Shimadzu, Japonsko

Ultrazvuková čistička SONOREX SUPER Bandelin

Vakuová sušárna BINDER

7.2 Použité suroviny

Čištěná voda, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Fosfátový tlumivý roztok pH 7,4 tablety, Sigma Life Science

Terbinafin- baze, Farmaceutická fakulta Hradec Králové

Terbinafin- hydrochlorid, Zentiva

Triethyl citrát – Sigma Aldrich chemistry

Větvené polyestery (5P, 3T) Farmaceutická fakulta Hradec Králové

7.3 Charakterizace polyesterových nosičů

Polymery použité v diplomové práci byly syntetizovány na Katedře farmaceutické technologie FaF UK stupňovou kopolymerací bez použití katalyzátorů. Jsou tvořeny ekvimolárním množstvím kyseliny D,L-mléčné a glykolové a větvené na centrální molekule pentaerythritolu (P) nebo tripentaerythritolu (T).

Tab. 3: Charakteristiky polyesterových nosičů [63]

Označení	Větvící monomer	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	M_w/M_n	g´(M_w)	Tg (°C)
3T	3 % tripentaerythritol	5 300	17 400	3,97	0,43	27,6
5P	5 % pentaerythritol	2 000	2 700	1,35	0,67	19,0

M_n	číselně střední molární hmotnost
M_w	hmotnostně střední molární hmotnost
M_w/M_n	index polydisperzity
g´	stupeň větvení
T_g	teplota skelného přechodu

7.4 Příprava tuhých disperzí

Pro účely experimentální části práce byly připraveny metodou tavení tuhé disperze o hmotnosti 5,00 g. Tuhé disperze se skládaly z polyesteru 5P nebo 3T, terbinafin-hydrochloridu (Ter-HCl) nebo terbinafinu baze (Ter-baze). Některé tuhé disperze byly plastifikovány triethyl citrátem (TEC) v koncentraci 30 %. Přesné složení testovaných tuhých disperzí uvádí Tab. 4.

Polymer byl rozdrobněn v porcelánové třence, potřebné množství bylo naváženo do vytárované kádinky a roztaveno v horkovzdušné sušárně při 80 °C. Bylo odváženo léčivo a homogenně inkorporováno do roztaveného polymeru. Při přípravě plastifikovaných tuhých disperzí byl triethyl citrát zahřát na teplotu 40 °C a přidán k roztavenému polymeru. Soustava byla důkladně zhomogenizována.

Tab. 4: Složení tuhých disperzí

Polyester	Plastifikátor	Léčivo	
5P	0	Ter-HCl	10 %
	30 % TEC	Ter-HCl	10 %
	0	Ter-HCl	20 %
3T	0	Ter-HCl	10 %
	0	Ter-baze	10 %

5P	polyester PLGA větvený na pentaerythritolu
3T	polyester PLGA větvený na tripentaerythritolu
TEC	triethyl citrát
Ter-HCl	terbinafin-hydrochlorid
Ter-baze	terbinafin baze

7.5 Příprava terbinafinu baze

12,0 g terbinafinu hydrochloridu bylo rozpuštěno v 3 000 ml čištěné vody 80 °C za použití ultrazvukové lázně a zfiltrováno. Byl přikapáván 10 % roztok amoniaku do dosažení hodnoty pH 7,0. Hodnota pH byla průběžně kontrolována digitálním pH-metrem. Z roztoku byla vysrážena baze terbinafinu. Tekutina byla dekantována a baze terbinafinu byla vysušena ve vakuové sušárně.

7.6 Disoluční testy

Pro disoluční testy byl připraven fosforečnanový tlumivý roztok pH 7,4 rozpuštěním jedné tablety v 200,0 ml čištěné vody. Uchovávaný byl ve skleněné nádobě se šroubovacím víčkem v chladném prostředí (2-8°C). Z předem připravených tuhých disperzí (viz. kap. 7.4) bylo do vialek odváženo vždy 200,0 mg. Dno vialek bylo zahřáto, aby se vytvořila tenká vrstva. Bylo přidáno 15,0 ml disolučního média a vialky byly umístěny do lázně s integrovanou třepací platformou. Disoluční testy probíhaly při teplotě 37,0 °C a míchání horizontálním pohybem po dráze 22 mm s frekvencí 50 kmitů/min.

V časových intervalech 1-2-3-4-7-10-17 dnů bylo odebráno disoluční médium a nahrazeno novým. V odebraných vzorcích bylo stanoveno množství uvolněného léčiva. Disoluční test byl proveden triplicitně.

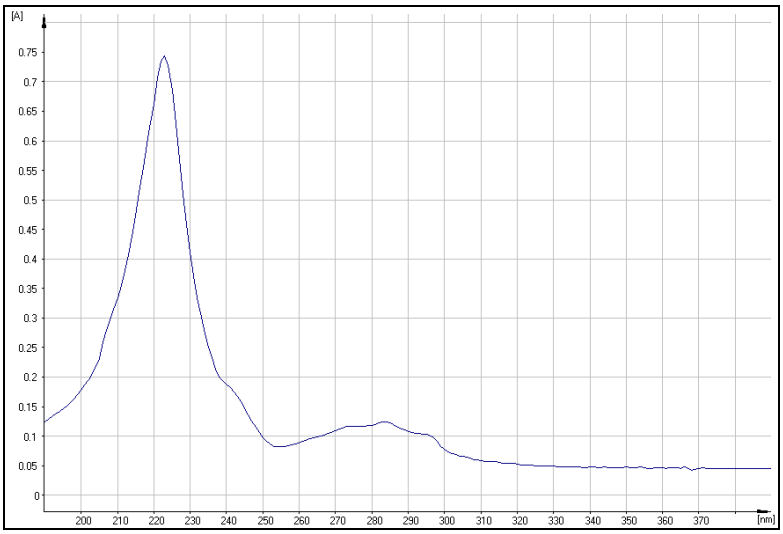
7.7 Stanovení množství uvolněného léčiva

Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu a terbinafinu baze bylo stanoveno spektrofotometricky na Katedře farmaceutické technologie a ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) ve spolupráci s Katedrou analytické chemie.

7.7.1 Spektrofotometrické stanovení

Z absorpčního spektra terbinafinu v rozmezí vlnových délek 190 až 390 nm (Obr. 8) bylo zjištěno absorpční maximum při vlnové délce 223 nm.

Obr. 8: Absorpční spektrum terbinafinu

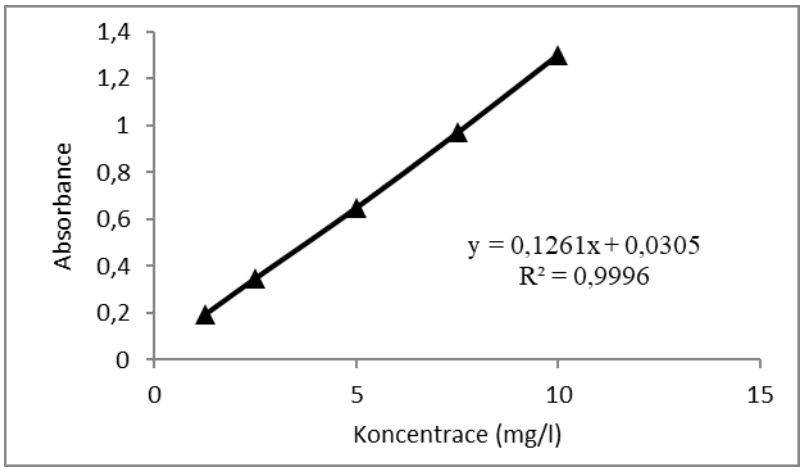


Byl připraven zásobní roztoky terbinafin-hydrochloridu ve fosforečnanovém pufru o koncentraci 50 mg/l. Tento zásobní byl roztok naředěn na nižší koncentrace a byly změřeny hodnoty absorbance (Tab. 5). Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační přímka, zjištěna rovnice kalibrační přímky a hodnota korelačního koeficientu. Z rovnice kalibrační přímky bylo vypočítáno množství uvolněného léčiva v daném časovém intervalu, procentuální podíl z celkového množství terbinafinu obsaženého v tuhé disperzi a kumulativní procenta.

