



Katedra Technologii Postaci Leku i Biofarmacji
Wydziału Farmaceutycznego
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego



**Octanobursztynian hydroksypropylometylocelulozy jako
substancja pomocnicza do sporządzania postaci leku
w terapii przeciwgrzybiczej**

Rozprawa doktorska

Witold Jamróz

Promotor

Prof. dr hab. Renata Jachowicz

Kraków 2009

Szanownej Pani Profesor dr hab. Renacie Jachowicz

*składam serdeczne podziękowania za opiekę naukową,
poświęcony czas i cenne wskazówki, bez których
nie byłoby możliwe przygotowywanie niniejszej rozprawy
oraz za wielką życzliwość i cierpliwość jakiej doświadczyłem.*

Szanownej Pani Profesor dr hab. Alicji Budak
oraz Szanownej Pani dr Danucie Trojanowskiej
z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej UJ CM
składam serdeczne podziękowania za pomoc
w realizacji badań mikrobiologicznych
oraz pracownikom Zakładu *za okazaną życzliwość*

Koleżankom i Kolegom *dziękuję za*
wsparcie udzielone przy pisaniu
niniejszej rozprawy

I. WSTĘP	7
1. GRZYBICA PAZNOKCI	7
2. TERAPIA DOUSTNA I MIEJSCOWA.....	11
3. ROZWIĄZANIA TECHNOLOGICZNE POSTACI LEKU	16
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	25
III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	27
1. SUBSTANCJE UŻYTE DO BADAŃ.....	27
1.1. Substancje lecznicze	27
1.2. Substancje pomocnicze	29
1.3. Odczynniki i rozpuszczalniki	35
1.4. Materiały	35
2. APARATURA	36
3. OPROGRAMOWANIE	36
4. UKŁADY PROSZKOWE.....	37
4.1. Sporządzenie układów proszkowych z itrakonazolem	37
4.1.1. Sporządzenie stałych rozprożeń.....	37
4.1.2. Sporządzenie mieszanin fizycznych	42
4.2. Sporządzenie układów proszkowych z chlorowodorkiem terbinafiny	42
4.2.1. Sporządzenie stałych rozprożeń.....	42
4.2.2. Sporządzenie mieszanin fizycznych	43
4.3. Metodyka badań właściwości fizycznych układów proszkowych.....	44
4.3.1. Badania w mikroskopie polaryzacyjnym	44
4.3.2. Badania w mikroskopie skaningowym.....	44
4.3.3. Badania rentgenograficzne (X-ray).....	44
4.3.4. Badania różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC).....	45
4.4. Metody analizy ilościowej substancji leczniczych	45
4.5. Badanie dostępności farmaceutycznej	45
4.5.1. Badanie rozpuszczalności.....	45
4.5.2. Badanie szybkości rozpuszczania.....	46
4.5.3. Analiza kinetyczna procesu rozpuszczania substancji leczniczych z wybranych formułacji	47
4.6. Badanie trwałości układów z itrakonazolem	48
5. LAKIERY DO PAZNOKCI Z TERBINAFINĄ.....	49
5.1. Sporządzenie lakierów do paznokci z terbinafiną	49
5.1.1. Przygotowanie filmów z lakierów do paznokci	51
5.1.2. Właściwości filmów.....	51
5.2. Przygotowanie membran z kopyt wołowych	51
5.2.1. Analiza mikroskopowa membran z kopyt wołowych i płytek paznokciowych	52
5.3. Badania dostępności farmaceutycznej	52
5.3.1. Badania szybkości uwalniania chlorowodorku terbinafiny z filmów.....	52
5.3.2. Badania przenikania chlorowodorku terbinafiny w komorach dyfuzyjnych	52
5.4. Badania mikrobiologiczne	54
5.4.1. Przygotowanie podłoża	54
5.4.2. Przygotowanie membran z kopyt wołowych do badań	54
5.4.3. Przygotowanie płytek paznokciowych do badań	55
5.4.4. Analiza wzrostu kolonii na membranach.....	55

IV. WYNIKI BADAŃ	56
1. UKŁADY PROSZKOWE Z ITRAKONAZOLEM	56
1.1. Charakterystyka układów	56
1.2. Wpływ wytwarzania stałego rozproszenia na właściwości substancji leczniczej	60
1.2.1. Wyniki badań mikroskopowych	60
1.2.2. Wyniki badań rentgenograficznych	62
1.3. Wpływ ilości i rodzaju nośnika w układzie na rozpuszczalność i profil rozpuszczania itrakonazolu	65
1.3.1. Wyniki badań rozpuszczalności	65
1.3.2. Wyniki badań szybkości rozpuszczania	70
1.3.3. Ocena trwałości stałych rozproszeń z itrakonazolem w badaniach długoterminowych	79
2. UKŁADY PROSZKOWE Z CHLOROWODORKIEM TERBINAFINY	86
2.1. Charakterystyka układów	86
2.2. Wpływ wytwarzania stałego rozproszenia na właściwości substancji leczniczej	88
2.2.1. Wyniki badań mikroskopowych	88
2.2.2. Wyniki badań rentgenograficznych	88
2.2.3. Wyniki badań różnicowej kalorymetrii skaningowej	88
2.3. Wpływ składu stałych rozproszeń na profil rozpuszczania terbinafiny	93
3. LAKIERY DO PAZNOKCI Z TERBINAFINĄ	98
3.1. Charakterystyka filmów otrzymanych z lakierów do paznokci	98
3.2. Wpływ składu lakierów na szybkość uwalniania terbinafiny z filmów	100
3.2.1. Rozpuszczalnik aceton/woda	100
3.2.2. Rozpuszczalnik etanol/aceton/woda	105
3.3. Wpływ nośnika i plastyfikatorów na przenikanie terbinafiny przez membrany	109
3.3.1. Charakterystyka membran otrzymanych z kopyt wołowych	109
3.3.2. Wyniki badań przenikania	111
3.4. Ocena skuteczności działania lakierów w oparciu o badania mikrobiologiczne	113
V. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW BADAŃ	123
VI. WNIOSKI	134
VII. PIŚMIENNICTWO	135
VIII. STRESZCZENIE	143
IX. SUMMARY	145
X. SPIS TABEL	147
XI. SPIS RYCIN	149

I. Wstęp

W ostatnich latach odnotowuje się systematyczny wzrost ilości zachorowań na grzybice powierzchniowe. Wśród nich zasadniczą grupę stanowią schorzenia stóp i paznokci. Ocenia się, że zarówno w Europie jak i Stanach Zjednoczonych grzybica paznokci stanowi 50 % wszystkich schorzeń paznokci. Z badań przeprowadzonych w Kanadzie oraz Stanach Zjednoczonych wynika, że schorzeniem tym dotkniętych jest od 8 % do 14 % pacjentów zgłaszających się do dermatologów [27, 33]. Wyniki badań przeprowadzone w Polsce w ramach europejskiego projektu Achilles na grupie 40 tys. osób wykazały rozpoznanie u 42 % spośród nich grzybicę stóp oraz u 21 % grzybicę paznokci [13, 28, 39].

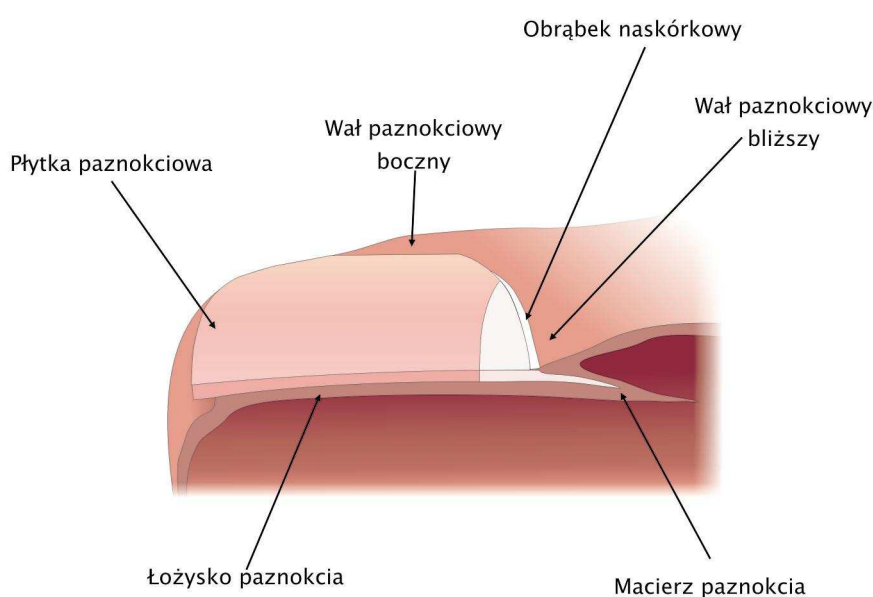
1. Grzybica paznokci

Grzybica paznokci (*onychomycosis*) jest zakażeniem jednego lub kilku elementów paznokcia wywołanym przez strzępki grzybów chorobotwórczych [20]. Choroba rozwija się często w wyniku przenoszenia patogenów z obszarów istniejącego zakażenia grzybiczego skóry, a zwłaszcza czynników środowiskowych [20, 39]. Z tego powodu grzybica paznokci stóp występuje częściej niż grzybica paznokci rąk. Ponadto u osób w starszym wieku, a także cierpiących z powodu zaburzeń odporności, krążenia obwodowego lub cukrzycy przypadki grzybic paznokci są często odnotowywane [20, 27, 31, 32, 34, 39, 102, 112].

Grzybice paznokci wywoływane są przez dermatofity, grzyby drożdżopodobne i grzyby pleśniowe. Głównymi patogenami odpowiedzialnymi za grzybice paznokci są dermatofity z rodzaju *Trichophyton*, przede wszystkim *Trichophyton rubrum* oraz *Trichophyton mentagrophytes*. Stwierdzono, że są one przyczyną ponad 90 % przypadków grzybic paznokci. Gatunki te należą do grzybów antropofilnych, które są patogenne głównie dla człowieka. Wywołują one dermatofitozy przewlekłe, wieloletnie i często nawracające. Wiąże się to ze słabą aktywnością stymulowania odpowiedzi immunologicznej oraz hamującym wpływem na tą odpowiedź składników grzybni wydzielanych do podłoża [22, 39]. Z grupy grzybów

drożdżopodobnych najczęściej występuje *Candida albicans*. Grzybice wywołane przez pleśnie występują rzadko. Spośród tej grupy najczęściej izolowany jest *Scopularopsis brevicaulus* [20, 112].

W wyniku infekcji paznokcia dochodzi do zmian w obrębie płytki paznokciowej. Płytkę paznokciową jest wytworem macierzy paznokcia. Szybkość jej wzrostu jest uwarunkowana osobniczo i przyjmuje się, że płytki paznokciowe rąk odrastają po ok. 6 miesiącach, a w przypadku paznokci stóp proces ten trwa wolniej, ok. 12-18 miesięcy. Płytkę znajduje się na łożu paznokcia i jest otoczona wałami paznokciowymi: bocznymi i bliższym, który przechodzi w obrąbek naskórkowy [20, 79, 104]. Schemat budowy paznokcia przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Budowa paznokcia.

Płytkę paznokciową ma ok. 0,25 - 0,6 mm grubości i zbudowana jest z warstw skeratynizowanych, ściśle przylegających do siebie komórek, zawierających helisy keratynowe tworzące mikro i makrofibre. Keratynowe fibrele składają się w 80 % z tzw. keratyny twardej i połączone są pomiędzy sobą mostkami disiarczkowymi. W matrycy keratynowej znajduje się od 10 do 30 % wody. Jej obecność warunkuje elastyczność płytki paznokciowej i sprawia, że zachowuje się ona jak hydrofilowa błona żelowa [79]. Zawartość lipidów znajdujących się głównie przy zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni płytki paznokciowej wynosi od 0,1 % do 1 %.

Z uwagi na strukturę paznokcia przenikanie substancji leczniczych odbywa się na drodze dyfuzji i zależne jest przede wszystkim od rozpuszczalności substancji leczniczej w wodzie, a także jej stężenia w preparacie. Cząsteczki substancji leczniczej o dużej masie cząsteczkowej, a także obdarzone ładunkiem wolniej penetrują przez płytkę paznokciową [60, 79, 104]. Skuteczność działania leków zależy też od zmian patologicznych płytki paznokciowej wynikających z rodzaju schorzenia i stopnia jego zaawansowania.

Ze względu na różne mechanizmy rozwoju zakażenia wyróżnić można pięć typów klinicznych grzybicy paznokci: powierzchowną onychomikozę, dalszą i boczną podpaznokciową onychomikozę, bliższą podpaznokciową onychomikozę, wewnątrzpłytkową onychomikozę oraz całkowitą dystroficzną onychomikozę (ryc. 2) [20, 39, 68, 79, 112].

