

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej technológie



Diplomová práca

**Testovanie PLGA filmov pre lokálnu
aplikáciu kanabidiola**

Testing of PLGA films for local delivery of cannabidiol

ČESTNÉ PREHLÁSENIE

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a riadne citované. Taktiež prehlasujem, že táto práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, 24. apríla 2024

Daniela Juhászová

POĎAKOVANIE

Týmto by som sa chcela poďakovať PharmDr. Eve Šnejdrovej, Ph.D. za profesionálny prístup, odborné vedenie a poskytnutie cenných rád a pripomienok pri vypracovaní tejto diplomovej práce. Poďakovanie za merania metódou SEM a HPLC patrí taktiež Mgr. Janovi Loskotovi, Ph.D. a PharmDr. Rudolfovi Andrýsovi, Ph.D. z Prírodovedeckej fakulty UHK. V neposlednom rade by som sa rada poďakovala aj svojej rodine a priateľovi, ktorí mi boli nesmiernou oporou počas celého štúdia, vrátane písania tejto práce.

OBSAH

| | |
|--|----|
| ABSTRAKT | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| ZADANIE PRÁCE | 8 |
| ÚVOD..... | 9 |
| ZOZNAM SKRATIEK | 10 |
| 1 TEORETICKÁ ČASŤ | 11 |
| 1.1 Charakteristika filmotvorných systémov..... | 11 |
| 1.2 Mechanizmus tvorby <i>in situ</i> filmov | 11 |
| 1.3 Zloženie FFS..... | 14 |
| 1.3.1 Liečivá látka..... | 14 |
| 1.3.2 Polyméry..... | 16 |
| 1.3.3 Plastifikátory | 18 |
| 1.3.4 Rozpúšťadlá | 19 |
| 1.3.5 Enhancery | 20 |
| 1.4 Filmotvorné formulácie | 20 |
| 1.4.1 Filmotvorné spreje/roztoky..... | 21 |
| 1.4.2 Filmotvorné gély | 22 |
| 1.4.3 Filmotvorné emulzie | 22 |
| 1.5 Hodnotenie FFS a <i>in situ</i> filmov | 23 |
| 1.5.1 Doba odparovania rozpúšťadla | 23 |
| 1.5.2 Štruktúra povrchu..... | 24 |
| 1.5.3 Hrúbka filmu..... | 24 |
| 1.5.4 Priepustnosť vodnej pary..... | 24 |
| 1.5.5 Reologické a mechanické vlastnosti | 25 |
| 1.5.6 Termické vlastnosti | 26 |
| 1.5.7 Adhezívne vlastnosti | 26 |
| 1.5.8 Disolučné a permeačné charakteristiky | 29 |
| 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 31 |
| 2.1 Použité prístroje a pomôcky | 31 |
| 2.2 Použité suroviny..... | 31 |

| | | |
|-----|--|----|
| 2.3 | Príprava a zloženie FFS..... | 32 |
| 2.4 | Termická analýza | 33 |
| 2.5 | Skenovacia elektrónová mikroskopia..... | 34 |
| 2.6 | Doba odparovania rozpúšťadla | 35 |
| 2.7 | Adhezívne vlastnosti | 35 |
| 2.8 | Disolúcia CBD z <i>in situ</i> filmov..... | 36 |
| 3 | VÝSLEDKY | 38 |
| 3.1 | Termická analýza | 38 |
| 3.2 | Skenovacia elektrónová mikroskopia..... | 41 |
| 3.3 | Doba odparovania rozpúšťadla | 42 |
| 3.4 | Adhezívne vlastnosti | 43 |
| 3.5 | Disolúcia CBD z <i>in situ</i> filmu..... | 45 |
| 4 | DISKUSIA | 48 |
| 4.1 | Termická analýza | 48 |
| 4.2 | Skenovacia elektrónová mikroskopia..... | 50 |
| 4.3 | Doba odparovania rozpúšťadla | 51 |
| 4.4 | Adhezívne vlastnosti | 54 |
| 4.5 | Disolúcia CBD z <i>in situ</i> filmu..... | 56 |
| 5 | ZÁVER | 58 |
| 6 | POUŽITÁ LITERATÚRA | 59 |
| 7 | PRÍLOHY | 74 |

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutickej technológie

Autor: Daniela Juhászová
Názov práce: Testovanie PLGA filmov pre lokálnu aplikáciu kanabidiola
Školiteľ: PharmDr. Eva Šnejdrová, PhD.
Konzultant: PharmDr. Andrea Věříš

Cieľom predloženej práce bolo študovať kvapalné systémy pre tvorbu *in situ* filmov (FFS). Boli formulované FFS na báze PLGA lineárnej alebo vetvovej štruktúry. Polyméry boli plastifikované methyl-salicylátom (MS) alebo ethyl-pyruvátom (EP) a inkorporované kanabidiolom (CBD). Ako rozpúšťadlá boli testované ethyl-acetát, acetón a isopropanol. V teoretickej časti boli zhrnuté obecné charakteristiky použitých surovín pre formuláciu FFS. V experimentálnej časti bol sledovaný priebeh odparovania organického rozpúšťadla z FFS a vplyv použitého plastifikátora. Fyzikálno-chemické vlastnosti *in situ* filmov boli charakterizované pomocou DSC, metódou SEM a ťahovým testom na reometri. Došlo sa k záverom, že doba evaporácie rozpúšťadiel z FFS je ovplyvnená použitým plastifikátorom, rýchlejšie odparovanie rozpúšťadla nastalo pri plastifikácii EP. DSC preukázalo, že inkorporovaný kanabidiol je v *in situ* filme rozpustený a film plastifikuje. Metódou SEM bola homogénna štruktúra *in situ* filmov potvrdená. Bola zistená výborná adhezivita *in situ* filmov ovplyvnená charakteristikami použitého filmotvorného PLGA. Trojfázový liberačný profil CBD z neplastifikovaného lineárneho PLGA bol modifikovaný použitím vetveného PLGA a plastifikáciou methyl-salicylátom alebo ethyl-pyruvátom.

Kľúčové slová: *in situ* film, kanabidiol, PLGA, SEM, testovanie adhézie, disolúcia.

ABSTRACT

CHARLES UNIVERSITY

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmaceutical Technology

Author: Daniela Juhászová
Title of thesis: Testing of PLGA films for local delivery of cannabidiol
Supervisor: PharmDr. Eva Šnejdrová, PhD.
Consultant: PharmDr. Andrea Věříš

The aim of the presented work was to study film forming systems for the formation of *in situ* films (FFS). FFS based on PLGA linear or branched architecture were formulated. The polymers were plasticized with methyl salicylate (MS) or ethyl pyruvate (EP) and incorporated with cannabidiol (CBD). Ethyl acetate, acetone and isopropanol were tested as solvents. In the theoretical section, the general characteristics of the excipients used for the FFS formulation were summarized. In the experimental section, the course of evaporation of the organic solvent from FFS and the effect of the used plasticizer were monitored. The physicochemical properties of the *in situ* films were characterized using DSC, the SEM method and a tensile test on a rheometer. It was concluded that the solvent evaporation time from FFS is influenced by the used plasticizer, whereas faster solvent evaporation occurred with EP plasticization. DSC showed that the incorporated cannabidiol is dissolved in the *in situ* film and significantly plasticizes the film. The homogeneous structure of the *in situ* films was confirmed by the SEM. Excellent *in situ* adhesiveness of the films influenced by the characteristics of the film-forming PLGA used was found. The triphasic release profile of CBD from unplasticized linear PLGA was modified by using branched PLGA and plasticizing with methyl salicylate or ethyl pyruvate.

Key words: *in situ* film, cannabidiol, PLGA, SEM, adhesion testing, dissolution.

ZADANIE PRÁCE

Cieľom tejto práce bolo formulovať kvapalné sústavy pre tvorbu *in situ* filmov (FFS) a novovzniknuté filmy následne podrobiť testovaniu fyzikálno-chemických vlastností.

Zadanie práce sa dá rozdeliť do nasledujúcich krokov:

1. Pre formuláciu FFS použiť lineárny polymér PLGA alebo jeho deriváty vetvené na kyseline polyakrylovej.
2. PLGA deriváty plastifikovať methyl-salicylátom alebo ethyl-pyruvátom a inkorporovať 10 % kanabidiolu.
3. Testovať dobu evaporácie acetónu a isopropanolu v pomeroch 1:1 a 1:3 z FFS.
4. Termické charakteristiky *in situ* filmov zhodnotiť pomocou DSC.
5. Zhodnotiť mikroštruktúru *in situ* filmov metódou SEM.
6. Študovať adhezívne vlastnosti *in situ* filmov.
7. Testovať disolúciu kanabidiolu z *in situ* filmu.

ÚVOD

Topická aplikácia liečivých prípravkov umožňuje lokálne aj systémové účinky. Oproti systémovým aplikačným cestám ponúka množstvo výhod, ako je jednoduchá aplikácia, zníženie frekvencie dávkovania, zabránenie metabolizácii liečiva pri prvom prechode pečeňou, vyhnutie sa účinkom enzýmov a kyslého prostredia žalúdka. Väčšina liekových foriem umožňujúca topickú aplikáciu liečiv (krémy, masti, gély, pasty a náplasti) má radu obmedzení a nevýhod, čo môže vyústiť k zhoršeniu prístupu samotného pacienta k liečbe.

Na druhej strane filmotvorné systémy sú veľmi sľubnými prípravkami, pretože prekonávajú obmedzenia topických formulácií. Vo svojom zložení majú bohato zastúpené polyméry, ktoré pri aplikácii na povrch tela vytvárajú tenké filmy. Tie predstavujú zásobný systém, z ktorého sa postupne uvoľňuje účinná látka, čím sa predlžuje doba kontaktu liečiva s miestom aplikácie a tým aj zlepšenie terapeutického účinku. V súčasnosti predstavujú perspektívnu stratégiu, ktorú možno využiť ako alternatívu ku konvenčným topickým liekovým formám.

V predloženej práci bola pozornosť venovaná kopolymérom kyseliny D,L-mliečnej a glykolovej (PLGA) lineárnej alebo vetvovej štruktúry. Tieto polyméry sa vyznačujú vysokou biokompatibilitou, majú taktiež vhodné degradačné charakteristiky, nízku toxicitu a ideálne predpoklady na dlhodobé podávanie liečiva. Okrem polyméra môže k profilu uvoľňovania liečiva prispievať aj prítomnosť plastifikátora. Ako liečivá látka bol testovaný kanabidiol.

Táto práca tematicky a metodicky nadväzuje na diplomové a rigorózne práce z predchádzajúcich ročníkov, ktoré sa tiež zaoberali štúdiom fyzikálno-chemických vlastností PLGA polymérov s tým rozdielom, že boli testované iné varianty, či koncentrácie polymérov/plastifikátorov/rozpúšťadiel alebo liečivej látky.¹⁻⁵

ZOZNAM SKRATIEK

| | |
|----------------|--|
| A2 | poly(laktid-ko-glykolid) vetvený na kyseline polyakrylovej 2 % v reakčnej zmesi |
| A4 | poly(laktid-ko-glykolid) vetvený na kyseline polyakrylovej 4 % v reakčnej zmesi |
| Ac | acetón |
| CB1 | kanabinoidný receptor typu 1 |
| CB2 | kanabinoidný receptor typu 2 |
| CBD | kanabidiol |
| DSC | diferenciálna skenovacia kalorimetria |
| EA | ethyl-acetát |
| ECS | endokanabinoidný systém |
| EP | ethyl-pyruvát |
| FFS | filmtvorný systém (film forming system) |
| GA | kyselina glykolová |
| IPA | isopropanol |
| LA | kyselina mliečna |
| LL | liečivá látka |
| MS | methyl-salicylát |
| OR | organické rozpúšťadlo |
| PLGA | poly(laktid-ko-glykolid) 50:50 |
| PS | polymérny systém |
| SC | stratum corneum |
| SEM | skenovacia elektrónová mikroskopia |
| T _e | teplota evaporácie |
| T _g | teplota skleného prechodu |
| TGA | termogravimetrická analýza |
| THC | tetrahydrokanabinol |
| T _m | teplota topenia |
| WVP | priepustnosť vodnej pary |

1 TEORETICKÁ ČASŤ

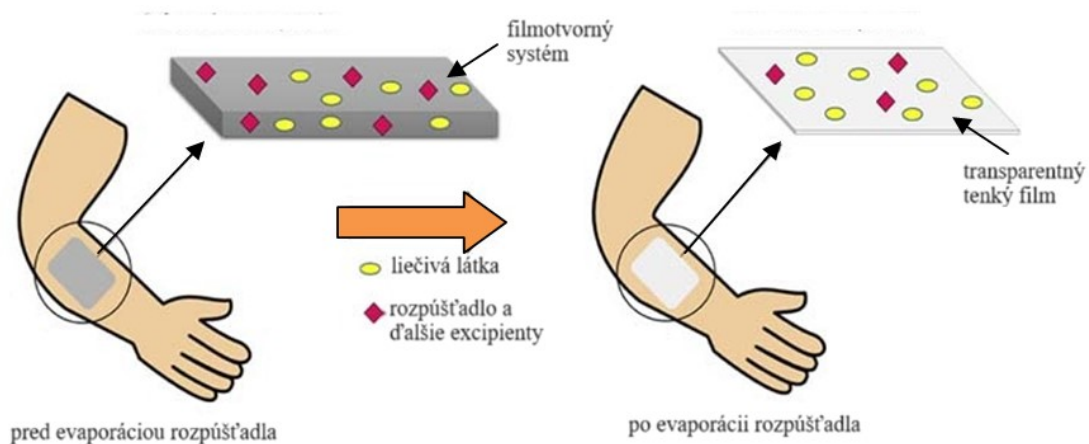
1.1 Charakteristika filmotvorných systémov

Filmotvorný systém (FFS) je definovaný ako kvapalná lieková forma, ktorá vytvára film *in situ*, t. j. po aplikácii na kožu alebo sliznicu. Tieto systémy obsahujú liečivo a filmotvorné excipienty vo vehikule, ktoré po odparení rozpúšťadla zanechávajú na pokožke tenký, adhezívny film. Vytvorený film môže byť buď pevný polymérny materiál, ktorý pôsobí ako matrica pre predĺžené uvoľňovanie liečiva alebo môže byť reziduálnym tekutým filmom, ktorý sa rýchlo absorbuje v stratum corneum (SC). Filmotvorný systém sa nanáša priamo na kožu a po odparení rozpúšťadla vytvára tenký, priehľadný film. Novovzniknutý *in situ* film je pružný, nelepivý, odolný voči treniu.^{6,7}

Polymérne filmotvorné systémy boli študované na transdermálne podávanie steroidných hormónov, analgetík, vývoj mukoadhezívnych systémov na retenciu žalúdka a ako náhrada náplasti s cieľom zlepšiť bezpečnosť a účinnosť lieku, ako aj samotnú adhérenciu pacienta k liečbe. V oblasti dermatologických ochorení sú to nielen rôzne aplikácie antimykotík, liečba popálenín, rán, ale majú svoju úlohu aj v prevencii transepidermálnej straty vody, čím napomáhajú hydratácii pokožky.⁸⁻¹³

1.2 Mechanizmus tvorby *in situ* filmov

Tvorba *in situ* filmu (Obr. 1) sa javí ako jednoduchý, nekomplikovaný proces. Pozostáva z nanosenia FFS na povrch pokožky.¹⁴ Polymérny film sa začína vytvárať tesne po aplikácii, akonáhle sa začnú odparovať prvé molekuly rozpúšťadla. V dôsledku strát prchavých zložiek vehikula sa zloženie filmotvorného systému výrazne zmení, čo vedie k vytvoreniu tenkého filmu na povrchu kože.¹⁵ Tam sa môže správať buď ako rezervoár účinnej látky, ktorá bude postupne penetrovať do kože alebo permeovať cez kožu.¹⁶



Obr. 1: Ilustratívne znázornenie tvorby tenkého filmu¹⁵

Počas tohto procesu, vplyvom odparenia prchavej látky, sa zvyšuje koncentrácia liečiva na úroveň nasýtenia s možnosťou dosiahnutia stavu presýtenia (supersaturácie) na povrchu kože. Tá má za následok zvýšený tok liečiva cez kožu zvýšením termodynamickej aktivity prípravku bez poškodenia kožnej bariéry. Zároveň sa znížia vedľajšie účinky či podráždenie spôsobené organickým rozpúšťadlom. Pojem presýtenia možno vysvetliť pomocou Fickovho zákona difúzie, ktorý popisuje rovnica (1).

$$J = \frac{DKCv}{h} \quad (1)$$

kde

- J rýchlosť prenikania liečiva [$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]
- D difúzny koeficient liečiva [$\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$]
- K rozdeľovací koeficient liečiva [bezrozmerný]
- C_v koncentrácia liečiva [$\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$]
- h hrúbka bariéry proti difúzii [cm]

Z rovnice vyplýva, že rýchlosť permeácie liečivej látky cez kožu je úmerná koncentrácii liečiva. To však platí iba v prípade liečiva rozpusteného vo vehikule. Modifikovanú formu Fickovho zákona difúzie popisuje rovnica (2).

$$J = \frac{\alpha D}{\gamma h} \quad (2)$$

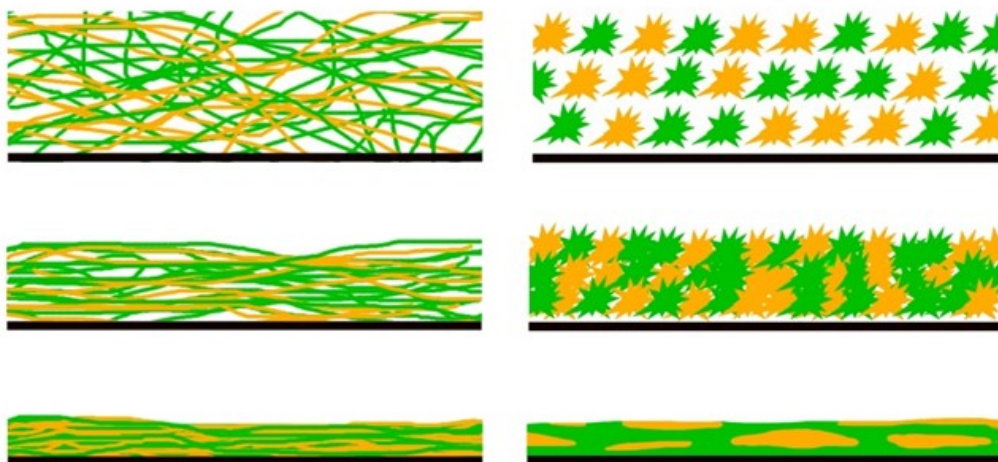
kde

α termodynamická aktivita liečiva vo formulácii

γ termodynamická aktivita liečiva v membráne

Podľa tejto rovnice je tok liečiva priamo úmerný termodynamickej aktivite formulácie, čo súvisí so saturáciou. Nesmieme však zabúdať na skutočnosť, že pri zvýšení presýtenia sa zvyšuje aj termodynamická nestabilita. FFS tento problém nestability prekonáva v prípade, že sa presýtené systémy vytvárajú tesne po aplikácii na pokožku.¹⁷

V závislosti na rozpustnosti filmotvorného polyméru v použítom rozpúšťadle sa FFS správajú buď ako roztoky alebo ako disperzie. Zatiaľ čo polymérne reťazce v roztoku sú dôkladne prepletené a pri odparovaní rozpúšťadla dochádza k tvorbe filmu, polymérne častice v disperzii musia najprv interagovať, aby sa umožnila vzájomná penetrácia jednotlivých polymérnych reťazcov (Obr. 2). Pri tvorbe filmu z polymérnych disperzií prebieha proces koalescencie, teda splývanie disperzných častíc do väčších celkov, pretože s odparovaním rozpúšťadla sa zvyšujú aj kapilárne sily.^{15,18}



Obr. 2: Schematické znázornenie filmotvorného roztoku (vľavo) a disperzie častíc (vpravo)⁷

Počiatkový stav polyméru tiež ovplyvňuje vlastnosti finálneho filmu. Polymérne roztoky zvyčajne vedú k tvorbe transparentného hladkého filmu, zatiaľ čo polymérne filmy vytvorené z disperzie, najmä emulzie, môžu byť nepriehľadné s drsným povrchom. V oboch prípadoch je možné použiť plastifikátor na zlepšenie vlastností finálneho filmu.^{15,18}

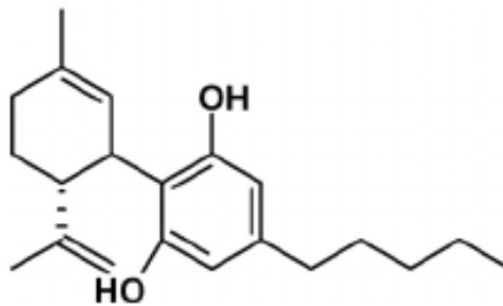
1.3 Zloženie FFS

Všetky zložky použité na formuláciu filmotvorného systému ovplyvňujú nielen mechanické a kozmetické vlastnosti finálneho filmu, ale aj dodávanie liečiva na miesto jeho pôsobenia.¹⁵

1.3.1 Liečivá látka

Liečivá látka (LL) určená k topickej/transdermálnej aplikácii musí spĺňať určité požiadavky. V prvom rade musí byť schopná dobre preniknúť do stratum corneum. Liečivá s lipofilným charakterom zvyčajne prenikajú lepšie ako hydrofilné liečivá, keďže aj matrica SC je lipofilného charakteru. Distribučný koeficient log P by sa mal ideálne pohybovať v rozmedzí 1 až 3. Rozhodujúcu úlohu zohráva aj molekulová hmotnosť, pretože malé molekuly vykazujú vyššiu rýchlosť difúzie. Molekulová hmotnosť by mala byť obecné nižšia ako 500.^{19,20} Ďalšou dôležitou vlastnosťou LL, ktorú je potrebné vziať do úvahy, je jej rozpustnosť vo vehikule. Liečivo by malo byť dostatočne rozpustné aj v prchavom organickom rozpúšťadle a zároveň aj v neprchavých zložkách daného prípravku, aby sa predišlo samotnej kryštalizácii liečiva počas procesu odparovania. Zo štúdií vyplýva, že pH formulácie s rozpusteným liečivom by sa malo pohybovať v intervale od 5 až 10, ak chceme predísť súčasne aj podráždeniu pokožky.¹⁹

V tejto práci bol testovaný kanabidiol (CBD) ako liečivá látka. V dôsledku rozmanitej škály terapeutických vlastností a priaznivého profilu znášanlivosti čelí v súčasnej dobe veľkému záujmu.²¹ Kanabidiol (Obr. 3) je jedným z hlavných farmakologicky aktívnych fytoKANABINOIDOV vyskytujúcich sa v konopí siatom a indikom (*Cannabis sativa*, *C. indica*).²² Spolu s tetrahydrokanabinolom (THC) patria medzi najrozšírenejšie a najpreštudovanejšie zlúčeniny spomedzi kanabinoidov.²³