Tab. 5: Koncentrace a absorbance roztoků terbinafin-hydrochloridu

c (mg/l)	A
10,00	1,3017
7,50	0,9690
5,00	0,6494
2,50	0,3488
1,25	0,1945

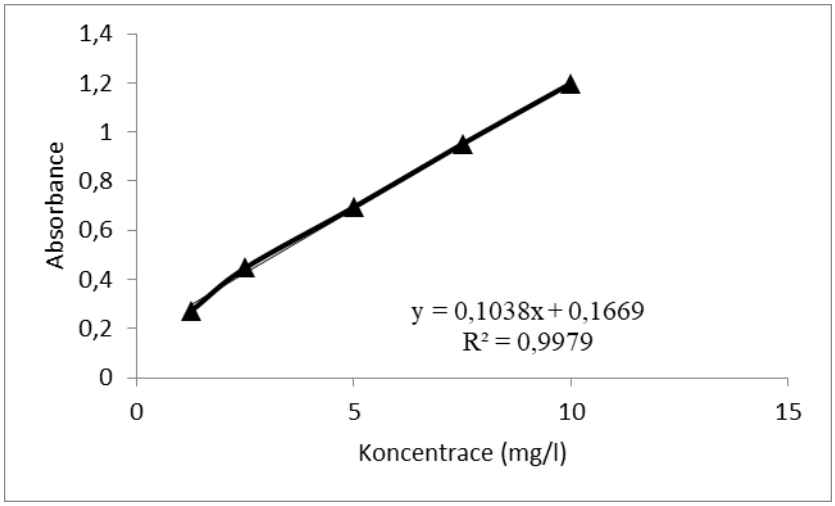
Obr. 9: Kalibrační přímka terbinafin-hydrochloridu



Tab. 6: Koncentrace a absorbance roztoků terbinafinu baze

c (mg/l)	A
10,00	1,1949
7,50	0,9499
5,00	0,6935
2,50	0,4474
1,25	0,2728

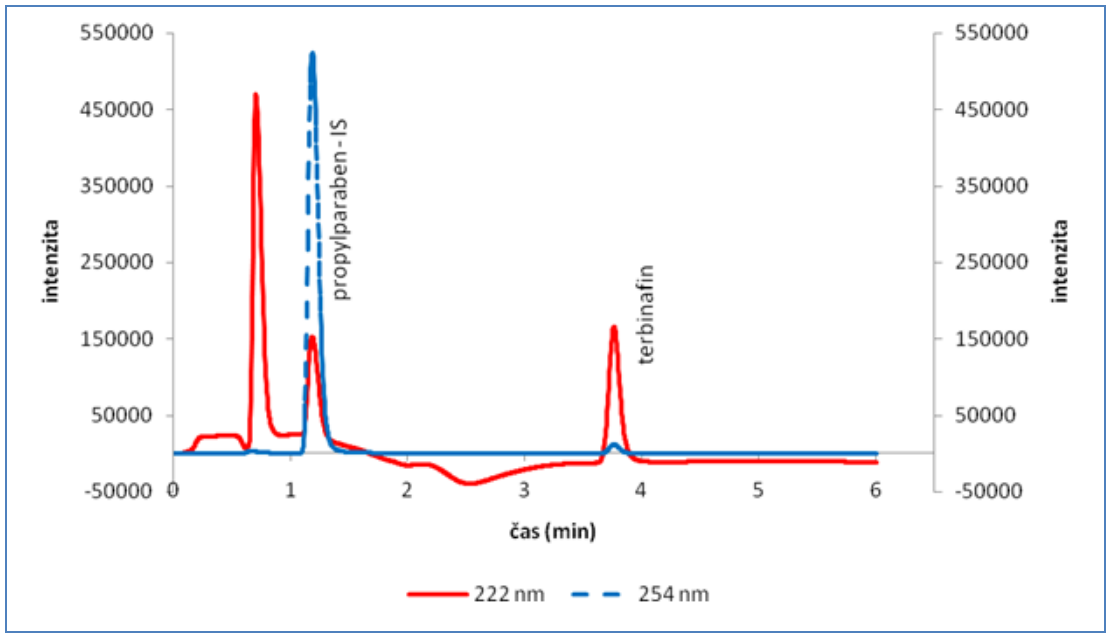
Obr. 10: Kalibrační přímka terbinafinu baze



7.7.2 UHPLC stanovení terbinafinu

Stanovení terbinafinu a jeho tří rozkladných produktů bylo realizováno na Katedře analytické chemie. Byla použita metoda UHPLC. Optimální chromatografické podmínky jsou shrnuty v Tab. 7.

Obr. 11: Ukázka chromatogramu testovaných vzorků



Tab. 7: Optimální chromatografické podmínky pro stanovení terbinafinu

Analytická kolona	Kinetex^{TM} 1,7 µm – Bifenyl 100A (50 x 2,1 mm)	
Mobilní fáze	Pufr : methanol (25:75)	
Složení roztoku pufru	citrátový (0,01 M) : fosfátový (0,02 M) pufr (1:1)	
Průtoková rychlost (gradient)	Čas [min]	Průtoková rychlost [ml/min]
	0,00 – 1,39	0,2
	1,40 – 5,0	0,6
	5,1 – 6,0	0,2
pH	5,0	
Vlnová délka	222 nm a 254 nm	
Vnitřní standard	propylparaben	
Nastřikovaný objem	0,5 µl	
Retenční čas terbinafinu	4,2 min	
Tlak	55 MPa	
Teplota	25 °C	
Celková délky analýzy	do 6 min	

8 VÝSLEDKY

8.1 Liberace terbinafinu z polyesteru 3T

8.1.1 Spektrofotometrické stanovení uvolněného léčiva

Tab. 8: Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (vzorek A)

Čas [dny]	A	Ředění	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,8967	1	0,1030	2,34	2,34
2	0,9389	1	0,1081	2,66	5,00
3	0,6392	5	0,3620	2,76	7,76
4	0,5692	5	0,3204	2,42	10,18
7	0,7397	20	1,6872	14,35	24,53
10	0,9281	50	5,3386	27,05	51,58
17	0,9865	30	3,4116	35,19	86,77

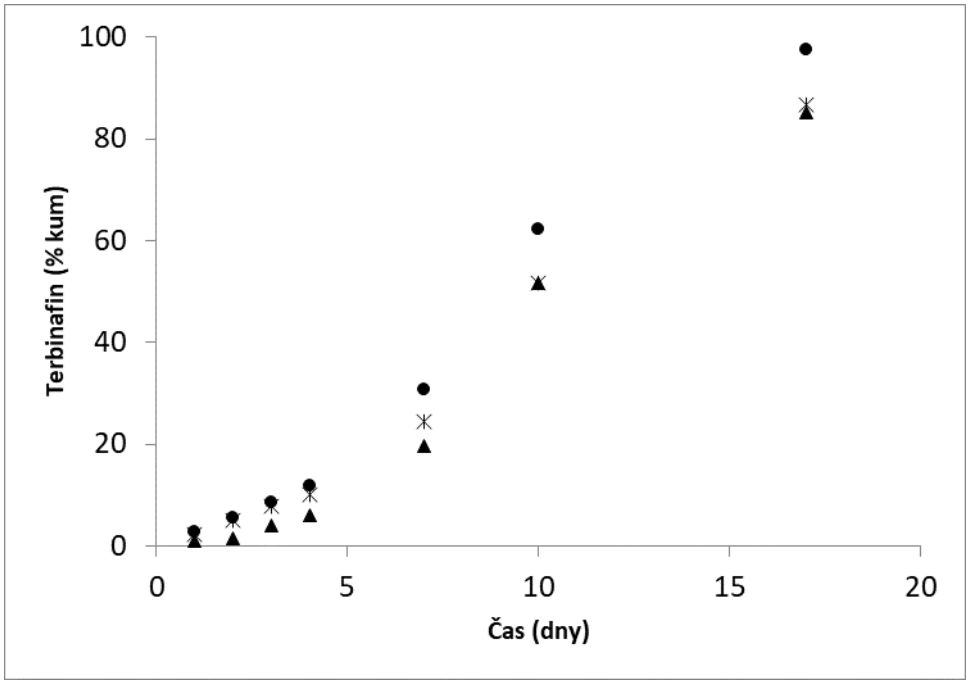
Tab. 9: Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (vzorek B)

Čas [dny]	A	Ředění	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,6370	5	0,3607	0,89	0,89
2	0,7173	5	0,4085	0,71	1,60
3	0,7449	5	0,4249	2,35	3,95
4	0,6562	5	0,3721	2,08	6,03
7	0,7472	20	1,7051	13,58	19,61
10	0,8148	50	4,6648	32,09	51,70
17	1,0486	30	3,6332	33,54	85,24

Tab. 10: Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (vzorek C)

Čas [dny]	A	Ředění	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,7135	5	0,4062	2,64	2,64
2	0,7585	5	0,4330	2,81	5,45
3	0,8631	5	0,4952	3,22	8,67
4	0,8701	5	0,4994	3,25	11,92
7	0,9866	20	2,2746	18,89	30,81
10	0,9492	50	5,4641	31,51	62,22
17	0,9956	30	3,4441	35,4	97,62

Obr. 12: Průběh liberace terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (spektofotometrické stanovení) - vzorky A, B, C



Tab. 11: Množství uvolněného terbinafinu baze z polyesteru 3T (vzorek A)

Čas [dny]	A	Ředění	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,8387	5	0,4854	3,40	3,40
2	0,8619	5	0,5022	3,58	6,98
3	1,1063	5	0,6788	5,45	12,43
4	0,9203	20	2,1775	15,24	27,67
7	0,5090	20	0,9887	11,86	39,53
10	0,7740	50	4,3866	25,77	65,30
17	1,1086	25	3,4021	23,81	89,11