W powierzchownej onychomikozie proces chorobowy obejmuje powierzchnię płytki paznokciowej. Penetracja strzępków grzybni w głąb płytki może występować w niewielkim stopniu. Na powierzchni pojawiają się charakterystyczne białe plamy, które mogą zlewać się i zajmować całą powierzchnię paznokcia. Wówczas paznokieć staje się kruchy i szorstki. Zakażenie całej płytki paznokciowej określa się jako wewnątrzpłytkową onychomikozę. Infekcja rozpoczyna się od wolnego brzegu paznokcia i nie obejmuje łożyska paznokcia. Jeżeli proces obejmuje łożysko paznokcia, a w niewielkim stopniu płytkę, to wówczas ten stan nazywany jest dalszą i boczną podpaznokciową onychomikozą. Następuje rogowacenie podpaznokciowe. Paznokieć staje się łamliwy i kruchy, a obszar objęty zakażeniem ma zabarwienie żółtawo-brązowe. Może dochodzić do odstawania dystalnej części paznokcia od łożyska. Zakażenie może także rozwijać się od strony obróbka naskórkowego. W miejscu wnikania strzępków grzybni pojawia się biała plama, następuje rogowacenie łożyska i wykruszanie się proksymalnej części płytki paznokciowej. Te zmiany charakteryzują bliższą podpaznokciową onychomikozę. W przypadku całkowitej dystroficznej onychomikozy proces obejmuje cały paznokieć. Płytkę paznokciową jest całkowicie zniszczona, a rogowacenie podpaznokciowe jest bardzo nasilone.

Do infekcji dochodzi najczęściej z zakażonego naskórka wokół paznokcia. Strzępki grzybni rozrastają się w naskórku łożyska, co powodować może następnie odczyn zapalny, a po dłuższym czasie rogowacenie łożyska. W wyniku tych zmian może następować oddzielenie płytki paznokciowej od łożyska (*onycholiza*). W obecności dermatofitów następuje enzymatyczny rozkład miękkiej keratyny i dlatego rozwijają się one w warstwach paznokcia bliżej łożyska. Powstające wówczas kanały między komórkami tworzą strukturę w formie tzw. poprzecznej siatki. W zależności od aktywności enzymatycznej dermatofitu

może dojść nawet do rozkładu keratyny komórek paznokcia, tym samym dezintegracji struktury płytki i nadmiernego rogowacenie łożyska. W takim przypadku może dochodzić do zakażenia nowo odrastającej płytki paznokciowej poprzez dermatofity znajdujące się w zrogowaciałym łożysku [68].



dalsza i boczna podpaznokciowa onychomikoza



bliższa podpaznokciowa onychomikoza



powierzchniowa onychomikoza



wewnątrzpłytkowa onychomikoza



całkowita dystroficzna onychomikoza

Rycina 2. Typy grzybicy paznokci [9].

2. Terapia doustna i miejscowa

Ze względu na specyfikę zakażonych tkanek, leczenie grzybicy paznokci jest długotrwałe. Okres leczenia może wynosić od kilku do kilkunastu miesięcy, często odnotowywane są nawroty choroby powodowane nadkażeniem zdrowej płytki paznokciowej poprzez grzyby bytujące w zrogowaciałym łożu paznokciowym [68].

Na początku XX wieku stosowano niespecyficzne leki przeciwgrzybicze takie jak nasycony roztwór jodku potasu lub maść Whitfielda o zawartości 6 % kwasu benzoowego i 3 % kwasu salicylowego na podłożu absorpcyjnym. Z końcem lat pięćdziesiątych wprowadzono do leczenia doustne leki przeciwgrzybicze. Po raz pierwszy zastosowano gryzeofulwinę w leczeniu grzybicy paznokci. Zbyt mała skuteczność terapeutyczna i stwierdzone działania niepożądane przyczyniły się do dalszych poszukiwań. W drugiej połowie lat sześćdziesiątych wprowadzono do leczenia leki imidazolowe, a w latach osiemdziesiątych triazolowe (itakonazol i flukonazol), które charakteryzowały się większą skutecznością. Pojawiła się wtedy także nowa grupa leków – pochodne alliloaminy, do których jest zaliczana terbinafina. W przypadku substancji leczniczych stosowanych wyłącznie miejscowo zostały opracowane na przełomie lat 80- i 90-tych lakiery do paznokci [1, 20, 64, 69, 86, 122].

Mechanizm działania leków przeciwgrzybiczych stosowanych w leczeniu grzybicy paznokci wiąże się z zaburzeniem metabolizmu komórki grzybiczej. W przypadku pochodnych azolu, a także alliloamin oraz amorolfiny dochodzi do zahamowania na różnych etapach szlaku syntezy ergosterolu – składnika budulcowego ściany komórkowej. Działanie cyklopiroksu wiąże się z modyfikacją przepuszczalności błon organelli komórkowych i zaburzeniem ich czynności metabolicznych poprzez wiązanie trójwartościowych jonów metali będących kofaktorami enzymów (ryc. 3) [7, 16, 69].

Polskie Towarzystwo Dermatologiczne zgodnie ze światowymi standardami zaleca w leczeniu grzybicy paznokci preparaty doustne zawierające terbinafinę, itakonazol, ketokonazol oraz flukonazol, a także preparaty o działaniu miejscowym zawierające: cyklopiroks, amorolfinę i bifonazol z mocznikiem oraz preparaty z mikonazolem, bifonazolem, chlormidazolem i ekonazolem, aby zapobiec reinfekcjom [28, 103]. Przykładowe preparaty zarejestrowane w Polsce stosowane w leczeniu doustnym i miejscowym grzybicy paznokci zebrano w tabelach 1 i 2 [94, 95, 118].

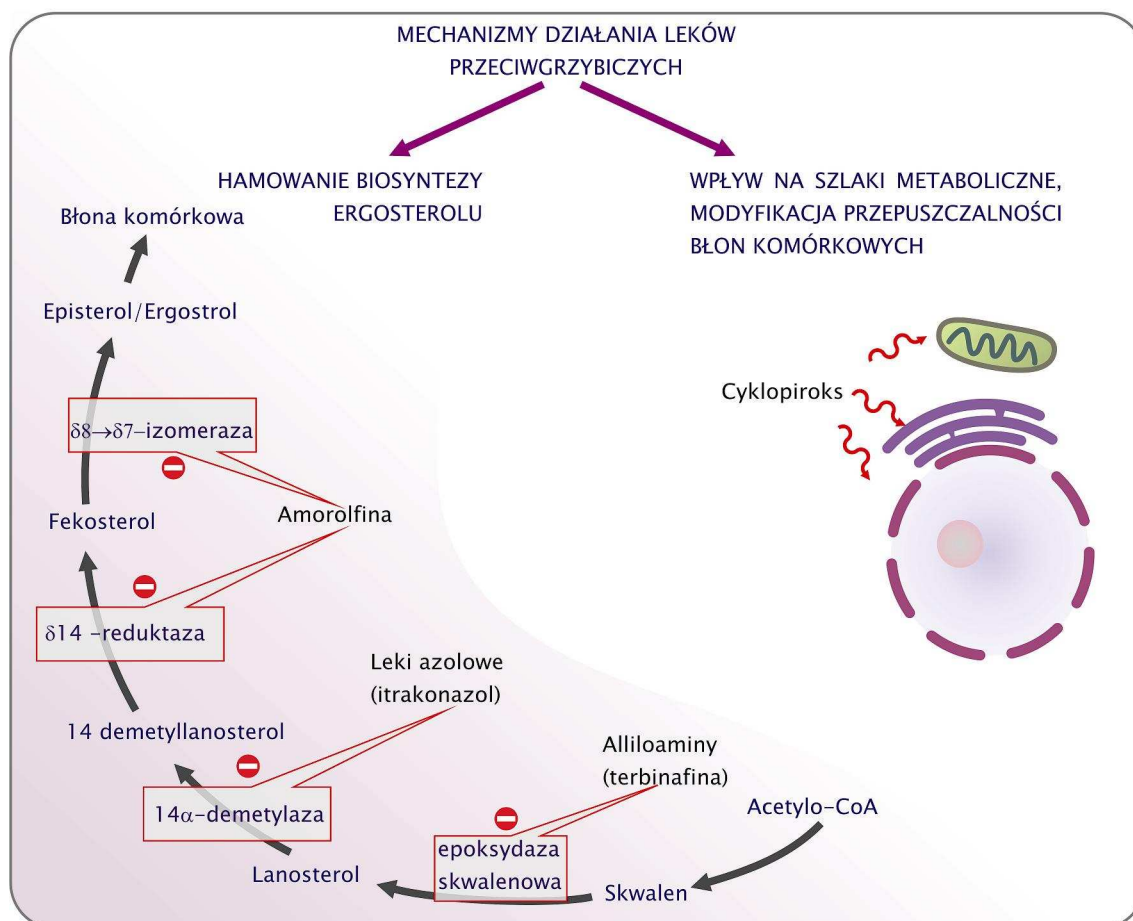
Tabela 1. Przykłady preparatów zarejestrowanych w Polsce stosowanych doustnie w leczeniu grzybicy paznokci.

Nazwa międzynarodowa	Postać i dawka	Nazwa handlowa
Fluconazol	kapsułki (50, 100, 150 mg)	Diflucan®
		Fluconazol®
	kapsułki (50, 150 mg)	Mycosyst®
		Fluconazole®
	kapsułki (50, 100, 150, 200 mg)	Flumycon®
Itrakonazol	kapsułki (100 mg)	Cladosol 100®
		ItraLek®
		Orungal®
		Trioxal®
Ketekonazol	tabletki (200 mg)	Fungores®
		Ketokonazol®
		Ketokonazole®
		Nizoral®
Terbinafina	tabletki (125, 250 mg)	Afugin®
		Lamisil®
		Verbinaf®
	tabletki (250 mg)	Myconafine®
		Onymax®
		Terbisil®
	tabletki (125 mg)	Terbisil® Kid

Tabela 2. Preparaty zarejestrowane w Polsce stosowane w leczeniu miejscowym grzybic paznokci.

Nazwa międzynarodowa	Nazwa handlowa i postać	Wskazania producenta
Amorolfina	Loceryl® lakier do paznokci	Stosować 1-2 razy w tygodniu
Bifonazol	Mycospor Onychoset® maść	Zawiera 10 mg/g bifonazolu i 400 mg/g mocznika. Plastry do opatrunków okluzyjnych i tarka do usuwania płytki paznokciowej
Cyklopiroks	Batrafen® 8% lakier do paznokci	Stosować codziennie
	Hasofungin® (10 mg/g)	Lek II rzutu w terapii
	Pirolam® – 10 % - roztwór, zawiesina, żel	W przypadku grzybic paznokci można stosować opatrunki okluzyjne
Ekonazol	Pevaryl® krem (10mg/g)	
	Pevazol® krem (10 mg/g)	Preparat stosowany w grzybicy paznokci w skojarzeniu z leczeniem doustnym
	Pevisone® maść, krem	Preparat złożony zawiera 10 mg/g ekonazolu i 1 mg/g acetonid triamcinolonu
Mikonazol	Daktarin® krem (20 mg/g)	
	Miconazol® krem (20 mg/g)	
	Mycosolon® krem	Preparat złożony zawiera 20 mg/g mikonazolu i 2,5 mg/g mazipredonu
Naftifina	Exoderil® (krem 10mg/g)	
Inne	Acifungin forte®	Preparat złożony zawiera 40 mg/g kw. borowego, 9,6 mg/g kw. salicylowego, 16 mg/g kw. galusowego, 44 mg/g kw. taninowego

W przypadku zakażeń dermatofitowych zaleca się stosowanie w pierwszej kolejności terbinafiny [28]. Ostatnio wykazano skuteczność terbinafiny również w niektórych zakażeniach mieszanych [98]. Efektywność działania terbinafiny po podaniu doustnym wynika z zaburzenia syntezy ściany komórkowej grzyba, a także nagromadzenia toksycznego dla komórki grzybiczej skwalenu [19, 86, 95].



Rycina 3. Mechanizm działania substancji przeciwgrzybiczych.

Terbinafina stosowana jest doustnie w jednorazowej dawce 250 mg na dobę. Ze względu na lipofilowy charakter osiąga wysokie stężenie w warstwie rogowej naskórka, mieszkach włosowych i we włosach [5, 19, 86, 95]. Po 12 dniach, stężenie w warstwie rogowej jest 75-krotnie większe niż w surowicy [19, 35]. Szybko przenika także do płytek paznokciowych. Pojawia się w dystalnej części paznokcia po 1 do 7 tygodni od momentu rozpoczęcia kuracji i utrzymuje się na poziomie terapeutycznym przez okres od 2 do 3 miesięcy [86]. Czas trwania terapii może wynosić od 6 do 12 miesięcy [36, 95]. Prowadzone są także badania nad możliwością zastosowania terbinafiny w miejscowym leczeniu grzybicy paznokci. Używane są preparaty w postaci półstałej – kremu lub płynnej - roztworu zawierającego oprócz terbinafiny azotan mikonazolu. Stosowanie tych preparatów okazało się skuteczne w przypadku łżejszych przypadków grzybicy paznokci [29, 101].

Itrakonazol stosowany jest zwłaszcza w przypadku mieszanych i drożdżakowych zakażeń paznokci [28, 89]. Należy do grupy pochodnych triazolu. Jest substancją leczniczą

o szerokim zakresie działania grzybostatycznego. Podobnie jak terbinafina zaburza syntezę ściany komórki grzyba poprzez zaburzenie syntezy ergosterolu i chityny oraz zmienia przepuszczalność błon komórkowych [12, 86, 95]. Itrakonazol podawany jest doustnie w postaci peletek w dawce 100 mg. Schemat dawkowania polega na stosowaniu leku przez tydzień w dawce 400 mg dziennie, z przerwą 3-tygodniową przed kolejnym cyklem terapii [86, 87, 91]. W przypadku grzybicy paznokci rąk zalecane są dwa cykle, a w przypadku grzybicy paznokci stóp 3 cykle. Stwierdzono, że stężenie terapeutyczne w dystalnym odcinku paznokcia występuje po okresie od 7 do 14 dni od rozpoczęcia kuracji i lek pozostaje w obrębie płytki paznokciowej przez okres od 6 do 9 miesięcy [28, 86, 95].