Obr. 3: Chemická štruktúra kanabidiola²⁴

CBD je biela až svetložltá kryštalická látka, ktorá podlieha degradácii svetelným žiarením a oxidáciou pri izbovej teplote.²⁵ Je to vysoko lipofilná zlúčenina s nízkou rozpustnosťou vo vode. V dôsledku spomínanej vysokej lipofility, nestability v kyslom prostredí žalúdka a výrazného metabolizmu pri prvom prechode pečeňou, je jeho biologická dostupnosť po perorálnom podaní veľmi nízka.²⁶ Molekulová hmotnosť kanabidiola (314,5 g/mol) je celkom priaznivá najmä pre topické podávanie, pri ktorom dochádza k akumulácii CBD v stratum corneum bez penetrácie do hlbších vrstiev kože. Avšak transdermálne podávanie vzhľadom na jeho extrémnu lipofilitu je dosť obmedzené.²⁵

CBD pôsobí komplexne na viaceré receptory endokanabinoidného systému (ECS). Ten pozostáva z kanabinoidných receptorov, endogénnych ligandov a enzýmov zodpovedných za syntézu, spätné vychytávanie a degradáciu endokanabinoidov.²⁷ Dvoma hlavnými kanabinoidnými receptormi sú kanabinoidný receptor typu 1 (CB1) a kanabinoidný receptor typu 2 (CB2). Receptory CB1 sú distribuované hlavne v centrálnom nervovom systéme, zatiaľ čo receptory CB2 sú prítomné v periférnych nervových zakončeníach a imunitných bunkách.²⁸ CBD má malú afinitu k týmto receptorom a pôsobí ako čiastočný antagonistu receptoru CB1 a ako slabý inverzný agonista CB2.²⁹

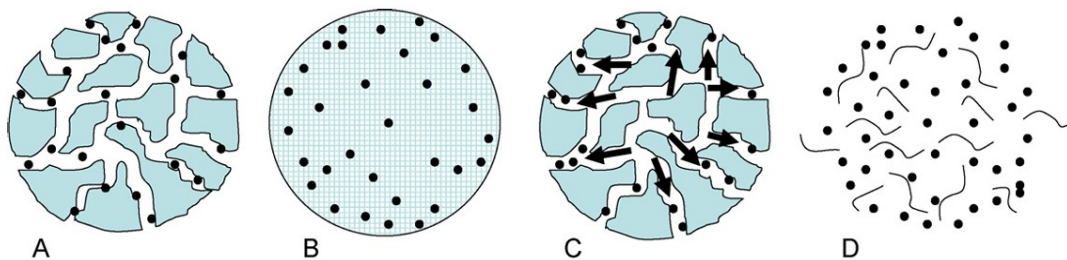
Kanabidiol, na rozdiel od tetrahydrokanabinolu (THC), je nepsychoaktívny a vyznačuje sa radou priaznivých farmakologických účinkov.³⁰ Boli popísané jeho neuroprotektívne,³¹ analgetické, sedatívne, antiemetické³² a antispasmodické účinky.³³ Takisto sa zistilo, že CBD blokuje úzkosť produkovanú THC.³⁴ Terapeutický potenciál CBD bol hodnotený pri kardiovaskulárnych, neurodegeneratívnych, rakovinových a metabolických ochoreniach, ktoré sú zvyčajne sprevádzané oxidačným stresom a zápalom.³⁵

1.3.2 Polyméry

Filmotvorné polyméry sú pre tvorbu filmu veľmi dôležité, keďže majú najväčší vplyv na substantivitu formulácie. Pri kontakte s pokožkou by mali byť schopné vytvárať pružný, tenký, transparentný a odolný film. Môžu byť použité kombinácie polymérov pre dosiahnutie požadovaných vlastností filmu. Rozlišujeme vo vode rozpustné (hydrofilné) a vo vode nerozpustné (hydrofóbne) filmotvorné látky.³⁶ Polyméry hydrofilného charakteru sú ideálne pre formulácie, z ktorých liečivo rýchlo preniká do SC a vytvára tam rezervoár. Hydrofóbne polyméry tvoria vodoodolné filmy s vysokou substantivitou, sú častokrát krehké a málo pružné, čo sťažuje príľnutie k pokožke a spôsobuje rozpad filmotvorných formulácií. Na zvýšenie pružnosti filmu sa zvyčajne pridávajú zmäkčovadlá alebo sa polymér kombinuje s polymérom rozpustným vo vode.¹⁴ Na prípravu filmotvorných systémov sa používajú najčastejšie deriváty celulózy, polyvinylalkohol, povidon, chitosan, polymethakryláty, kopolymér kyseliny mliečnej a glykolovej (PLGA).¹⁵

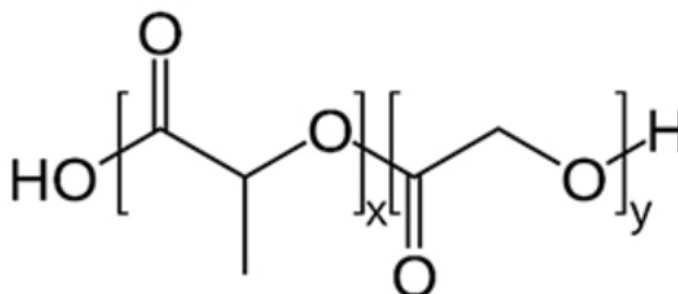
V predloženej práci bol na prípravu FFS použitý polymér PLGA a jeho deriváty. Vďaka svojej vynikajúcej biologickej kompatibilite a degradabilite sa PLGA polyméry používajú nielen v chirurgii, ortopédii, tkanivovom inžinierstve,³⁷ ale ich použitie sa rozširuje aj na systémy dodávania liečiv s riadeným a cieľovým uvoľňovaním.³⁸ Takisto sa vyznačujú dobrou rozpustnosťou v širokej škále organických rozpúšťadiel (ako napr. acetón, ethylacetát, tetrahydrofuran, chlorované uhľovodíky).³⁹

Čo sa týka uvoľňovania liečivej látky z PLGA polymérov, existujú 4 základné mechanizmy, ktorými je LL uvoľňovaná do vonkajšieho prostredia (Obr. 4). Prvým z nich je difúzia LL prostredníctvom vodných pórov. Iniciačná dávka liečiva sa uvoľní cez vzniknuté póry, ktorými preniká voda do štruktúry. Ďalším mechanizmom je difúzia z PLGA matrice, počas ktorej sa depotná forma liečiva uvoľňuje bez tvorby pórov. Následuje osmotické nasávanie vody spôsobené zvýšeným osmotickým tlakom, kedy je LL vodou vytlačovaná z matrice.⁴⁰ PLGA podlieha hydrolýze (štiepeniu esterových väzieb) akonáhle príde do kontaktu s vodou. Dochádza k pozvoľnému uvoľňovaniu kyslých monomérov (kyselina mliečna a glykolová), ktoré katalyzujú degradáciu polymérnej matrice, čo vedie k následnej erózii.



Obr. 4: Mechanizmus uvoľňovania liečiva z PLGA polymérov: difúzia cez vodu naplnené póry (A), difúzia z polymérnej matrice (B), osmóza (C), erózia (D)⁴¹

PLGA je lineárny alifatický polyester tvorený kyselinou D,L-mliečnou a glykolovou (Obr. 5). Fyzikálno-chemické vlastnosti PLGA závisia hlavne od molárnej hmotnosti a pomeru monomérov kyseliny mliečnej (LA) a glykolyvej (GA). LA má menšiu hydrofilitu v porovnaní s GA. Ak sa teda zvyšuje podiel kyseliny mliečnej, rýchlosť degradácie PLGA sa znižuje a naopak.⁴² Vo všeobecnosti sú to amorfné látky a vykazujú relatívne nízku teplotu skleného prechodu (T_g), čo spôsobuje tuhosť polyméru. T_g polyméru závisí od jeho molekulovej hmotnosti. So zvyšujúcou molekulovou hmotnosťou sa zvyšuje T_g .⁴³



Obr. 5: Chemická štruktúra PLGA³⁸

Vetvením polymérneho reťazca môžeme zlepšiť vlastnosti PLGA. Polyestery A2 a A4 boli syntetizované polykondenzačnou reakciou bez použitia katalyzátora, vetvením na kyseline polyakrylovej (A) o molárnej hmotnosti 2000 g/mol (Tab. 1), pričom číslo v označení predstavuje množstvo vetvovej zložky použitej v reakčnej zmesi pri syntéze. Významným parametrom vetvených polyesterov je ich potlačená hydrofobicita, nižší stupeň bobtnania, vyššia kapacita pre liečivo a adhezívne vlastnosti z dôvodu väčšieho počtu koncových karboxylových skupín.^{44,45}

Tab. 1: Číselné (M_n) a hmotnostné (M_w) priemery molárnej hmotnosti, hmotnostný priemer vnútornej viskozity ($[\eta]_w$) a vetviaci pomer (g')⁴⁶

| Polymér | M_n (g/mol) | M_w (g/mol) | $[\eta]_w$ (mL/g) | g' |
|---------|---------------|---------------|-------------------|------|
| PLGA | 1 700 | 2 400 | 5,9 | 1,0 |
| A2 | 8 600 | 14 400 | 8,9 | 0,54 |
| A4 | 10 900 | 18 700 | 8,0 | 0,42 |

1.3.3 Plastifikátory

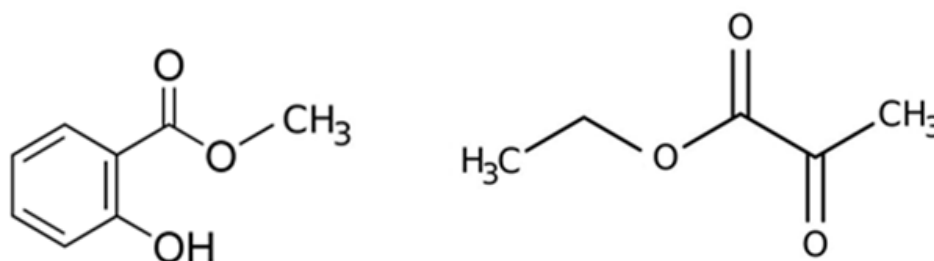
Z dôvodu krehkosti mnohých polymérov používaných vo farmácii je častokrát nevyhnutné zakomponovať do filmotvorných sústav aj plastifikátor.⁴⁷ Plastifikátory sú vo všeobecnosti neprchavé organické kvapaliny alebo pevné látky s nízkou teplotou topenia. Po pridaní k polymérom spôsobujú zmeny v ich fyzikálnych a mechanických vlastnostiach.⁴⁸ To je dosiahnuté začlenením molekúl plastifikátora medzi polymérne reťazce a interakciou s ich funkčnou skupinou. Medzimolekulové sily medzi polymérnymi reťazcami sa znížia a väzby čoraz oslbnú. Výsledkom je pevnejší, pružnejší a menej krehký film. Použité zmäkčovadlá by mali byť kompatibilné s polymérmi a mali by mať nízku permeabilitu pre pokožku. Do prípravku sa majú pridávať v optimálnom množstve, aby sa zabezpečila potrebná flexibilita filmu a zlepšila sa priepustnosť vody cez film.⁴⁷

Medzi často používané zmäkčovadlá radíme glycerol, polyethylenglykol, propylenglykol, sorbitol, dibutylftalát, triethylcitrát, triacetin a močovinu.¹⁵ V rámci diplomovej práce boli ako plastifikátory testované methyl-salicylát (MS) a ethyl-pyruvát (EP).

Methyl-salicylát je methylester kyseliny salicylovej. Je to bezfarebná až nažltlá či svetločervená olejovitá kvapalina s typickým zápachom a miešateľná s organickými rozpúšťadlami.⁴⁹ Pre svoje dráždivé účinky na sliznicu tráviaceho traktu slúži hlavne k topickej aplikácii. Vplyvom esteráz sa rýchlo v koži hydrolyzuje na kyselinu salicylovú, ktorá sa vyznačuje analgetickými, antipyretickými a protizápalovými účinkami a poskytuje rýchlu úľavu od bolesti tým, ktorí trpia reumatickými stavmi, bolestivými svalmi alebo kĺbmi.⁵⁰ Methyl-salicylát má tiež vasodilatačný účinok,

ktorý vedie k zvýšenému lokalizovanému prietoku krvi a následne spôsobuje zvýšenie teploty tkaniva – rubefacientný účinok.⁵¹

Ethyl-pyruvát je ester kyseliny pyrohroznovej. Je to bezfarebná kvapalina so sladkou kvetinovou vôňou. Vykazuje silnú protizápalovú aktivitu pri liečbe kritických zápalových stavoch, vrátane pankreatitídy, ischemicko-reperfúzneho poškodenia, sepsy, poškodenia obličiek či endotoxémie.⁵² Boli tiež preukázané jeho antioxidačné vlastnosti.⁵³ Štruktúry testovaných plastifikátorov sú uvedené na Obr. 6.



Obr. 6: Chemická štruktúra MS (vľavo)⁴⁹ a EP (vpravo)⁵²

1.3.4 Rozpúšťadlá

Rozpúšťadlo musí byť v prvom rade kompatibilné s pokožkou. Taktiež by ju nemalo dráždiť v procese odparovania. Filtrovateľný polymér by mal byť vo vybranom rozpúšťadle dobre rozpustný alebo dispergovateľný. Výsledný *in situ* film by sa mal vytvoriť za menej ako jednu minútu po aplikácii prípravku. Rozpúšťadlo by malo byť preto dostatočne prchavé, aby sa pri teplote pokožky (~32 °C) odparilo z povrchu čo najskôr, ale zároveň proces evaporácie nesmie byť rýchly natoľko, aby bola ovplyvnená homogenita finálneho filmu.^{16,54}

Väčšinou sa používajú rozpúšťadlá v kombinácii, aby sa dosiahol požadovaný účinok na dobu schnutia, tvorbu filmu a uvoľňovanie liečiva.⁵⁵ Preferované je použitie alkoholov s krátkym reťazcom, pretože dokážu zaručiť úplnú rozpustnosť najpoužívanejších filmových polymérov. Prvou voľbou pre prípravu FFS je ethanol, aj keď vo vysokých koncentráciách spôsobuje podráždenie kože.⁵⁶ Taktiež je známy ako urýchľovač penetrácie, keďže uľahčuje rozdelenie lipofilných liečiv do stratum corneum.⁵⁷ Bežne používané rozpúšťadlá vo filmových formuláciách sú zhrnuté v Tab. 2.

Tab. 2: Prehľad organických rozpúšťadiel pre tvorbu FFS¹⁵

| Kategória | Príklady |
|-----------|--|
| alkoholy | ethanol butanol isopropanol benzylalkohol |
| glykoly | propylenglykoly polyethylenglykoly |
| d'alsie | ethyl-acetát isopropyl-myristát voda acetón |

1.3.5 Enhancery

Do filmotvorných formulácií môžu byť začlenené aj urýchľovače penetrácie. Sú to molekuly, ktoré interagujú so zložkami SC, čím zvyšujú jej priepustnosť a zlepšujú tok liečiva cez membránu.⁵⁸ V ideálnom prípade by nemali byť toxické, dráždivé a vyvolávajúce alergickú reakciu. Nemali by byť nositeľom farmakologického účinku v tele. Funkcia enhancerov by mala byť dočasná len po dobu aplikácie filmu a taktiež by mali pôsobiť jednosmerne, t. j. mali by umožniť vstup terapeutických činidiel do tela a zároveň zabrániť strate endogénneho materiálu von z tela.⁵⁷

1.4 Filmotvorné formulácie

Rozlišujeme 3 základné typy filmotvorných formulácií, ktoré budú postupne predstavené v nasledujúcich podkapitolách. Príklady FFS dostupných na trhu sú uvedené v Tab. 3.

Tab. 3: Prehľad komerčných FFS (vlastné spracovanie)^{15,59}

| FFS | LL | Polymér | Rozpúšťadlo | Typ FFS |
|---------------------------|----------------------------|------------------------|--|------------------------|
| Lamisil Once® | Terbinafin hydrochlorid | Akrylát, HPC | Ethanol | Roztok |
| Hansaplast® | - | Akrylát, polyuretán | Ethanol, voda | Roztok |
| Axiron® | Testosteron | Povidon | Ethanol 96%, isopropanol | Sprej |
| Opsite® | - | Akrylát | Acetón, ethyl- acetát, isopropanol | Sprej |
| Urgo Filmogel® | - | Celulóza | Ethanol, ethyl- acetát, isopropanol | Gél |
| Flint® | - | Akrylát | Ethyl-acetát, ricínový olej | Tekutý obväz/ sprej |
| Akutol® | - | Akrylát | Ethanol | Tekutý obväz/ sprej |

1.4.1 Filmotvorné spreje/roztoky

Spreje a roztoky sú najbežnejším typom filmotvorných formulácií. Pozostávajú z organického rozpúšťadla, v ktorom sú polyméry rozpustené alebo dispergované spolu s liečivou látkou, plastifikátorom a ďalšími pomocnými látkami.⁵⁹ Filmotvorný sprej/roztok sa na kožu buď nastrieka alebo naniesie prostredníctvom aplikátora a odparením rozpúšťadla sa vytvorí priehľadná rýchloschnúca filmová vrstva.¹⁵ Misra a spol.⁶⁰ boli jednými z prvých, ktorí vyvinuli tekutý filmotvorný roztok na transdermálnu aplikáciu testosterónu. Testosterón bol rozpustený v isopropanole a ako filmotvorné polyméry boli použité polyvinylalkohol a povidon. Keďže sa transdermálna aplikácia hormonálnych derivátov prostredníctvom filmotvorných roztokov celkom osvedčila, bola vyvinutá ďalšia formulácia na aplikáciu ethinylestradiolu.⁶¹ Taktiež bol vyvinutý filmotvorný sprej s nesteroidným protizápalovým liečivom ropivakainom, ktorý bol spolu s Eudragitom EPO® dispergovaný v etanole a isopropanole. Analgetický účinok spreja je porovnateľný s účinkom bežného lidokainového gélu, pričom aplikácia filmotvorného spreja je

jednoduchšia a menej častá.⁹ Yang a kol.⁶² vyvinuli filmotvorný roztok chitosanu a polyvinylalkoholu s benzalkóniumbromidom, ktorý sa javil ako vhodnejší na liečbu infekcií MRSA v porovnaní s vodným roztokom benzalkóniumbromidu. Bola skúmaná aj dermálna aplikácia ciprofloxacínu rozpustením vo vodnom roztoku spolu s povidonom a ďalšími pomocnými látkami. Integrovaním antibiotika do filmotvorného systému by sa súčasne liečila infekcia antibiotickým depotom obsiahnutým v tenkom filme a taktiež by bola rana chránená pred vonkajšími vplyvmi.⁶³

1.4.2 Filmotvorné gély

Filmotvorné gély sú viskózne alebo polotuhé prípravky obsahujúce polyméry, ktoré v prítomnosti kvapalného prostredia gelovatejú a vytvárajú trojrozmernú sieť vzájomne prepojených polymérnych reťazcov. Gély sú zvyčajne transparentné a bezfarebné, čo ich robí kozmeticky atraktívnymi. V porovnaní s roztokmi, ponúkajú gély tú výhodu, že sa vďaka svojmu polotuhému charakteru ľahšie a presnejšie nanášajú, sú flexibilné a vykazujú vyššiu priľnavosť k pokožke.⁵⁹

Vij a Saudagar⁶⁴ vyvinuli filmotvorný gél terbinafinu hydrochloridu. Použitými polymérmí boli Eudragit a hydroxypropylcelulóza, čím sa vytvoril matricový film umožňujúci predĺžené uvoľňovanie terbinafinu. Boli taktiež úspešne vyvinuté filmotvorné hydrogély na transdermálnu aplikáciu tolterodínu, ktorý sa používa na liečbu hyperaktívneho močového mechúra. Biologická dostupnosť liečiva bola dokonca o niečo vyššia v porovnaní s perorálnou biodostupnosťou.⁶⁵

1.4.3 Filmotvorné emulzie

Emulzie sú kvapalné prípravky tvorené olejovou a vodnou fázou. Kvôli ich termodynamickej nestabilite je potrebné ich stabilizovať použitím emulgátora. V prípade filmotvorných emulzií, použité polyméry zastávajú funkciu nielen filmotvorných činidiel, ale aj stabilizátorov, čo vedie k zníženiu množstva emulgátora potrebného na stabilizáciu danej emulzie. Filmotvorný polymér je rozpustený alebo dispergovaný v prchavom rozpúšťadle a tvorí spojitú fázu. Pri odparovaní rozpúšťadla sa viskozita polymérnej fázy zvýši, čo stabilizuje filmotvornú emulziu. LL je súčasťou dispergovanej fázy a difunduje cez vonkajšiu polymérnu fázu do pokožky. V dôsledku umiestnenia LL v dispergovanej fáze,

nedochádza pri odparovaní rozpúšťadla k presýteniu a kryštalizácii liečiva.⁵⁹ Padula a kol.⁶⁶ vyvinuli filmy s mikroemulziou na transdermálnu aplikáciu levotyroxínu, ktorý bol integrovaný do vopred pripravenej mikroemulzie a následne vložené do transdermálnych filmov, čím sa docielilo predĺžené uvoľňovanie LL.

1.5 Hodnotenie FFS a *in situ* filmov

Filmotvorné systémy predstavujú pomerne novú liekovú formu, pre ktorú zatiaľ nie sú v liekopise uvedené žiadne špecifické testy. Podľa ich formulácie a vlastností by patrili do článku Tekuté prípravky na kožné použitie, ale ani tam nie sú uvedené pokyny pre kontrolu kvality finálnych *in situ* filmov. V literatúre¹⁵ narazíme na pár metód, ktoré budú postupne spomenuté v ďalších podkapitolách.

Novovytvorené filmotvorné formulácie musia spĺňať určité vlastnosti, ktoré platia nielen pre filmotvorný roztok/gél/emulziu, ale aj pre *in situ* film. Na posúdenie vhodnosti formulácií slúžia charakteristiky ako napr. viskozita, doba schnutia, lepidlosť vonkajšieho povrchu, kozmetická príťažlivosť a integrita filmu po určitom čase nosenia (~18 h). Ideálna formulácia by mala mať nízku viskozitu, aby bola umožnená aplikácia prípravku vo forme spreja, čo by zabezpečilo presné a zároveň flexibilné dávkovanie. Doba schnutia je pre vytvorenie filmu kľúčovým parametrom FFS.⁶⁷ V literatúre sa uvádza, že doba schnutia by nemala byť dlhšia ako 5 min.⁶⁸ Taktiež sa vyžaduje, aby vytvorený film transparentný a nelepivý. Mal by vykazovať určitú stálosť na koži, aby bol schopný zabezpečiť nepretržitý prísun liečiva počas dlhšieho časového obdobia. Tieto vlastnosti novej liekovej formy sa pre praktickú aplikáciu považujú za kľúčové najmä z pohľadu pacientov.⁶⁷

1.5.1 Doba odparovania rozpúšťadla

Doba, resp. rýchlosť odparovania organického rozpúšťadla zo systému je rozhodujúcim faktorom v procese tvorby polymérneho filmu. Krátka doba schnutia sa všeobecne považuje za žiadúcu, ale môže mať aj nepriaznivé účinky na výsledný film. Príkladom môže byť situácia, kedy kvapôčky obsahujúce polymér začnú vysychať skôr, než dopadnú na povrch substrátu (podobne ako pri procese sušenia rozprašovaním) alebo sa rozšíria na povrch (efekt pomarančovej kôry). Na druhej strane, ak sa rozpúšťadlo odparuje príliš pomaly, môže dôjsť k nadmernému zmáčaniu povrchových substrátov, v extrémnych prípadoch sa začnú rozpúšťať.