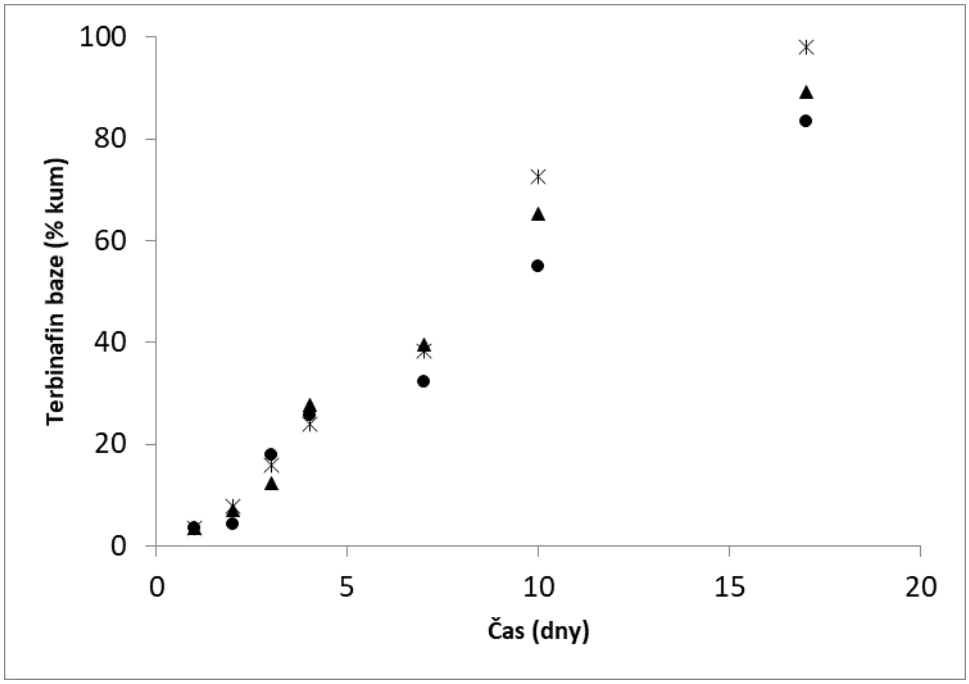
Tab. 12: Množství uvolněného terbinafinu baze z polyesteru 3T (vzorek B)

Čas [dny]	A	Ředění	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,8805	5	0,5156	3,61	3,61
2	0,9774	5	0,5856	4,10	7,71
3	0,5698	20	1,1645	8,15	15,86
4	0,5671	20	1,1566	8,1	23,96
7	0,6362	20	1,3564	14,27	38,23
10	0,9414	50	5,5961	34,39	72,62
17	0,9414	50	5,5961	25,38	98,00

Tab. 13: Množství uvolněného terbinafinu baze z polyesteru 3T (vzorek C)

Čas [dny]	A	Ředění	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,8381	5	0,4850	3,39	3,39
2	0,9774	5	0,5856	0,94	4,33
3	0,8404	20	1,9465	12,62	17,95
4	0,8404	20	1,9465	7,67	25,62
7	0,2922	20	0,3621	6,56	32,18
10	0,6984	50	3,8403	22,86	55,04
17	1,0989	30	4,0405	28,28	83,32

Obr. 13: Průběh liberace terbinafinu baze z polyesteru 3T (spektofotometrické stanovení) – vzorky A, B, C



8.1.2 UHPLC stanovení uvolněného léčiva

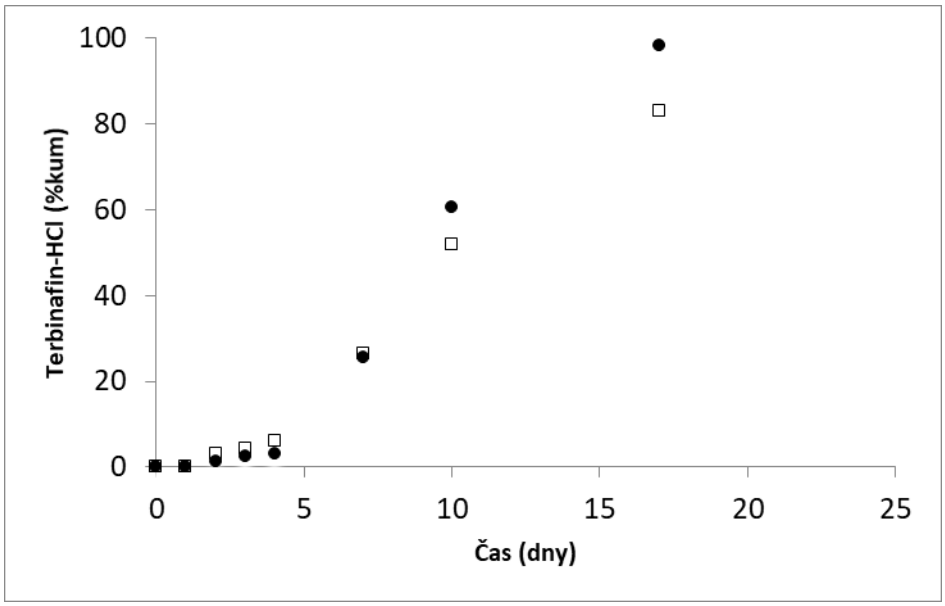
Tab. 14: Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (vzorek A)

Čas (dny)	c (mg/ml)	Ter-HCl (mg)	kum (mg)	Ter-HCl (%)	%kum
1	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
2	0,018	0,270	0,270	1,34	1,34
3	0,017	0,255	0,525	1,10	2,44
4	0,011	0,165	0,690	0,80	3,24
7	0,298	4,470	5,160	22,38	25,62
10	0,467	7,005	12,165	35,05	60,67
17	0,499	7,485	19,650	37,46	98,13

Tab. 15: Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (vzorek B)

Čas (dny)	c (mg/ml)	Ter-HCl (mg)	kum (mg)	Ter-HCl (%)	%kum
1	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
2	0,042	0,630	0,630	3,11	3,11
3	0,017	0,255	0,885	1,25	4,36
4	0,024	0,360	1,245	1,76	6,12
7	0,267	4,005	5,250	20,30	26,42
10	0,338	5,070	10,320	25,33	51,75
17	0,417	6,255	16,575	31,28	83,03

Obr. 14: Průběh liberace terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 3T (UHPLC stanovení)



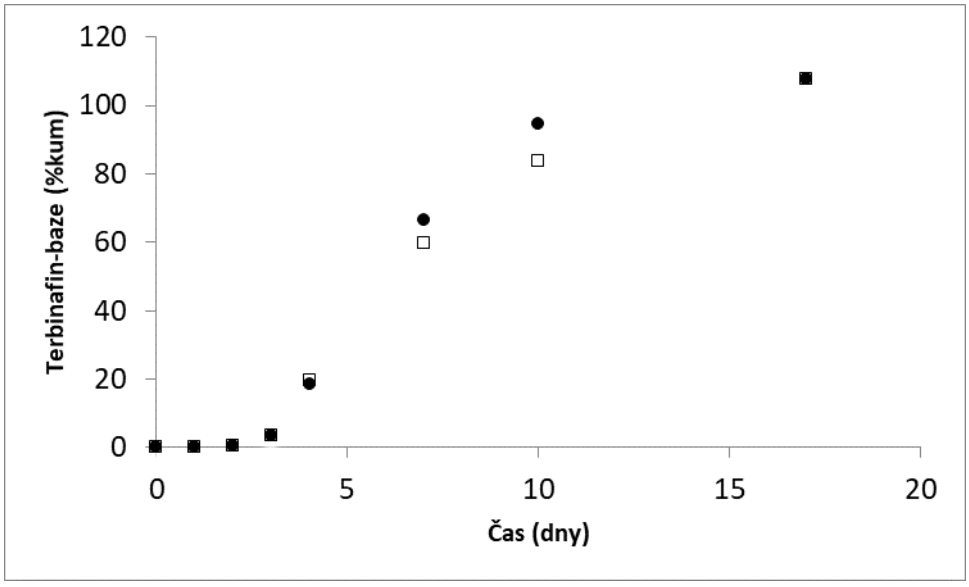
Tab. 16: Množství uvolněného terbinafinu baze z polyesteru 3T (vzorek A)

Čas (dny)	c (mg/ml)	Ter-HCl (mg)	kum (mg)	Ter-HCl (%)	%kum
1	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
2	0,009	0,135	0,135	0,65	0,65
3	0,038	0,570	0,705	2,86	3,51
4	0,199	2,985	3,690	14,94	18,45
7	0,642	9,630	13,320	48,12	66,57
10	0,374	5,610	18,930	28,03	94,60
17	0,175	2,625	21,555	13,11	107,71

Tab. 17: Množství uvolněného terbinafinu baze z polyesteru 3T (vzorek B)