Obok preparatów doustnych w terapii grzybicy stosowane są również preparaty o działaniu miejscowym na zmienioną chorobowo płytkę paznokciową. Zaletą jest brak wchłaniania substancji leczniczej do krążenia ogólnego. Mogą natomiast wystąpić miejscowe podrażnienia po zastosowaniu preparatu [79].

Jedną z najstarszych metod leczenia miejscowego grzybicy paznokci jest usunięcie zmienionej chorobowo płytki paznokciowej. Opisano wiele metod chemicznej awulsji płytki paznokciowej preparatami zawierającymi mocznik w stężeniu od 20 do 40 %. Po usunięciu dystroficznej płytki można aplikować preparaty w postaci roztworów, żeli lub kremów z substancjami przeciwgrzybiczymi. Stosowane są także preparaty łączące działanie awulsyjne z przeciwgrzybiczym np. preparat zawierający 1 % bifonazolu i 40 % mocznika. Maść jest codziennie nakładana na płytkę paznokciową, na którą następnie przykleja się plaster. Podczas zmiany plastra po 24 godz. usuwa się rozmiękczoną płytkę paznokciową tarką dołączoną do zestawu [20, 95]. Chirurgiczne metody usuwania płytek paznokciowych są uznawane jako najskuteczniejsze w przypadku nawracających zakażeń powodowanych przez patogeny o wysokiej aktywności enzymatycznej. Leczenie pozabiegowe wymaga okresowego oczyszczania łożyska z warstw rogowych do momentu odrośnięcia płytki paznokciowej i stosowania preparatów doustnych [70, 97].

Przykładem nowszych rozwiązań w zakresie postaci leku są lakiery do paznokci. Są to systemy matrycowe zawierające substancję leczniczą o dużej aktywności termodynamicznej, a także polimerowy nośnik, lotny rozpuszczalnik oraz substancje pomocnicze poprawiające właściwości mechaniczne [79, 80].

Lakiery stosowane są zwłaszcza w początkowym stadium choroby, jako preparaty wspomagające w terapii doustnej oraz zapobiegające nawrotom choroby [112]. Brytyjskie Towarzystwo Dermatologów poleca stosowanie lakieru z amorolfina jedynie w przypadku

powierzchnowej onychomikozy i we wczesnych stadiach dalszej i bocznej pod paznokciowej onychomikozy [103].

Użycie lakieru jest korzystne ze względu na możliwość uzyskania wysokiego stężenia substancji leczniczej, po odparowaniu rozpuszczalnika, a substancja uwalniana jest przez długi czas, co umożliwia także wydłużenie przedziałów dawkowania do kilku dni [79, 95].

Obecnie w leczeniu stosowane są dwa preparaty zawierające cyklopiroks lub amorolfinę [95]. W przypadku lakieru zawierającego cyklopiroks w stężeniu 8 %, po odparowaniu rozpuszczalnika stężenie substancji leczniczej na płytce paznokciowej zwiększa się do ok. 35 %. Zaleca się stosowanie go codziennie, a dopiero po 7 dniach należy usunąć go z powierzchni płytki paznokciowej przy użyciu etanolu. Kuracja może trwać do 48 tygodni [8, 79, 95]. Stężenie amorolfiny w lakierze wynosi 5 %, po odparowaniu rozpuszczalnika ok. 25 %. Należy go stosować przez okres od 6 do 12 miesięcy, 1-2 razy w tygodniu [79, 95].

Równoczesne stosowanie preparatów doustnych np. terbinafiny lub itrakonazolu z działającymi miejscowo np. cyklopiroks i amorolfina ma na celu zwiększenie skuteczności działania. Ten sposób postępowania polecany szczególnie jest w przypadkach nawracających zakażeń [6, 8, 65, 66, 90, 103].

3. Rozwiązania technologiczne postaci leku

Opracowania mające na celu poprawę skuteczności działania są przedmiotem wielokierunkowych badań również w zakresie technologii postaci leku. Dotyczą z jednej strony poprawy rozpuszczalności substancji leczniczych trudno rozpuszczalnych w wodzie, z drugiej zaś zwiększenia wchłaniania substancji leczniczych przez płytkę paznokciową po podaniu miejscowym oraz możliwości zastosowania miejscowego substancji leczniczych stosowanych doustnie.

W technologii postaci leku poświęca się wiele uwagi rozwiązaniom mającym na celu poprawę szybkości rozpuszczania substancji leczniczych trudno lub praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie, gdyż ponad 40 % substancji leczniczych stosowanych w leczeniu charakteryzuje się takimi właściwościami.

Spośród stosowanych w grzybicy substancji leczniczych, itrakonazol określany jest jako praktycznie nierozpuszczalny w wodzie ($< 1 \mu\text{g/ml}$) [14, 21, 108, 130]. W związku

z tym prowadzone badania dotyczą przede wszystkim poprawy dostępności farmaceutycznej itrakonazolu.

Poprawę rozpuszczalności można uzyskać m.in. poprzez modyfikację chemiczną cząsteczki substancji leczniczej [116], tworzenie kompleksów [3, 4, 11, 38, 52, 71, 76, 93], zwiększenie stopnia rozdrobnienia [10, 59, 106, 124], stosowanie solubilizatorów [2, 51, 123] lub formułowanie układów, w których substancja lecznicza może występować w formie rozproszenia molekularnego w łatwo rozpuszczalnym nośniku tj. stałych rozproszeń [42, 43, 67, 75, 126, 127].

Wyróżnia się zasadniczo cztery metody sporządzania stałych rozproszeń: stapiania na łaźni wodnej, piaskowej lub przy użyciu ekstrudera (ekstruzja topliwa), odparowania rozpuszczalnika, metodę łączącą obydwie ww. metody oraz suszenia rozpyłowego [42, 43, 67].

Makrogol (PEG) jest jednym z częściej stosowanych nośników w technologii wytwarzania stałych rozproszeń, zwłaszcza metodą stapiania. Polimer ten został z dobrym skutkiem użyty do sporządzania stałych roztworów itrakonazolu. W badaniach tych stosowano zwilżanie itrakonazolu glicerolem przed wprowadzeniem go do stopionego glikolu polioksyetylenowego, uzyskując tym samym zmniejszenie ilości polimerowego nośnika w układzie, co ma istotne znaczenie przy określeniu masy projektowanej stałej postaci leku. Wprowadzenie substancji pomocniczych takich jak skrobi glikolan sodu lub hydroksypropylometylceluloza (HPMC) do stopionego roztworu PEG i itrakonazolu pozwoliło na uzyskanie stałego rozproszenia substancji pomocniczej w stałym roztworze zawierającym substancję leczniczą. Obecność skrobi glikolanu sodu w stałym roztworze przyczyniła się do poprawy ilości rozpuszczonego itrakonazolu w większym stopniu niż to wynika z zastosowania tylko glikolu polioksyetylenowego. Z tak przygotowanego trójskładnikowego układu w procesie rozpuszczania następowało jednak wytrącanie substancji leczniczej. Zjawisku temu można zapobiec wprowadzając dodatkowo związki polimerowe takie jak PVP lub pochodne celulozy. Z tego względu do badanego układu inkorporowano dodatkowo HPMC. W wyniku optymalizacji składu i procesu technologicznego sporządzono kapsułki zawierające układ proszkowy o składzie itrakonazol, PEG 20000, glicerol, skrobi glikolan sodu, HPMC w proporcji 1:2,75:0,75:0,25:0,25. Kapsułki te o zawartości 100 mg itrakonazolu porównano w badaniach dostępności farmaceutycznej i biologicznej z preparatem Sporanox®. Z obu postaci leku po 1 godzinie uwolniło się 90 % substancji leczniczej, jakkolwiek w przypadku opracowanego układu stałych rozproszeń proces ten przebiegał szybciej. Ponadto

w badaniach na ludziach uzyskano zwiększenie stężenia maksymalnego $c_{\max}$ oraz pola powierzchni pod krzywą (AUC) stężenie – czas w przypadku kapsulek zawierających stałe rozproszenia, zwłaszcza po podaniu preparatu po posiłku [57].

W propozycji omawianej formulacji interesujące jest wykorzystanie do tworzenia układów stałych rozprożeń substancji pomocniczych, które znajdują zastosowanie bezpośrednio w wytwarzaniu doustnych postaci leku. Jest to nowatorskie podejście, gdyż jak już wielokrotnie podkreślano, znaczną poprawę rozpuszczalności substancji leczniczych można uzyskać w wyniku zastosowania nośnika w ilości wielokrotnie przewyższającej ilość substancji leczniczej w układzie, co stanowi pewnego rodzaju ograniczenie w praktycznym wykorzystaniu tej metody [67].

Sporządzano również stałe rozproszenia itrakonazolu z substancjami pomocniczymi stosowanymi wyłącznie do wytwarzania doustnych postaci leku tj. substancjami wypełniającymi: laktozą, mikrokrystaliczną celulozą (MCC) oraz substancjami rozsadzającymi np.: poprzecznie usieciowaną karmelozą sodu (Ac-Di-Sol[®]), poprzecznie usieciowanym PVP (Kollidon[®] CL) lub skrobi glikolanem sodu (Primogel[®], Explotab[®]) [15]. Najlepszy efekt – 28-krotny wzrost szybkości rozpuszczania itrakonazolu, uzyskano w wyniku zastosowania Ac-Di-Sol[®]. Sposób sporządzania stałych rozprożeń polegał na wymieszaniu roztworu itrakonazolu w dichlorometanie z nośnikiem, a następnie odparowanie lotnego rozpuszczalnika, w wyniku czego uzyskano itrakonazol w formie bezpostaciowej, co potwierdzono badaniami rentgenograficznymi.

Hydroksypropylometylocelulozę stosowano także jako nośnik w dwuskładnikowych stałych rozproszeniach sporządzonych metodą topliwej ekstruzji [128]. Z układów o zawartości 60 % HPMC po 2 godz. uzyskano ok. 45-krotny wzrost ilości rozpuszczonego itrakonazolu w porównaniu z mieszaniną fizyczną. W badaniach na ludziach wykazano podobną dostępność biologiczną itrakonazolu z preparatu Sporanox[®] i układu stałych rozprożeń w HPMC. Wartości pola powierzchni pod krzywą stężenie – czas (AUC), stężenia maksymalnego ($c_{\max}$) i czasu po którym występuje stężenie maksymalne ($t_{\max}$) były zbliżone [108]. Należy zwrócić uwagę, że stosowany w lecznictwie Sporanox[®] produkowany jest w formie peletek sporządzonych przez powlekanie obojętnych rdzeni cukrowych stałym roztworem itrakonazolu w HPMC [128]. Stwierdzona więc zbliżona biodostępność układów stałych rozprożeń sporządzonych metodą ekstruzji topliwej do leku referencyjnego daje podstawę uznania ww. metody sporządzania stałych rozprożeń jako wartościowej do szerszego zastosowania na skalę przemysłową.

Metodę ekstruzji topliwej użyto także do sporządzania stałych rozprożeń itraconazolu z zastosowaniem jako nośnika nowej karbaminowej pochodnej inuliny (Inutec® SP1) zawierającej grupy alkilowe w łańcuchu inuliny, uzyskując w ten sposób w badaniach szybkości rozpuszczania po 10 minutach 80 % rozpuszczonej substancji leczniczej [125].

Podobny efekt uzyskano stosując trójskładnikowe stałe rozproszenia itraconazolu. Po wprowadzeniu do układów itraconazol – PVPVA 64 bursztynianu polietylenoglikolu 1000 z witaminą E (TPGS 1000) już po 10 min. rozpuściło się 80 % substancji leczniczej [50].

Tworzenie układów trójskładnikowych ma na celu zwiększenie efektywności oddziaływania jednego nośnika poprzez wprowadzenie drugiego zazwyczaj o budowie polimerowej. Przykładem takich rozwiązań jest wprowadzenie do układów dwuskładnikowych z PEG 6000 dodatkowo takich związków polimerowych jak PVPVA 64 [45] lub HPMC [46, 48]. Uzyskano w ten sposób z najlepszych układów ok. 3-krotne zwiększenie ilość rozpuszczonej substancji leczniczej po 4 godzinach badania szybkości rozpuszczania. Inne przykłady ww. rozwiązań zebrano w tabelach 3 i 4.

W przypadku postaci leków formułowanych z przeznaczeniem do aplikacji miejscowej, zasadniczy problem dotyczy szybkości przenikania substancji leczniczej przez płytkę paznokciową stanowiącą barierę dyfuzyjną. Prowadzono badania dotyczące możliwości zastosowania promotorów wchłaniania - substancji zmieniających przepuszczalność płytki paznokciowej [79]. Promotory wchłaniania mogą zmieniać strukturę płytki paznokciowej poprzez oddziaływanie chemiczne lub enzymatyczne.

Przykładem enzymu rozkładającego keratynę jest keratynaza, która powoduje rozkład keratyny międzykomórkowej w płytce paznokciowej co skutkuje osłabieniem wiązań pomiędzy komórkami. Efektem działania enzymu jest osłabienie zwartej struktury zewnętrznej warstwy płytki paznokciowej i zwiększenie przenikania substancji aplikowanych na powierzchnię płytki. Do badań *in vitro* stosowane są membrany z kopyt wołowych [72, 73, 77], wieprzowych [18, 81]. Mohorčič poprzez zastosowanie keratynazy uzyskał ponad 2-krotne zwiększenie przenikania metforminy przez membranę z kopyt wołowych [77].