Vyparovanie rozpúšťadla závisí od teploty, atmosférického tlaku, pohybu vzduchu a v prípade vody aj od relatívnej vlhkosti. Väčšinu faktorov evaporácie rozpúšťadla je možné modifikovať úpravou podmienok spracovania.⁶⁹ Pre testovanie doby evaporácie sa filmotvorný systém naniesie na podložné sklíčko a merá sa čas dosiahnutia suchého stavu. Film sa považuje za suchý, ak na podložnom sklíčku nie je viditeľná žiadna tekutina.¹⁵ Prípadne sa podložné sklíčko s testovacou vzorkou zváži na začiatku a vo vopred stanovených intervaloch, počas ktorých dochádza k evaporácii rozpúšťadla.⁷⁰

1.5.2 Štruktúra povrchu

Medzi významné testovacie parametre patrí aj povrchová štruktúra. Na získanie informácií o distribúcii liečiva, povrchovej textúre, hrúbke, či počte pórov na povrchu polymérneho filmu nám poslúžia zobrazovacie techniky, hlavne skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM), transmisná elektrónová mikroskopia (TEM) a mikroskopia atómovej sily (AFM).⁷¹ AFM poskytuje informácie o topografických a mechanických vlastnostiach polymérnych filmov, ktoré sa zvyčajne porovnávajú s vlastnosťami kože. Vytvára obraz homogenity a drsnosti povrchu filmov v nanometroch a nevyžaduje žiadne špeciálne ošetrovanie pred meraním. TEM na rozdiel od AFM poskytuje aj mikroštruktúrne či chemické informácie o povrchu filmu. Na zobrazenie pomocou metódy SEM je potrebný kovový povlak na zvýšenie kontrastu a získanie presných rozmerových meraní.⁷²

1.5.3 Hrúbka filmu

Pre pohodlnú aplikáciu *in situ* filmov je potrebné zaistiť aj ich primeranú hrúbku. Napríklad ideálna hrúbka bukálnych filmov by mala byť v rozsahu 50 až 1000 μm .⁷³ Na hrúbku má vplyv mnoho faktorov, okrem iného aj množstvo zmäkčovadla v danej formulácii sa môže podieľať na jej zvýšení.⁷⁴ Vo všeobecnosti sa hrúbka filmov meria pomocou Vernierovho posuvného meradla, elektronického digitálneho mikrometra, skrutkového meradla alebo zo SEM snímok.³⁶

1.5.4 Priepustnosť vodnej pary

Priepustnosť vodnej pary *in vitro* sa hodnotí podľa modifikovanej metódy z Britského liekopisu,⁷⁵ kde je definovaná ako množstvo vody prejdenej cez jednotku plochy filmu za jednotku času. Tento údaj je dôležitý pri určovaní permeačných

charakteristík filmu, keďže permeabilita vodnej pary má vplyv na vlastnosti pokožky, ako je hydratácia stratum corneum, prietok krvi a teplota kože.⁷⁶ Vzorky tenkých filmov o definovanej ploche sa vložia do vytárovaných vialiek naplnených vodou a následne sa umiestnia do exsikátora. Tam sú pri konštantnej teplote udržiavané určitú dobu a v stanovených časových intervaloch odvážené. Z úbytku hmotnosti vialiek sa vypočíta priepustnosť vodnej pary (WVP) ako množstvo vody, ktoré prenikne cez film vo vzťahu k ploche povrchu a času. Popisuje to rovnica (3):⁶⁷

$$WVP = \frac{w}{A \cdot t} \quad (3)$$

kde

w úbytok hmotnosti obsahu vo vialke [g]

A plocha povrchu [cm²]

t čas [h]

1.5.5 Reologické a mechanické vlastnosti

Štúdie reologických vlastností popisujú tokové správanie a viskoelastické vlastnosti filmtvorných systémov, ktoré by mohli ovplyvniť roztierateľnosť, hrúbku, rovnomernosť odlievacej vrstvy a mechanické vlastnosti biopolymérneho filmu.⁷⁷

Viskoelastické vlastnosti *in situ* filmov sa určujú z dynamických modulov, ktorými sú elastický modul (G') a viskózný modul (G'').⁷⁸ Viskózne správanie sa prejavuje, keď $G'' > G'$ a systém je z reologického hľadiska kvapalinou (liquid-like). Zatiaľ čo gélovité správanie sa prejavuje, keď $G' > G''$ a jedná sa o pevnú sústavu (solid-like). Analýza týchto modulov poskytuje informácie o štruktúre, najmä z hľadiska tuhosti, pružnosti a deformovateľnosti.⁷⁹

FFS sa často správa ako neneutonská kvapalina a vykazuje pseudoplastické správanie, ktorého zdanlivá viskozita sa znižuje so zvyšujúcim sa namáhaním.⁸⁰

Viskozita je závislá predovšetkým na koncentrácii polyméru a jeho plastifikácii. So zvyšujúcou sa koncentráciou plastifikátora viskozita klesá. Príliš vysoká viskozita sťažuje dispergovanie zložiek a elimináciu vzduchových bublín vzniknutých pri príprave, preto by sa na tvorbu filmu nemal použiť príliš viskózný roztok.⁸¹

Mechanické vlastnosti, ako je pevnosť v ťahu a percento predĺženia pri pretrhnutí, sa používajú na charakterizáciu polymérnych filmov z hľadiska ich odolnosti voči oderu a pružnosti.⁶⁷ Sú taktiež jednými z dôležitých parametrov pri hodnotení filmov, pretože ich nedostatočné mechanické vlastnosti by mohli viesť počas používania či skladovania ku vzniku prasklín.⁸² Nízku pevnosť v ťahu a percento predĺženia pri pretrhnutí vykazujú mäkké a krehké polyméry, zatiaľ čo tvrdé a pružné polyméry majú vysokú pevnosť v ťahu a vysoké percento predĺženia pri pretrhnutí.⁸³

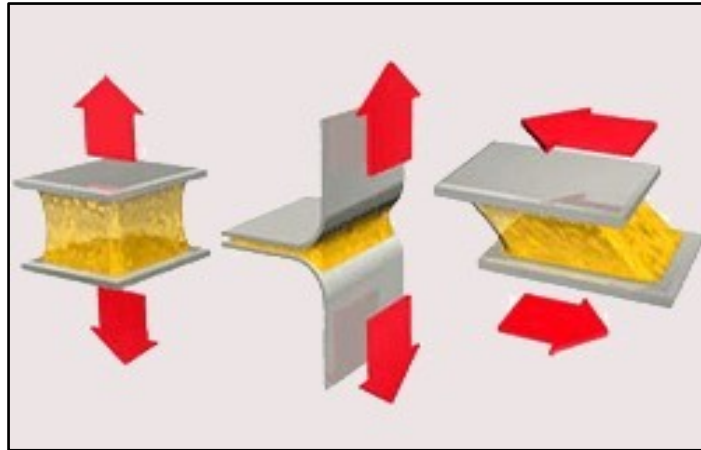
1.5.6 Termické vlastnosti

Pre hodnotenie termických vlastností FFS sa používajú dve metódy: diferenciálna skenovacia kalorimetria (DSC) a termogravimetrická analýza (TGA). TGA slúži na meranie tepelnej stability materiálov vrátane polymérov. Pri tejto metóde sa merajú zmeny hmotnosti vzorky pri zvyšovaní jej teploty.⁸⁴ DSC je účinný analytický nástroj na charakterizáciu fyzikálnych vlastností. Umožňuje stanoviť teplotu skleného prechodu (T_g), teplotu topenia (T_m), teplotu kryštalizácie (T_c), entalpiu (H) a tepelnú kapacitu (C_p).⁸⁵ DSC meria teplotné rozdiely v tepelnom toku vzorky a referenčného materiálu pri konštantnej rýchlosti ohrevu a zisťuje rozdiely v tepelnom toku medzi oboma materiálmi.⁸⁶ Oproti TGA je táto metóda oveľa viacej preferovaná, pretože umožňuje detekciu prechodov v širokom rozsahu teplôt (-90 až 550 °C) a uľahčuje ich kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu.⁸⁷

1.5.7 Adhezívne vlastnosti

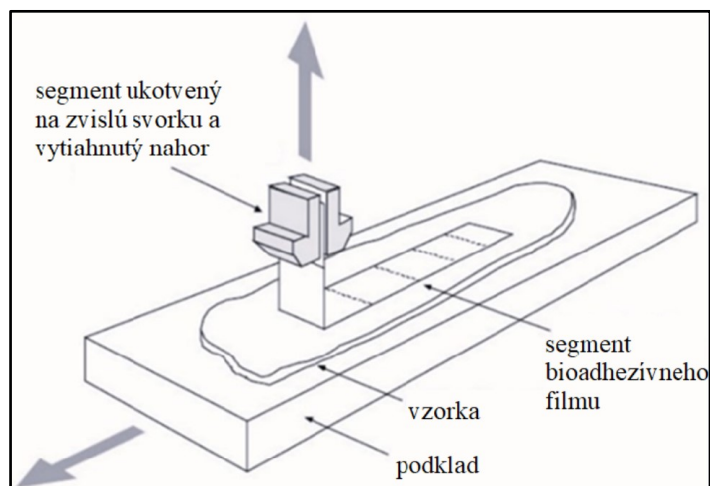
Pri testovaní FFS, či *in situ* filmov, je dôležité rozlišovať adhezivitu vonkajšej vrstvy filmu, tzv. lepivosť filmu a adhezivitu vnútornej vrstvy, resp. príľnavosť v mieste aplikácie. Vonkajšia vrstva výsledného *in situ* filmu by mala byť nelepivá. Čo sa týka príľnavosti, novoformulovaný film by sa mal v mieste aplikácie vyznačovať dostatočnou príľnavosťou k pokožke, aby bol zaručený dostatočný prienik liečiva s kožou, čo následne vedie k vyššiemu a predĺženému terapeutickému účinku.⁸⁸

Najznámejšou metódou na hodnotenie mukoadhezivít systému *in vitro* sú ťahové skúšky, kedy sa stanovuje sila potrebná na oddelenie filmu od substrátu. Deštrukcia adhézneho spoja je zvyčajne pôsobením šmykovej, ťažnej alebo odtrhávacej sily (Obr. 7).⁸⁹



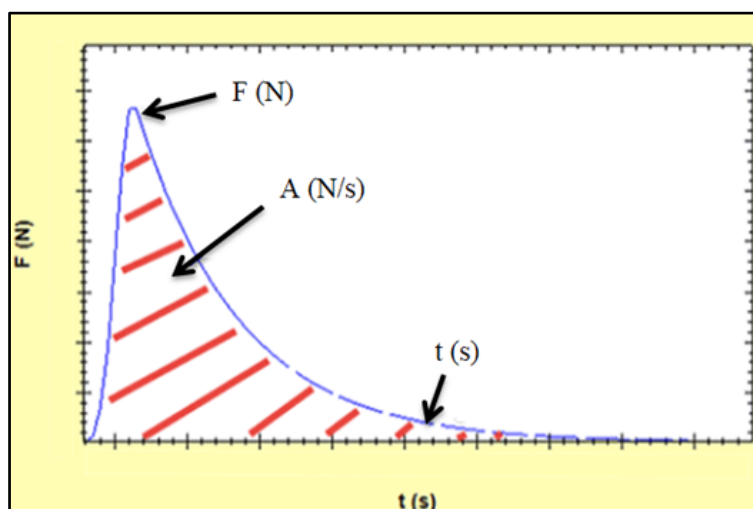
Obr. 7: Ilustratívne znázornenie ťažnej (vľavo), odtrhávacej (v strede) a šmykovej (vpravo) sily⁹⁰

Odtrhávací (peel) test je bežnou testovacou technikou na určenie adhezívnych vlastností bioadhezívnych systémov. Uplatňuje sa hlavne u bukálnych liekových foriem a transdermálnych náplastí. U *in situ* filmov je jeho použitie však obmedzené. Podľa štúdie McCarron a kol.⁹¹ bola k pohyblivému podkladu prilepená prasacia koža. Bioadhezívny film bol konštantnou silou po konštantnú dobu prilepený na prasaciu kožu, pričom jeden jej koniec bol uchytený do svoriek. Svorky sa pohybovali nahor a plošina sa posúvala horizontálne tak, aby medzi filmom a kožou bol uhol 90° (Obr. 8).



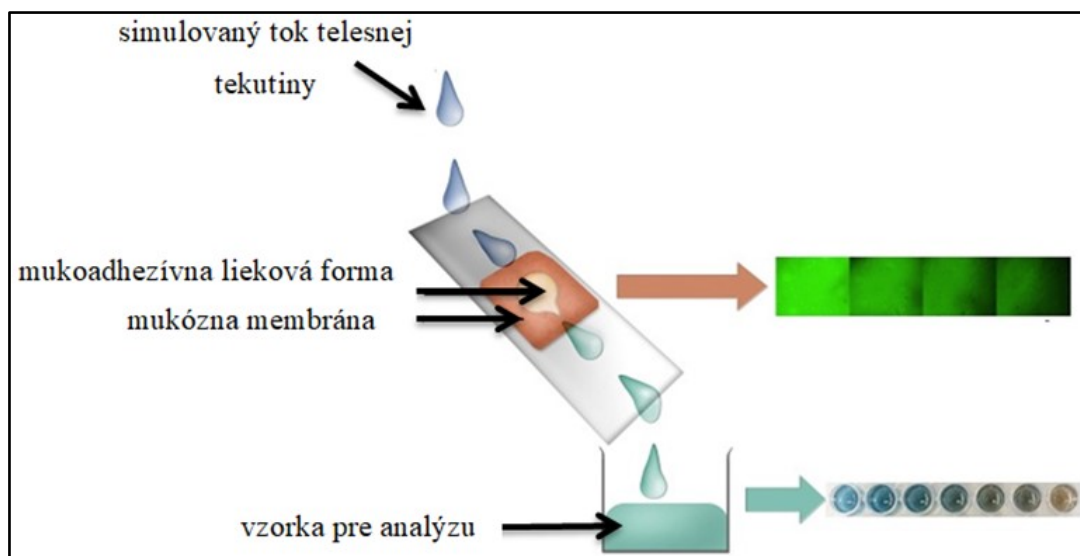
Obr. 8: Znázornenie princípu odtrhávacieho testu⁹¹

Adhezivitu je možné stanoviť na absolútnom rotačnom reometri. Používa sa systém dvoch paralelných plôch (plate-plate), na jednej je umiestnená testovaná vzorka, na druhej modelový substrát. Horná geometria pritlačí nanesenú vzorku konštantnou silou po konštantnú kontaktnú dobu a potom je odtrhnutá konštantnou silou naspäť. Pre vyhodnotenie adhezivity je možné použiť nasledujúce tri parametre: maximálna (normálová) sila F (N) - potrebná pre odtrhnutie hornej geometrie od vzorky, čas t (s) - potrebný k zníženiu normálovej sily o 90 % a plocha pod krivkou sila/čas A (N/s), ktorá je mierou adhézných a kohéznych síl (Obr. 9).



Obr. 9: Závislosť maximálnej sily na čase zobrazujúca hlavné parametre pre posúdenie adhezívnych a kohezívnych vlastností⁹²

Ďalšou metódou na hodnotenie adhezivity sú prietokové (zmývacie) testy, ktoré sa často používajú na odhadnutie mukoadhezívnych vlastností liekových foriem podávaných v oblastiach ľudského tela, kde sú sliznicové tkanivá vysoko ovplyvňované prúdením biologických tekutín a je náročné ich testovať klasickým ťahovým testom. Táto metóda môže slúžiť na testovanie nielen gastrointestinálnych, očných, nazálnych a vaginálnych formulácií, ale aj polotuhých. Zahŕňa simuláciu biologického toku, ktorý zmýva dávkovú formu z povrchu slizničného tkaniva.⁹³ Princíp prietokového testu je znázornený na Obr. 10.

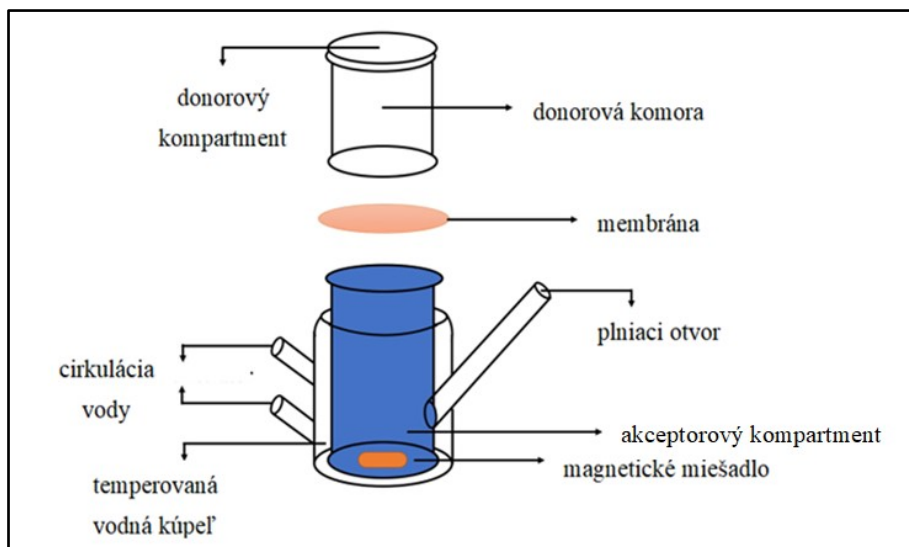


Obr. 10: Ilustratívne znázornenie prietokového testu⁹⁴

Testovaná mukoadhezívna lieková forma sa aplikuje na slizničné tkanivo, ktoré je umiestnené na testovacom sklíčku. Pomocou perfúznej pumpy je simulovaný biologický tok s použitím média, ako sú umelé sliny alebo tlmivý roztok. Dochádza postupne k premytiu slizničného tkaniva obsahujúceho mukoadhezívum. Tekutina je zachytávaná v nádobe a slúži neskôr k analýze testovanej vzorky. Samotná analýza sa môže vykonať buď kolorimetriou tekutiny zachytávanej v nádobe alebo na slizničnom tkanive na monitorovanie retencie, spektrofotometricky (UV-VIS, fluorescencia) alebo pomocou chromatografických techník (vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, gélová permeačná chromatografia).⁹³

1.5.8 Disolučné a permeačné charakteristiky

Disolučné štúdie *in vitro* sa používajú na predpovedanie liberačných a permeačných charakteristík liečiva *in vivo*. Franzova difúzna cela (Obr. 11) sa používa na stanovenie penetrácie alebo permeácie liečiva cez modelovú membránu. Cela sa skladá z dvoch kompartmentov - donorového a akceptorového, medzi ktorými je pripevnená difúzna membrána. Donorová časť je miestom pripojenia FFS k membráne, zatiaľ čo akceptorová časť obsahuje fyziologické médium. Vzorky sa odoberajú cez plniaci otvor v akceptorovom kompartimente a analyzujú sa permeované množstvo liečiva vhodnou analytickou metódou.⁶⁷



Obr. 11: Schéma Franzovej difúznej cely⁹⁵

Testovanie *ex vivo* prebieha na izolovaných zvieracích tkanivách pomocou Franzovej/Keshary-Chienovej difúznej cely. Ako uvádza štúdia,⁹⁶ na testovanie bola použitá potkana koža, ktorá bola následne umiestnená medzi dva kompartmentmi, pričom stratum corneum smerovala k donorovej časti a dermis k akceptorovej. Na povrch kože potkana bol aplikovaný testovaný FFS, ktorý po vysušení vytvoril film. Akceptorový kompartment bol tvorený fyziologickým roztokom fosfátového pufru pH 7,4 a udržiavaný na teplote $37 \pm 0,5$ °C.

2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

2.1 Použité prístroje a pomôcky

Analytické digitálne váhy CAHN 26 (Cahn Instruments, USA)

Analytické digitálne váhy KERN ABS (Fisher Scientific, Nemecko)

DSC 200 F3 Maia (Netzsch, Nemecko)

Hliníkové téglíky s viečkom (Netzsch, Nemecko)

HPLC QqQ 6470 (Agilent Technologies, USA)

Magnetická miešačka (IKA – WERKE, Nemecko)

Rotačný reometer Kinexus Pro+ (Malvern Instruments Ltd, Veľká Británia)

Teplovzdušná sušiareň ULE 400 (Mettler, Nemecko)

2.2 Použité suroviny

A2 poly(laktid-*ko*-glykolid) vetvený na kyseline polyakrylovej 2 % v reakčnej zmesi (FaF UK HK)

A4 poly(laktid-*ko*-glykolid) vetvený na kyseline polyakrylovej 4 % v reakčnej zmesi (FaF UK HK)

Acetón p.a. (Lach-Ner s.r.o., Česká republika)

AkutoTM sprej (Aveflor, a.s., Česká republika)

Ethyl-acetát (Merck, Česká republika)

Ethyl-pyruvát (Merck, Česká republika)

Isopropanol (Penta, Česká republika)

Kanabidiol (Ilesol pharmaceuticals d.o.o., Chorvátsko)

Methyl-salicylát (Merck, Česká republika)

PLGA poly(laktid-*ko*-glykolid) 50:50 (FaF UK HK)

Tablety pre prípravu fosforečnanového pufru pH 7,4 (Merck, Česká republika)

URGO Filmogel po bodnutí hmyzom (Laboratoires URGO HEALTHCARE, Francúzsko)

2.3 Príprava a zloženie FFS

Bolo pripravených 21 rôznych formulácií kvapalných sústav pre tvorbu *in situ* filmov (FFS). Sústavy boli tvorené lineárnym PLGA polymérom alebo jeho derivátmi vetvenými na kyseline polyakrylovej (A2, A4), liečivou látkou (kanabidiol), organickým rozpúšťadlom (ethyl-acetát, acetón, isopropanol), prípadne plastifikátormi (methyl-salicylát, ethyl-pyruvát). Jednotlivé zložky FFS formulácií sú zhrnuté v Tab. 4.