Čas (dny)	c (mg/ml)	Ter-HCl (mg)	kum (mg)	Ter-HCl (%)	%kum
1	0,000	0,000	0,000	0,00	0,00
2	0,007	0,105	0,105	0,53	0,53
3	0,039	0,585	0,690	2,91	3,44
4	0,215	3,225	3,915	16,13	19,57
7	0,536	8,040	11,955	40,18	59,75
10	0,318	4,770	16,725	23,84	83,59
17	0,322	4,830	21,555	24,14	107,73

Obr. 15: Průběh liberace terbinafinu baze z polyesteru 3T (UHPLC stanovení)



8.2 Liberace terbinafinu z polyesteru 5P

Tab. 18: Množství uvolněného léčiva z polyesteru 5P s 10 % terbinafinu (n=3)

Čas [dny]	c [mg/ml]	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,02	0,30	1,50	1,47
4	0,05	0,72	3,60	5,33
7	0,26	3,86	19,26	24,59
10	0,24	3,60	18,67	43,26
15	0,35	5,19	25,95	73,81
22	0,27	4,04	20,18	99,26

Tab. 19: Množství uvolněného léčiva z polyesteru 5P s 20 % terbinafinu (n=3)

Čas [dny]	C [mg/ml]	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,02	0,33	0,82	0,82
4	0,24	3,54	8,85	9,67
7	0,37	5,51	13,76	23,43
10	0,41	6,19	15,49	38,91
15	0,55	8,24	20,59	59,50
22	1,06	15,92	39,81	99,31

Tab. 20: Množství uvolněného terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 5P plastifikovaného 30 % triethyl citrátu (n=3)

Čas [dny]	c [mg/ml]	TBF HCl [mg/15ml]	TBF HCl [%]	Kumulativní [%]
1	0,12	1,85	9,26	9,26
4	0,18	2,71	13,56	22,82
7	0,34	5,12	25,61	48,43
10	0,24	3,63	18,17	66,59
15	0,19	2,86	14,30	80,89
22	0,25	3,79	18,97	99,86

9 DISKUZE

9.1 Příprava tuhých disperzí a tenkých filmů

Větvené polyestery kyseliny D,L-mléčné a glykolové, větvené pentaerythritolem nebo tripentaerythritolem (5P, 3T), jsou za normální teploty tuhé a křehké materiály. Z reologického hlediska se jedná newtonské kapaliny s vysokou viskozitou (např. jako sklo nebo asfalt).[64] Vysoká viskozita je příčinou obtížné zpracovatelnosti polyesterů při přípravě medikovaných tuhých disperzí nebo tenkých filmů a při aplikaci těchto terapeutických systémů. Tuhé disperze se nejčastěji připravují tavením, nebo rozpuštěním a odpařením rozpouštědla. Obě metody mají své výhody a nevýhody. U metody tavením je limitujícím faktorem tepelná stabilita polymerního nosiče a léčiva, u metody rozpouštění přítomnost zbytkových rozpouštědel ve finální tuhé disperzi. Tepelná stabilita větvených polyesterů byla ověřena měřením viskozity na rotačním reometru. Byl proveden test tepelné stability při rychlosti deformaci 10 s^{-1} a teplotě 80 °C a 90 °C po dobu 20 min. Viskozita polyesterů byla konstantní.[65] Tepelná stabilita terbinafin-hydrochloridu a terbinafinu baze byla zjištěna metodou DSC. Termickou analýzou tuhých disperzí bylo potvrzeno, že při inkorporaci léčiva v koncentracích 5 až 20 % je léčivo v polymeru molekulárně dispergováno a mírně zvyšuje teplotu skelného přechodu T_g polyesteru.3,[66]

Při přípravě tuhých disperzí tavením je polyester zahřát na teplotu 80 °C, čímž je viskozita soustavy snížena a je možno jak inkorporovat léčivo, tak vytvořit tenký film o tloušťce přibližně 400 μm. Na pokožku nebo sliznici samozřejmě není možno aplikovat polymerní soustavu zahřátou na 80 °C. Snížení viskozity se dosáhne plastifikací polymeru biokompatibilním plastifikátorem. V předložené práci byl polyesterový nosič terbinafinu plastifikován triethyl citrátem v koncentraci 30 %. Triethyl citrát je účinný, biokompatibilní plastifikátor dobře mísitelný s větvenými polyestery i ve vyšších koncentracích.[64] Jako plastifikátor snižuje teplotu skelného přechodu polyesterového nosiče, snižuje viskozitu, hydrofilizuje soustavy a proto se předpokládá, že ovlivní průběh liberace terbinafinu z polyesteru 5P a 3T.

9.2 Analýza množství uvolněného terbinafinu

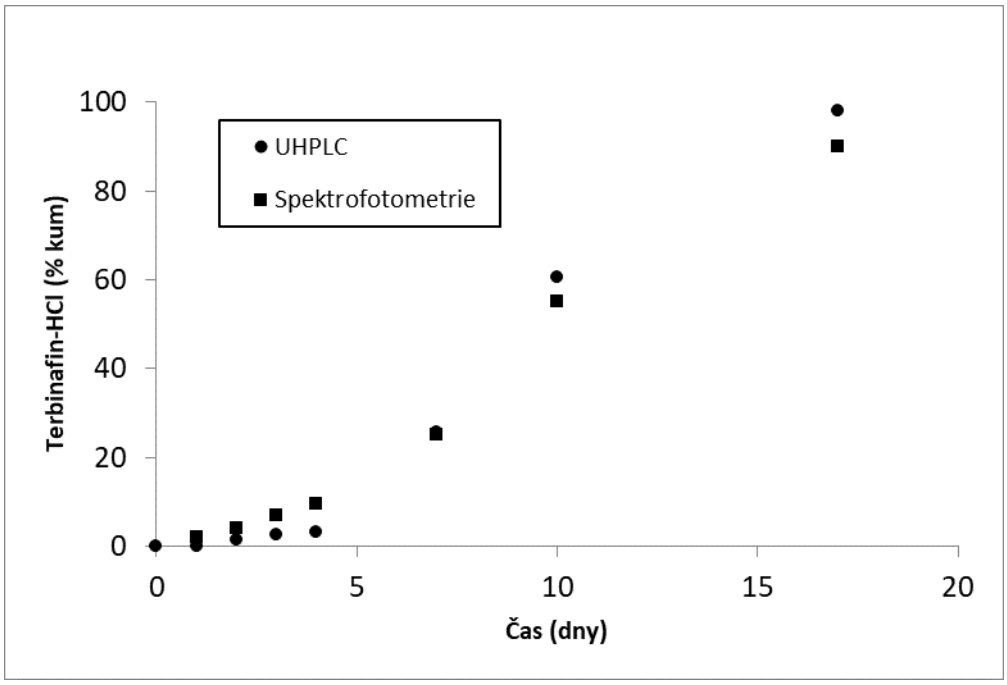
Terbinafin se v rámci BCS klasifikačního systému léčiv řadí do II. třídy mezi léčiva špatně rozpustná s dobrou permeabilitou. Špatná rozpustnost terbinafinu činí problém při disolučních testech, kdy by se jako disoluční médium pro liberaci terbinafinu mělo použít fyziologické médium. Analytické metody stanovení terbinafin-hydrochloridu jsou přehledně uvedeny v článku publikovaném v roce 2016 v Journal of Pharmaceutical Analysis.[67] Ve studiích zabývajících se liberací terbinafinu z tuhých disperzí nebo nanočástic bylo množství uvolněného terbinafinu stanoveno spektrofotometricky nebo metodou HPLC. Absorbance byla měřena při vlnové délce 281 nm[13] nebo 283 nm.[68] V předložené diplomové práci byla na základě zjištěného absorpčního maxima (Obr. 8) zvolena vlnová délka 223 nm.

Přesnější je stanovení terbinafinu metodou HPLC, a to z důvodu vyšší citlivosti a možnosti eliminace vlivu ostatních složek léčivého přípravku, které se v průběhu disoluce uvolňují do média.[69,15] Relativně nová technika je ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), která poskytuje další možnosti v oblasti kapalinové chromatografie, zejména pokud jde o zkrácení času analýzy a snížení spotřeby rozpouštědel.[70] Pro stanovení terbinafinu a jeho tří rozkladných produktů, konkrétně β-terbinafinu, Z-terbinafinu a 4-methylterbinafinu pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie, byla na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK vyvinuta metoda, která všechny čtyři strukturně podobné látky dokáže spolehlivě a bezpečně separovat. Její předností je především výrazně zkrácená délka analýzy (max. šest minut) a snížení spotřeby rozpouštědel. Optimální chromatografické podmínky jsou shrnuty v Tab. 7. U metody byl proveden test způsobilosti systému a následně i validace podle doporučení ICH a Českého lékopisu 2017. Během validačního procesu byl hodnocen detekční a kvantifikační limit, dále pak linearita, správnost, přesnost, robustnost a selektivita. Požadovaným hodnotám vyhovovaly všechny naměřené výsledky. Tato metoda byla v předložené práci použita pro stanovení množství terbinafinu uvolněného z větvených polyesterů.