Tabela 3. Przykłady dwuskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.

Nośnik	Metoda	Ilość substancji leczniczej w układzie	Piśmiennictwo
PEG 6000, 20000	odparowanie suszenie rozpyłowe	20 % - 80 %	[46, 53, 120]
PVP	suszenie rozpyłowe	66 %	[53]
Kollidon® CL	odparowanie	50 %	[15]
Poloxamer® 188	suszenie rozpyłowe	66 %	[53]
HPMC	suszenie rozpyłowe ekstruzja topliwa odparowanie	30% - 70%	[53, 91, 108, 110, 128]
HPMCP	odparowanie	73%	[91]
PVPVA 64	suszenie rozpyłowe ekstruzja topliwa odparowanie	10 % - 80 %	[45, 50, 107, 119, 129]
mikrokrystaliczna celuloza	odparowanie	50 %	[15]
laktoza			
Primogel®			
Ac-Di-Sol®			
Eudragit® E100	suszenie rozpyłowe ekstruzja topliwa stapianie	36 % - 66 %	[53, 107, 108, 109, 133]
Kollicoat® IR	ekstruzja topliwa	5% - 80%	[49]
Inutec® SP1	suszenie rozpyłowe ekstruzja topliwa	5% -30%	[125]

Tabela 4. Przykłady trójskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.

Nośniki	Metoda	Ilość substancji leczniczej w układzie	Piśmiennictwo
PEG 6000:PVPVA 64	suszenie rozpyłowe	10% - 40%	[45]
PEG 6000:HPMC	suszenie rozpyłowe	20% i 40%	[46, 48]
PVPVA 64:TPGS 1000	suszenie rozpyłowe	10% - 40%	[50]
PVPVA 64:Eudragit® E100	ekstruzja topliwa	40%	[107, 108]
Myrij® 52:PVPVA 64	odparowanie	5 % - 30%	[119]
Inutec® SP1:PVPVA 64	suszenie rozpyłowe	20% - 40%	[47]

Do badania przenikania cyklopiroksu użyto z powodzeniem membran z kopyt wieprzowych [81]. Zastosowano szereg chemicznych promotorów wchłaniania w celu poprawy przenikania substancji leczniczej z systemów adhezyjnych. W obecności N-metylo-2-pirolidonu uzyskano 2,5-krotne zwiększenie przenikania cyklopiroksu przez membrany po 4 tygodniach badania, w porównaniu do systemu bez promotora.

Natomiast w celu określenia wpływu promotorów wchłaniania na poprawę przenikania ekonazolu do głębszych warstw płytki paznokciowej prowadzono badania nanosząc lakier EcoNail® z dodatkiem lub bez 2-N-nonyl-1,3-dioksolanu. Substancja ta jest stosowana w preparatach dermatologicznych, a mechanizm działania polega na odwracalnym upłynnieniu lipidów w warstwie rogowej skóry. W lakierach przypisuje się jej właściwości plastyfikatora oraz substancji wpływającej na lepszą adhezję lakieru do płytki paznokciowej. W badaniach *in vitro* lakier nakładano na płytkę paznokciową dwukrotnie w ciągu dnia przez okres 14 dni. Po tym czasie stwierdzono w obecności 2-N-nonyl-1,3-dioksolanu ponad 6-krotne zwiększenie stężenia ekonazolu w głębszych warstwach płytki paznokciowej. Wykazano zależność zwiększenia szybkości przenikania ekonazolu wraz ze wzrostem ilości 2-N-nonyl-1,3-dioksolanu w lakierze. Ponadto stężenie ekonazolu

w głębszych warstwach płytki paznokciowej było wielokrotnie większe od minimalnego stężenia hamującego (MIC) wzrost dermatofitów, co wskazywać może na skuteczność stosowania EcoNail® w leczeniu grzybic [40].

W celu zwiększenia przenikania substancji leczniczej przez płytkę paznokciową stosowano również substancję powodującą wzrost porowatości zewnętrznej warstwy płytki tj. kwas fosforowy (V). Naniesiony na płytkę paznokciową powodował trawienie jej zewnętrznej warstwy. Na zmienioną w ten sposób płytkę paznokciową stosowano ketokonazol w postaci żelu z Carbopolem lub bioadhezyjnego filmu z HPC i/lub PEO. Z obu formułacji w badaniach *in vitro* większa ilość substancji leczniczej przeniknęła przez płytki o zwiększonej porowatości. W przypadku filmów adhezyjnych ilość ta była 6,5-krotnie większa. Efekt ten należy przypisać nie tylko większej zawartości substancji leczniczej w filmie (20 %) uzyskanej w wyniku zastosowania technologii wytwarzania tj. ekstruzji topliwej, ale również powstaniu w tym procesie stałego roztworu ketokonazolu w HPC [74, 99, 100].

Zwiększenie przenikania cyklopiroksu przez płytkę uzyskano w wyniku zastosowania jonoforezy. Dzięki zastosowanej metodzie ilość substancji, która przeniknęła z roztworu etanolowo-wodnego przez płytkę paznokciową była 10- i 6-krotnie większa w porównaniu z wynikami badań przenikania cyklopiroksu z analogicznej formułacji lub z lakieru do paznokci w przypadku których nie stosowano jonoforezy [37].

Prowadzono także badania nad nowymi metodami miejscowego leczenia grzybic paznokci. Proponuje się zastosowanie kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA), który w odpowiednim stężeniu może indukować syntezę protoporfiryny IX – czynnika fotouczulającego. W wyniku działania światła widzialnego może dojść do zniszczenia komórek. Opracowano plastry adhezyjne na płytkę paznokciową, z których po 72 godz. 6,9 mmol 5-ALA przeniknęło przez płytkę paznokciową. W celu oceny zasadności stosowania plastrów dokonano badań wrażliwości *Candida albicans* na 10 mmol 5-ALA, w których wykazano redukcję kolonii o 87 %. Natomiast inkubacja kolonii z 0,1 mmol 5-ALA spowodowała jej zmniejszenie o 32 % [18].

Spośród wielu substancji pomocniczych stosowanych w technologii postaci leku szerokie zastosowanie znajdują pochodne celulozy zwłaszcza etery i estry celulozy. W przedstawionych powyżej badaniach w zakresie leków przeciwgrzybiczych stosowano przede wszystkim HPMC.

W 1987 wprowadzono do badań formułacyjnych octanobursztynian hydroksypropylometylocelulozy (HPMCAS, AQOAT®). Produkowane są trzy rodzaje

octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy: AS-LF, AS-MF i AS-HF różniące się zawartością podstawników octanowych i bursztynianowych w łańcuchu HPMC. Wraz ze zwiększeniem ilości grup octanowych i równoczesnym zmniejszeniem ilości grup bursztynianowych w cząsteczce, octanobursztynian hydroksypropylometylocelulozy rozpuszcza się w roztworach buforowych o wyższej wartości pH [105, 114, 115].

Octanobursztynian hydroksypropylometylocelulozy jest nierozpuszczalny w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych i ich mieszaninach z wodą.

Ze względu na właściwości błonotwórcze oraz rozpuszczalność uwarunkowaną wartością pH środowiska znalazł zastosowanie przede wszystkim w pracach dotyczących doustnych postaci leku, zwłaszcza jako substancja powlekająca. Polimer może być natryskiwany na rdzenie w formie roztworu w lotnych rozpuszczalnikach lub jako dyspersja wodna [96, 105] oraz możliwe jest także powlekanie na sucho [24, 25, 26, 54, 55, 56, 88, 105, 111].

W badaniach peletek dotyczących sporządzania peletek dojelitowych z tymidyną wykazano jego dobre właściwości błonotwórcze przy użyciu cytrynianu trietylu jako plastyfikatora. W dyspersji wodnej w obecności plastyfikatora następuje koalescencja cząstek polimeru i tworzenie homogennego filmu na powierzchni rdzenia peletek [41].

Na przykładzie peletek z pankreatyną zwrócono uwagę na możliwość występowania interakcji substancji leczniczej i powlekającej. Stwierdzono zmiany w wyglądzie otoczki w wyniku hydrolizy wiązań estrowych grup octanowych AQOAT® [117].

Powlekanie przy użyciu dyspersji wodnych nie może być stosowane w przypadku substancji leczniczych wrażliwych na wilgoć. Z tego względu Obara stosował powlekanie tabletek zmikronizowanym octanobursztynianem hydroksypropylometylocelulozy na sucho, tj. bez użycia rozpuszczalników. W tym celu na ogrzewane do temp. 40 °C tabletki nanoszono polimer otoczkujący i spryskiwano roztworem plastyfikatora. W końcowej fazie natryskiwano wodą by doprowadzić do koalescencji składników otoczki [88, 105].

Kabliz zastosowała jednoczesne natryskiwanie na rdzenie polimeru i plastyfikatora. Dzięki tej zmianie uzyskano większą homogenność otoczek oraz mniejsze straty w trakcie powlekania [54, 55, 56].

Na przykładzie felodypiny i nifedypiny ocenie poddano również przydatność octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy jako nośnika stałych rozproszeń. W wyniku zastosowania metody odparowania uzyskano po 3 godz. ok. 14-krotne zwiększenie ilości rozpuszczonej felodypiny [62, 63] i 3,5-krotne nifedypiny [113].

W przypadku układów z nifedypiną sporządzonych metodą suszenia rozpyłowego ilość rozpuszczonej nifedypiny po tym samym czasie była ponad 4-krotnie większa [85].

Prace badawcze na przestrzeni ostatnich lat dotyczyły zastosowania octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy jako substancji pomocniczej do formułowania: tabletek [23, 58], peletek [61] oraz flotacyjnych postaci leku [83], a także mikrocząstek [44, 131, 132].

Badano wpływ AQOAT[®] jako substancji wiążącej na szybkość uwalniania modelowych substancji leczniczych różniących się rozpuszczalnością z trójwarstwowych tabletek. Do sporządzenia rdzenia tabletki użyto AQOAT[®] jako substancji wiążącej. Próby zastosowania innych polimerów (Eudragit[®] S, Kollicoat[®] MAE, octanoftalan celulozy, ftalan HPMC) nie powiodły się ze względu na niedostateczne właściwości wiążące tych polimerów. Niezależnie od właściwości substancji leczniczych z tabletek zawierających 10 % substancji czynnych uwalnianie w medium o pH 7,4 było zgodne lub zbliżone do kinetyki zerowego rzędu [58].

Na przykładzie nikardypiny wykazano zasadność użycia AQOAT[®] do sporządzania flotacyjnych postaci leku metodą ekstruzji w połączeniu z fosforanem (V) wapnia i skrobią [83].

Polimer ten był także nośnikiem modyfikującym uwalnianie teofiliny w zależności od pH środowiska w peletkach otrzymanych metodą ekstruzji i sferonizacji [61].

Na przykładzie nitrendypiny wykazano wpływ rodzaju substancji pomocniczej na właściwości mikrosfer. W przypadku użycia octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy uzyskano kuliste cząstki o budowie „balonowej” z pustą przestrzenią w środku. W wyniku użycia octanoftalanu celulozy i Eudragitu[®] E okrągłe mikrocząstki charakteryzowały się porowatą strukturą jakkolwiek w obecności Eudragitu[®] E tworzyła się wewnątrz również pusta przestrzeń jednak o mniejszej średnicy niż z AQOAT[®] [131, 132].

W badaniach dotyczących stosowania octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy do sporządzania mikrosfer z piroksikamem wykazano wpływ jego ilości na kształt mikrosfer [17, 44].

II. Założenia i cel pracy

Odnotowywany w ostatnich latach wzrost liczby zachorowań na grzybicę paznokci i związane z tym długotrwałe leczenie skłania do podjęcia badań nad opracowaniem nowych rozwiązań technologicznych dotyczących leków przeciwgrzybiczych.

Prowadzone są badania zmierzające do modyfikacji postaci leku stosowanych zarówno doustnie jak i miejscowo na płytkę paznokciową, w celu zapewnienia efektywnej terapii. W tym zakresie istotnym jest wybór substancji pomocniczych, a także rodzaju postaci leku, zapewniającej odpowiednie uwalnianie substancji leczniczej. Założenia te mają służyć przede wszystkim poprawie dostępności biologicznej substancji leczniczych. W terapii grzybiczy paznokci stosowane są przede wszystkim substancje z grupy pochodnych imidazolowych i alliloaminy.

Celem podjętych badań była ocena przydatności octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy (AQOAT®), PVP, Gelucire® 44/14, Gelucire® 50/13, PEG 6000 jako nośników substancji leczniczych o działaniu przeciwgrzybiczym. Do badań wybrano jako modelowe substancje: chlorowodorek terbinafiny i itrakonazol, których stosowanie jest terapeutycznie uzasadnione.

Założenia prac badawczych dotyczyły oceny właściwości octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy jako substancji pomocniczej w opracowaniu formułacji technologicznych pod kątem poprawy dostępności farmaceutycznej itrakonazolu, a także uzyskania efektu przedłużonego uwalniania terbinafiny w aspekcie opracowania preparatu o działaniu miejscowym na płytkę paznokciową.