Tab. 4: Zloženie FFS

| FFS | Polymérny systém (PS) | | | Organické rozpúšťadlo (OR) | Pomer PS a OR | |
|-----|-----------------------|---------|----------------------|----------------------------|---------------|-----|
| | Liečivo | Polymér | Plastifikátor (10 %) | | | |
| 1 | Kanabidiol 10 % (CBD) | A2 | - | EA | 1:1 | |
| 2 | | A4 | | | | |
| 3 | | A2 | EP | | | |
| 4 | | A4 | | | | |
| 5 | | A2 | MS | | | |
| 6 | | A4 | | | | |
| 7 | | PLGA | - | EA | 1:2 | |
| 8 | | A2 | | | | |
| 9 | | A4 | | | | |
| 10 | | PLGA | - | Ac: IPA (1:1) | 1:1 | |
| 11 | | | | 1:2 | | |
| 12 | | | | Ac: IPA (1:3) | 1:1 | |
| 13 | | | | 1:2 | | |
| 14 | | | | EP | Ac: IPA (1:1) | 1:1 |
| 15 | | | | | 1:2 | |
| 16 | | | Ac: IPA (1:3) | 1:1 | | |
| 17 | | | | 1:2 | | |
| 18 | | | MS | Ac: IPA (1:1) | 1:1 | |
| 19 | | | | | 1:2 | |
| 20 | | | | Ac: IPA (1:3) | 1:1 | |
| 21 | | | | | 1:2 | |

Bol pripravený FFS s hmotnosťou 3 g. Polyméry boli najprv rozdrobnené v porcelánovej trenke a následne 1,2-1,35 g odvážené do vopred vytárovej sklenenej vialky. K polyméru bola pridaná liečivá látka (10 %) a pri laboratórnej teplote rozpustené v organickom rozpúšťadle (resp. v zmesi rozpúšťadiel). Hmotnosť OR bola ekvivalentná k hmotnosti všetkých zložiek PS. V prípade plastifikácii polyméru, bol k polymérnemu systému pridaný ešte EP alebo MS (10 %). Takto pripravená zmes bola ponechaná v uzavretej vialke na elektromagnetickej miešačke až do úplného rozpustenia. Podobným spôsobom boli pripravené aj FFS s použitím dvojnásobného množstva organického rozpúšťadla oproti polymérnemu systému.

2.4 Termická analýza

Pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie (DSC) bola realizovaná termická analýza kanabidiola, PLGA polymérov, plastifikátorov a A4 *in situ* filmu získaného z FFS 2 (Tab. 4) evaporáciou rozpúšťadla v teplovzdušnej sušiarňi pri 40 °C po dobu 15 min.

Vzorky pre DSC boli navážené na analytických váhach Cahn 26. Najprv bol zvážený prázdny téglík aj s viečkom a zaznamenaná hmotnosť. Potom bola do téglíka pridaná testovacia vzorka o hmotnosti približne 10,0 mg a následne to bolo hermeticky uzavreté zlisovaním. Opäť bol téglík zvážený a jeho hmotnosť zaznamenaná. Hmotnosť testovanej vzorky bola určená ako rozdiel hmotnosti zlisovaného téglíka so vzorkou a prázdneho téglíka. Prístroj DSC 200 F3 Maia, využívaný pri meraní, bol zapnutý asi hodinu pred prvým meraním a preplachovaný inertným dusíkom. Do meracej cely bol vložený téglík s testovanou vzorkou a porovnávací štandard (prázdny téglík o známej hmotnosti), každý na určený teplotný senzor. Po uzavretí cely príslušnými krytmi boli v počítačovom programe Proteus nastavené parametre merania, t. j. hmotnosť prázdneho téglíka a samotnej vzorky, hmotnosť štandardu a teplotné režimy pre sústavy s liečivom (Obr. 12) a bez liečiva (Obr. 13). Boli vyhodnotené získané termogramy. Teplota topenia (T_m) a evaporácie (T_e) boli stanovené z krivky prvého ohrevu a teplota skleneného prechodu (T_g) v inflexnom bode krivky druhého ohrevu.

| Total Selection | | Dynamic | Heating | Cooling | Isothermal |
|-------------------------------------|----|------------|----------|-------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1 | Dynamic | -20.0 °C | -10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2 | Isothermal | -20.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3 | Dynamic | 250.0 °C | 10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4 | Isothermal | 250.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5 | Dynamic | -20.0 °C | -20.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6 | Isothermal | -20.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 7 | Dynamic | 250.0 °C | 10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 8 | Isothermal | 250.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 9 | Dynamic | 20.0 °C | -10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 10 | Isothermal | 20.0 °C | 5 min | |

Obr. 12: Teplotný režim pre CBD, plastifikátory a *in situ* film

| Total Selection | | Dynamic | Heating | Cooling | Isothermal |
|-------------------------------------|----|------------|----------|-------------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | 1 | Dynamic | -20.0 °C | -10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 2 | Isothermal | -20.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 3 | Dynamic | 60.0 °C | 10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 4 | Isothermal | 60.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 5 | Dynamic | -20.0 °C | -20.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 6 | Isothermal | -20.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 7 | Dynamic | 60.0 °C | 10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 8 | Isothermal | 60.0 °C | 5 min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 9 | Dynamic | 20.0 °C | -10.0 K/min | |
| <input checked="" type="checkbox"/> | 10 | Isothermal | 20.0 °C | 5 min | |

Obr. 13: Teplotný režim pre PLGA deriváty

2.5 Skenovacia elektrónová mikroskopia

Bola hodnotená mikroštruktúra PLGA polyméra, CBD a PLGA *in situ* filmov získaných z FFS 10 a 14 (Tab. 4). Vzorky boli testované pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu FlexSEM 1000 pri urýchľovacom napätí 15 kV. Príprava filmov pre SEM zahŕňala rozotrenie alebo nástrek FFS na podložné sklíčko a evaporáciu rozpúšťadla pri laboratórnej teplote. Samotné meranie bolo realizované na katedre fyziky Prírodovedeckej fakulty Univerzity Hradec Králové Mgr. Janom Loskotom, Ph.D. Vzorky boli potiahnuté vrstvou kovu – zlata.

2.6 Doba odparovania rozpúšťadla

Bola testovaná doba evaporácie organického rozpúšťadla z FFS 10-21 (Tab. 4). Na analytických váhach bolo vytárované podložné sklíčko s vopred vyznačenou testovacou plochou 7 cm². Na ňu bol pomocou mikropipety nanesený FFS a v časových intervaloch 1 min bol zaznamenávaný úbytok hmotnosti. Každý FFS bol testovaný trikrát, z čoho sa určil priemer a SD. Priebeh odparovania bol vyhodnotený ako úbytok hmotnosti FFS podľa vzorca (4):

$$E (\%) = \frac{m_0 - m_t}{m_R} \cdot 100 \quad (4)$$

E (%) evaporácia rozpúšťadla

m₀ hmotnosť FFS v čase 0

m_t hmotnosť FFS v čase t

m_R hmotnosť rozpúšťadla použitého pri príprave FFS

2.7 Adhezívne vlastnosti

Bola hodnotená adhezivita dvoch komerčných prípravkov: Akutol sprej a URGO Filmogel a novoformulovaných FFS 7-9 (Tab. 4). Bola meraná adhezivita FFS hneď po aplikácii a adhezivita *in situ* filmu po 5 min evaporácie organického rozpúšťadla pri teplote 32 °C. Meranie prebiehalo na absolútnom rotačnom reometri Kinexus Pro+ firmy Malvern testom *rSolution 0019 Determination of pressure sensitive tack and adhesion using axial measurements*. Bola využívaná geometria typu doska-doska o priemere hornej geometrie 20 mm (PU20). Bola nastavená nulová medzera (*zero gap*) a spodná geometria vyhriata na potrebnú teplotu. Potom boli nastavené parametre testu, t.j. kontaktný čas, kontaktná sila a rýchlosť odtrhnutia hornej geometrie (Tab. 5).

Tab. 5: Podmienky merania pre testovanie adhézie

| | | |
|--------------------------------------|---------|-------|
| Teplota spodnej geometrie | 32 °C | |
| Kontaktný čas | 30 s | |
| Kontaktná sila | 1 N | |
| Hmotnosť vzorky | 100 mg | |
| Doba evaporácie rozpúšťadla | 0 s | 5 min |
| Rýchlosť odtrhnutia hornej geometrie | 10 mm/s | |

Pred meraním každej vzorky bola spodná geometria odobraná z prístroja, vytárovaná, odvážených 100 mg FFS a vložená na pôvodné miesto. Test bol spustený hneď po nanosení FFS alebo až za 5 min, počas čoho prebiehala evaporácia organického rozpúšťadla. Horná geometria zišla dole, pritlačila nanosenú vzorku silou 1 N po 30 s a vrátila sa naspäť rýchlosťou 10 mm/s. Po dokončení každého merania boli obe geometrie vyčistené acetónom. Boli merané vždy 3 novonanesené vzorky. Pre vyhodnotenie adhezivity bola použitá maximálna (normálová) sila F (N) potrebná pre odtrhnutie hornej geometrie od vzorky, čas t (s) potrebný k zníženiu normálovej sily o 90 % a plocha pod krivkou sila/čas A (N/s). Z nameraných výsledkov bol vypočítaný priemer a SD.

2.8 Disolúcia CBD z *in situ* filmov

Pre testovanie disolúcie boli použité FFS 1-6, 8, 12 a 16 (Tab. 4). 200,0 ml FFS bolo umiestnené do vopred vytárovanej sklenenej vialky a nechané v teplovzdušnej sušiarňi pri 40 °C po dobu 15 min odparovať rozpúšťadlo, aby sa vytvoril tenký film na dne vialky. Bol pripravený fosforečnanový pufer pH 7,4 rozpustením tablety pre prípravu v 200,0 ml čistenej vody na elektromagnetickej miešačke za laboratórnej teploty.

In situ filmy boli preliate 15,0 ml pufru predhriateho na teplotu 37 °C a vložené do vodného kúpeľa s integrovanou trepacou platformou, ktorá bola vytemperovaná na 37 °C. Frekvencia trepania bola 50 kmitov/min a prebiehalo horizontálnym pohybom po dráhe 22 mm. Vo vopred stanovených časových intervaloch 3, 10, 24, 48 a 72 hod boli vialky z vodného kúpeľa vybrané, disolučná kvapalina vyliata, filmy znovu

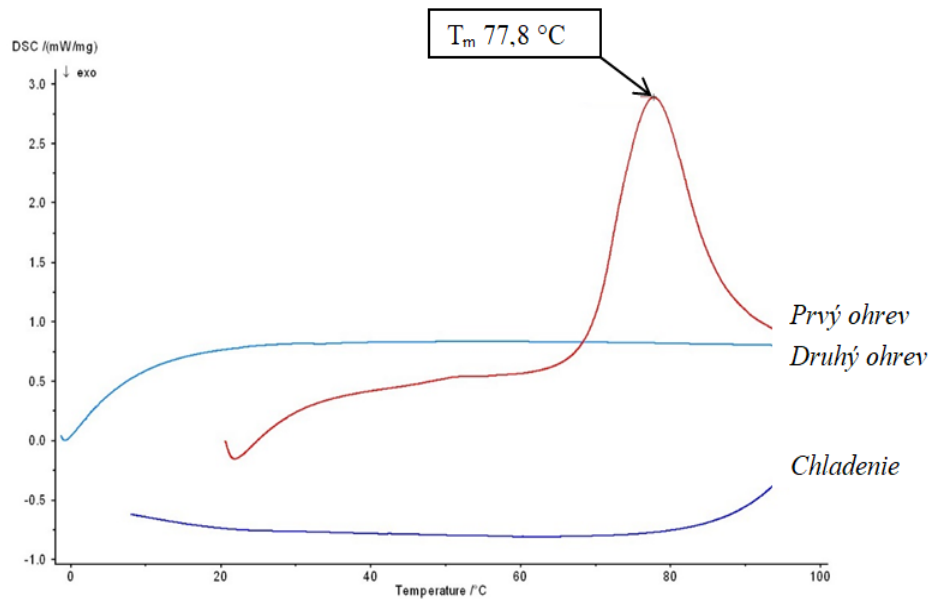
preliate 15,0 ml média vopred predhriateho na 37 °C a vložené späť. Do troch 2 ml vialiek (triplicitné vzorky A, B a C) bol odobraný 1,0 ml disolučného média. Vialky boli uchovávané v mrazničke a po skončení disolučného testu dané k HPLC analýze CBD, realizované na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Hradec Králové PharmDr. Rudolfom Andrýsom, Ph.D.

Vzorky boli rozmrazené, centrifugované a supernatant bol následne sfiltrovaný cez filter 0,22 µm. Supernatant a sediment boli analyzované na HPLC Agilent QqQ 6470 pomocou kolóny Zorbax Eclipse C18 RRHD (50 x 2.1 mm, 1.8 µm), mobilná fáza bola (A) 5 mM mravenčan amonný s 0.1% kyselinou mravenčou, (B) acetonitril s 0.1% kyselinou mravenčou.

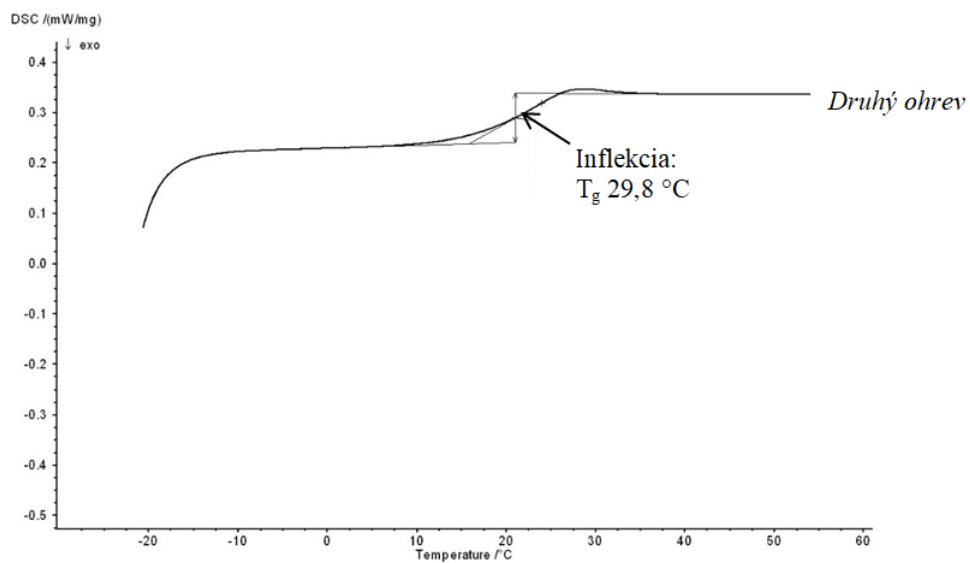
Koncentrácia CBD v µg/ml bola prepočítaná na množstvo CBD uvoľneného z filmu v daný časový interval. Bol vypočítaný percentuálny podiel uvoľneného CBD z celkového množstva CBD obsiahnutého vo filme a graficky znázornený časový priebeh uvoľňovania CBD z filmov.

3 VÝSLEDKY

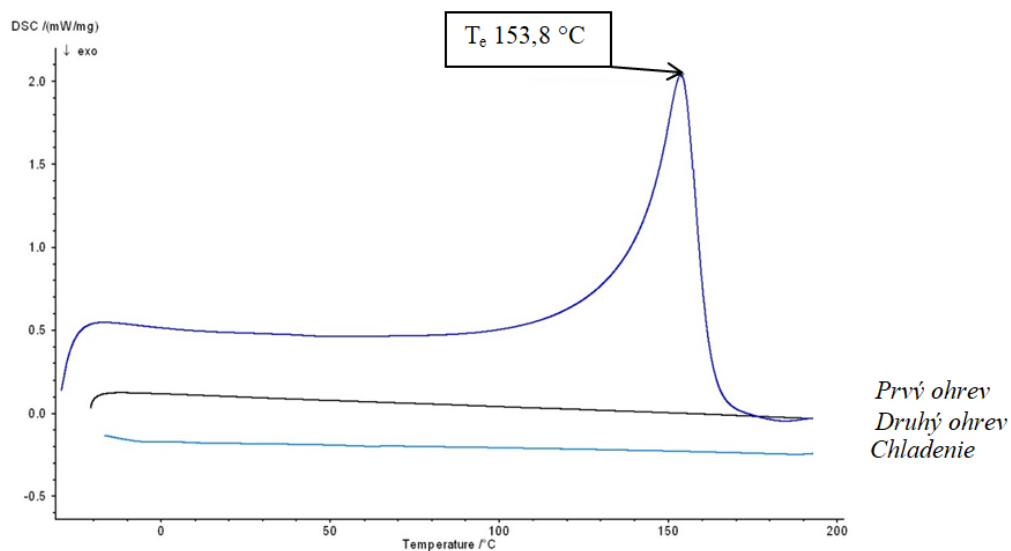
3.1 Termická analýza



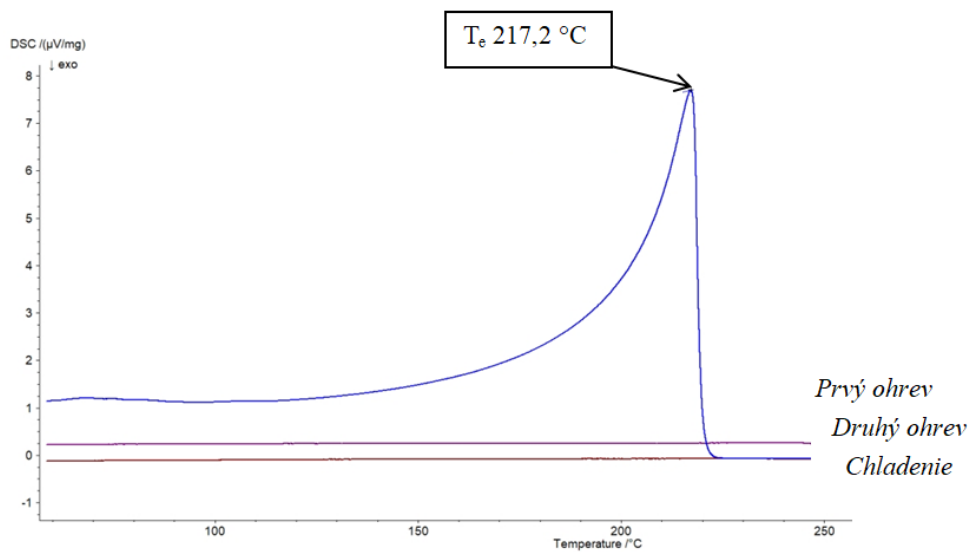
Obr. 14: DSC sken kanabidiola



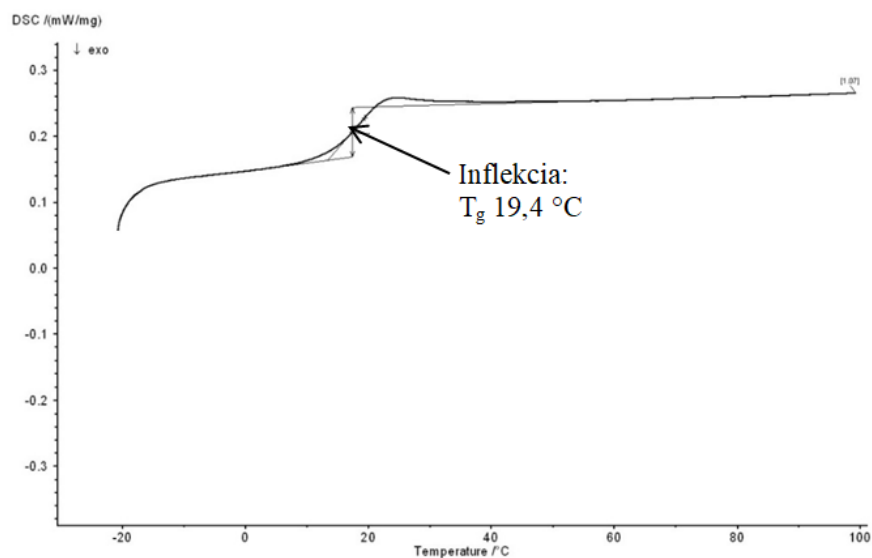
Obr. 15: DSC sken PLGA



Obr. 16: DSC sken ethyl-pyruvátu



Obr. 17: DSC sken methyl-salicylátu

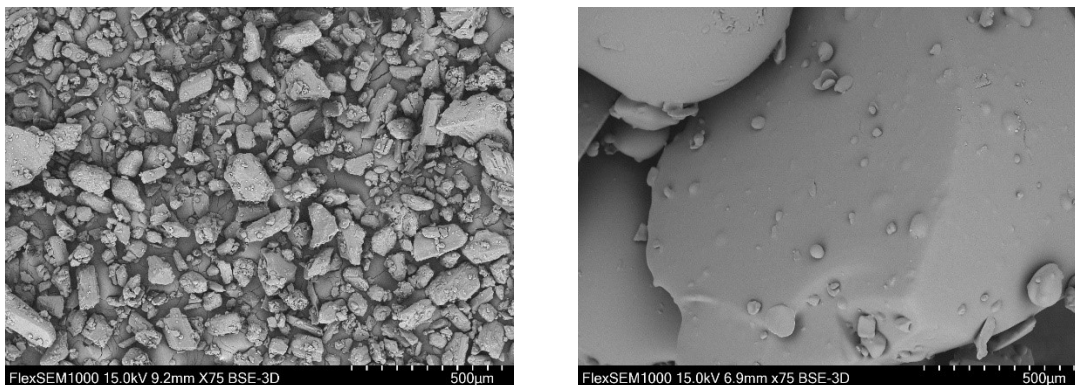


Obr. 18: DSC sken A4 *in situ* filmu s obsahom 10 % CBD

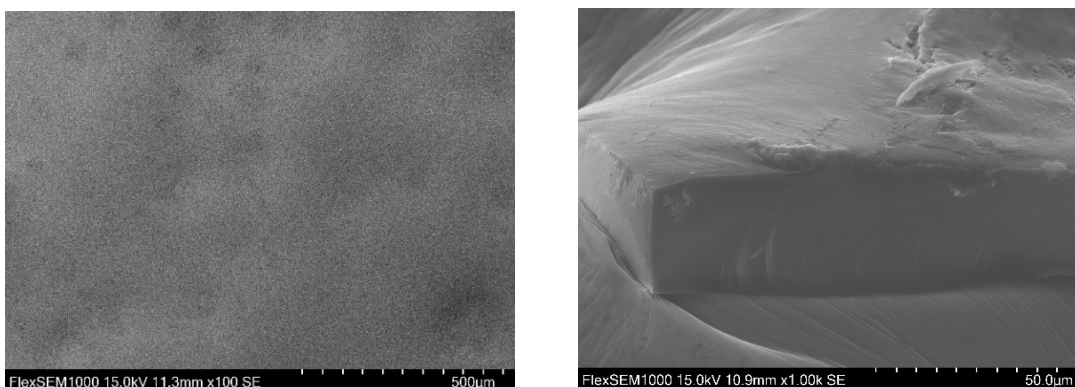
Tab. 6: Hodnoty teploty topenia liečiva, teploty evaporácie plastifikátorov a teploty skleného prechodu PLGA derivátov a *in situ* filmu

| Testovaný materiál | T _m /T _e /T _g (°C) |
|------------------------|---|
| kanabidiol | 77,8 |
| methyl-salicylát | 217,2 |
| ethyl-pyruvát | 153,8 |
| PLGA | 29,8 |
| A2 | 32,6 |
| A4 | 36,5 |
| A4 <i>in situ</i> film | 19,4 |