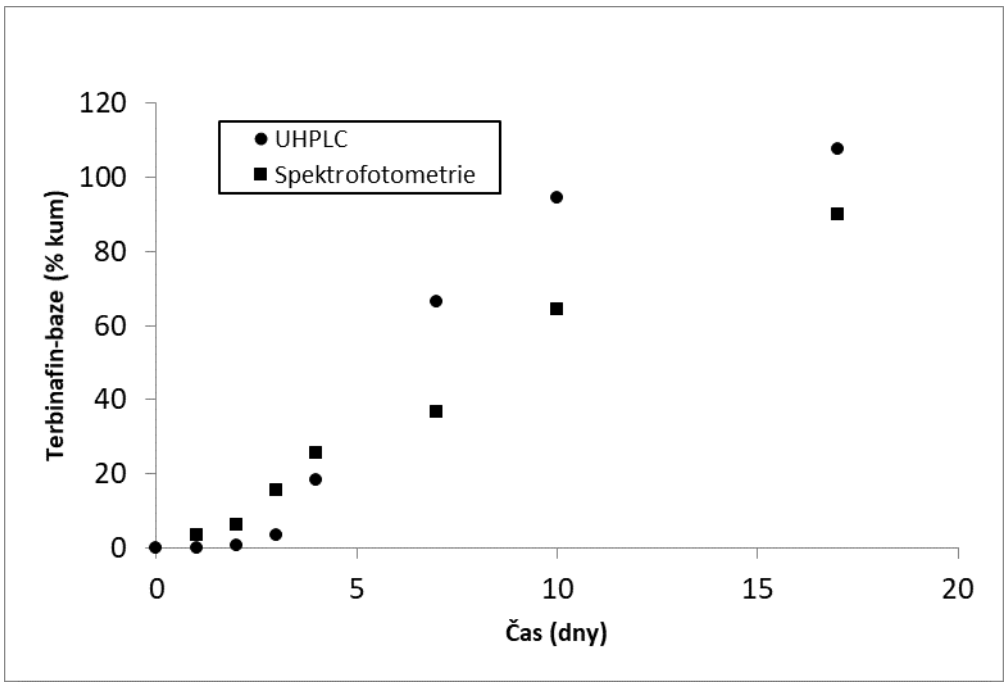
Na obr. 16 a 17 jsou porovnány výsledky spektrofotometrického stanovení množství uvolněného terbinafinu s metodou UHPLC. V případě terbinafin-hydrochloridu byly zjištěny shodné hodnoty. V případě terbinafinu baze byly od 4. dne liberace

naměřeny vyšší hodnoty metodou UHPLC, což může být dáno problémy s rozpustností léčiva. Toto zjištění je pozitivní, neboť se s ohledem na problémy při spektrofotometrickém stanovení terbinafinu předpokládaly odchylky výraznější.

Obr. 16: Porovnání dvou metod stanovení terbinafin-hydrochloridu



Obr. 17: Porovnání dvou metod stanovení terbinafinu baze

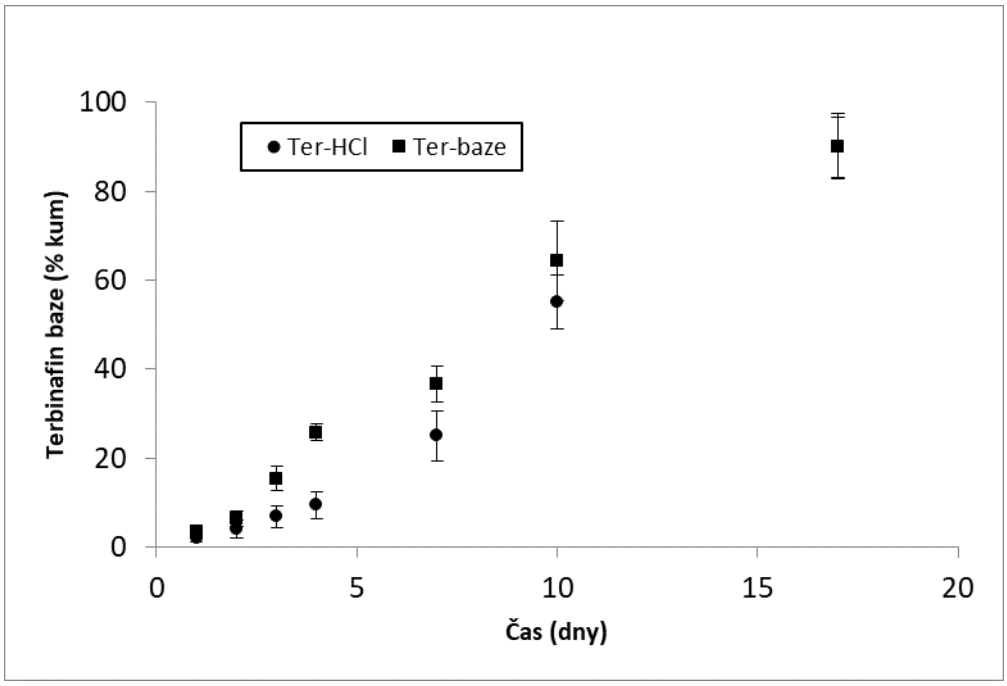


9.3 Liberace terbinafinu z větvených polyesterů

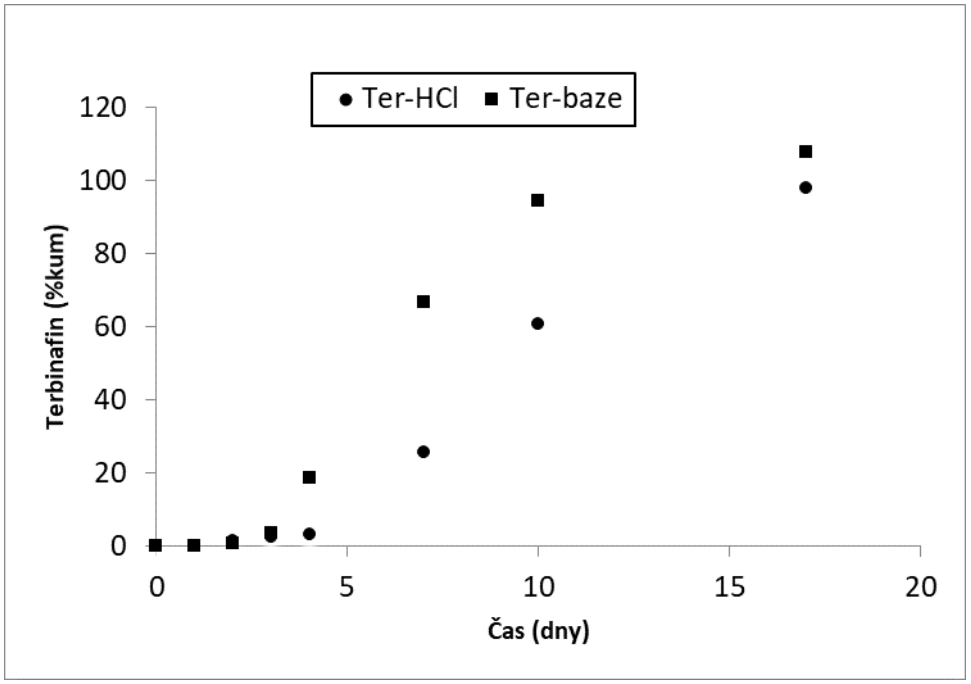
Větvené polyestery kyseliny mléčné a glykolové větvené, originálně syntetizované na Katedře farmaceutické technologie Farmaceutické fakulty UK, již byly jako nosiče léčiv testovány při formulaci mikročástic, nanočástic, tuhých disperzí, tenkých filmů či implantátů in situ.[64,71,72,73] V této práci byly pro terbinafin vybrány polyestery kyseliny D,L-mléčné a glykolové větvené na pentaerythritolu (5P) a tripentaerythritolu (3T). Polyestery se liší molární hmotností a stupněm větvení (Tab. 3). Terbinafin byl použit ve formě hydrochloridu nebo baze v koncentraci 10 % nebo 20 %.

Na všech liberačních křivkách terbinafinu z polyesteru 3T je vidět významné časové zpoždění disoluce terbinafinu (lag-time). Při spektrofotometrickém stanovení terbinafinu je patrný jednodenní lag-time u obou forem léčiva (Obr. 18). Při UHPLC stanovení je lag-time třídenní u hydrochloridu a čtyřdenní u baze terbinafinu (Obr. 19). V následující fázi se léčivo uvolňovalo po dobu 6 až 13 dnů přibližně lineárně. Celková doba liberace byla 17 dnů. Počáteční zpoždění disoluce terbinafinu je dáno špatnou rozpustností terbinafinu při pH 7,4 a nízkým stupněm bobtnání polyesteru 3T, které vyplývá z jeho molární hmotnosti a stupně větvení. Uvolňování terbinafinu nastává pravděpodobně současně s objemovou degradací polyesteru, při které se tvoří kyselé degradační produkty, což vede ke zvýšení rozpustnosti terbinafinu. Překvapující je vyšší rychlost disoluce terbinafinu baze ve srovnání s terbinafin-hydrochloridem oproti původnímu předpokladu.