Z uwagi na bardzo trudną rozpuszczalność itrakonazolu, gdyż substancja określana jest jako praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, zakres prac badawczych dotyczył wytwarzania układów dwu- i trójskładnikowych stałych rozproszeń przy użyciu AQOAT® jako zasadniczego składnika oraz dodatkowo PVP, Gelucire® 44/14, Gelucire® 50/13 i PEG 6000.

Opracowane formułacje badane były pod względem właściwości wynikających z rodzaju uzyskanej formy technologicznej i zastosowanych nośników. Realizacja celu badań miała charakter technologiczny i analityczny i obejmowała:

- opracowanie składu i technologii wytwarzania dwuskładnikowych stałych rozproszeń metodą suszenia rozpyłowego z dwoma rodzajami AQOAT® AS-HF i AS-LF,
- optymalizację właściwości stałych rozproszeń itrakonazolu poprzez sporządzenie trójskładnikowych stałych rozproszeń zawierających dodatkowo Gelucire® 44/14 lub Gelucire® 50/13 lub PVP lub PEG 6000,
- ocenę właściwości stałych rozproszeń na podstawie badań rentgenograficznych oraz przy użyciu mikroskopii skaningowej i polaryzacyjnej,
- ocenę wpływu ilości i rodzaju nośnika na dostępność farmaceutyczną substancji leczniczej ze stałych rozproszeń w porównaniu z samą substancją leczniczą,
- ocenę trwałości stałych rozproszeń.

Zakres prowadzonych badań dotyczących chlorowodoru terbinafiny obejmował wytwarzanie stałych rozproszeń z AQOAT®, ze wskazaniem optymalnego układu do sporządzenia lakierów, których przeznaczeniem byłoby nanoszenie na płytkę paznokciową.

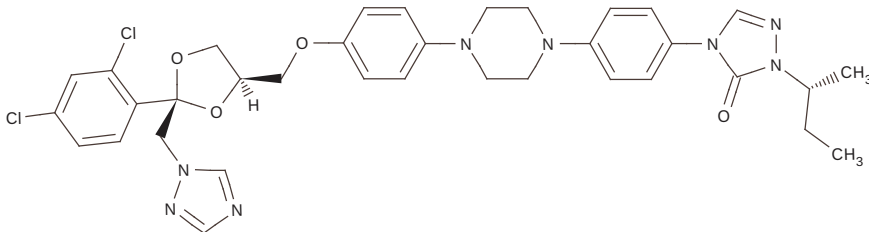
W związku z tym w etapie technologicznym uwzględniono czynniki mające wpływ na sporządzanie i jakość stałych rozproszeń oraz optymalizację formuacji do podania miejscowego tj. lakierów do paznokci. Do oceny posłużyły badania rentgenograficzne, różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz mikroskopowe - mikroskopia skaningowa i polaryzacyjna oraz badania dostępności farmaceutycznej.

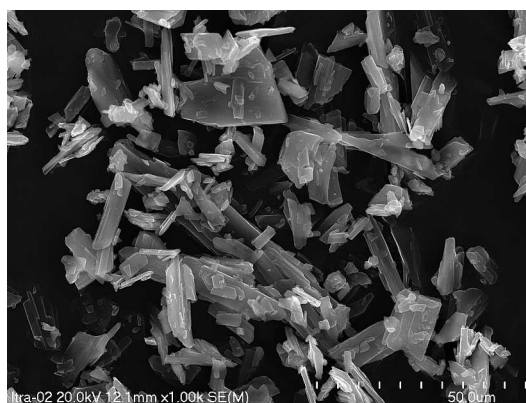
W opracowaniu optymalnej formuacji lakierów wzięto pod uwagę dobór rozpuszczalników, łatwość tworzenia filmów o odpowiedniej przyczepności i homogenności. W związku z tym założono sporządzenie lakierów z dodatkiem lub bez plastyfikatorów. Ocenę ich właściwości przeprowadzono w oparciu o badania mikroskopowe, szybkości uwalniania terbinafiny, a także szybkości przenikania i badania mikrobiologiczne w celu wykazania zahamowania wzrostu dermatofitów.

III. Część doświadczalna

1. Substancje użyte do badań

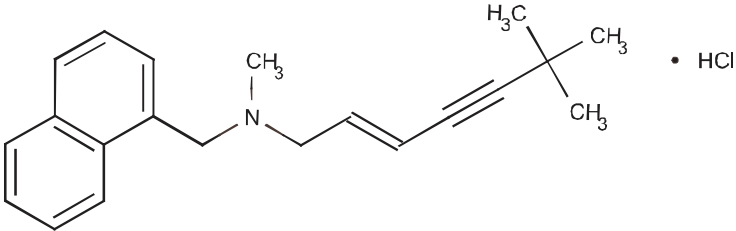
1.1. Substancje lecznicze

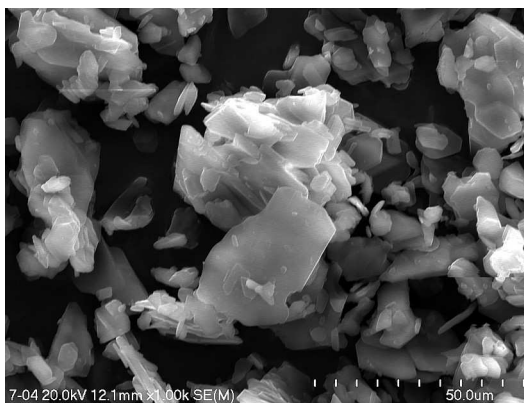
Itrakonazol	
4-[4-[4-[4-[[cis-2- (2,4-dichlorofenilo)-2-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-ilometylo)-1,3-dioksolan-4-ylo]metoksy]fenilo]piperazyn-1-ylo]fenilo]-2-[(1 <i>R,S</i>)-metylopropylo]-2,4-dihydro-3 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-on	
Wzór strukturalny	
Masa cząsteczkowa	705,65
Postać i właściwości	Biały proszek
Rozpuszczalność	Substancja praktycznie nierozpuszczalna w wodzie
Temperatura topnienia	166-170 °C
Producent	Shouguang Fukang Pharmaceutical Co., Ltd, China



Chlorowodorek terbinafiny

(2*E*)-*N*,6,6-Trimetylo-*N*-(naftalen-1-ylometylo)hept-2-en-4-yno-1-aminy chlorowodorek

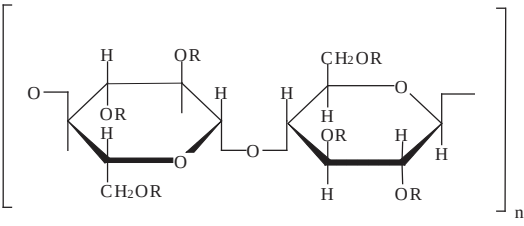
Wzór strukturalny	
Masa cząsteczkowa	327,90
Postać i właściwości	Biały proszek
Rozpuszczalność	Substancja bardzo trudno lub trudno rozpuszczalna w wodzie, łatwo rozpuszczalna w bezwodnym etanolu i metanolu, trudno rozpuszczalna w acetonie
Temperatura topnienia	207-211°C
Producent	Nacto Pharma Ltd, Indie

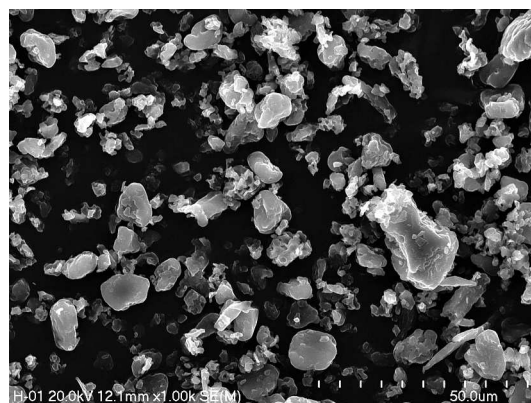


1.2. Substancje pomocnicze

Octanobursztynian hydroksypopylometylocelulozy

HPMCAS, AQOAT[®]

Wzór strukturalny	 R= —H —CH₃ —C(=O)—CH₃ —C(=O)—CH₂—CH₂—C(=O)OH —CH₂—CH(OH)—CH₃ —CH₂—CH(CH₃)—O—C(=O)—CH₃ —CH₂—CH(CH₃)—O—C(=O)—CH₂—CH₂—C(=O)OH
Postać i właściwości	Biały proszek
Rozpuszczalność	Substancja rozpuszcza się w acetonie, metanolu, mieszaninie etanol/woda (8:2), mieszaninie chlorek metylenu/etanol (1:1), mieszaninie etanol/woda (1:1)
Producent	ShinEtsu Chemical Co. Ltd, Japonia

AQOAT[®] AS-LFAQOAT[®] AS-HF

Gelucire® 44/14

Mieszanina mono-, di- i triglicerydów oraz estrów polietylenoglikoli z kwasami tłuszczowymi

Postać i właściwości	Kremowa substancja o konsystencji wosku
Rozpuszczalność	Rozpuszcza się w: etanolu 96°, chloroformie, chlorku metylenu, nierozpuszczalna w olejach organicznych
Temperatura topnienia	44 °C
HLB	14
Producent	Gattefossé, Francja



Gelucire® 50/13

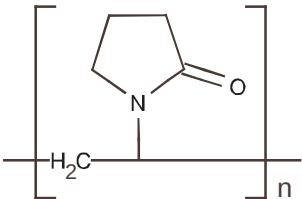
Mieszanina mono-, di- i triglicerydów oraz estrów polietylenoglikoli z kwasami tłuszczowymi

Postać i właściwości	Kremowa substancja o konsystencji wosku
Rozpuszczalność	Rozpuszcza się w: etanolu 96°, chloroformie, chlorku metylenu, nierozpuszczalna w olejach organicznych
Temperatura topnienia	50 °C
HLB	13
Producent	Gattefossé, Francja



Poliwinylopirolidon 30K (PVP 30K)

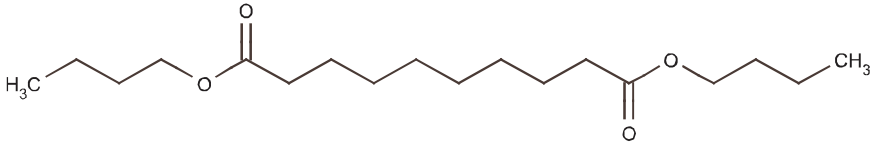
Syntetyczny polimer zbudowany z mieszaniny liniowych polimerów 1-winylo-2-pirolidonu

Wzór strukturalny	
Masa cząsteczkowa	~40 000
Postać i właściwości	Biały proszek
Rozpuszczalność	Rozpuszcza się w: wodzie, etanolu, chloroformie, glikolach
Temperatura topnienia	300 °C
Producent	Fluka AG, Niemcy

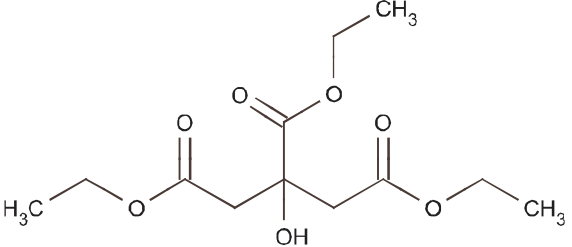


Makrogol		
	400	6000
Glikol polioksyetylenowy, PEG		
Wzór strukturalny	$\text{H} \left[\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n \text{OH}$ 400 (n=8-10) 6000 (n=120-150)	
Masa cząsteczkowa	380-420	5500-6500
Postać i właściwości	Bezbarwna i przezroczysta, lepka ciecz	Białe płatki
Rozpuszczalność	Bardzo łatwo miesza się z wodą i etanolem	Łatwo rozpuszcza się w wodzie i etanolu
Temperatura topnienia		56-63 °C
Producent	SERVA Feinbiochemica GmbH, Niemcy	POCH, Polska

Sebacynian dibutyłu (DBS)

Wzór strukturalny	
Masa cząsteczkowa	314,46
Postać i właściwości	Bezbarwna i przezroczysta lepka ciecz
Producent	Fluka AG, Niemcy

Cytrynian trietylu (TEC)

Wzór strukturalny	
Masa cząsteczkowa	276,28
Postać i właściwości	Bezbarwna i przezroczysta ciecz
Producent	Sigma Aldrich, Niemcy

1.3. Odczynniki i rozpuszczalniki

Podłoże Sabouraud z chloramfenikolem	<i>bioMérieux</i> (Francja)
Cykloheksymid (Aktidion)	<i>Sigma Aldrich</i> (Niemcy)
Agar	
K_2HPO_4 cz. d. a.	
$MgSO_4$ cz. d. a.	
$CaCl_2$ cz. d. a.	
$NaCl$ cz. d. a.	
Polisorbat 80	<i>Polskie Odczynniki Chemiczne POCH</i> (Polska)
Glicerol cz. d. a.	
Aceton cz. d. a.	
Dichlorometan cz. d. a.	
Acetonitryl cz. d. a.	
Etanol 96% obj. wg FP VII	<i>Zakład Farmaceutyczny „Amara”</i> (Polska)
Kwas solny 37 % cz. d. a.	<i>Merck Chemicals KGaA</i> (Niemcy)
Woda destylowana	wg FP VII

1.4. Materiały

- Sączi membranowe jednorazowe w obudowie, średnica porów 0,22 μm *Sartorius* (Niemcy)
- Strzykawki jednorazowe poj. 5 i 10 ml *Polfa Lublin* (Polska)
- Igły jednorazowe 0,8 mm *Mifam* (Polska)
- Końcówki do pipet automatycznych
- Flizelina
- Gaza jałowa *TZMO Toruń* (Polska)