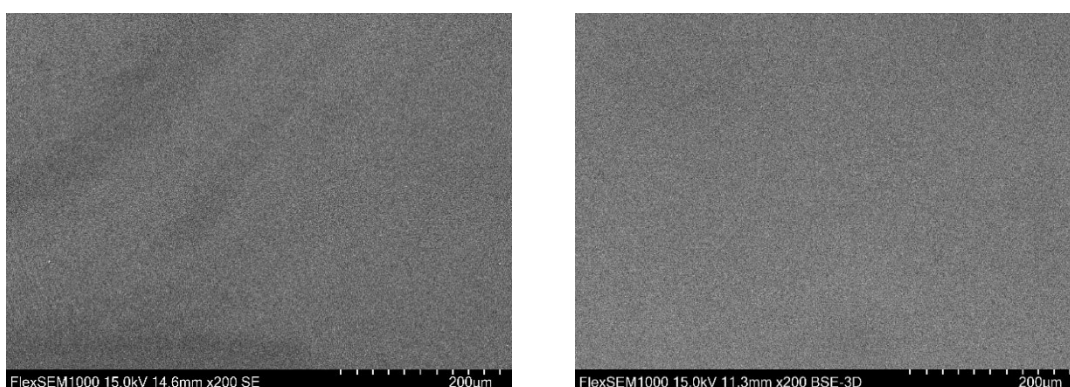
3.2 Skenovacia elektrónová mikroskopia



Obr. 19: SEM snímky CBD (vľavo) a PLGA (vpravo)



Obr. 20: SEM snímky *in situ* filmu z FFS 10 aplikovaného roztieraním:
povrch (vľavo) a lom (vpravo)



Obr. 21: SEM snímky *in situ* filmu z FFS 10 (vľavo) a FFS 14 (vpravo)

3.3 Doba odparovania rozpúšťadla

Tab. 7: Vplyv plastifikátora na evaporáciu acetónu a isopropanolu z FFS

| Čas (min) | bez plastifikátora | | EP | | MS | |
|--------------|--------------------|------|-------|------|-------|------|
| | % | SD | % | SD | % | SD |
| 1 | 22,87 | 2,09 | 30,94 | 1,73 | 20,10 | 0,04 |
| 2 | 37,27 | 1,55 | 51,37 | 2,31 | 37,56 | 0,72 |
| 3 | 47,19 | 1,46 | 63,68 | 2,22 | 48,51 | 0,48 |
| 4 | 54,26 | 1,68 | 72,72 | 2,49 | 55,80 | 0,53 |
| 5 | 59,12 | 1,57 | 78,81 | 1,99 | 60,64 | 0,64 |
| 6 | 62,16 | 1,55 | 83,26 | 1,91 | 64,07 | 0,62 |
| 7 | 63,92 | 1,53 | 86,11 | 1,55 | 66,05 | 0,59 |
| 8 | 65,50 | 1,44 | 88,74 | 1,70 | 67,76 | 0,62 |
| 9 | 66,85 | 1,55 | 90,56 | 1,58 | 69,08 | 0,60 |
| 10 | 67,96 | 1,53 | 97,09 | 9,09 | 70,24 | 0,69 |

Tab. 8: Evaporácia acetónu a isopropanolu z neplastifikovaného FFS

| Čas (min) | Ac : IPA 1:1 (1:1) | | Ac : IPA 1:1 (1:2) | | Ac : IPA 1:3 (1:1) | | Ac : IPA 1:3 (1:2) | |
|--------------|-----------------------|------|-----------------------|------|-----------------------|-------|-----------------------|------|
| | % | SD | % | SD | % | SD | % | SD |
| 1 | 22,87 | 2,09 | 32,85 | 0,46 | 23,68 | 2,47 | 30,84 | 3,48 |
| 2 | 37,27 | 1,55 | 51,19 | 1,52 | 38,62 | 5,20 | 49,73 | 3,47 |
| 3 | 47,19 | 1,46 | 62,08 | 1,64 | 48,93 | 7,29 | 62,52 | 3,68 |
| 4 | 54,26 | 1,68 | 70,17 | 1,88 | 56,01 | 10,25 | 74,46 | 3,14 |
| 5 | 59,12 | 1,57 | 76,30 | 2,10 | 60,17 | 12,09 | 84,11 | 3,26 |
| 6 | 62,16 | 1,55 | 80,10 | 2,00 | 63,49 | 13,74 | 93,24 | 2,77 |
| 7 | 63,92 | 1,53 | 82,17 | 1,71 | 65,90 | 14,50 | 100,75 | 2,74 |
| 8 | 65,50 | 1,44 | 83,56 | 1,50 | 67,49 | 15,11 | 107,16 | 2,09 |
| 9 | 66,85 | 1,55 | 84,34 | 1,30 | 69,29 | 15,49 | 112,68 | 1,26 |
| 10 | 67,96 | 1,53 | 85,01 | 1,27 | 70,21 | 15,62 | 116,20 | 0,77 |

Tab. 9: Evaporácia acetónu a isopropanolu z FFS plastifikovaného EP

| Čas (min) | Ac : IPA 1:1 (1:1) | | Ac : IPA 1:1 (1:2) | | Ac : IPA 1:3 (1:1) | | Ac : IPA 1:3 (1:2) | |
|-----------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|-------|--------------------|------|
| | % | SD | % | SD | % | SD | % | SD |
| 1 | 30,94 | 1,73 | 28,10 | 2,23 | 15,28 | 4,90 | 23,91 | 0,44 |
| 2 | 51,37 | 2,31 | 46,83 | 1,93 | 28,32 | 5,21 | 38,26 | 1,07 |
| 3 | 63,68 | 2,22 | 58,85 | 1,78 | 39,09 | 5,37 | 48,09 | 1,47 |
| 4 | 72,72 | 2,49 | 67,16 | 1,75 | 46,20 | 6,97 | 55,87 | 1,90 |
| 5 | 78,81 | 1,99 | 73,17 | 1,56 | 51,38 | 9,01 | 62,69 | 1,85 |
| 6 | 83,26 | 1,91 | 78,32 | 1,72 | 55,16 | 11,23 | 68,56 | 2,13 |
| 7 | 86,11 | 1,55 | 82,09 | 1,84 | 58,30 | 13,56 | 73,50 | 1,85 |
| 8 | 88,74 | 1,70 | 84,95 | 1,88 | 60,69 | 15,36 | 77,53 | 2,19 |
| 9 | 90,56 | 1,58 | 86,81 | 1,66 | 62,30 | 16,42 | 81,15 | 2,13 |
| 10 | 97,09 | 9,09 | 87,58 | 1,50 | 63,79 | 17,17 | 83,93 | 2,25 |

3.4 Adhezívne vlastnosti

Tab. 10: Adhezivita prípravku Akutol sprej

| Vzorka | Po aplikácii | | | Po 5 min | | |
|---------|--------------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 0,2935 | 0,4555 | 0,1616 | 0,628 | 0,7068 | 0,2809 |
| 2 | 0,3910 | 0,5112 | 0,1929 | 1,524 | 0,6351 | 0,5129 |
| 3 | 0,4350 | 0,4705 | 0,1738 | 0,461 | 0,8771 | 0,3518 |
| priemer | 0,3732 | 0,4791 | 0,1761 | 0,8711 | 0,7397 | 0,3819 |
| SD | 0,0724 | 0,0288 | 0,0158 | 0,5715 | 0,1243 | 0,1189 |

Tab. 11: Adhezivita prípravku Urgo filmogel

| Vzorka | Po aplikácii | | | Po 5 min | | |
|---------|--------------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 12,13 | 0,5626 | 3,217 | 0,004 | 1,3820 | 0,1301 |
| 2 | 12,80 | 0,5505 | 3,289 | 0,003 | 2,7940 | 0,2144 |
| 3 | 12,87 | 0,5573 | 3,476 | 0,002 | 1,1750 | 0,4313 |
| priemer | 12,60 | 0,5568 | 3,327 | 0,003 | 1,7837 | 0,2586 |
| SD | 0,41 | 0,0061 | 0,134 | 0,001 | 0,8811 | 0,1554 |

Tab. 12: Adhezivita FFS 7 tvoreného lineárnym PLGA (Tab. 4)

| Vzorka | Po aplikácii | | | Po 5 min | | |
|----------------|--------------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 5,17 | 0,4848 | 1,074 | 12,89 | 0,5583 | 3,357 |
| 2 | 6,23 | 0,4825 | 1,251 | 14,26 | 0,6002 | 4,061 |
| 3 | 6,43 | 0,4831 | 1,266 | 12,84 | 0,5452 | 3,264 |
| priemer | 5,94 | 0,4835 | 1,197 | 13,33 | 0,5679 | 3,561 |
| SD | 0,68 | 0,0012 | 0,107 | 0,81 | 0,0287 | 0,436 |

Tab. 13: Adhezivita FFS 8 tvoreného polymérom A2 (Tab. 4)

| Vzorka | Po aplikácii | | | Po 5 min | | |
|----------------|--------------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 9,16 | 0,5090 | 1,925 | 12,92 | 0,5415 | 3,320 |
| 2 | 8,19 | 0,5062 | 1,804 | 9,560 | 0,4879 | 2,013 |
| 3 | 8,50 | 0,5071 | 1,789 | 9,647 | 0,5285 | 2,129 |
| priemer | 8,615 | 0,5074 | 1,839 | 10,709 | 0,5193 | 2,487 |
| SD | 0,496 | 0,0014 | 0,075 | 1,915 | 0,0280 | 0,723 |

Tab. 14: Adhezivita FFS 9 tvoreného polymérom A4 (Tab. 4)

| Vzorka | Po aplikácii | | | Po 5 min | | |
|----------------|--------------|--------|---------|----------|--------|---------|
| | F (N) | t (s) | A (N/s) | F (N) | t (s) | A (N/s) |
| 1 | 11,47 | 0,5581 | 2,851 | 10,43 | 0,4987 | 2,295 |
| 2 | 10,43 | 0,5238 | 2,373 | 9,104 | 0,5451 | 2,066 |
| 3 | 10,48 | 0,5298 | 2,365 | 6,173 | 0,5171 | 1,400 |
| priemer | 10,79 | 0,5372 | 2,530 | 8,569 | 0,5203 | 1,920 |
| SD | 0,59 | 0,0183 | 0,278 | 2,178 | 0,0234 | 0,465 |

3.5 Disolúcia CBD z *in situ* filmu

Tab. 15: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného neplastifikovaným polymérom PLGA

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,599 | 0,131 | 0,599 | 5,99 |
| 10 | 0,854 | 0,084 | 1,453 | 14,53 |
| 24 | 0,031 | 0,006 | 1,484 | 14,84 |
| 48 | 1,094 | 0,127 | 2,578 | 25,78 |
| 72 | 2,223 | 0,208 | 4,801 | 48,01 |

Tab. 16: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného lineárnym PLGA plastifikovaným MS

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 1,628 | 0,187 | 1,628 | 16,28 |
| 10 | 1,574 | 0,103 | 3,202 | 32,02 |
| 24 | 1,389 | 0,088 | 4,591 | 45,91 |
| 48 | 0,510 | 0,142 | 5,101 | 51,01 |
| 72 | 0,113 | 0,014 | 5,214 | 52,14 |

Tab. 17: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného lineárnym PLGA plastifikovaným EP

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 1,707 | 0,144 | 1,707 | 17,07 |
| 10 | 3,006 | 0,176 | 4,713 | 47,13 |
| 24 | 1,738 | 0,098 | 6,451 | 64,51 |
| 48 | 1,689 | 0,112 | 8,140 | 81,4 |
| 72 | 1,121 | 0,085 | 9,261 | 92,61 |

Tab. 18: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného neplastifikovaným polymérom A2

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,002 | 0,000 | 0,002 | 0,02 |
| 10 | 0,690 | 0,028 | 0,693 | 6,93 |
| 24 | 1,105 | 0,050 | 1,798 | 17,98 |
| 48 | 1,379 | 0,057 | 3,178 | 31,78 |
| 72 | 0,502 | 0,021 | 3,680 | 36,80 |

Tab. 19: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného polymérom A2 plastifikovaným MS

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,023 | 0,001 | 0,023 | 0,23 |
| 10 | 1,303 | 0,066 | 1,327 | 13,27 |
| 24 | 2,420 | 0,113 | 3,747 | 37,47 |
| 48 | 1,590 | 0,071 | 5,338 | 53,38 |
| 72 | 0,998 | 0,044 | 6,337 | 63,37 |

Tab. 20: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného polymérom A2 plastifikovaným EP

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,772 | 0,029 | 0,772 | 7,72 |
| 10 | 1,691 | 0,075 | 2,464 | 24,64 |
| 24 | 2,679 | 0,114 | 5,143 | 51,43 |
| 48 | 2,458 | 0,098 | 7,601 | 76,01 |
| 72 | 1,563 | 0,070 | 9,164 | 91,64 |

Tab. 21: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného neplastifikovaným polymérom A4

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,567 | 0,023 | 0,567 | 5,67 |
| 10 | 1,731 | 0,62 | 2,299 | 22,99 |
| 24 | 1,088 | 0,047 | 3,387 | 33,87 |
| 48 | 0,031 | 0,002 | 3,418 | 34,18 |
| 72 | 0,968 | 0,033 | 4,387 | 43,87 |

Tab. 22: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného polymérom A4 plastifikovaným MS

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,647 | 0,028 | 0,647 | 6,47 |
| 10 | 1,774 | 0,072 | 2,422 | 24,22 |
| 24 | 1,841 | 0,088 | 4,263 | 42,63 |
| 48 | 0,395 | 0,015 | 4,659 | 46,59 |
| 72 | 0,998 | 0,042 | 5,658 | 56,58 |

Tab. 23: Množstvo CBD uvoľneného z *in situ* filmu tvoreného polymérom A4 plastifikovaným EP

| Čas (h) | Priemer (mg) | SD (mg) | Σ mg | % kum |
|---------|--------------|---------|-------|-------|
| 3 | 0,733 | 0,022 | 0,734 | 7,34 |
| 10 | 2,262 | 0,131 | 2,996 | 29,96 |
| 24 | 2,404 | 0,099 | 5,401 | 54,01 |
| 48 | 1,408 | 0,061 | 6,810 | 68,10 |
| 72 | 0,992 | 0,042 | 7,802 | 78,02 |

4 DISKUSIA

V predloženej diplomovej práci boli študované kvapalné systémy pre tvorbu *in situ* filmov formulované na báze nekomerčných kopolymérov kyseliny D,L-mliečnej a glykolovej v pomere 50:50 lineárnej alebo vetvovej štruktúry, ktoré boli syntetizované polykondenzačnou reakciou bez použitia katalyzátora a charakterizované molárnou hmotnosťou a stupňom vetvenia (Tab. 1).⁴⁶ Vetvené PLGA deriváty boli pripravené za účelom zlepšenia vlastností, ako napr. zníženie hydrofobicity.⁴⁴ FFS založené na PLGA polyméroch boli testované už v niekoľkých diplomových a rigorózných prácach,¹⁻⁵ na ktoré táto práca metodicky nadväzuje.

Z dôvodu značnej krehkosti a vysokej viskozity PLGA polymérov bolo nutné ich pre formuláciu filmov plastifikovať. Ako vhodné plastifikátory sa už v predošlých diplomových prácach¹⁻⁵ osvedčili methyl-salicylát a ethyl-pyruvát. Použitím vhodného plastifikátora je možné dosiahnuť zníženie viskozity a optimalizovať elastické vlastnosti polymérneho systému. Do testovaných polymérov bola takisto inkorporovaná liečivá látka - kanabidiol. Ako rozpúšťadlá boli testované ethyl-acetát, acetón a isopropanol.

FFS a *in situ* filmy sú testované celou radou fyzikálne-chemických metód a metódami farmaceutickej technológie s cieľom charakterizovať ich vlastnosti. Jedná sa najmä o stanovenie termických vlastností pomocou DSC alebo TGA, FT - IR pre zistenie interakcií zložiek filmu, SEM pre hodnotenie mikroštruktúry, doba evaporácie organického rozpúšťadla z FFS, hodnotenie reologických a adhezívnych vlastností, disolučné a permeačné testy.¹⁵

4.1 Termická analýza

Bola realizovaná termická analýza kanabidiola, PLGA polymérov, plastifikátorov a A4 *in situ* filmu, získaného z FFS 2 (Tab. 4), pomocou diferenciálnej skenovacej kalorimetrie. Teplota topenia (T_m) a evaporácie (T_e) boli stanovené z krivky prvého ohrevu a teplota skleneného prechodu (T_g) v inflexnom bode krivky druhého ohrevu.

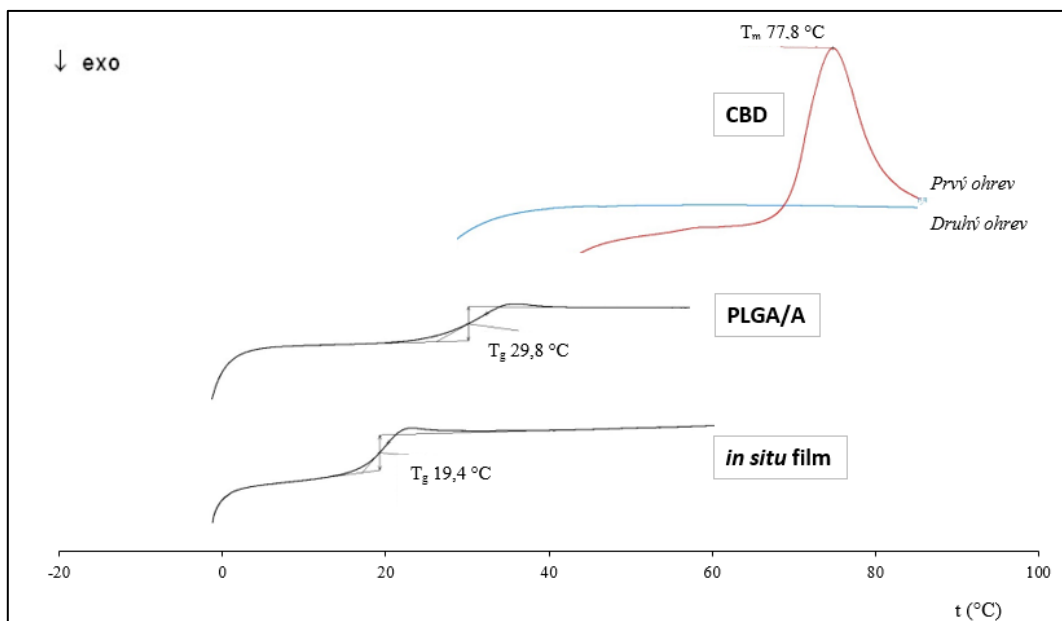
Kanabidiol je kryštalická látka a jeho teplota topenia, ako najčastejšie uvádza literatúra, sa pohybuje okolo 66-67 °C.⁹⁷ Na základe toho bol nastavený aj teplotný režim merania (Obr. 12). Experimentálne bola stanovená vyššia T_m CBD 77,8 °C

(Tab. 6), podobne ako v niektorých prezentovaných štúdiách.⁹⁸ Dôvodom môže byť polymorfia, teda existencia inej inherentnej kryštalickej formy. Rôzne kryštalizačné podmienky, ako napr. rýchlosť kryštalizácie, môžu viesť k rôznym molekulárnym konformáciám, ktoré majú rôzne fyzikálne-chemické vlastnosti.²⁵

PLGA polyméry sú amorfné látky, ktoré sú charakterizované teplotou skleného prechodu (T_g). V dostupnej literatúre⁹⁹ sú uvedené hodnoty T_g PLGA polymérov okolo 35 °C, v závislosti od zloženia koncových skupín a molárných hmotností vetvených derivátov. Na základe predpokladaných hodnôt T_g , bol nastavený aj teplotný režim merania (Obr. 13). Experimentálne zistená T_g PLGA derivátov použitých pre formuláciu FFS sa pohybuje v rozmedzí od 29,8 do 36,5 °C (Tab. 6). Najnižšiu T_g má lineárny PLGA. V prípade vetvených je vidieť výrazné zvýšenie. Môžeme skonštatovať, že s rastúcou molekulovou hmotnosťou a stupňom vetvenia polymérnych reťazcov rastie aj teplota skleného prechodu. Najvyššiu T_g vykazoval polymér A4, u ktorého bol následne študovaný vplyv liečiva (CBD) na termické správanie výsledného filmu.

Ethyl-pyruvát a methyl-salicylát sú prchavé organické rozpúšťadla. Bola u nich stanovovaná teplota evaporácie (T_e). Experimentálne zistená T_e ethyl-pyruvátu bola 153,8 °C (Tab. 6), pričom v literatúre sa uvádza teplota okolo 144 °C.⁵² U methyl-salicylátu bola zistená vyššia T_e v porovnaní s EP (217,2 °C). Dohľadateľná teplota v literatúre sa pohybuje v intervale 220-224 °C.⁴⁹

Bol hodnotený *in situ* film tvorený polymérom A4 s 10 % CBD bez plastifikátora (Obr. 22), aby bol zistený vplyv kanabidiola a nebolo to skreslené použitým plastifikátorom. Na krivke 1. ohrevu nie je prítomný pík kryštalickej fázy, bol zaznamenaný len jeden sklený prechod, a to pri nižšej teplote (19,4 °C) než je T_g polyméru (29,8 °C). Môžeme skonštatovať, že CBD je v *in situ* filme rozpustený a pôsobí v ňom ako účinný plastifikátor.



Obr. 22: Termické charakteristiky zložiek FFS

4.2 Skenovacia elektrónová mikroskopia

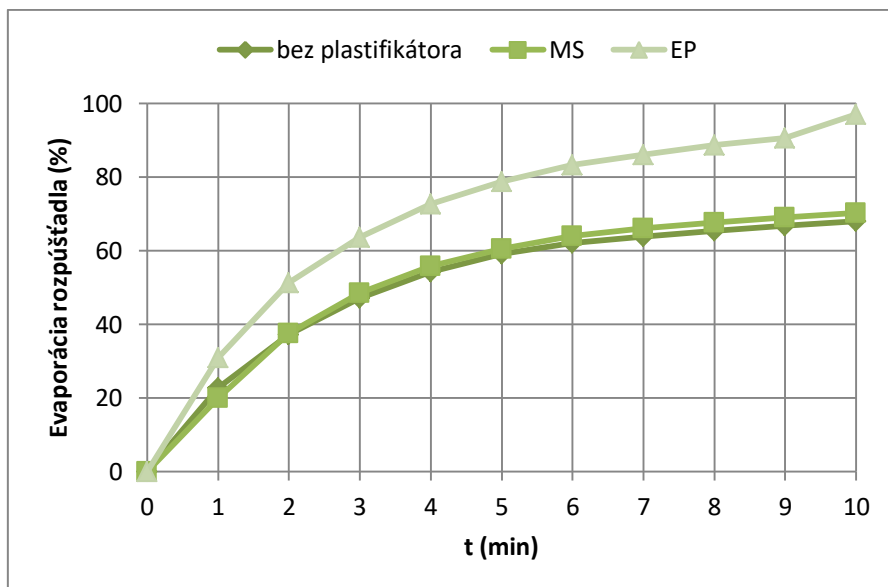
Metódou SEM bola hodnotená mikroštruktúra PLGA polyméru, kanabidiolu a *in situ* PLGA filmu tvoreného 10 % CBD, a to plastifikovaným a neplastifikovaným polymérom. Na Obr. 19 môžeme vidieť SEM snímky kanabidiolu a PLGA polyméru. Metódou sme si overili, že sa ozaj jedná o kryštalickú látku, keďže je možné pozorovať drobné kryštály nepravidelného tvaru a rôznej veľkosti. Na druhej strane je PLGA amorfná látka, výrazne krehká a po jej rozdrobnení vznikajú nepravidelné častice, ktoré po čase spolu splynú, keďže sa z reologického hľadiska jedná o kvapalinu s extrémne vysokou viskozitou (liquid-like), nie o pevnú látku (solid-like). Na Obr. 20 je povrch a lom *in situ* filmu vytvoreného z FFS 3, ktorý neobsahuje plastifikátor a pomer PS a OR je 1:1. Z dôvodu vyššej viskozity bol aplikovaný rozotretím, čím sa vytvára silnejší film než pri sprejovej aplikácii. Povrch filmu je hladký s miernymi nerovnosťami, nie sú však viditeľné žiadne fragility, a to ani na lomu. Na obr. 21 je porovnávaný povrch neplastifikovaného filmu a filmu plastifikovaného EP, vytvorených *in situ* zo sprejovo aplikovaných FFS, pričom sa nejedná o štatisticky významný rozdiel. Lom filmu nemohol byť skenovaný, pretože vrstva filmu bola príliš tenká. SEM snímky potvrdili výsledky DSC analýzy a to, že 10 % CBD je v PLGA molekulárne dispergované a pôsobí plastifikačne, čím zaisťuje relatívne dostatočnú elasticitu *in situ* filmu aj bez použitia EP.