Obr. 18: Porovnání průběhu liberace terbinafin-hydrochloridu a terbinafinu baze z polyesteru 3T – spektrofotometrické stanovení léčiva

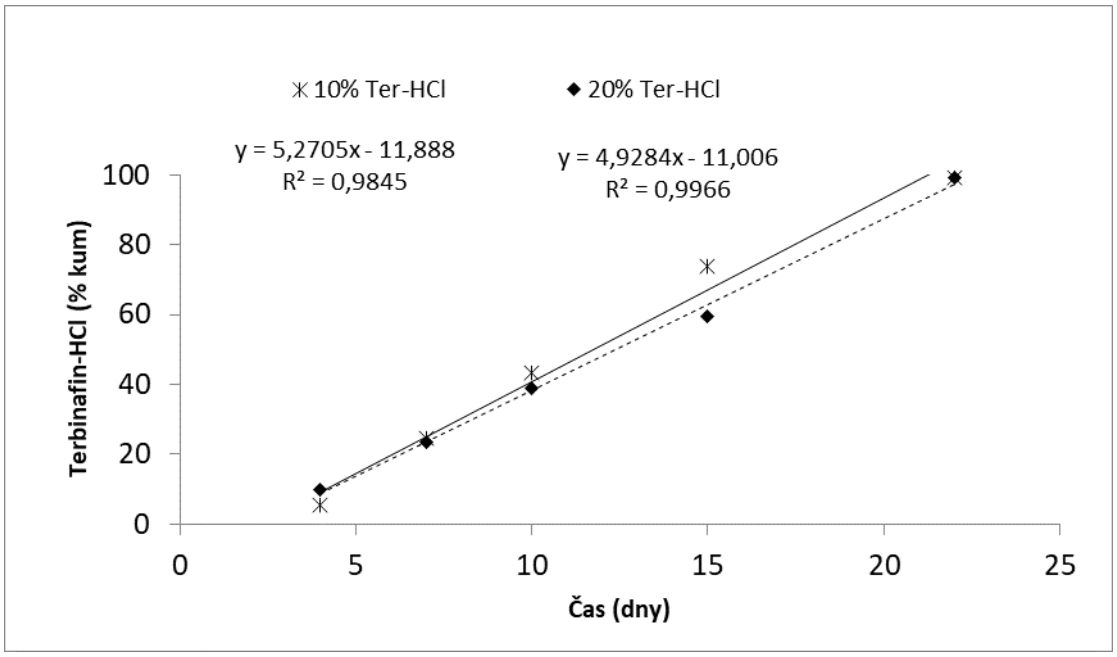


Obr. 19: Porovnání průběhu liberace terbinafin-hydrochloridu a terbinafinu baze z polyesteru 3T – UHPLC stanovení léčiva



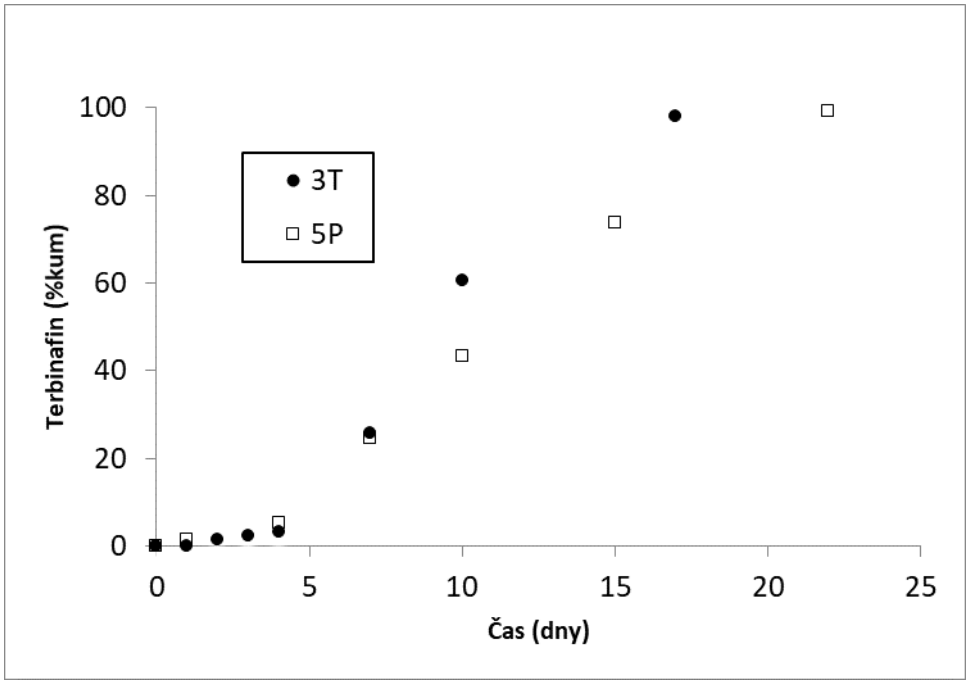
Průběh liberace terbinafinu z nosiče 5P je na Obr. 20. Jedná se o oligoester, který ve srovnání s polyesterem 3T má šest krát nižší molární hmotnost a nižší stupeň větvení (Tab. 3). Na disolučních křivkách je opět patrný lag-time, za 24 hod se uvolnilo pouze přibližně 1 % léčiva. V časovém intervalu 4 dny až 22 dnů se terbinafin uvolňoval kinetikou nultého řádu. Nebyl zjištěn vliv množství inkorporovaného léčiva na průběh disoluce.

Obr. 20: Průběh liberace terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 5P



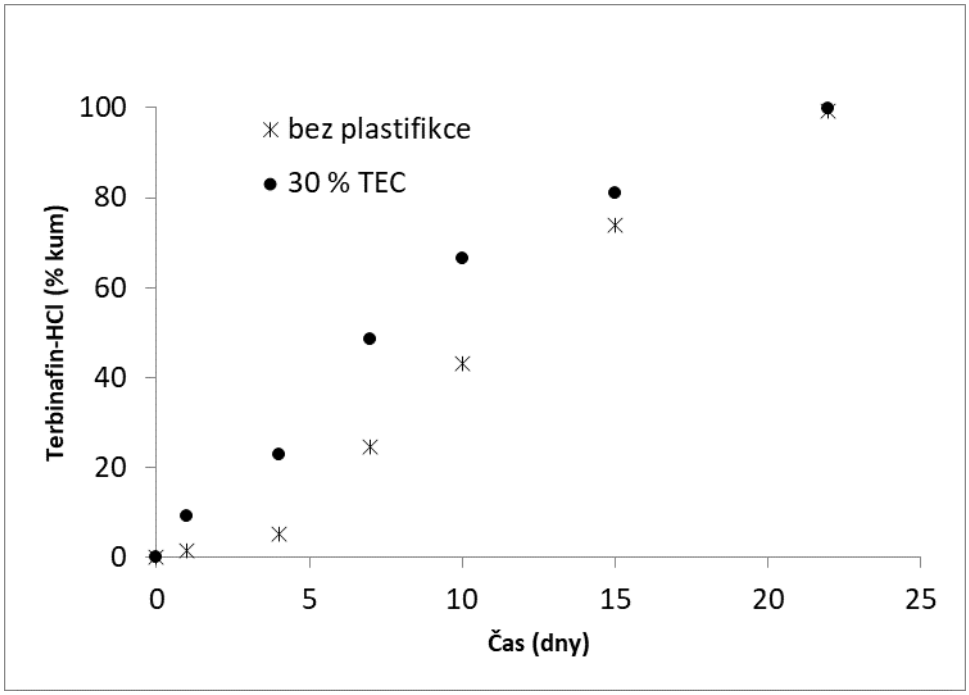
Vliv typu polyesterového nosiče na liberaci terbinafin-hydrochloridu je znázorněn na Obr. 21. Shodný je počáteční lag-time po dobu čtyř dnů a 25 % uvolněného léčiva za 7 dnů. V další fázi bylo rychlejší uvolňování terbinafinu z polyesteru 3T. Může to souviset s průběhem bobtnání polymeru s vyšší molární hmotností, ale významnějším faktorem než odlišné fyzikálně chemické charakteristiky obou polyesterů jsou fyzikálně chemické vlastnosti terbinafinu.

Obr. 21: Porovnání liberace terbinafin-hydrochloridu z polyesteru 5P a 3T



Jak je patrné na Obr. 22, disoluci terbinafinu z polyesteru 5P výrazně ovlivnila plastifikace polyesteru 30 % triethyl citrátu, zejména na počátku disoluce. Není zde lag-time, v průběhu 24 hod se uvolnilo téměř 10 % léčiva. V časovém intervalu 1 den až 10 dnů je průběh liberace lineární, dále nastává mírné zpomalení a celková doba liberace je 22 dnů.