2. Aparatura

- Suszarka rozpyłowa *Büchi Mini Spray Dryer B-191* (Szwajcaria)
- Aparat do badania szybkości uwalniania substancji leczniczej *Hanson Research SR 8 Plus* (Stany Zjednoczone)
- Kolektor frakcji *Dissoette II* (Stany Zjednoczone)
- Spektrofotometr *Jasco V-530* (Japonia)
- Wytrząsarka *IKA® KS 130 basic* (Niemcy)
- Łaźnia wodna z wytrząsarką *WNB7-45 Memmert* (Niemcy)
- Suszarka *Memmert 600* (Niemcy)
- Dyfraktometr proszkowy *Philips PW 1830* (Holandia)
- Różnicowy kalorymetr skaningowy *Mettler Toledo DSC 822e* (Szwajcaria)
- Wirówka *MPW 221 Mechanika Precyzyjna* (Polska)
- Komory dyfuzyjne wg Franz'a (Polska)
- Mikroton *Leica RM 2154* (Niemcy)
- Mikroskop elektronowy skaningowy *HITACHI S-4700* (Japonia)
- Mikroskop polaryzacyjny *Hund Wetzlar H600 LL 50/100* (Niemcy)
- Aparat fotograficzny *Lumix DMC-FZ7* (Japonia)
- Aparat fotograficzny *Lumix DMC-LS75* (Japonia)
- Wagosuszarka *Radwag WP-30* (Polska)
- Śruba mikrometryczna *Micromaster* (Japonia)
- Pipety automatyczne 100 µl; 0,1-1ml; 1-5 ml *Hilti* (Niemcy)

3. Oprogramowanie

- Pakiet MS Office 2000 Professional *Microsoft* (Stany Zjednoczone)
- Pakiet Corel Draw X3 *Corel Corporation* (Kanada)
- ImageJ 1.38x – program do analizy obrazu *National Institutes of Health* (Stany Zjednoczone)
- KinetDS – program do analizy kinetyki procesów uwalniania (opracowanie dr Aleksander Mendyk)

4. Układy proszkowe

Sporządzono układy proszkowe w formie mieszanin fizycznych i stałych rozproszeń. W przypadku terbinafiny wykonano układy dwuskładnikowe z AQOAT[®] AS-HF i LF, natomiast w przypadku itrakonazolu sporządzono dwu- i trójskładnikowe układy.

4.1. Sporządzenie układów proszkowych z itrakonazolem

Sporządzono dwu- i trójskładnikowe stałe rozproszenia itrakonazolu metodą suszenia rozpyłowego przy użyciu suszarki rozpyłowej Büchi Mini Spray Dryer 191 (ryc. 4) z polimerowymi nośnikami. Stosowano AQOAT[®] AS-HF i LF, Gelucire[®] 44/14, Gelucire[®] 50/13, PVP, Makrogol 6000.

4.1.1. Sporządzenie stałych rozproszeń

Dwuskładnikowe stałe rozproszenia zawierały substancję leczniczą i nośnik. Sporządzono 7 formułacji, do których użyto jako nośnika AQOAT[®] AS-HF i AQOAT[®] AS-LF oraz dwóch formułacji z Gelucire[®] 44/14. Trójskładnikowe stałe rozproszenia, zawierały oprócz AQOAT[®] AS-HF dodatkowo Gelucire[®] 44/14, Gelucire[®] 50/13, PVP lub Makrogol 6000. Łącznie sporządzono 13 trójskładnikowych formułacji o składzie podanym w tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Skład dwuskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.

Ilość itrakonazolu [g]	Ilość AQOAT® [g]		Ilość Gelucire® 44/14 [g]
	AS-LF	AS-HF	
1	1	-	-
	2	-	-
	-	1	-
	-	2	-
	-	3	-
	-	4	-
	-	10	-
	-	-	0,1
	-	-	0,5

Tabela 6. Skład trójskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.

Ilość itrakonazolu [g]	Ilość AQOAT® AS-HF [g]	Ilość Gelucire® 44/14 [g]	Ilość Gelucire® 50/13 [g]	Ilość PVP [g]	Ilość PEG 6000 [g]
1	2	0,5	-	-	-
	2	1	-	-	-
	2	2	-	-	-
	4	0,5	-	-	-
	4	1	-	-	-
	2	-	0,5	-	-
	4	-	0,5	-	-
	4	-	1	-	-
	2	-	-	0,5	-
	2	-	-	1	-
	4	-	-	0,5	-
	4	-	-	1	-
	2	-	-	-	0,5

Sporządzanie stałych rozproszeń metodą suszenia rozpyłowego polegało na rozpyleniu przez dyszę o średnicy 0,7 mm roztworu, który doprowadzony był do atomizera przy użyciu pompy perystaltycznej. Następowало rozpylenie mikrokropelek roztworu w strumieniu gorącego powietrza. Po odparowaniu rozpuszczalnika suchy produkt był oddzielany w cyklonie i zbierany w odbieralniku (ryc. 5).

Parametry procesu technologicznego tj.: ciśnienie kompresora, szybkość przepływu powietrza, wydajność pompy perystaltycznej, temperaturę wlotu i wylotu powietrza ustalono doświadczalnie w celu uzyskania najlepszej wydajności. Na podstawie tych danych opracowano przepis technologiczny sporządzania stałych rozproszeń.

Uzyskanie stałych rozproszeń w formie suchego proszku o określonych właściwościach wymagało doboru odpowiednich rozpuszczalników, a także parametrów procesu suszenia rozpyłowego. Wybór rozpuszczalników podyktowany był właściwościami fizykochemicznymi nośnika i substancji leczniczej różniących się znacznie rozpuszczalnością. W oparciu o wstępne prace doświadczalne do sporządzenia stałych rozproszeń zastosowano mieszaninę etanol/chlorek metylenu (1:1) uzyskując w ten sposób roztwór obu składników.

W przypadku zastosowania AQOAT[®] proces technologiczny prowadzono stosując następujące parametry technologiczne: przepływ powietrza 700 l/min, ciśnienie z kompresora 3,5 MPa. Wydajność pompy perystaltycznej wynosiła 30 % (8 ml/min), a wydajność aspiratora 100 %. Temperaturę wlotu nastawiono na 110 °C i w trakcie procesu utrzymywała się na zbliżonym poziomie (108 – 110 °C). Temperatura wylotu wynosiła od 82 do 85 °C.

Sporządzanie dwuskładnikowych stałych rozproszeń z Gelucire[®] i trójskładnikowych wymagało użycia innych parametrów procesu suszenia rozpyłowego. Pozostawiono ten sam przepływ powietrza tj. 700 l/min. i wydajność aspiratora 100 %. Natomiast zwiększono ciśnienie z kompresora do 4,5 MPa, a wydajność pompy perystaltycznej ustalono na poziomie 16 % (4 ml/min). Temperaturę wlotu powietrza wynosiła 45 °C, temperatura wylotu wynosiła od 32 do 35°C.

Parametry procesu suszenia dwuskładnikowych stałych rozproszeń itrakonazolu z AQOAT[®] przedstawiono w tabeli 7. W tabeli 8 przedstawiono parametry stosowane w przypadku układów dwuskładnikowych z Gelucire[®] i trójskładnikowych.

Tabela 7. Parametry suszenia rozpyłowego układów dwuskładnikowych z itrakonazolem.

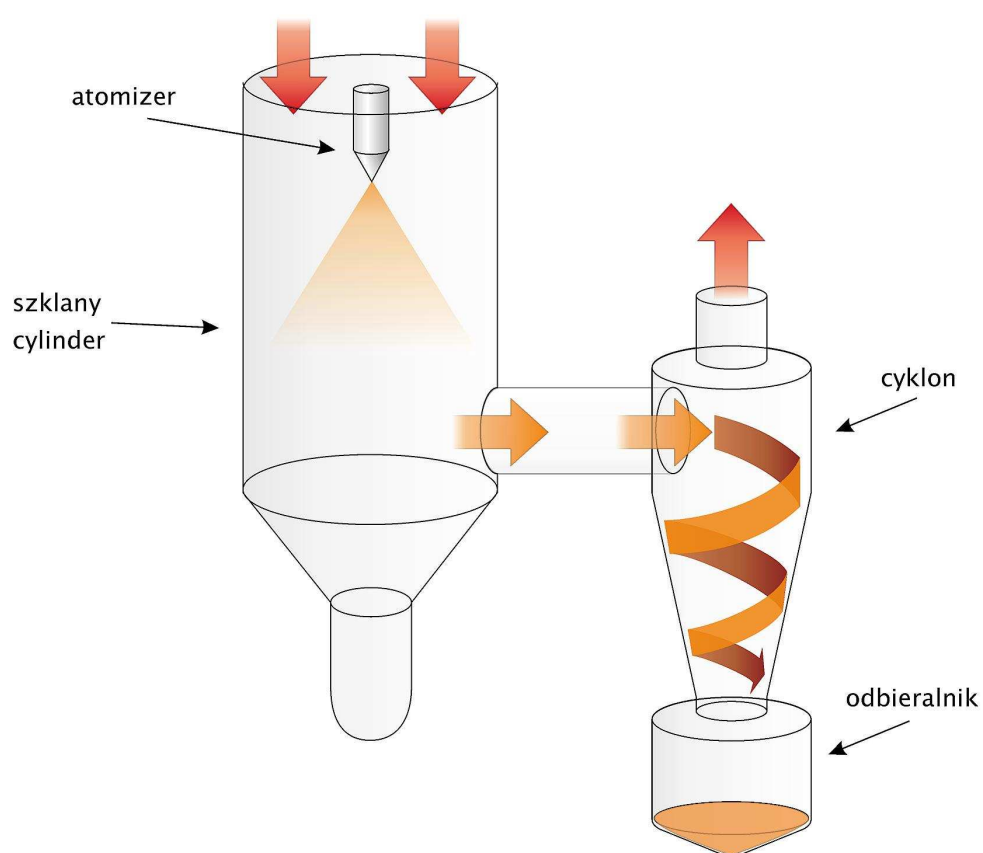
Ciśnienie z kompresora [MPa]		3,5
Przepływ powietrza [l/min]		700
Wydajność pompy perystaltycznej [%]		30
Wydajność aspiratora [%]		100
Temp. wlotu [°C]	nastawiona	110
	obserwowana	108-110
Temp. wylotu [°C]		82-85

Tabela 8. Parametry suszenia rozpyłowego układów dwuskładnikowych z Gelucire® i trójskładnikowych.

Ciśnienie z kompresora [MPa]		4,5
Przepływ powietrza [l/min]		700
Wydajność pompy perystaltycznej [%]		16
Wydajność aspiratora [%]		100
Temp. wlotu [°C]	nastawiona	45
	obserwowana	45
Temp. wylotu [°C]		32-35



Rycina 4. Suszarka rozpyłowa Büchi Mini Spray Dryer B 191.



Rycina 5. Proces suszenia rozpyłowego.

4.1.2. Sporządzenie mieszanin fizycznych

Mieszaniny fizyczne sporządzono poprzez dokładne rozdrobnienie i wymieszanie w moździerzku substancji leczniczej z AQOAT[®] AS-HF i AQOAT[®] AS-LF w proporcji 1:1 i 1:2 i ujednolicenie przez sito (0,5 mm).

4.2. Sporządzenie układów proszkowych z chlorowodorkiem terbinafiny

Sporządzono trzy rodzaje dwuskładnikowych stałych rozproszeń oraz mieszanin fizycznych chlorowodoru terbinafiny z AQOAT[®] o zawartości substancji czynnej od 14,3 % do 50 % w proporcjach 1:1, 1:4, 1:6.

4.2.1. Sporządzenie stałych rozproszeń

Do sporządzenia dwuskładnikowych stałych rozproszeń terbinafiny z AQOAT[®] AS-LF i AS-HF zastosowano metodę suszenia rozpyłowego. Proces technologiczny przeprowadzono w aparacie Büchi Mini Spray Dryer 191 (ryc. 4). Przygotowano łącznie 5 formułacji o składzie podanym w tabeli 9.

Tabela 9. Skład stałych rozproszeń z chlorowodorkiem terbinafiny.

chlorowodorek terbinafiny	
AQOAT [®] AS-HF	AQOAT [®] AS-LF
1:1	1:1
1:4	-
1:6	1:6

Podobnie jak w przypadku itrakonazolu, na podstawie wstępnych badań ustalono skład mieszanin rozpuszczalników. Do sporządzenia stałych rozprożeń zastosowano mieszaninę etanol/woda w proporcji (4:1) uzyskując w ten sposób roztwór obu składników.

Proces technologiczny prowadzono w oparciu o następujące parametry: zastosowano przepływ powietrza 700 l/min, ciśnienie z kompresora wynosiło 3,5 MPa. Wydajność pompy perystaltycznej wynosiła 30 % (8 ml/min), wydajność aspiratora 100 %. Temperaturę wlotu nastawiono na 110 °C i w trakcie procesu utrzymywała się na poziomie 108 – 110 °C. Temperatura wylotu wynosiła od 82 do 85 °C.

Parametry procesu suszenia stałych rozprożeń chlorowodorku terbinafiny z AQOAT[®] przedstawiono w tabeli 10.

Tabela 10. Parametry suszenia rozpyłowego układów z chlorowodorkiem terbinafiny.