4.3 Doba odparovania rozpúšťadla

Bola testovaná doba evaporácie organického rozpúšťadla z FFS 10-21 (Tab. 4) po aplikácii na podložné sklíčko o definovanej ploche 7 cm². Testovaniu boli podrobené len filmy tvorené lineárnym PLGA polymérom, pretože sa nepredpokladá signifikantný vplyv typu polyméru na priebeh evaporácie. Bola testovaná evaporácia z neplastifikovaného filmu alebo z filmu plastifikovaného 10 % MS alebo EP. Ako rozpúšťadlá boli testované acetón a isopropanol v rôznom pomere.

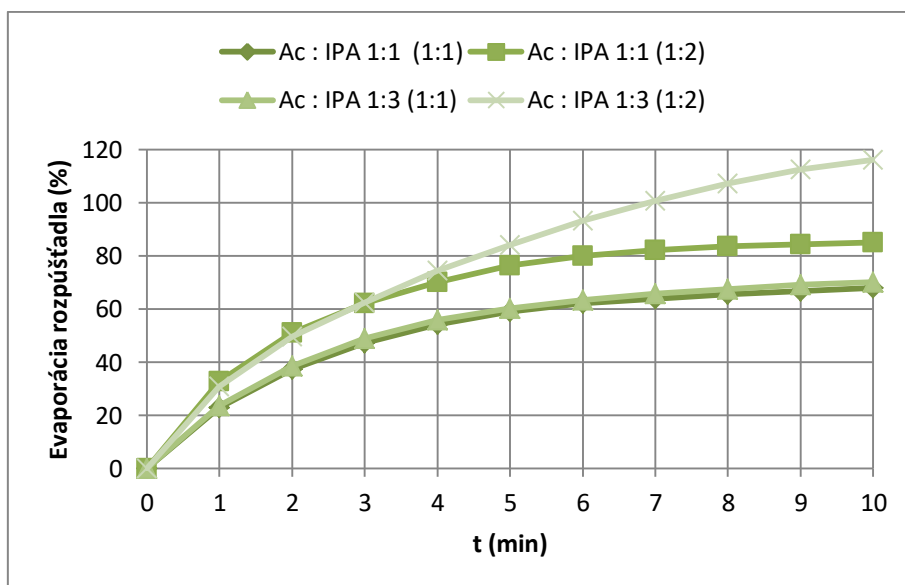
Pri výbere rozpúšťadla zohráva dôležitú rolu nielen prchavosť rozpúšťadla, ale aj biokompatibilita s pokožkou či sliznicou. Literatúra uvádza, že prvou voľbou pri formulácii FFS je ethanol,⁶⁵ ale my sme na testovanie zvolili biokompatibilnejší isopropanol. Kvôli zlej rozpustnosti PLGA derivátov v IPA, ale dobrej v acetóne,¹⁰⁰ sme nakoniec použili ich zmes v pomere 1:1. V snahe nahradiť aspoň časť acetónu isopropanolom, sme zmenili pomer na 1:2 v prospech isopropanolu. Neskôr sme zistili, že pri aplikácii sprejom je FFS veľmi viskóznym a tak bola potreba ho viacej nariediť, vychádzajúc z úvahy, že pri zriedenom roztoku sa vytvorí tenší film a dôjde rýchlejšie k evaporácii. Získali sme tak pomer polymérneho systému a zmesi rozpúšťadiel 1:2. Ďalej sme pokračovali vo zvyšovaní množstva isopropanolu, až napokon pri pomere 1:4 sme zistili, že sa nám systém rozpadáva.

Obr. 23 zobrazuje vplyv plastifikátora na priebeh evaporácie. Bola použitá zmes acetónu a isopropanolu v pomere 1:1. Pomer polymérnej sústavy a zmesi rozpúšťadiel bol v tomto prípade 1:1. Z obrázka je jasne vidieť, že najrýchlejšie nastalo odparovanie u PLGA plastifikovaného ethyl-pyruvátom. Za 2 min sa odparilo viac ako 50 % zmesi acetónu a isopropanolu, pričom pri použití PLGA neplastifikovanom alebo plastifikovanom methyl-salicylátom len 37 % zmesi rozpúšťadiel. To sa dá vysvetliť tým, že FFS s EP majú nižšiu viskozitu a tým pádom prebehla evaporácia rozpúšťadla rýchlejšie. Ďalej si môžeme všimnúť, že evaporácia filmu bez plastifikátora a filmu plastifikovaného MS mala takmer totožný priebeh. Chybové úsečky kvôli prehľadnosti uvedené nie sú.



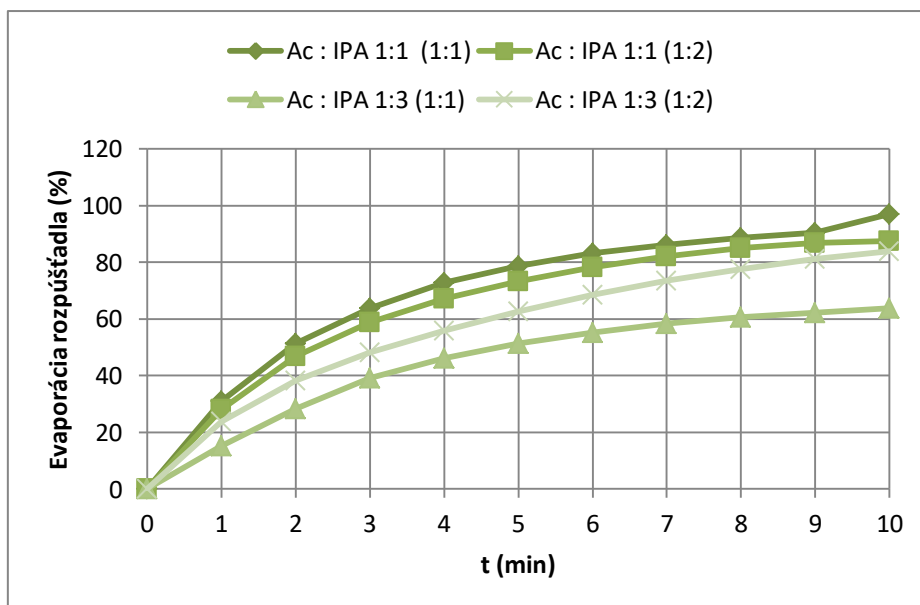
Obr. 23: Vplyv plastifikátora na priebeh evaporácie

Na Obr. 24 je znázornený priebeh evaporácie neplastifikovaného FFS za použitia zmesi acetónu a isopropanolu v rôznych pomeroch, pričom pomer polymérneho systému a organických rozpúšťadiel bol 1:1. So zvyšujúcim sa množstvom isopropanolu neboli zaznamenané žiadne významné rozdiely v rýchlosti odparovania. Rozdiel bol pozorovaný až pri použití polymérneho systému a organických rozpúšťadiel v pomere 1:2. Odparovanie rozpúšťadiel prebiehalo rýchlejšie pri použití acetónu a isopropanolu 1:3. Môžeme skonštatovať, že v 5 min došlo k evaporácii viac než 60 % organických rozpúšťadiel u všetkých testovaných formuláciách. Dôvodom, prečo nedošlo k odpareniu väčšieho množstva rozpúšťadla, môže byť nízka prchavosť IPA.



Obr. 24: Priebek evaporácie u neplastifikovaného FFS

Priebek evaporácie FFS plastifikovaného EP vykresľuje Obr. 25, z ktorého vyplýva, že najpomalšie prebiehala evaporácia pri použití acetónu a isopropanolu v pomere 1:3 (pomer polymérnej sústavy a zmesi rozpúšťadiel 1:1). U zvyšných formulácií došlo v 5 min k odpareniu viac ako 60 % rozpúšťadiel.

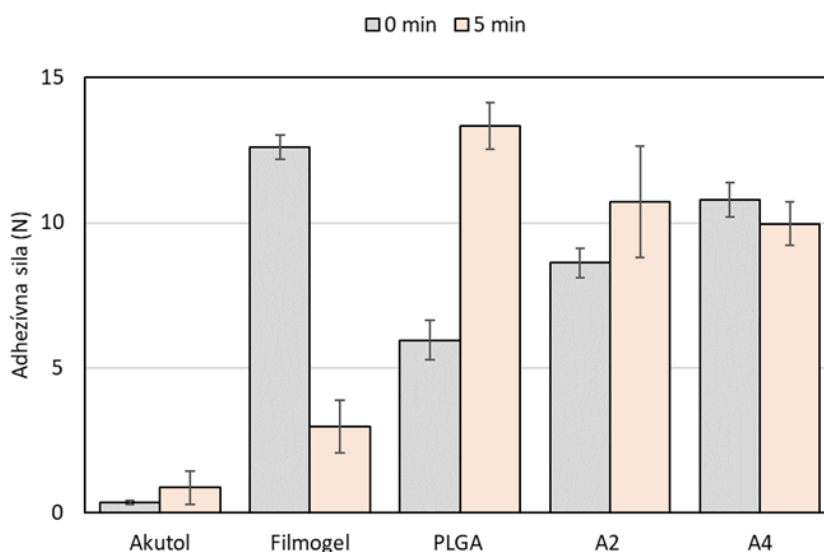


Obr. 25: Priebek evaporácie u FFS plastifikovaného EP

4.4 Adhezívne vlastnosti

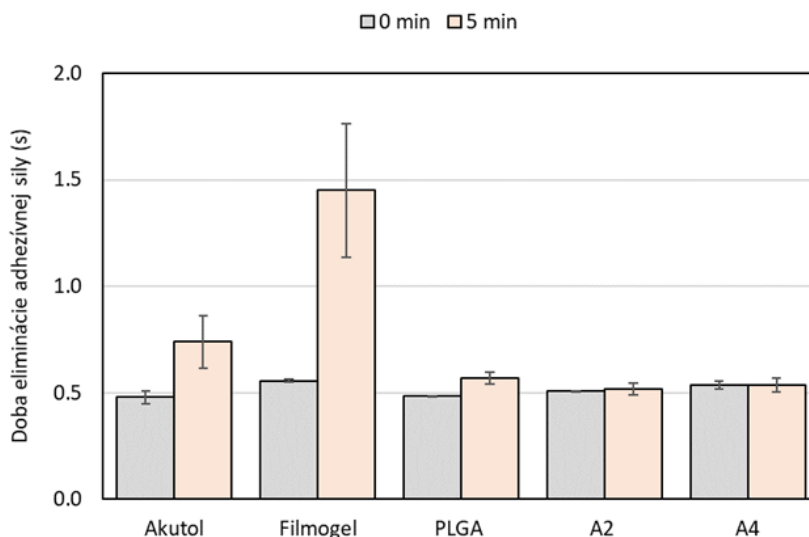
Bola testovaná adhezivita FFS a *in situ* filmov pomocou absolútneho rotačného reometra. Test bol spustený hneď po aplikácii, pričom získané výsledky môžu byť mierou adhézie FFS a po 5 min evaporácie organického rozpúšťadla, čo môže reflektovať lepivosť povrchu *in situ* filmu. Adhezívne vlastnosti boli hodnotené u FFS 7-9 (Tab. 4) a u dvoch komerčných prípravkoch - Akutol sprej a URGO Filmogel. Jedná sa síce o prípravky tvorené iným polymérom (derivátmi celulózy/methakrylátom) a zmesou rozpúšťadiel (ethanolom/ isopropanolom, ethanolom, ethyl-acetátom), ale vzhľadom k tomu, že FFS v praxi až tak veľa nie je, na porovnanie finálneho správania po aplikácii na kožu je to dostačujúce.

Na Obr. 26 je adhezivita komerčných a novoformulovaných FFS hodnotená pomocou maximálnej sily potrebnej k odtrhnutiu FFS, respektíve *in situ* filmu od podkladu. Najnižšia adhezívna sila bola prekvapivo nameraná u Akutolu, ako hneď po aplikácii, tak aj po 5 min od aplikácie, čo reflektuje nízku lepivosť povrchu filmu. Zistená vyššia adhézia po 5 min nie je štatisticky až tak významná. U Filmogelu boli namerané relatívne optimálne hodnoty, vysoká adhezivita hneď po aplikácii a 4x nižšia adhezivita po evaporácii rozpúšťadla. U PLGA FFS bola nameraná hneď po aplikácii vyššia adhezivita než u Akutolu, ale nižšia než u Filmogelu. Po 5 min u FFS tvorených polymérom A2 a A4 nebola zistená významná zmena v adhezivite, ale u polyméru PLGA sa adhezívna sila zvýšila viac než dvojnásobne.



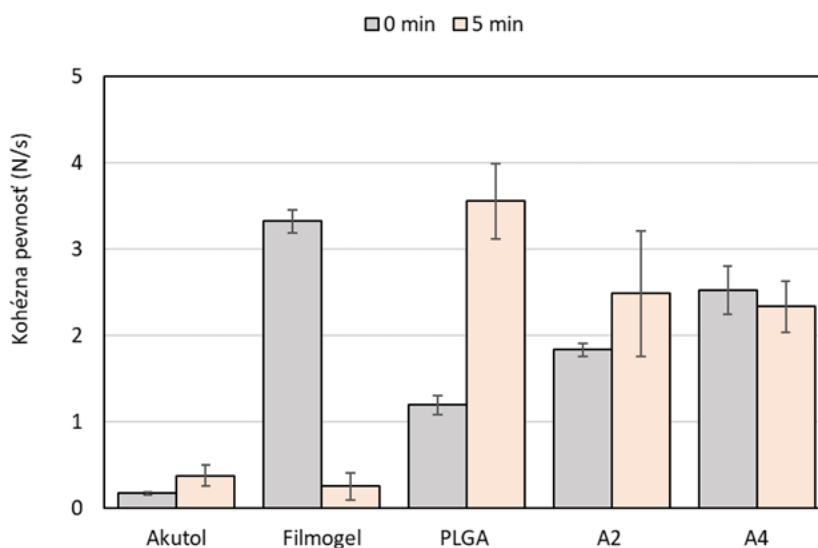
Obr. 26: Adhezivita hodnotená pomocou adhezívnej sily

Na Obr. 27 je porovnávaná doba eliminácie adhezívnej sily ako miera viskoelastických resp. kohezívnych vlastností. Neboli zistené významné rozdiely vo viskoelasticite meranej hneď po aplikácii. U PLGA formulácií sa ani po 5 min viskoelasticita nezmenila. Akutol a Filmogel vykazujú zvýšenie kohezívnych vlastností po 5 min evaporácie rozpúšťadla.



Obr. 27: Adhezivita vyjadrená dobou eliminácie adhezívnej sily

Na Obr. 28 je adhezivita porovnávaná pomocou plochy pod krivkou sila-čas, čo komplexne hodnotí adhezívne a kohezívne vlastnosti (kohéznú pevnosť). Vzhľadom k tomu, že kohezivita bola relatívne zhodná (Obr. 27), tak hodnoty plochy pod krivkou korelujú s hodnotami maximálnej sily (F_{max}) potrebnej k odtrhnutiu FFS, respektíve *in situ* filmu od podkladu.

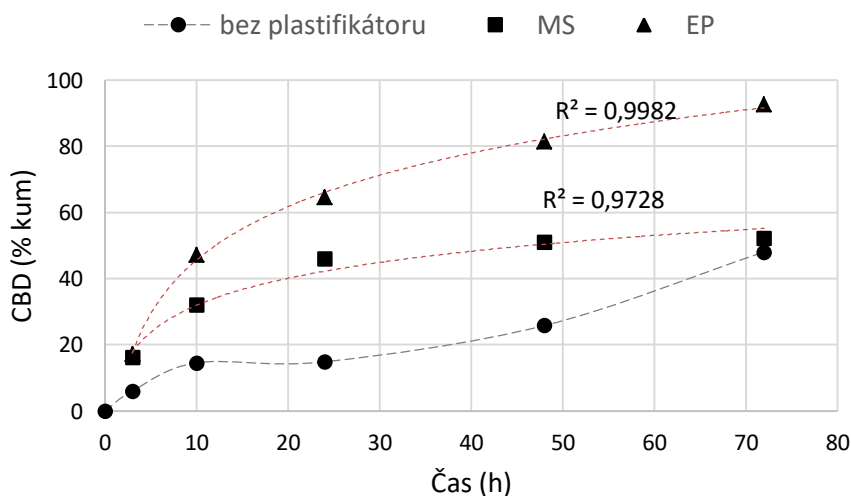


Obr. 28: Adhezivita vyjadrená ako kohézna pevnosť

4.5 Disolúcia CBD z *in situ* filmu

Priebeh uvoľňovania CBD z *in situ* filmov bol študovaný pomocou disolučných testov po dobu 72 hod a bol vyhodnotený vplyv polyméru a plastifikátora. Množstvo CBD uvoľneného v danom časovom intervale do disolučného média tvoreného fosforečnanovým pufrom pH 7,4 pri 37 °C je uvedené v Tab. 15-23.

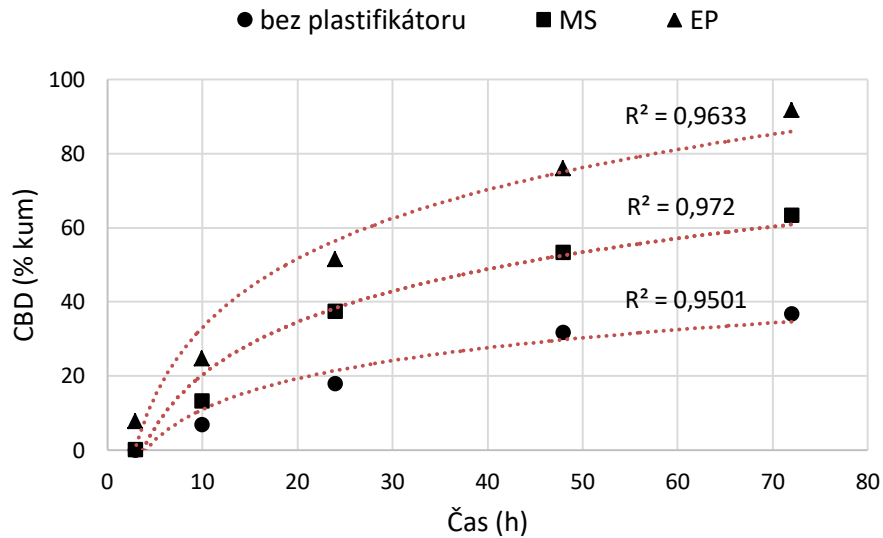
Na Obr. 29 je znázornený priebeh uvoľňovania CBD z lineárneho PLGA. Z neplastifikovaného PLGA filmu sa po 3 hod uvoľnilo len približne 6 % CBD, v časovom intervale 10 až 24 hod došlo k spomaleniu liberácie s následnou akceleráciou, pričom za 72 hod sa uvoľnilo 48 % CBD obsiahnutého vo filme. Disolučný profil je možné charakterizovať ako typicky trojfázový. Plastifikáciou PLGA filmu došlo k zmene disolučného profilu na kinetiku 1. rádu, pričom za 72 hod sa pri použití MS uvoľnilo približne rovnaké množstvo CBD ako z neplastifikovaného filmu, zatiaľ čo pri použití EP 92 %. Plastifikácia lineárneho PLGA s molárnou hmotnosťou M_n 1700 g/mol a M_w 2400 g/mol spôsobí rozvoľnenie polymérnych reťazcov a zvýšenie rýchlosti uvoľňovania CBD.



Obr. 29: Priebeh uvoľňovania CBD z *in situ* filmu tvoreného lineárnym PLGA

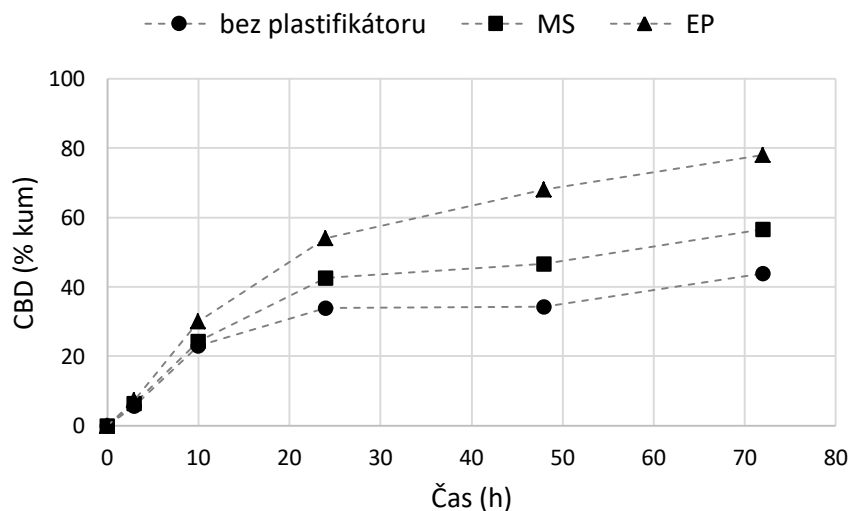
Liberácia CBD z polyméru A2 (Obr. 30) prebieha kinetikou 1. rádu, pričom podľa nižších hodnôt koeficientov korelácie je zrejماً tendencia k ustálenému uvoľňovaniu, a to najmä v časovom intervale 24 až 72 hod. V prípade neplastifikovaného filmu a filmu plastifikovaného MS bol zistený *lag-time*, oneskorenie uvoľňovania po dobu 3 hod. Pri plastifikácii EP k oneskoreniu liberácie nedochádza a za 3 hod sa uvoľnilo

asi 7 % CBD. Za 72 hod z neplastifikovaného filmu sa uvoľnilo len asi 37 % CBD, pri plastifikácii MS 63 % a pri plastifikácii EP asi 92 %. Preukázal sa vplyv vyššej molárnej hmotnosti a vetvovej štruktúry filmotvorného polyméru A2 (Tab. 1).