Obr. 22: Vliv plastifikace polyesterového nosiče na průběh liberace Ter-HCl



10 ZÁVĚRY

Analýzy terbinafinu spektrofotometricky a ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografie (UHPLC) poskytují srovnatelné výsledky.
Spektrofotometrie je z hlediska přístrojového vybavení dostupnější, problémem je volba vhodné vlnové délky pro stanovení terbinafinu a získání kalibrační přímky terbinafinu v potřebném rozsahu koncentrací a fyziologickém disolučním médiu. Problémem je i nižší citlivost metody.
UHPLC umožňuje stanovení terbinafinu včetně jeho rozkladných produktů a eliminaci vlivu ostatních složek léčivého přípravku, které se v průběhu disoluce uvolňují do média. Předností je krátká doba analýzy a nízká spotřeba rozpouštědel.

Liberace terbinafinu z větvených polyesterů vykazuje počáteční zpoždění (lag-time) v délce jeden až čtyři dny. V následující fázi se léčivo uvolňuje po dobu 6 až 13 dnů přibližně lineárně a celková doba liberace je 17 dnů.
Byla zjištěna rychlejší disoluce léčiva z tenkých filmů, do kterých byl inkorporován terbinafin ve formě baze než při použití terbinafin-hydrochloridu.
Nebyl zjištěn vliv množství inkorporovaného léčiva na průběh jeho disoluce z polyesterových filmů.
Průběh liberace terbinafinu není výrazně ovlivněn molární hmotností ani stupněm větvení polyesterového nosiče.
Plastifikace polyesterového nosiče vede k eliminaci počátečního zpoždění liberace.

Z výsledků předložené diplomové práce je možno učinit jednoznačný závěr, že vhodným nosičem terbinafinu při formulaci tenkých filmů k topické aplikaci je oligoester větvený pentaerythritolem, plastifikovaný 30 % triethyl citrátu, s inkorporovaným terbinafinem ve formě baze a stanoveným metodou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

11 LITERATURA

[1] Kráčalíková M. Studium vlivu terbinafinu na teplotu skelného přechodu polyesterových matric, Hradec Králové, 2014. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 44 s.

[2] Jakubíková, H. Liberace terbinafinu z polyesterů větvených kyselinou polyakrylovou, Hradec Králové, 2017. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 51 s.

[3] Hluchníková, N. Tuhé disperze s terbinafinem, Hradec Králové, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 52 s.

[4] Poljak, V., J. Ehrmann, I. Krč. Přehled infekčních nemocí: skripta z vnitřního lékařství. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 1997. ISBN 80-7067-758-9.

[5] Gillespie, S. H., K. B. Bamford. Medical Microbiology and Infection at a Glance. 1. vydání. London: Blackwell Science, 2000. ISBN 978-1405111737.

[6] Jedličková, A., J. Mašata, a M. Skořepová. Lokální mykózy: průvodce ošetřujícího lékaře. Praha: Maxdorf, 2008. ISBN 978-80-7345-150-9.

[7] Hampl, F., S. Rádl, a J. Paleček. Farmakochemie. 3., upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-875-7.

[8] Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. PubChem Substance and Compound databases. Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4; 44(D1):D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093/nar/gkv951.

[9] Tubic-Grozdanis, M., M. B. Bolger, P. Langguth. Application of Gastrointestinal Simulation for Extensions for Biowaivers of Highly Permeable Compounds. AAPS J, 2008, 10, 213 – 226. ISSN 1550-7416.

[10] Krishnan-Natesan S. Terbinafine: a pharmacological and clinical review. Expert Opin Pharmaco, 2009, 10, 2723–2733. ISSN 1465-6566.

[11] Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. [Praha]: Státní ústav pro kontrolu léčiv, © 2010 [cit. 30. dubna 2018] Dostupné z: http://www.sukl.cz/modules/marketreport/index.php?h=index&a=search

[12] Mcclellan, K. J., L. R. Wiseman, a A. Markham. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. Drugs, 1999, 58, 179-202. ISSN 0012-6667.

[13] Celebi, N., S. Ermiş, S. Ozkan. Development of topical hydrogels of terbinafine hydrochloride and evaluation of their antifungal activity. Drug Dev Ind Pharm, 2014, 41, 631-639. ISSN 0363-9045

[14] Natrosol™ 250. [online]. [Covington, USA]: Ashland, © 2018 [cit. 7. května 2018] Dostupné z: https://www.brenntag.com/media/documents/bsi/product_data_sheets/material_science/ashland_cellulose_rheology_modifiers/natrosol_250_pds.pdf

[15] Tanrıverdi, S. T. et al. Terbinafine hydrochloride loaded liposome film formulation for treatment of onychomycosis: in vitro and in vivo evaluation. J Liposome Res, 2016, 26, 163–173. ISSN 0898-2104.

[16] Barot, B. S., P. B. Parejiya, H. K. Patel, M. C. Gohel, P. K. Shelat. Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. AAPS PharmSciTech, 2012, 13, 184-192. ISSN 1530-9932.

[17] Chen, Y.-Ch., D.-Z. Liu, J.-J. Liu, T.-W. Chang, H.-O. Ho, M.-T. Sheu. Development of terbinafine solid lipid nanoparticles as a topical delivery system. Int J Nanomed, 2012, 7, 4409-4418. ISSN 1176-9114.

[18] Gaba, B., M. Fazil, S. Khan, A. Ali, S. Baboota, J. Ali. Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. B-FOPCU, 2015, 53, 147–159. ISSN 1110-0931.

[19] Vaghasiya, H., A. Kumar, K. Sawant. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. Eur J of Pharm Sci, 2013, 49, 311–322. ISSN 0928-0987.

[20] Wavikar P., P. Vavia. Nanolipidgel for enhanced skin deposition and improved antifungal activity. AAPS PharmSciTech, 2013, 14, 222-233. ISSN 1530-9932.

[21] Hrabálek, A., K. Vávrová. Lze překonat kožní bariéru? Prakt lékáren, 2005, 1, 8-11. ISSN 1801-2434.

[22] Čihák, R. Anatomie 3. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004, ISBN 978-80-247-1132-4.

[23] Kotingová, L., L. Borská, Z. Fiala. Testování transdermální absorpce chemických látek in vitro. Chem Listy, 2009, 103, 533-539. ISSN 0009-2770

[24] Cui, L., J. Jiang, L. Zhang, Ch. Song, W. Zhao, J. Lin. Enhancing effect of electret on transdermal drug delivery. J Electrostat, 2001, 51, 153-158. ISSN 0304-3886.

[25] Český lékopis 2017, 1. Díl. První vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2017. ISBN 859-404-924-045-6.

[26] Čulen, M., A. Řezáčová, J. Jampílek, J. Dohnal. Designing a dynamic dissolution method: a review of instrumental options and corresponding physiology of stomach and small intestine. J Pharm Sci, 2013, 102, 2995-3017, ISSN 1520-6017.

[27] Vardakou, M., A. Mercuri, S. A. Barker, D. Q. M. Craig, R. M. Faulks, M. S. J. Wickham. Achieving Antral Grinding Forces in Biorelevant *In Vitro* Models: Comparing the USP Dissolution Apparatus II and the Dynamic Gastric Model with Human *In Vivo* Data. AAPS PharmSciTech, 2011, 12, 620-626. ISSN 1530-9932.

[28] Gruberová, L., B. Kratochvíl. Disoluční přístroje pro simulaci in vivo podmínek. Chem Listy, 2015, 109, 908-912. ISSN 0009-2770.

[29] Carino, S. R., D. C. Sperry, M. Hawley. Relative bioavailability of three different solid forms of PNU-141659 as determined with the artificial stomach-duodenum model. J Pharm Sci, 2010, 99, 3923-3930. ISSN 1520-6017.

[30] Blanquet, S., E. Zeijdner, E. Beyssac, J. P. Meunier, S. Denis, R. Havenaar, M. Alric. A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. Pharm Res, 2004, 21, 585-596. ISSN 0724-8741.

[31] Dvořáčková, K., T. Bautzová, M. Rabišková. Disoluční studie v hodnocení perorálních léků s řízeným uvolňováním léčiva. Chem Listy, 2011, 105, 50-54. ISSN 0009-2770.

[32] Park, S.-H., H.-K. Choi. The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. Int J Pharm, 2006, 321, 35-41. ISSN 1873-3476.

[33] Vasconcelos, T., B. Sarmento, P. Costa. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. Drug Discov Today, 2007, 12, 1068−1075. ISSN 1359-6446.

[34] Ford, J. L. The current status of solid dispersions. Pharm Acta Helv, 1986, 61, 69-88. ISSN 0031-6865.

[35] Mogal, S. A., P. N. Gurjar, D. S. Yamgar, A. C. Kamod. Solid dispersion technique for improving solubility of some poorly soluble drugs. Pharm Lett, 2012, 4, 1574-1586. ISSN 0975-5071.