Ciśnienie z kompresora [MPa]		3,5
Przepływ powietrza [l/min]		700
Wydajność pompy perystaltycznej [%]		30
Wydajność aspiratora [%]		100
Temp. wlotu [°C]	nastawiona	110
	obserwowana	108-110
Temp. wylotu [°C]		82-85

4.2.2. Sporządzenie mieszanin fizycznych

Mieszaniny fizyczne sporządzono poprzez dokładne rozdrobnienie w młynku i wymieszanie substancji leczniczej z nośnikiem AQOAT[®] AS-HF i AQOAT[®] AS-LF w proporcji 1:1 i 1:6 i ujednolicenie przez sito (0,5 mm).

4.3. Metodyka badań właściwości fizycznych układów proszkowych

Ocenę właściwości sporządzonych układów proszkowych dokonano w oparciu o badania mikroskopowe, rentgenograficzne, różnicowej kalorymetrii skaningowej.

4.3.1. Badania w mikroskopie polaryzacyjnym

Substancje lecznicze, pomocnicze, a także mieszaniny fizyczne i stałe rozproszenia obserwowano w świetle spolaryzowanym przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego Hund Wetzlar przy 100-krotnym powiększeniu.

4.3.2. Badania w mikroskopie skaningowym

Wykonano również badania układów proszkowych przy użyciu mikroskopu skaningowego HITACHI S-4700. Próbki naklejano na holdery na węglowych plasterkach napyłanych węglem. Obrazy z mikroskopu skaningowego wykonano przy powiększeniu 1000-, 2000- i 5000-krotnym.

4.3.3. Badania rentgenograficzne (X-ray)

Badanie rentgenograficzne przeprowadzono dla chlorowodoru terbinafiny, itrakonazolu, AQOAT[®] oraz mieszanin fizycznych i stałych rozproszeń. Pomiary wykonano w dyfraktometrze proszkowym Philips PW 1830. Do badań stosowano monochromatyczne promieniowanie miedziowe Cu-K_α ($\lambda=2 \text{ \AA}$) z filtrem Ni. Obraz dyfrakcyjny rejestrowano w zakresie kątów 2Θ od 5° do 40°.

4.3.4. Badania różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC)

Badanie przeprowadzono dla chlorowodoru terbinafiny, AQOAT[®] oraz ich mieszanin fizycznych i stałych rozproszeń przy użyciu kalorymetru firmy Mettler Toledo DSC 822e. Pomiary przeprowadzono w zakresie temperatur 20°C-220°C przy szybkości ogrzewania próbki 5 °C/min.

4.4. Metody analizy ilościowej substancji leczniczych

Ilość rozpuszczonej substancji leczniczej oznaczano metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru Jasco V-530. Przed badaniem próbki odpowiednio rozcieńczano.

W przypadku itrakonazolu dokonywano pomiarów roztworów o stężeniu od 1 do 25 µg/ml przy $\lambda=201$ nm, $\lambda=221$ nm, $\lambda=257$ nm. Średnia wartość współczynników kalibracji wynosiła: $k=0,1068$ przy $\lambda = 201$, $k=0,0439$ przy $\lambda = 221$ i $0,0313$ przy $\lambda = 257$ nm. Współczynnik korelacji mieścił się pomiędzy $0,992 - 0,999$.

Oznaczenia terbinafiny wykonano przy długości fali $\lambda=223$ nm. Stężenia mieściły się w zakresie od 1 do 6 µg/ml. Współczynnik krzywej kalibracji wynosił $0,2157$, a współczynnik korelacji $= 0,998$.

4.5. Badanie dostępności farmaceutycznej

Przeprowadzono badania rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania substancji leczniczych z układów proszkowych.

4.5.1. Badanie rozpuszczalności

Rozpuszczalność itrakonazolu badano w $0,1$ mol/l HCl o pH $1,2$ (wg FP VII). Naważkę odpowiadającą 20 mg itrakonazolu umieszczono w kolbie stożkowej

o pojemności 100 ml z doszlifowanym korkiem. Do każdej kolbki dodano 25 ml 0,1 mol/l HCl. Kolbki wytrząsano w temperaturze 37 °C w termostatowanej wytrząsarce typu: WNB7-45 Memmert przez 24 godziny. Po wytrząsaniu próbki odwirowano przy użyciu wirówki MPW 221 przez 15 min przy prędkości 3200 obr/min. Następnie przesączono roztwór przez sączi membranowe o średnicy porów 0,22 µm (Sartorius). Zawartość substancji leczniczej oznaczono metodą spektrofotometryczną przy użyciu spektrofotometru Jasco V-530. Wyniki stanowią wartość średnią z trzech pomiarów.

4.5.2. Badanie szybkości rozpuszczania

Badania szybkości rozpuszczania przeprowadzono metodą łopatkową wg FP VII. Zestaw składał się z 8 - miejscowego aparatu Hanson Resarch SR 8 Plus z automatycznym kolektorem frakcji Dissoette II i komputerową rejestracją danych. Zlewki o pojemności 1300 ml napełniono 900 ml odpowiedniego medium. Badanie prowadzono w temperaturze 37 °C. Próbki pobierane były automatycznie w ustalonych odstępach czasu, gromadzone w kolektorze frakcji Dissoette II i analizowane spektrofotometrycznie przy użyciu spektrofotometru Jasco V-530 stosując analityczną długość fali. Wyniki stanowią wartość średnią z trzech pomiarów.

Dla każdego punktu czasowego obliczano współczynnik zmienności S_{rel} wg następującego wzoru:

$$S_{rel} = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100$$

SD – średnie odchylenie od pojedynczego pomiaru

$\bar{x}$ – średnie stężenie

$$SD = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_1 - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Itrakonazol

Do badań stosowano próbki substancji leczniczej, stałych rozproszeń i mieszanin fizycznych w ilości odpowiadającej 100 mg itrakonazolu. Jako medium użyto 0,1 mol/l HCl o pH 1,2. Badanie prowadzono przy szybkości obrotów mieszadła 100 obr/min. Próbkę pobierano automatycznie po: 15, 30, 60, 90, 120 min. i uzupełniano rozpuszczalnikiem do pierwotnej objętości.

Chlorowodorek terbinafiny

Do badań stosowano próbki substancji leczniczej, stałych rozproszeń i mieszanin fizycznych w ilości odpowiadającej 125 mg chlorowodoru terbinafiny. Jako medium użyto wodę destylowaną lub roztwór 0,1 mol/l kwasu solnego. Szybkość obrotów mieszadła wynosiła 50 obr/min. Próbkę pobierano automatycznie po: 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 min. i uzupełniano rozpuszczalnikiem do pierwotnej objętości.

4.5.3. Analiza kinetyczna procesu rozpuszczania substancji leczniczych z wybranych formulacji

Dokonano oceny profilu rozpuszczania itrakonazolu i chlorowodoru terbinafiny z układów dwuskładnikowych (1:4) z octanobursztynianem hydroksypropylometylocelulozy jako optymalnych dla obu substancji leczniczych. Ponadto dokonano analizy profili rozpuszczania itrakonazolu z układów trójskładnikowych zawierających również ten sam rodzaj octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy AS-HF w proporcji (1:4:0,5) z Gelucire® lub PVP oraz (1:2:0,5) z Gelucire® 50/13, dla których uzyskano najlepsze wyniki poprawy rozpuszczania.

W analizie tej posłużono się programem KinetDS, w którym zastosowano metodę regresji liniowej w doborze parametrów zlinearyzowanych postaci kinetycznych i empirycznych modeli procesu uwalniania. W celu dokonania opisu przebiegu rozpuszczania substancji leczniczych stosowano modele kinetyczne: zerowego, pierwszego i drugiego rzędu, Korsmeyera-Peppasa, Higuchiego, Hixson-Crowella oraz empiryczny model Weibulla.

Na podstawie wyników obliczeń wybrano modele z najwyższymi wartościami współczynników korelacji (R^2). Z tego względu ostatecznie zostały wzięte pod uwagę następujące modele:

a) model kinetyczny zerowego rzędu

$$Q = K \cdot t + Q_0$$

b) model Korsmeyer-Peppas

$$Q = K \cdot t^N$$

gdzie: Q – ilość uwolnionej substancji leczniczej w czasie t
 Q_0 – ilość uwolnionej substancji leczniczej w czasie $t = 0$
 K – stała szybkości procesu uwalniania
 t – czas
 N – wykładnik czasowy procesu uwalniania

4.6. Badanie trwałości układów z itrakonazolem

Badania trwałości wykonano dla wybranych układów stałych rozproszeń z AQOAT[®] AS-HF: dwuskładnikowych (1:4) i trójskładnikowych z Gelucire[®] 44/14, 50/13, PVP (1:2:0,5; 1:4:0,5). Układy proszkowe przechowywano przez okres 12 miesięcy w temperaturze pokojowej (18-22°C) w szczelnie zamkniętych plastikowych butelkach zaopatrzonych w pochłaniacz wilgoci. Analiza obejmowała badania rentgenograficzne, a także ocenie poddano obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego. Przeprowadzono ponadto badania szybkości rozpuszczania substancji leczniczej.

W celu porównania profili rozpuszczania, obliczono współczynnik podobieństwa krzywych f_2 [30, 78] ze wzoru:

$$f_2 = 50 \log \left[\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{i=1}^n (T_i - R_i)^2}{n}}} \right]$$

gdzie:

T - ilość rozpuszczonej substancji leczniczej w % preparatu testowanego

R - ilość rozpuszczonej substancji leczniczej w % preparatu referencyjnego

5. Lakiery do paznokci z terbinafiną

Przygotowano lakiery z chlorowodorkiem terbinafiny, polimerowym nośnikiem, a także zawierające dodatkowo plastyfikator. Z uwagi na fakt, że lakiery po odparowaniu tworzą powłokę do badań sporządzono także filmy.

5.1. Sporządzenie lakierów do paznokci z terbinafiną

Lakiery sporządzono z dwoma rodzajami nośnika: AQOAT® AS-HF i AQOAT® AS-LF, który stanowił matrycę dla substancji leczniczej. Ponadto sporządzono lakiery zawierające w swym składzie plastyfikator:

- glicerol (G)
- polioksyetylenoglikol (PEG)
- sebacynian dibutyłu (DBS)
- cytrynian trietylu (TEC)

a także zawierające kombinację dwuskładnikową plastyfikatorów: DBS z glicerolem lub PEG.

W celu sporządzenia lakierów o optymalnych właściwościach dokonano wyboru rozpuszczalników, biorąc pod uwagę rozpuszczalność substancji leczniczej, nośników i plastyfikatorów. Istotnym jest także zdolność rozpuszczalników do szybkiego odparowania. Na podstawie wstępnych badań określono doświadczalnie skład jakościowy mieszanin rozpuszczalników. Do badań użyto dwa rodzaje rozpuszczalników będących mieszaninami:

- acetonu/wody (7,5 : 1)
- acetonu/etanolu (760g/l)/wody (4,5 : 4 : 1)

Lakiery sporządzono poprzez rozpuszczenie chlorowodorku terbinafiny, nośników oraz plastyfikatorów w rozpuszczalnikach. Łącznie sporządzono 26 formułacji. Składy lakierów przedstawiono w tabelach 11 - 13.

Tabela 11. Skład lakierów bez plastyfikatorów.

substancje \ formuacja	AQH	AQL
chlorowodorek terbinafiny	1	
AQOAT® AS-HF	4	-
AQOAT® AS-LF	-	4

Tabela 12. Skład lakierów z jednym plastyfikatorem.

substancje \ formuacja	AQH G	AQH PEG	AQH DBS	AQH TEC	AQL G	AQL PEG	AQL DBS	AQL TEC
chlorowodorek terbinafiny	1							
AQOAT® AS-HF	4				-			
AQOAT® AS-LF	-				4			
Glicerol	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-
PEG 400	-	0,5	-	-	-	0,5	-	-
DBS	-	-	0,4	-	-	-	0,4	-
TEC	-	-	-	0,4	-	-	-	0,4

Tabela 13. Skład lakierów z dwoma plastyfikatorami.

substancje \ formuacja	AQH DBS PEG	AQH DBS G	AQL DBS PEG	AQL DBS G
chlorowodorek terbinafiny	1			
AQOAT® AS-HF	4		-	
AQOAT® AS-LF	-		4	
DBS	0,4			
Glicerol	-	0,25	-	0,25
PEG 400	0,25	-	0,25	-

5.1.1. Przygotowanie filmów z lakierów do paznokci

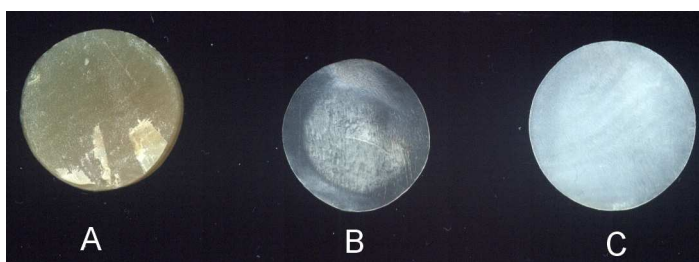
Sporządzono filmy z lakierów do paznokci. Lakier wylano na szalkę Petriego o średnicy ok. 8 cm i suszono w suszarce Memmert 600 w temp. 40°C przez 18 godzin.

5.1.2. Właściwości filmów

Grubość filmów określono przy użyciu śruby mikrometrycznej Micromaster. W przypadku formulacji zawierających plastyfikatory oznaczono zawartość wilgoci przy użyciu wagosuszarki Radwag typ WP 30.