Obr. 30: Priebeh uvoľňovania CDB z *in situ* filmu tvoreného polymérom A2

Ako je vidieť z disolučných profilov na Obr. 31, použitím polyméru A4 s vyššou molárnou hmotnosťou, vyšším stupňom vetvenia a nižšou hydrofobicitou vďaka vyššiemu podielu kyseliny polyakrylovej ako vetviacej zložky, došlo k eliminácii počiatočného lag-time a miernému spomaleniu liberácie CBD. Rovnako aj vplyv plastifikácie je menší v porovnaní s filmotvornými polymérmi PLGA a A2.



Obr. 31: Priebeh uvoľňovania CDB z *in situ* filmu tvoreného polymérom A4

5 ZÁVER

Na základe výsledkov získaných v experimentálnej časti predloženej diplomovej práce môžeme urobiť tieto závery:

- Boli úspešne sformulované FFS tvorené PLGA derivátmi lineárnej a vetvovej štruktúry, plastifikované MS alebo EP, určené pre lokálnu aplikáciu kanabidiola.
- Doba evaporácie organických rozpúšťadiel z FFS je ovplyvnená použitým plastifikátorom.
- U PLGA FFS plastifikovaným ethyl-pyruvátom sa za 2 min odparilo viac ako 50 % zmesi acetónu a isopropanolu.
- DSC potvrdila, že inkorporovaný kanabidiol je v *in situ* filme rozpustený a film plastifikuje.
- Metódou SEM bola preukázaná homogénna štruktúra *in situ* filmov, a to i filmov bez plastifikátora.
- Rozdiely v adhezivite sú dané rozdielnou molekulovou hmotnosťou polymérov, vetvením reťazca a počtom koncových karboxylových skupín.
- Adhezívne vlastnosti PLGA filmov je možné komplexne hodnotiť pomocou plochy pod krivkou sila-čas.
- V porovnaní s komerčnými FFS bola zistená vyššia adhezivita, ale pretrvávajúca lepivosť PLGA filmov.
- Trojfázový liberačný profil CBD z neplastifikovaného lineárneho PLGA bol modifikovaný použitím vetveného PLGA a plastifikáciou methyl-salicylátom alebo ethyl-pyruvátom.
- Bude nutné validovať HPLC analýzu CBD vo fyziologickom médiu, aby sa optimalizovali výsledky disolučných a permeačných testov.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

- 1) Paňkiv J. *Adhezivita in situ PLGA filmů pro lokální aplikaci léčiv*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2023.
- 2) Kodytková S. *Disoluce léčiva z tenkých filmů na bázi plastifikovaných PLGA derivátů*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2022.
- 3) Věříš A. H. *Characterization of PLGA-Based Film Forming Systems*. Rigorózní práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta.; 2021.
- 4) Soukupová J. *Adhezivní vlastnosti tenkých filmů na bázi plastifikovaných polyesterů*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2019.
- 5) Rychterová G. *Plastifikované polymerní soustavy s kyselinou salicylovou*. Diplomová práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta; 2016.
- 6) DONNELLY, Ryan F. a SINGH, Thakur Raghu Raj. *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*. Online. Wiley, 2015. ISBN 9781118734513. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9781118734506>.
- 7) FREDERIKSEN, Kit; GUY, Richard H. a PETERSSON, Karsten. The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. Online. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2015, s. 349-360. ISSN 1742-5247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1124412>.
- 8) FREDERIKSEN, Kit; GUY, Richard H. a PETERSSON, Karsten. Formulation considerations in the design of topical, polymeric film-forming systems for sustained drug delivery to the skin. Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2015, s. 9-15. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.01.002>.

- 9) RANADE, Sneha; BAJAJ, Amrita; LONDHE, Vaishali; BABUL, Najib a KAO, Danny. Fabrication of topical metered dose film forming sprays for pain management. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, s. 132-141. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.01.004>.
- 10) JABER, Robben; WASBROUGH, Matthew J.; HOLDAWAY, James A. a EDLER, Karen J. Interactions between quaternary ammonium surfactants and polyethylenimine at high pH in film forming systems. Online. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2015, s. 286-296. ISSN 00219797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.01.034>.
- 11) PEREIRA, Gabriela Garrastazu; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaki; BALDUCCI, Anna Giulia; COLOMBO, Paolo a SONVICO, Fabio. Polymeric Films Loaded with Vitamin E and Aloe vera for Topical Application in the Treatment of Burn Wounds. Online. *BioMed Research International*. 2014, s. 1-9. ISSN 2314-6133. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2014/641590>.
- 12) BHOWMIK, Debjit; GOPINATH, Harish; KUMAR, B. Pragati; Duraivel, S.; KUMAR, K. P. Sampath. Recent Advances in Novel Topical Drug Delivery System. *Pharma Innovation*. 2012, 1, 12-31. ISSN 2277-7695.
- 13) PUNDIR, Sarika; BADOLA, Ashutosh; SHARMA, Deepak. Sustained Release Matrix Technology and Recent Advance in Matrix Drug Delivery System. Review article. *International Journal of Drug Research and Technology*. 2017, 3, 12-20. ISSN 2277-1506.
- 14) DE OLIVEIRA, Flora Ferreira Duarte; DE MENEZES, Livia Rodrigues a TAVARES, Maria Inês Bruno. Film-Forming Systems in Topically Administered Pharmaceutical Formulations. Online. *Materials Sciences and Applications*. 2020, s. 576-590. ISSN 2153-117X. Dostupné z: <https://doi.org/10.4236/msa.2020.118038>.
- 15) KATHE, Kashmira a KATHPALIA, Harsha. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. Online. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, s. 487-497. ISSN 18180876. Dostupné

z: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>.

- 16) BORNARE, Swapnil S.; AHER, Smita S. a SAUDAGAR, Ravindranath B. A REVIEW: FILM FORMING GEL NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEM. Online. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2018, s. 25-28. ISSN 0975-7066. Dostupné z: <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2018v10i2.25886>.
- 17) MALI, Anjali A; MALI, Vishnu Vasant a SHAMKUWAR, Prashant. Film forming systém: A review. Online. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Analysis*. 2021. ISSN 23952466. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.21276/ijcpra>.
- 18) TRAN, Thao T. D. a TRAN, Phuong H. L. Controlled Release Film Forming Systems in Drug Delivery: The Potential for Efficient Drug Delivery. Online. *Pharmaceutics*. 2019, ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060290>.
- 19) ALBERTI, Ingo; GRENIER, Arnaud; KRAUS, Holger a CARRARA, Dario Norberto. Pharmaceutical development and clinical effectiveness of a novel gel technology for transdermal drug delivery. Online. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2005, s. 935-950. ISSN 1742-5247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17425247.2.5.935>.
- 20) KALIA, Yogeshvar N.; MERINO, Virginia a GUY, Richard H. TRANSDERMAL DRUG DELIVERY. Online. *Dermatologic Clinics*. 1998, s. 289-299. ISSN 07338635. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(05\)70011-5](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(05)70011-5).
- 21) WHO. Cannabidiol (CBD): *World Health Organisation Expert Committee on Drug Dependence Thirty-ninth Meeting*. 2017.
- 22) RONG, Carola; LEE, Yena; CARMONA, Nicole E.; CHA, Danielle S.; RAGGUETT, Renee-Marie et al. Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. Online. *Pharmacological Research*. 2017, s.

z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.005>.

- 23) GARRETT, Edward R. a HUNT, C.Anthony. Physicochemical Properties, Solubility, and Protein Binding of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. Online. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1974, s. 1056-1064. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jps.2600630705>.
- 24) ILIAS, Yara; RUDAZ, Serge; MATHIEU, Patrick; CHRISTEN, Philippe a VEUTHEY, Jean-Luc. Extraction and analysis of different Cannabis samples by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. Online. *Journal of Separation Science*. 2005, s. 2293-2300. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.200500130>.
- 25) MILLAR, Sophie Anne; MAGUIRE, Ryan Francis; YATES, Andrew Stephen a O'SULLIVAN, Saoirse Elizabeth. Towards Better Delivery of Cannabidiol (CBD). Online. *Pharmaceuticals*. 2020, ISSN 1424-8247. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ph13090219>.
- 26) MILLAR, Sophie A.; STONE, Nicole L.; YATES, Andrew S. a O'SULLIVAN, Saoirse E. A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. Online. *Frontiers in Pharmacology*. 2018, ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01365>.
- 27) SMERIGLIO, Antonella; GIOFRÈ, Salvatore V.; GALATI, Enza M.; MONFORTE, Maria T.; CICERO, Nicola et al. Inhibition of aldose reductase activity by chemotypes extracts with high content of cannabidiol or cannabigerol. Online. *Fitoterapia*. 2018, s. 101-108. ISSN 0367326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.02.002>.
- 28) MARZO, Vincenzo Di; BIFULCO, Maurizio a PETROCELLIS, Luciano De. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. Online. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004, s. 771-784. ISSN 1474-1776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrd1495>.

- 29) LIGRESTI, Alessia; DE PETROCELLIS, Luciano a DI MARZO, Vincenzo. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. Online. *Physiological Reviews*. 2016, s. 1593-1659. ISSN 0031-9333. Dostupné z: <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2016>.
- 30) IFFLAND, Kerstin a GROTENHERMEN, Franjo. An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. Online. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2017, s. 139-154. ISSN 2378-8763. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/can.2016.0034>.
- 31) HAMPSON, A. J.; GRIMALDI, M.; AXELROD, J. a WINK, D. Cannabidiol and (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Online. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, s. 8268-8273. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8268>.
- 32) GROTENHERMEN, Franjo; RUSSO, Ethan. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential. *The Haworth Integrative Healing Press*; New York: 1984. p. 165-181.
- 33) BAKER, David; PRYCE, Gareth; CROXFORD, J. Ludovic; BROWN, Peter; PERTWEE, Roger G. et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. Online. *Nature*. 2000, s. 84-87. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/35003583>.
- 34) ZUARDI, A. W.; SHIRAKAWA, I.; FINKELFARB, E. a KARNIOL, I. G. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. Online. *Psychopharmacology*. 1982, s. 245-250. ISSN 0033-3158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF00432554>.
- 35) OGUNTIBEJU, Oluwafemi Omoniyi. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: Examining the links. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2019, 45–63. ISSN:1944-8171.

- 36) KARKI, Sandeep; KIM, Hyeongmin; NA, Seon-Jeong; SHIN, Dohyun; JO, Kanghee et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. Online. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016, s. 559-574. ISSN 18180876. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>.
- 37) GENTILE, Piergiorgio; CHIONO, Valeria; CARMAGNOLA, Irene a HATTON, Paul. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, s. 3640-3659. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>.
- 38) MAKADIA, Hirenkumar K. a SIEGEL, Steven J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. Online. *Polymers*. 2011, s. 1377-1397. ISSN 2073-4360. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/polym3031377>.
- 39) LAMBERT, William J. a PECK, Kendall D. Development of an in situ forming biodegradable poly-lactide-coglycolide system for the controlled release of proteins. Online. *Journal of Controlled Release*. 1995, s. 189-195. ISSN 01683659. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)00083-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)00083-7).
- 40) KAMALY, Nazila; YAMEEN, Basit; WU, Jun a FAROKHZAD, Omid C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. Online. *Chemical Reviews*. 2016, s. 2602-2663. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>.
- 41) FREDENBERG, Susanne; WAHLGREN, Marie; RESLOW, Mats a AXELSSON, Anders. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, s. 34-52. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.
- 42) ELMOWAFY, Enas M.; TIBONI, Mattia a SOLIMAN, Mahmoud E. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic

- acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. Online. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2019, s. 347-380. ISSN 2093-5552. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00439-x>.
- 43) CHOU, Shih-Feng a WOODROW, Kim A. Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. Online. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2017, s. 724-733. ISSN 17516161. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.09.004>.
- 44) DAILEY, Lea Ann a KISSEL, Thomas. New poly(lactic-co-glycolic acid) derivatives: Modular polymers with tailored properties. Online. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2005, s. 7-13. ISSN 17406749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2005.05.017>.
- 45) SNEJDROVA, Eva; DITTRICH, Milan a DRASTIK, Martin. Plasticized branched aliphatic oligoesters as potential mucoadhesive drug carriers. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, s. 282-286. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.030>.
- 46) SNEJDROVA, Eva; PODZIMEK, Stepan; MARTISKA, Juraj; HOLAS, Ondrej a DITTRICH, Milan. Branched PLGA derivatives with tailored drug delivery properties. Online. *Acta Pharmaceutica*. 2020, s. 63-75. ISSN 1846-9558. Dostupné z: <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0011>.
- 47) GNDR, Sevgi; SEDEF, M. a ZSOY, Yldz. Plasticizers in Transdermal Drug Delivery Systems. Online. In: LUQMAN, Mohammad (ed.). *Recent Advances in Plasticizers*. InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0363-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/38156>.
- 48) BHARKATIYA, M.; NEMA, R.K. a BHATNAGAR, M. Designing and Characterization of Drug Free Patches for Transdermal Application. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2010, s. 35-39, ISSN 0975-248X.

- 49) National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 4133, Methyl Salicylate. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-Salicylate>.
- 50) MILES, Sarah. Methyl Salicylate. Online. In: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, 2007, s. 1-6. ISBN 9780080552323. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62158-0>.
- 51) DASGUPTA, Amitava a WAHED, Amer. Common poisonings including heavy metal poisoning. Online. In: *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*. Elsevier, 2021, s. 405-419. ISBN 9780128159606. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815960-6.00025-X>.
- 52) National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary for CID 12041, Ethyl pyruvate. from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-pyruvate>.
- 53) KAO, Kenneth K. a FINK, Mitchell P. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. Online. *Biochemical Pharmacology*. 2010, s. 151-159. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.03.007>.
- 54) PADULA, Cristina; NICOLI, Sara a SANTI, Patrizia. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, s. 12-16. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.028>.
- 55) GENNARI, Chiara G.M.; SELMIN, Francesca; FRANZÈ, Silvia; MUSAZZI, Umberto M.; QUARONI, Gaia M.G. et al. A glimpse in critical attributes to design cutaneous film forming systems based on ammonium methacrylate. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2017, s. 157-163. ISSN 17732247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.009>.
- 56) GENNARI, Chiara G.M.; SELMIN, Francesca; MINGHETTI, Paola a CILURZO, Francesco. Medicated Foams and Film Forming Dosage Forms as

- Tools to Improve the Thermodynamic Activity of Drugs to be Administered Through the Skin. Online. *Current Drug Delivery*. 2019, s. 461-471. ISSN 15672018. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1567201816666190118124439>.
- 57) WILLIAMS, Adrian C. a BARRY, Brian W. Penetration enhancers. Online. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012, s. 128-137. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>.
- 58) GUPTA, Rakesh; DWADASI, Balarama Sridhar; RAI, Beena a MITRAGOTRI, Samir. Effect of Chemical Permeation Enhancers on Skin Permeability: In silico screening using Molecular Dynamics simulations. Online. *Scientific Reports*. 2019, ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37900-0>.
- 59) PÜNNEL, Larissa Carine a LUNTER, Dominique Jasmin. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. Online. *Pharmaceutics*. 2021, ISSN 1999-4923. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13070932>.
- 60) MISRA, Amit; RAGHUVANSHI, Rajeev S.; GANGA, S.; DIWAN, Manish; TALWAR, G.P. et al. Formulation of a transdermal system for biphasic delivery of testosterone. Online. *Journal of Controlled Release*. 1996, s. 1-7. ISSN 01683659. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00122-0](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00122-0).
- 61) SCHROEDER, Ines Zurdo; FRANKE, Patrick; SCHAEFER, Ulrich F. a LEHR, Claus-Michael. Delivery of ethinylestradiol from film forming polymeric solutions across human epidermis in vitro and in vivo in pigs. Online. *Journal of Controlled Release*. 2007, s. 196-203. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.12.013>.
- 62) YANG, Sha; YANG, Yun; CUI, Sixin; FENG, Ziqi; DU, Yuzhi et al. Chitosan-polyvinyl alcohol nanoscale liquid film-forming system facilitates MRSA-infected wound healing by enhancing antibacterial and antibiofilm properties. Online. *International Journal of Nanomedicine*. 2018, s. 4987-5002. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <https://doi.org/10.2147/IJN.S161680>.

- 63) CONTARDI, Marco; HEREDIA-GUERRERO, José A.; PEROTTO, Giovanni; VALENTINI, Paola; POMPA, Pier Paolo et al. Transparent ciprofloxacin-povidone antibiotic films and nanofiber mats as potential skin and wound care dressings. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, roč. 104, s. 133-144. ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.044>.
- 64) VIJ, N.N.; SAUDAGAR, R.B. Formulation, development and evaluation of film-forming gel for prolonged dermal delivery of terbinafine hydrochloride. *Int J Pharm Sci Res*. 2014, s. 537-554.
- 65) LIU, Ximing; FU, Lu; DAI, Wenwen; LIU, Wei; ZHAO, Jinlong et al. Design of transparent film-forming hydrogels of tolterodine and their effects on stratum corneum. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, s. 322-331. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.051>.
- 66) PADULA, Cristina; NICOLI, Sara a SANTI, Patrizia. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009, s. 12-16. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.028>.
- 67) ZURDO SCHROEDER, Ines; FRANKE, Patrick; SCHAEFER, Ulrich F. a LEHR, Claus-Michael. Development and characterization of film forming polymeric solutions for skin drug delivery. Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007, s. 111-121. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.07.015>
- 68) KHASRAGHI, AH; THOMAS, LM. Preparation and evaluation of lornoxicam film-forming gel. *Drug Invention Today*. 2019;11(8):1906-1913.
- 69) FELTON, Linda A. Mechanisms of polymeric film formation. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013, s. 423-427. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.027>.

- 70) HUANBUTTA, Kampanart; SITTIKIYOTHIN, Wancheng a SANGNIM, Tanikan. Development of topical natural based film forming system loaded propolis from stingless bees for wound healing application. Online. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2020, s. 625-634. ISSN 2093-5552. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40005-020-00493-w>.
- 71) BARANOWSKI, Przemysław; KAROLEWICZ, Bożena; GAJDA, Maciej a PLUTA, Janusz. Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods. Online. *The Scientific World Journal*. 2014, s. 1-14. ISSN 2356-6140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2014/861904>.
- 72) EATON, P.; QUARESMA, P.; SOARES, C.; NEVES, C.; DE ALMEIDA, M.P. et al. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. Online. *Ultramicroscopy*. 2017, s. 179-190. ISSN 03043991. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.07.001>.
- 73) NAIR, Anroop B.; KUMRIA, Rachna; HARSHA, Sree; ATTIMARAD, Mahesh; AL-DHUBIAB, Bandar E. et al. *In vitro* techniques to evaluate buccal films. Online. *Journal of Controlled Release*. 2013, s. 10-21. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.11.019>.
- 74) CAO, Na; YANG, Xinmin a FU, Yuhua. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. Online. *Food Hydrocolloids*. 2009, s. 729-735. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.017>.
- 75) Water-vapour Permeability, in British Pharmacopoeia. 2016.
- 76) BHARKATIYA, Meenakshi; NEMA, Rajesh Kumar; BHATNAGAR, Mahip. Development and characterization of transdermal patches of metoprolol tartrate. *Asian J Pharm Clin Res*, 2010, 3.2: 130-134.
- 77) CHEN, Chien-Hsien; KUO, Wen-Shiuh a LAI, Lih-Shiuh. Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum. Online. *Food Hydrocolloids*. 2009, s.

2132-2140. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.05.015>.

- 78) GLICERINA, Virginia; BALESTRA, Federica; ROSA, Marco Dalla a ROMANI, Santina. Rheological, textural and calorimetric modifications of dark chocolate during process. Online. *Journal of Food Engineering*. 2013, s. 173-179. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.012>.
- 79) GHASEMLOU, Mehran; KHODAIYAN, Faramarz a OROMIEHIE, Abdulrasoul. Rheological and structural characterisation of film-forming solutions and biodegradable edible film made from kefir as affected by various plasticizer types. Online. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011, s. 814-821. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.018>.
- 80) SILVA-WEISS, A.; BIFANI, V.; IHL, M.; SOBRAL, P.J.A. a GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Polyphenol-rich extract from murta leaves on rheological properties of film-forming solutions based on different hydrocolloid blends. Online. *Journal of Food Engineering*. 2014, s. 28-38. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.04.010>.
- 81) MA, Qianyun; DU, Lin; YANG, Yang a WANG, Lijuan. Rheology of film-forming solutions and physical properties of tara gum film reinforced with polyvinyl alcohol (PVA). Online. *Food Hydrocolloids*. 2017, s. 677-684. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.009>.
- 82) MUSTAFFA, MOHD FAIZ; RAMASAMY, KALAVATHY; JAAFAR, NAQIBAH; HAZIZUL HASAN, MIZATON; RAMLI, NOR AMLIZAN et al. In-situ film-forming solution for topical application of terbinafine hcl: biopharmaceutical evaluation and in vivo antifungal performance using animal model. Online. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2021, s. 98-105. ISSN 0975-7058. Dostupné z: <https://doi.org/10.22159/ijap.2021v13i6.42589>.

- 83) MORALES, Javier O. a MCCONVILLE, Jason T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. Online. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011, s. 187-199. ISSN 09396411. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.11.023>.
- 84) EBNESAJJAD, Sina. Surface and Material Characterization Techniques. Online. In: *Surface Treatment of Materials for Adhesion Bonding*. Elsevier, 2006, s. 43-75. ISBN 9780815515234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-081551523-4.50006-7>.
- 85) SCHICK, C. Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, s. 1589-1611. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3169-y>.
- 86) SABLANI, Shyam S.; SYAMALADEVI, Roopesh M. a SWANSON, Barry G. A Review of Methods, Data and Applications of State Diagrams of Food Systems. Online. *Food Engineering Reviews*. 2010, s. 168-203. ISSN 1866-7910. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9020-6>.
- 87) VERDONCK, Els; SCHAAP, Ko a THOMAS, Leonard C. A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999, s. 3-20. ISSN 03785173. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00267-7).
- 88) ŠNEJDROVÁ, Eva; MARTIŠKA, Juraj; LOSKOT, Jan; PARASKEVOPOULOS, Georgios; KOVÁČIK, Andrej et al. PLGA based film forming systems for superficial fungal infections treatment. Online. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021, ISSN 09280987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105855>.
- 89) MIKOS, A. G.; PEPPAS, N. A. Systems for controlled release of drugs. V: *Bioadhesive systems*. STP pharma, 1986, 19: 705-715.
- 90) Why Peel Strength Tester is Backbone of E-commerce Packaging. <https://www.prestogroup.com/blog/why-peel-strength-tester-is-backbone-of-e-commerce-packaging/>

commerce-packaging/.