[36] Tomsová, M. Alifatický polyester větvený na tripentaerythritolu jako nosič v tuhých disperzích, Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 44 s.

[37] Sekiguchi, K., N. Obi. Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man. Chem Pharm Bull, 1961, 9, 866−872. ISSN 0009-2363.

[38] Jachowicz, R. Dissolution rates of partially water-soluble drugs from solid dispersion systems. I. Prednisolone. Int J Pharm, 1987, 35, 1−5. ISSN 0724-8741.

[39] Chau Le-Ngoc Vo, Chulhun Park, Beom-Jin Lee. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. Eur J Pharm Biopharm, 2013, 85, 799-813. ISSN 0939-6411.

[40] Taylor, L.S., G. Zografi. Spectroscopic characterization of interactions between PVP and indomethacin in amorphous molecular dispersions. Pharm Res, 1997, 14, 1691−1698. ISSN 0724-8741.

[41] Bley, H., B. Fussnegger, R. Bodmeier. Characterization and stability of solid dispersions based on PEG/polymer blends. Int J Pharm, 2010, 390, 165−173. ISSN 0724-8741.

[42] Shin, S.-C., I.-J. Oh, Y.-B. Lee, H.-K. Choi, J.-S. Choi. Enhanced dissolution of furosemide by coprecipitating or cogrinding with crospovidone. Int J Pharm, 1998,175, 17−24. ISSN 0724-8741.

[43] Huang, J., R. J. Wigent, C. M. Bentzley, J. B. Schwartz. Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery: effect of drug loading on release kinetics. Int J Pharm, 2006, 319, 44–54. ISSN 0724-8741.

[44] Lim, H.-T., P. Balakrishnan, D. H. Oh, K. H. Joe, Y. R. Kim, D. H. Hwang, Y.-B. Lee, C. S. Yong, H.-G. Choi. Development of novel sibutramine base-loaded solid dispersion with gelatin and HPMC: physicochemical characterization and pharmacokinetics in beagle dogs. Int J Pharm, 2010, 397, 225–230. ISSN 0724-8741.

[45] Bialleck, S., H. Rein. Preparation of starch-based pellets by hot-melt extrusion. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 79, 440–448. ISSN 0939-6411.

[46] Van Drooge, D., W. Hinrichs, H. Frijlink. Anomalous dissolution behaviour of tablets prepared from sugar glass-based solid dispersions. J Controlled Release, 2004, 97, 441–452. ISSN 0168-3659.

[47] Passerini, N., B. Albertini, M. L. Gonzalez-Rodriguez, C. Cavallari, L. Rodriguez, Preparation and characterisation of ibuprofen–poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. Eur J Pharm Sci, 2002, 15, 71–78. ISSN 0939-6411.

[48] Moes, J., S. Koolen, A. Huitema, J. Schellens, J. Beijnen, B. Nuijen. Pharmaceutical development and preliminary clinical testing of an oral solid dispersion formulation of docetaxel (ModraDoc001). Int J Pharm, 2011, 420, 244–250. ISSN 0724-8741.

[49] Joshi, H.N., R. W. Tejwani, M. Davidovich, V. P. Sahasrabudhe, M. Jemal, M. S. Bathala, S. A. Varia, A. Serajuddin. Bioavailability enhancement of a poorly water-soluble drug by solid dispersion in polyethylene glycol–polysorbate 80 mixture. Int J Pharm, 2004, 269, 251–258. ISSN 0724-8741.

[50] Desai, J., K. Alexander, A. Riga. Characterization of polymeric dispersions of dimenhydrinate in ethyl cellulose for controlled release. Int J Pharm, 2006, 308, 115−123. ISSN 0724-8741.

[51] Ozeki, T., H. Yuasa, Y. Kanaya. Controlled release from solid dispersion composed of poly (ethylene oxide)−Carbopol interpolymer complex with various cross-linking degrees of Carbopol. J Controlled Release, 2000, 63, 287−295. ISSN 0168-3659.

[52] Craig, D. Q. The mechanisms of drug release from solid dispersions in watersoluble polymers. Int J Pharm, 2002, 231, 131−144. ISSN 0724-8741.

[53] Chiou, W. L., S. Riegelman. Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. J Pharm Sci, 1971, 60, 1281−1302. ISSN 1520-6017.

[54] Chiou, W. L., S. Riegelman. Preparation and dissolution characteristics of several fast-release solid dispersions of griseofulvin. J Pharm Sci, 1969, 58, 1505−1510. ISSN 1520-6017.

[55] Li, F.-Q., J.-H. Hu, J.-X. Deng, H. Su, S. Xu, J.-Y. Liu. In vitro controlled release of sodium ferulate from Compritol 888 ATO-based matrix tablets. Int J Pharm, 2006, 324, 152−157. ISSN 0724-8741.

[56] Yao, W.-W., T.-C. Bai, J.-P. Sun, C.-W. Zhu, J. Hu, H.-L. Zhang. Thermodynamic properties for the system of silybin and poly (ethylene glycol) 6000. Thermochim Acta, 2005, 437, 17−20. ISSN 0040-6031.

[57] Hoshino, T., Kusaki, F., Fukui, I.: Solid Dispersion Preparation, European Patent EP 1847260 A3 2007.

[58] Wang, X., A. Michoel, G. Van den Mooter. Solid state characteristics of terory solid dispersions composed of PVP VA64, Myrj 52 and itraconazole. Int J Pharm, 2005, 303, 54−61. ISSN 0724-8741.

[59] Ceballos, A., M. Cirri, F. Maestrelli, G. Corti, P. Mura. Influence of formulation and process variables on in vitro release of theophylline from directlycompressed Eudragit matrix tablets. Farmaco, 2005, 60, 913–918. ISSN 1879-0569.

[60] Li, C., Y. Le, J.-F. Chen. Formation of bicalutamide nanodispersion for dissolution rate enhancement. Int J Pharm, 2011, 404, 257–263. ISSN 0724-8741.

[61] Garcia-Rodriguez, J. J., P. M. de la Torre-Iglesias, M. C. Vegas-Sanchez, S. Torrado-Duran, F. Bolas-Fernandez, S. Torrado-Santiago. Changed crystallinity of mebendazole solid dispersion: improved anthelmintik aktivity. Int J Pharm, 2011, 403, 23–28. ISSN 0724-8741.

[62] Overhoff, K. A., J. D. Engstrom, B. Chen, B. D. Scherzer, T. E. Milner, K. P. Johnston, R. O. Williams. Novel ultra-rapid freezing particle engineering process for enhancement of dissolution rates of poorly water-soluble drugs. Eur J Pharm Biopharm, 2007, 65, 57–67. ISSN 0939-6411.

[63] Podzimek, Š. Charakterizace větvených polyesterů gelovou permeační chromatografií s on-line rozptylovým fotometrem a viskozimetrem. Výzkumná zpráva, Synpo a.s. Pardubice, 2016, 3.

[64] Šnejdrová, E., M. Drastík, M. Dittrich. Plasticized branched aliphatic oligoesters as potential mucoadhesive drug carriers. Int J Pharm, 2013, 458, 282– 286. ISSN 0724-8741

[65] Soukupová, H. Adhezivní vlastnosti tenkých filmů na bázi plastifikovaných polyesterů, Hradec Králové. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, řešená práce.

[66] Rychterová, G. Plastifikované polymerní soustavy s kyselinou salicylovou. Hradec Králové, 2016. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, 60 s.

[67] Kanakapura, B., V. K. Penmatsa. Analytical methods for determination of terbinafine hydrochloride in pharmaceuticals and biological materials. Int J Pharm Sci, 2016, 6, 137-149. ISSN 2095-1779.

[68] ArunPrasad, K., N. Narayanan, G. Rajalakshmi. Preparation and evaluation of solid dispersion of terbinafine hydrochloride. Int J Pharm Sci Rev Res, 2010, 3, 130-134. ISSN 0976-044X.

[69] Tayel, S. A., M. A. El-Nabarawi, M. I. Tadros, W. H. Abd-Elsalam. Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. Int J Pharm, 2013, 443, 293-305. ISSN 0378-5173.

[70] Nováková, L., L. Matysová, P. Solich. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. Talanta, 2006, 68, 908–918. ISSN 0039-9140.

[71] Dittrich, M., E. Snejdrova, E. Cyclic Swelling as a Phenomenon Inherent to Biodegradable Polyesters. J. Pharm. Sci., 2014, 103, 3560-3566. ISSN 1520-6017.

[72] Šnejdrová, E., M. Dittrich. Branched polyesters as mucoadhesive carriers of drugs. Čes. slov. Farm., 2015, 64, 192-193. ISSN 1210-7816.

[73] Snejdrova, E., M. Drastik, M. Dittrich, P. Kastner, J. Nguyenova. Mucoadhesive plasticized system of branched poly(lactic-co-glycolic acid) with aciclovir. Drug Dev Ind Pharm, 2016, 42, 1653-1659. ISSN 0363-9045.