- 91) MCCARRON, Paul A.; DONNELLY, Ryan F.; ZAWISLAK, Agnieszka; WOOLFSON, A. David; PRICE, John H. et al. Evaluation of a water-soluble bioadhesive patch for photodynamic therapy of vulval lesions. Online. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, s. 11-23. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.11.035>.
- 92) Assessing tackiness and adhesion using a pull away test on a rotational rheometer. Malvern Instruments Limited. Published online 2015.
- 93) KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers. Online. *Macromolecular Bioscience*. 2011, s. 748-764. ISSN 1616-5187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mabi.201000388>.
- 94) COOK, Sarah L.; BULL, Stephanie P.; METHVEN, Lisa; PARKER, Jane K. a KHUTORYANSKIY, Vitaliy V. Mucoadhesion: A food perspective. Online. *Food Hydrocolloids*. 2017, s. 281-296. ISSN 0268005X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.043>.
- 95) KUMAR, Mohit; SHARMA, Ankita; MAHMOOD, Syed; THAKUR, Anil; MIRZA, Mohd Aamir et al. Franz diffusion cell and its implication in skin permeation studies. Online. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2024, s. 943-956. ISSN 0193-2691. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01932691.2023.2188923>.
- 96) DE, Anjan; MUKHERJEE, Arup; CHATTOPADHYAY, Jayanta. Formulation & optimization of the transdermal film of 5-FU with in-vitro and ex-vivo study using ethyl cellulose and two grades of hydroxy propyl methyl cellulose. *Der Pharmacia Sinica*, 2013.
- 97) SITOVS, Andrejs; LOGVISS, Konstantins; LAUBERTE, Liga a MOHYLYUK, Valentyn. Oral delivery of cannabidiol: Revealing the formulation and absorption challenges. Online. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2024, ISSN 17732247. Dostupné

z: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105316>.

- 98) VLAD, ROBERT-ALEXANDRU. STRUCTURAL AND THERMAL ANALYSIS OF CANNABIDIOL ORODISPERSIBLE FORMULATIONS. Online. *FARMACIA*. 2021, s. 426-433. ISSN 00148237. Dostupné z: <https://doi.org/10.31925/farmacia.2021.3.5>.
- 99) SHI, Yi; CAO, Xiaosong; LUO, Shuangjiang; WANG, Xiaofeng; GRAFF, Robert W. et al. Investigate the Glass Transition Temperature of Hyperbranched Copolymers with Segmented Monomer Sequence. Online. *Macromolecules*. 2016, s. 4416-4422. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b01144>.
- 100) LAGRECA, Elena; ONESTO, Valentina; DI NATALE, Concetta; LA MANNA, Sara; NETTI, Paolo Antonio et al. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery. Online. *Progress in Biomaterials*. 2020, s. 153-174. ISSN 2194-0509. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00139-y>.

7 PRÍLOHY

Príloha 1: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 10 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 283,50 | - | - | - |
| | 211,98 | | | |
| | 247,79 | | | |
| 1 | 248,24 | 24,87 | 22,87 | 2,09 |
| | 190,03 | 20,71 | | |
| | 219,26 | 23,03 | | |
| 2 | 228,58 | 38,74 | 37,27 | 1,55 |
| | 174,19 | 35,65 | | |
| | 201,44 | 37,41 | | |
| 3 | 214,54 | 48,65 | 47,19 | 1,46 |
| | 163,51 | 45,73 | | |
| | 189,33 | 47,19 | | |
| 4 | 204,30 | 55,87 | 54,26 | 1,68 |
| | 156,32 | 52,51 | | |
| | 180,40 | 54,39 | | |
| 5 | 197,56 | 60,63 | 59,12 | 1,57 |
| | 151,04 | 57,50 | | |
| | 174,39 | 59,24 | | |
| 6 | 193,78 | 63,29 | 62,16 | 1,55 |
| | 147,96 | 60,40 | | |
| | 169,99 | 62,80 | | |
| 7 | 190,81 | 65,39 | 63,92 | 1,53 |
| | 145,90 | 62,35 | | |
| | 168,45 | 64,04 | | |
| 8 | 188,68 | 66,89 | 65,50 | 1,44 |
| | 144,13 | 64,02 | | |
| | 166,51 | 65,60 | | |
| 9 | 186,70 | 68,29 | 66,85 | 1,55 |
| | 142,86 | 65,21 | | |
| | 164,73 | 67,04 | | |
| 10 | 185,07 | 69,44 | 67,96 | 1,53 |
| | 141,62 | 66,38 | | |
| | 163,46 | 68,07 | | |

Príloha 2: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 11 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 205,16 | - | - | - |
| | 197,98 | | | |
| | 202,14 | | | |
| 1 | 160,46 | 32,68 | 32,85 | 0,46 |
| | 153,93 | 33,37 | | |
| | 158,34 | 32,50 | | |
| 2 | 136,97 | 49,86 | 51,19 | 1,52 |
| | 128,23 | 52,85 | | |
| | 133,59 | 50,87 | | |
| 3 | 121,83 | 60,93 | 62,08 | 1,64 |
| | 113,56 | 63,96 | | |
| | 119,45 | 61,36 | | |
| 4 | 111,43 | 68,53 | 70,17 | 1,88 |
| | 102,66 | 72,22 | | |
| | 108,15 | 69,75 | | |
| 5 | 103,36 | 74,43 | 76,30 | 2,10 |
| | 94,27 | 78,58 | | |
| | 99,86 | 75,90 | | |
| 6 | 97,93 | 78,40 | 80,10 | 2,00 |
| | 89,36 | 82,30 | | |
| | 94,87 | 79,60 | | |
| 7 | 94,62 | 80,82 | 82,17 | 1,71 |
| | 86,98 | 84,10 | | |
| | 92,17 | 81,60 | | |
| 8 | 92,47 | 82,39 | 83,56 | 1,50 |
| | 85,47 | 85,24 | | |
| | 90,24 | 83,04 | | |
| 9 | 91,16 | 83,35 | 84,34 | 1,30 |
| | 84,73 | 85,80 | | |
| | 89,13 | 83,86 | | |
| 10 | 90,18 | 84,07 | 85,01 | 1,27 |
| | 83,87 | 86,46 | | |
| | 88,26 | 84,51 | | |

Príloha 3: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 12 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|-------|
| 0 | 184,13 | - | - | - |
| | 142,69 | | | |
| | 164,56 | | | |
| 1 | 160,09 | 26,11 | 23,68 | 2,47 |
| | 127,58 | 21,18 | | |
| | 145,02 | 23,75 | | |
| 2 | 143,91 | 43,69 | 38,62 | 5,20 |
| | 118,94 | 33,29 | | |
| | 132,56 | 38,89 | | |
| 3 | 132,62 | 55,95 | 48,93 | 7,29 |
| | 113,16 | 41,39 | | |
| | 123,87 | 49,45 | | |
| 4 | 123,38 | 65,99 | 56,01 | 10,25 |
| | 110,22 | 45,51 | | |
| | 118,04 | 56,54 | | |
| 5 | 117,97 | 71,86 | 60,17 | 12,09 |
| | 108,64 | 47,73 | | |
| | 114,43 | 60,93 | | |
| 6 | 113,42 | 76,80 | 63,49 | 13,74 |
| | 107,47 | 49,37 | | |
| | 111,65 | 64,30 | | |
| 7 | 110,64 | 79,82 | 65,90 | 14,50 |
| | 106,38 | 50,89 | | |
| | 109,45 | 66,98 | | |
| 8 | 108,56 | 82,08 | 67,49 | 15,11 |
| | 105,65 | 51,92 | | |
| | 108,23 | 68,46 | | |
| 9 | 106,87 | 83,92 | 69,29 | 15,49 |
| | 104,83 | 53,07 | | |
| | 106,24 | 70,88 | | |
| 10 | 105,74 | 85,15 | 70,21 | 15,62 |
| | 104,18 | 53,98 | | |
| | 105,73 | 71,50 | | |

Príloha 4: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 13 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 157,12 | - | - | - |
| | 146,23 | | | |
| | 152,23 | | | |
| 1 | 128,23 | 27,58 | 30,84 | 3,48 |
| | 112,59 | 34,51 | | |
| | 121,35 | 30,43 | | |
| 2 | 108,34 | 46,57 | 49,73 | 3,47 |
| | 94,13 | 53,44 | | |
| | 102,32 | 49,18 | | |
| 3 | 95,03 | 59,28 | 62,52 | 3,68 |
| | 81,39 | 66,51 | | |
| | 89,54 | 61,77 | | |
| 4 | 82,14 | 71,58 | 74,46 | 3,14 |
| | 70,38 | 77,81 | | |
| | 77,13 | 74,00 | | |
| 5 | 72,03 | 81,23 | 84,11 | 3,26 |
| | 60,78 | 87,65 | | |
| | 67,54 | 83,45 | | |
| 6 | 61,98 | 90,83 | 93,24 | 2,77 |
| | 52,38 | 96,27 | | |
| | 58,24 | 92,61 | | |
| 7 | 54,05 | 98,40 | 100,75 | 2,74 |
| | 45,08 | 103,76 | | |
| | 50,65 | 100,09 | | |
| 8 | 46,56 | 105,55 | 107,16 | 2,09 |
| | 39,46 | 109,52 | | |
| | 44,23 | 106,42 | | |
| 9 | 40,04 | 111,77 | 112,68 | 1,26 |
| | 34,98 | 114,12 | | |
| | 38,43 | 112,13 | | |
| 10 | 35,60 | 116,01 | 116,20 | 0,77 |
| | 32,12 | 117,05 | | |
| | 34,97 | 115,54 | | |

Príloha 5: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 14 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 219,38 | - | - | - |
| | 225,64 | | | |
| | 223,53 | | | |
| 1 | 183,46 | 32,75 | 30,94 | 1,73 |
| | 192,58 | 29,30 | | |
| | 189,15 | 30,76 | | |
| 2 | 160,39 | 53,78 | 51,37 | 2,31 |
| | 170,15 | 49,18 | | |
| | 166,36 | 51,15 | | |
| 3 | 146,98 | 66,00 | 63,68 | 2,22 |
| | 156,17 | 61,58 | | |
| | 152,59 | 63,47 | | |
| 4 | 136,74 | 75,34 | 72,72 | 2,49 |
| | 146,23 | 70,39 | | |
| | 142,57 | 72,44 | | |
| 5 | 130,60 | 80,94 | 78,81 | 1,99 |
| | 138,79 | 76,98 | | |
| | 135,78 | 78,51 | | |
| 6 | 125,87 | 85,25 | 83,26 | 1,91 |
| | 133,76 | 81,44 | | |
| | 130,67 | 83,09 | | |
| 7 | 123,12 | 87,76 | 86,11 | 1,55 |
| | 130,09 | 84,69 | | |
| | 127,56 | 85,87 | | |
| 8 | 120,04 | 90,56 | 88,74 | 1,70 |
| | 127,25 | 87,21 | | |
| | 124,67 | 88,45 | | |
| 9 | 118,25 | 92,20 | 90,56 | 1,58 |
| | 125,19 | 89,04 | | |
| | 122,45 | 90,44 | | |
| 10 | 116,88 | 93,45 | 97,09 | 9,09 |
| | 123,66 | 90,39 | | |
| | 103,45 | 107,44 | | |

Príloha 6: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 15 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 208,18 | - | - | - |
| | 196,89 | | | |
| | 203,65 | | | |
| 1 | 166,09 | 30,33 | 28,10 | 2,23 |
| | 162,93 | 25,87 | | |
| | 165,49 | 28,11 | | |
| 2 | 140,39 | 48,84 | 46,83 | 1,93 |
| | 137,81 | 45,01 | | |
| | 140,34 | 46,63 | | |
| 3 | 123,93 | 60,70 | 58,85 | 1,78 |
| | 121,86 | 57,16 | | |
| | 123,98 | 58,68 | | |
| 4 | 112,40 | 69,01 | 67,16 | 1,75 |
| | 110,87 | 65,53 | | |
| | 112,76 | 66,95 | | |
| 5 | 104,35 | 74,81 | 73,17 | 1,56 |
| | 102,78 | 71,70 | | |
| | 104,54 | 73,00 | | |
| 6 | 97,08 | 80,05 | 78,32 | 1,72 |
| | 96,32 | 76,62 | | |
| | 97,35 | 78,30 | | |
| 7 | 91,47 | 84,09 | 82,09 | 1,84 |
| | 91,24 | 80,49 | | |
| | 92,76 | 81,68 | | |
| 8 | 87,56 | 86,91 | 84,95 | 1,88 |
| | 87,73 | 83,16 | | |
| | 88,56 | 84,77 | | |
| 9 | 85,20 | 88,61 | 86,81 | 1,66 |
| | 84,86 | 85,35 | | |
| | 86,24 | 86,48 | | |
| 10 | 84,37 | 89,21 | 87,58 | 1,50 |
| | 83,65 | 86,27 | | |
| | 85,19 | 87,25 | | |

Príloha 7: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 16 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|-------|
| 0 | 193,38 | - | - | - |
| | 179,81 | | | |
| | 190,01 | | | |
| 1 | 179,59 | 14,26 | 18,13 | 3,39 |
| | 161,29 | 20,60 | | |
| | 171,46 | 19,53 | | |
| 2 | 167,30 | 26,97 | 30,05 | 3,64 |
| | 149,18 | 34,07 | | |
| | 162,36 | 29,10 | | |
| 3 | 157,08 | 37,54 | 40,79 | 3,87 |
| | 139,29 | 45,07 | | |
| | 152,25 | 39,75 | | |
| 4 | 151,18 | 43,64 | 48,15 | 5,37 |
| | 131,18 | 54,09 | | |
| | 145,63 | 46,71 | | |
| 5 | 147,36 | 47,60 | 53,68 | 7,22 |
| | 124,37 | 61,67 | | |
| | 140,81 | 51,79 | | |
| 6 | 144,98 | 50,06 | 57,89 | 9,21 |
| | 118,64 | 68,04 | | |
| | 137,22 | 55,57 | | |
| 7 | 143,27 | 51,83 | 61,41 | 11,31 |
| | 113,38 | 73,89 | | |
| | 134,43 | 58,50 | | |
| 8 | 141,98 | 53,16 | 64,11 | 12,92 |
| | 109,36 | 78,36 | | |
| | 132,23 | 60,82 | | |
| 9 | 141,03 | 54,14 | 65,92 | 13,87 |
| | 106,80 | 81,21 | | |
| | 130,73 | 62,40 | | |
| 10 | 140,02 | 55,19 | 67,53 | 14,55 |
| | 104,68 | 83,57 | | |
| | 129,36 | 63,84 | | |

Príloha 8: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 17 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 223,19 | - | - | - |
| | 211,05 | | | |
| | 218,12 | | | |
| 1 | 186,93 | 24,37 | 23,91 | 0,44 |
| | 177,98 | 23,50 | | |
| | 183,45 | 23,84 | | |
| 2 | 164,58 | 39,39 | 38,26 | 1,07 |
| | 158,63 | 37,26 | | |
| | 162,67 | 38,13 | | |
| 3 | 149,35 | 49,63 | 48,09 | 1,47 |
| | 145,34 | 46,70 | | |
| | 148,41 | 47,94 | | |
| 4 | 137,12 | 57,85 | 55,87 | 1,90 |
| | 134,98 | 54,07 | | |
| | 137,12 | 55,70 | | |
| 5 | 127,09 | 64,59 | 62,69 | 1,85 |
| | 125,37 | 60,90 | | |
| | 127,09 | 62,60 | | |
| 6 | 118,15 | 70,59 | 68,56 | 2,13 |
| | 117,70 | 66,35 | | |
| | 118,15 | 68,75 | | |
| 7 | 110,98 | 75,41 | 73,50 | 1,85 |
| | 110,13 | 71,73 | | |
| | 111,46 | 73,35 | | |
| 8 | 104,41 | 79,83 | 77,53 | 2,19 |
| | 104,85 | 75,48 | | |
| | 105,75 | 77,28 | | |
| 9 | 99,18 | 83,34 | 81,15 | 2,13 |
| | 99,76 | 79,10 | | |
| | 100,34 | 81,00 | | |
| 10 | 94,78 | 86,30 | 83,93 | 2,25 |
| | 95,93 | 81,82 | | |
| | 96,45 | 83,67 | | |

Príloha 9: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 18 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 266,41 | - | - | - |
| | 231,59 | | | |
| | 250,12 | | | |
| 1 | 239,60 | 20,13 | 20,10 | 0,04 |
| | 208,29 | 20,12 | | |
| | 225,03 | 20,06 | | |
| 2 | 217,23 | 36,92 | 37,56 | 0,72 |
| | 187,19 | 38,34 | | |
| | 203,34 | 37,41 | | |
| 3 | 202,30 | 48,13 | 48,51 | 0,48 |
| | 174,80 | 49,04 | | |
| | 189,65 | 48,35 | | |
| 4 | 192,58 | 55,43 | 55,80 | 0,53 |
| | 166,28 | 56,40 | | |
| | 180,63 | 55,57 | | |
| 5 | 186,28 | 60,16 | 60,64 | 0,64 |
| | 160,53 | 61,37 | | |
| | 174,58 | 60,40 | | |
| 6 | 181,74 | 63,56 | 64,07 | 0,62 |
| | 156,60 | 64,76 | | |
| | 170,23 | 63,88 | | |
| 7 | 178,93 | 65,67 | 66,05 | 0,59 |
| | 154,32 | 66,73 | | |
| | 167,89 | 65,75 | | |
| 8 | 176,78 | 67,29 | 67,76 | 0,62 |
| | 152,32 | 68,46 | | |
| | 165,67 | 67,53 | | |
| 9 | 174,88 | 68,71 | 69,08 | 0,60 |
| | 150,80 | 69,77 | | |
| | 164,12 | 68,77 | | |
| 10 | 173,53 | 69,73 | 70,24 | 0,69 |
| | 149,35 | 71,02 | | |
| | 162,63 | 69,96 | | |

Príloha 10: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 19 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 195,33 | - | - | - |
| | 192,65 | | | |
| | 195,02 | | | |
| 1 | 166,19 | 22,38 | 22,57 | 0,26 |
| | 163,28 | 22,87 | | |
| | 165,83 | 22,45 | | |
| 2 | 144,28 | 39,20 | 39,31 | 0,17 |
| | 141,91 | 39,51 | | |
| | 144,01 | 39,23 | | |
| 3 | 129,36 | 50,66 | 51,34 | 0,66 |
| | 125,89 | 51,98 | | |
| | 128,23 | 51,37 | | |
| 4 | 119,65 | 58,12 | 58,35 | 0,39 |
| | 117,13 | 58,80 | | |
| | 119,45 | 58,12 | | |
| 5 | 112,16 | 63,87 | 64,28 | 0,58 |
| | 109,24 | 64,94 | | |
| | 111,76 | 64,04 | | |
| 6 | 106,73 | 68,04 | 68,34 | 0,49 |
| | 104,15 | 68,91 | | |
| | 106,53 | 68,06 | | |
| 7 | 103,13 | 70,80 | 71,01 | 0,47 |
| | 100,75 | 71,55 | | |
| | 103,12 | 70,69 | | |
| 8 | 100,78 | 72,61 | 73,22 | 0,81 |
| | 97,43 | 74,14 | | |
| | 100,24 | 72,90 | | |
| 9 | 98,65 | 74,24 | 74,81 | 0,80 |
| | 95,39 | 75,73 | | |
| | 98,21 | 74,46 | | |
| 10 | 97,50 | 75,13 | 75,76 | 0,84 |
| | 94,13 | 76,71 | | |
| | 96,93 | 75,45 | | |

Príloha 11: Pribeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 20 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|------|
| 0 | 171,98 | - | - | - |
| | 187,13 | | | |
| | 180,64 | | | |
| 1 | 155,28 | 19,42 | 19,64 | 0,26 |
| | 168,48 | 19,93 | | |
| | 162,97 | 19,56 | | |
| 2 | 141,56 | 35,38 | 34,25 | 1,05 |
| | 155,97 | 33,30 | | |
| | 149,88 | 34,06 | | |
| 3 | 130,39 | 48,37 | 46,07 | 2,19 |
| | 145,96 | 44,00 | | |
| | 139,23 | 45,85 | | |
| 4 | 121,86 | 58,29 | 55,38 | 2,76 |
| | 137,74 | 52,79 | | |
| | 130,91 | 55,06 | | |
| 5 | 115,58 | 65,59 | 62,01 | 3,43 |
| | 132,15 | 58,76 | | |
| | 124,94 | 61,67 | | |
| 6 | 112,05 | 69,69 | 65,81 | 3,72 |
| | 128,86 | 62,28 | | |
| | 121,53 | 65,45 | | |
| 7 | 110,02 | 72,05 | 68,02 | 3,85 |
| | 126,88 | 64,39 | | |
| | 119,58 | 67,60 | | |
| 8 | 108,89 | 73,37 | 69,37 | 3,81 |
| | 125,57 | 65,79 | | |
| | 118,37 | 68,94 | | |
| 9 | 107,48 | 75,01 | 70,71 | 4,07 |
| | 124,53 | 66,91 | | |
| | 117,23 | 70,21 | | |
| 10 | 106,50 | 76,15 | 71,56 | 4,36 |
| | 124,01 | 67,46 | | |
| | 116,45 | 71,07 | | |

Príloha 12: Priebeh evaporácie acetónu a isopropanolu z FFS 21 (Tab. 4)

| Čas (min) | Hmotnosť FFS (mg) | Evaporácia rozpúšťadla (%) | Priemer (%) | SD |
|-----------|-------------------|----------------------------|-------------|-------|
| 0 | 132,68 | - | - | - |
| | 135,60 | | | |
| | 135,23 | | | |
| 1 | 103,68 | 32,79 | 29,10 | 3,62 |
| | 112,50 | 25,55 | | |
| | 109,12 | 28,96 | | |
| 2 | 86,58 | 52,12 | 46,90 | 5,06 |
| | 97,62 | 42,01 | | |
| | 93,24 | 46,58 | | |
| 3 | 74,98 | 65,23 | 60,00 | 5,07 |
| | 85,78 | 55,11 | | |
| | 81,45 | 59,65 | | |
| 4 | 64,99 | 76,53 | 70,89 | 5,42 |
| | 76,20 | 65,71 | | |
| | 71,73 | 70,44 | | |
| 5 | 56,50 | 86,12 | 79,22 | 6,68 |
| | 69,80 | 72,79 | | |
| | 64,23 | 78,75 | | |
| 6 | 48,70 | 94,94 | 86,81 | 7,87 |
| | 63,98 | 79,23 | | |
| | 57,45 | 86,28 | | |
| 7 | 42,19 | 102,30 | 91,44 | 10,62 |
| | 62,30 | 81,08 | | |
| | 53,26 | 90,92 | | |
| 8 | 36,88 | 108,31 | 94,99 | 13,03 |
| | 61,23 | 82,27 | | |
| | 50,12 | 94,41 | | |
| 9 | 32,70 | 113,03 | 97,64 | 15,08 |
| | 60,67 | 82,89 | | |
| | 47,78 | 97,00 | | |
| 10 | 30,38 | 115,65 | 99,15 | 16,16 |
| | 60,25 | 83,35 | | |
| | 46,47 | 98,45 | | |