5.2. Przygotowanie membran z kopyt wołowych

Ze spodniej strony oczyszczonych kopyt wołowych wycinano, przy użyciu okrągłego wycinaka, fragmenty o średnicy ok. 20 mm. Tak otrzymany materiał moczone w wodzie destylowanej 24 godziny, a następnie przy użyciu mikrotomu Leica RM 2154 cięto na płytki o grubości 0,15-0,25 mm (ryc. 6).



Rycina 6. Membrany z kopyt wołowych. A – wycięty fragment kopyta, B – membrana sucha, C – membrana nawilżona.

5.2.1. Analiza mikroskopowa membran z kopyt wołowych i płytek paznokciowych

Analizę wykonano przy użyciu mikroskopu skaningowego HITACHI S-4700. Próbki naklejano na holdery na węglowych plasterkach napylanych węglem. Obrazy z mikroskopu skaningowego wykonano przy powiększeniu 500 i 2000-krotnym.

5.3. Badania dostępności farmaceutycznej

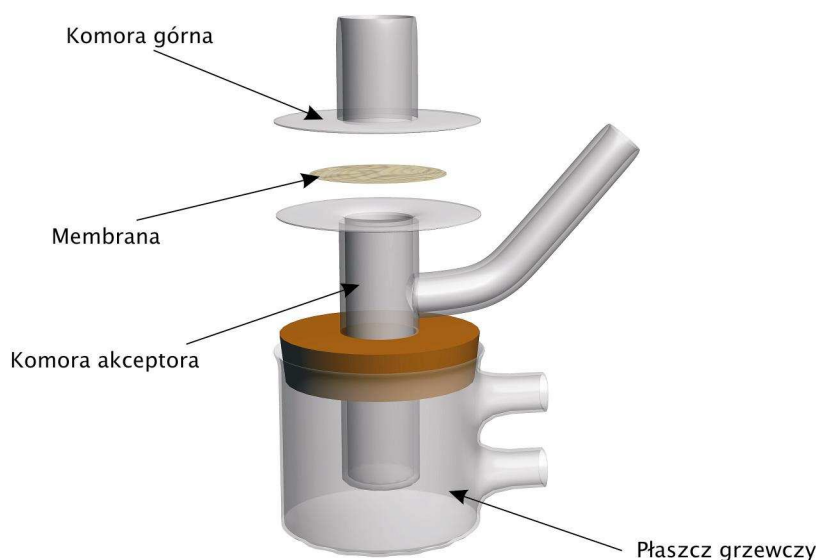
Badania dostępności farmaceutycznej chlorowodorku terbinafiny z lakierów do paznokci prowadzono dwoma metodami. Pierwsze badanie prowadzone metodą wytrząsania miało za zadanie wykazać wpływ formulacji na szybkość uwalniania substancji leczniczej z filmów, kolejne badanie miało na celu weryfikację wpływu formulacji na możliwość przenikania chlorowodorku terbinafiny przez modelowe membrany biologiczne.

5.3.1. Badania szybkości uwalniania chlorowodorku terbinafiny z filmów

Filmy o powierzchni ok. $2,25 \text{ cm}^2$ umieszczono w kolbie ze szlifem. Dodano 25 cm^3 wody destylowanej i wytrząsano w temperaturze pokojowej na wytrząsarce IKA KS 130 basic z prędkością 160 obr/min. Próbki pobierano po 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 i 24 godz. i analizowano spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 223 \text{ nm}$. Wyniki stanowią wartość średnią z trzech pomiarów.

5.3.2. Badania przenikania chlorowodorku terbinafiny w komorach dyfuzyjnych

Badanie wykonywano wg metody Franz'a, z użyciem szklanych komór dyfuzyjnych. Schemat komory przedstawiono na rycinie 7.



Rycina 7. Komora dyfuzyjna wg Franz'a.

Do badań użyto membrany o grubości ok. 150 lub ok. 250 μm . Membrany przechowywano w zlewkach zawierających wodę przez okres 24 godz. Po tym czasie błonę umieszczono w komorze dyfuzyjnej pomiędzy komorą górną i komorą akceptora. Do górnej części komory na powierzchnię membrany wprowadzono 0,5 ml (ok. 300 mg) formulacji zawierającej 12 mg terbinafiny, natomiast do części dolnej wodę (5 ml). Powierzchnia przenikania wynosiła 0,52 cm^2 . Stałą temperaturę układu 37 $^{\circ}\text{C}$ zapewniał płaszcz grzewczy otaczający komorę akceptorową. Próbki pobierano w ilości 0,5 ml co 24 godz. i uzupełniano do określonej objętości. Oznaczono spektrofotometrycznie ilość substancji leczniczej w płynie akceptorowym przechodzącej przez określoną powierzchnię błony [mg/cm^2]. Badania prowadzono przez 5 dni. Wyniki stanowią wartość średnią z trzech pomiarów.

Analiza kinetyczna procesu przenikania chlorowodorku terbinafiny

Analizie poddano profile przenikania terbinafiny z lakierów do paznokci z formulacji zawierających w swoim składzie AQOAT[®] AS-HF przez modelowe membrany keratynowe o grubości 150 μm .

W analizie posłużono się programem KinetDS i stosowano metodykę opisaną w punkcie 4.5.3.

5.4. Badania mikrobiologiczne

Badania mikrobiologiczne przeprowadzono z użyciem membran z kopyt wołowych oraz fragmentów płytki paznokciowej.

5.4.1. Przygotowanie podłoża

1. Przygotowanie zawiesiny zawierającej konidia

Wzorcowy szczep *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) hodowano na podłożu Sabouraud'a (Sabouraud's dextrose agar - SDA) w 27°C przez 10-14 dni i następnie przygotowano zawiesinę z konidiami w jałowym roztworze 0,9 % NaCl zawierającym 0,05% Tweenu 80. Stężenie wynosiło 1×10^7 konidia/ml.

2. Przygotowanie podłoża do badań mikrobiologicznych

Podłoże agarowe zawierało: 0,2% K_2HPO_4 ; 0,005% $MgSO_4$; 0,005% $CaCl_2$; 0,035% aktidion. Zawiesina przygotowana w pkt. 1 została dodana do agaru w ilości 1%.

5.4.2. Przygotowanie membran z kopyt wołowych do badań

Membrany z kopyt wołowych umieszczono w komorze z laminarnym nawiewem jałowego powietrza na szalce Petriego wyłożonej jałową gazą nasączoną wodą do iniekcji (*Aqua purificata FP VII*). Następnie całość poddano naświetlaniu lampą UV przez 2 godz.

Po tym czasie na membrany z kopyt wołowych nałożono pipetą automatyczną 100 µl lakieru. Czynność powtórzono po 24 i 48 godzinach usuwając mechanicznie poprzednią warstwę lakieru.

Po usunięciu lakieru membrany umieszczono na podłożu agarowym i inkubowano przez 14 dni w temp. 28°C. Po 7 i 14 dniach wykonano zdjęcia membran aparatem Lumix DMC-FZ7.

5.4.3. Przygotowanie płytek paznokciowych do badań

Na oczyszczone i zmatowione (przy użyciu pilnika do paznokci) płytki paznokciowe raz dziennie наносzono warstwę lakieru. Po pierwszym i po drugim tygodniu aplikacji paznokcie umieszczono na podłożu agarowym i inkubowano przez 14 dni w temp. 28 °C. Po 7 i 14 dniach wykonano zdjęcia płytek aparatem Lumix DMC-FZ7.

5.4.4. Analiza wzrostu kolonii na membranach

Zdjęcia hodowli wykonywane były na jasnym i ciemnym tle w celu lepszej identyfikacji obszaru kolonii. Wykonane zdjęcia poddano obróbce cyfrowej dzięki której uzyskano obrazy, na których wyraźnie zaznaczona była granica wzrostu dermatofitów. W tym celu zdjęcia membran wykonane na jasnym i ciemnym tle przekształcono z trybu RGB w tryb 8 bitowej skali szarości. Posłużono się programem do obróbki grafiki rastrowej Corel Photo-Paint X3, przy użyciu którego wykonano także obliczenia na mapach bitowych poprzez mnożenie kanałów szarości. Uzyskano wspólny obraz w 8 bitowej skali szarości o rozmiarze 416×302 px. Przy użyciu programu ImageJ 1.38x identyfikowano obszary zainteresowania (*region of interest*) otrzymanych obrazów. Następnie wykonano segmentację obrazów zgodnie z tabelą LUT (Look Up Table) w trybie 16 do palety RGB oraz sporządzono dwu- i trójwymiarowe profile intensywności sygnału w analizowanym obszarze.

IV. Wyniki badań

1. Układy proszkowe z itrakonazolem

Dokonano oceny właściwości układów proszkowych w formie mieszanin fizycznych i stałych rozproszeń.

1.1. Charakterystyka układów

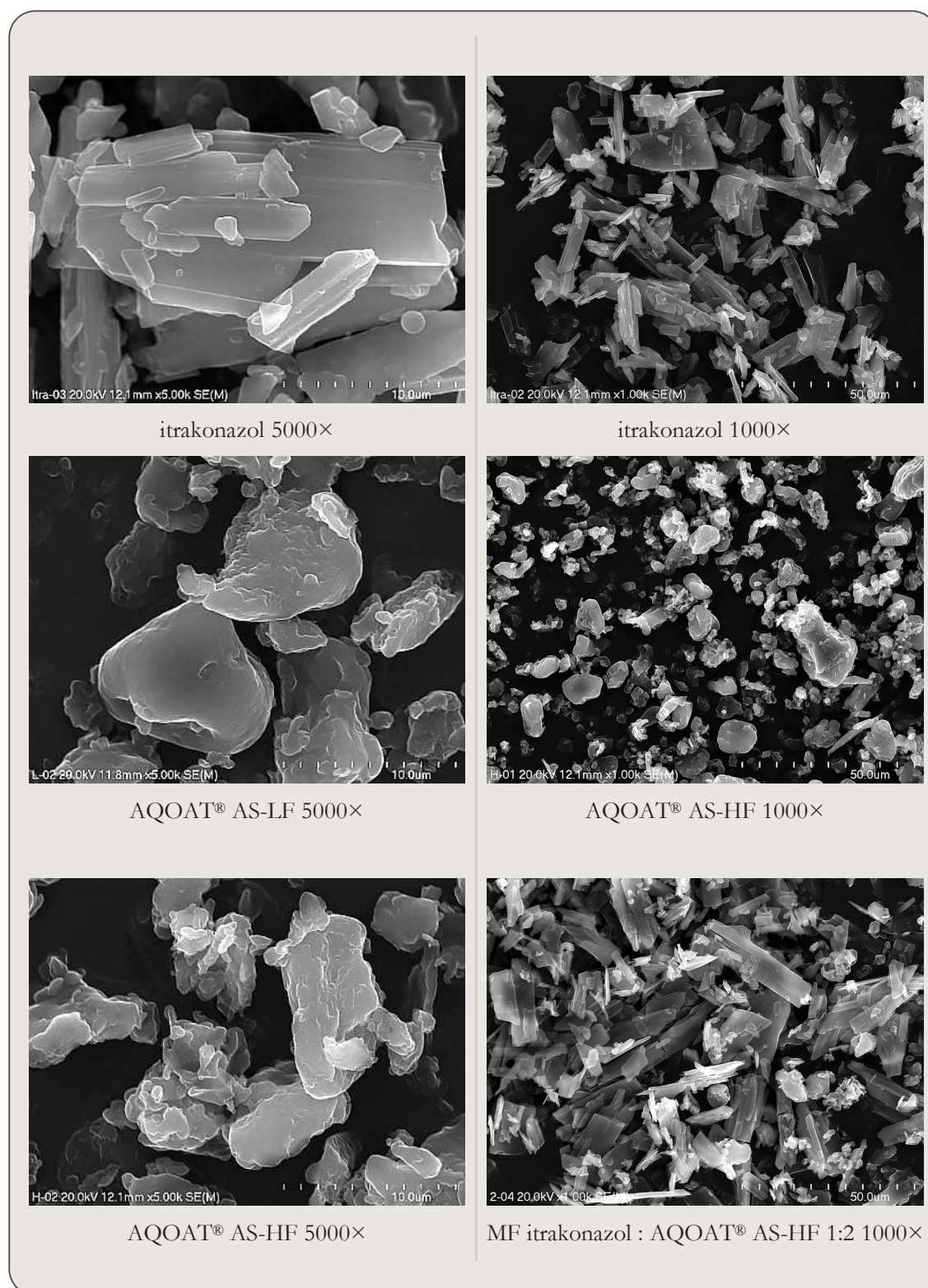
Stale rozproszenia sporządzono z AQOAT[®] jako nośnikiem. W wyniku zastosowania technologii suszenia rozpyłowego uzyskano produkt w formie białego proszku. Jedynie w przypadku użycia Gelucire[®] jako nośnika zarówno w układach dwuskładnikowych (1:0,1 i 1:0,5), jak i trójskładnikowych (1:2:1 i 1:2:2) otrzymano produkt o kremowym zabarwieniu i konsystencji wosku.

Stwierdzono ponadto nasilenie się właściwości elektrostatycznych produktów wraz ze zwiększeniem ilości AQOAT[®] w układzie. Proszek przylegał do ścian odbieralnika. Zmniejszenie się tego zjawiska obserwowano po wprowadzeniu trzeciego składnika do stałego rozproszenia.

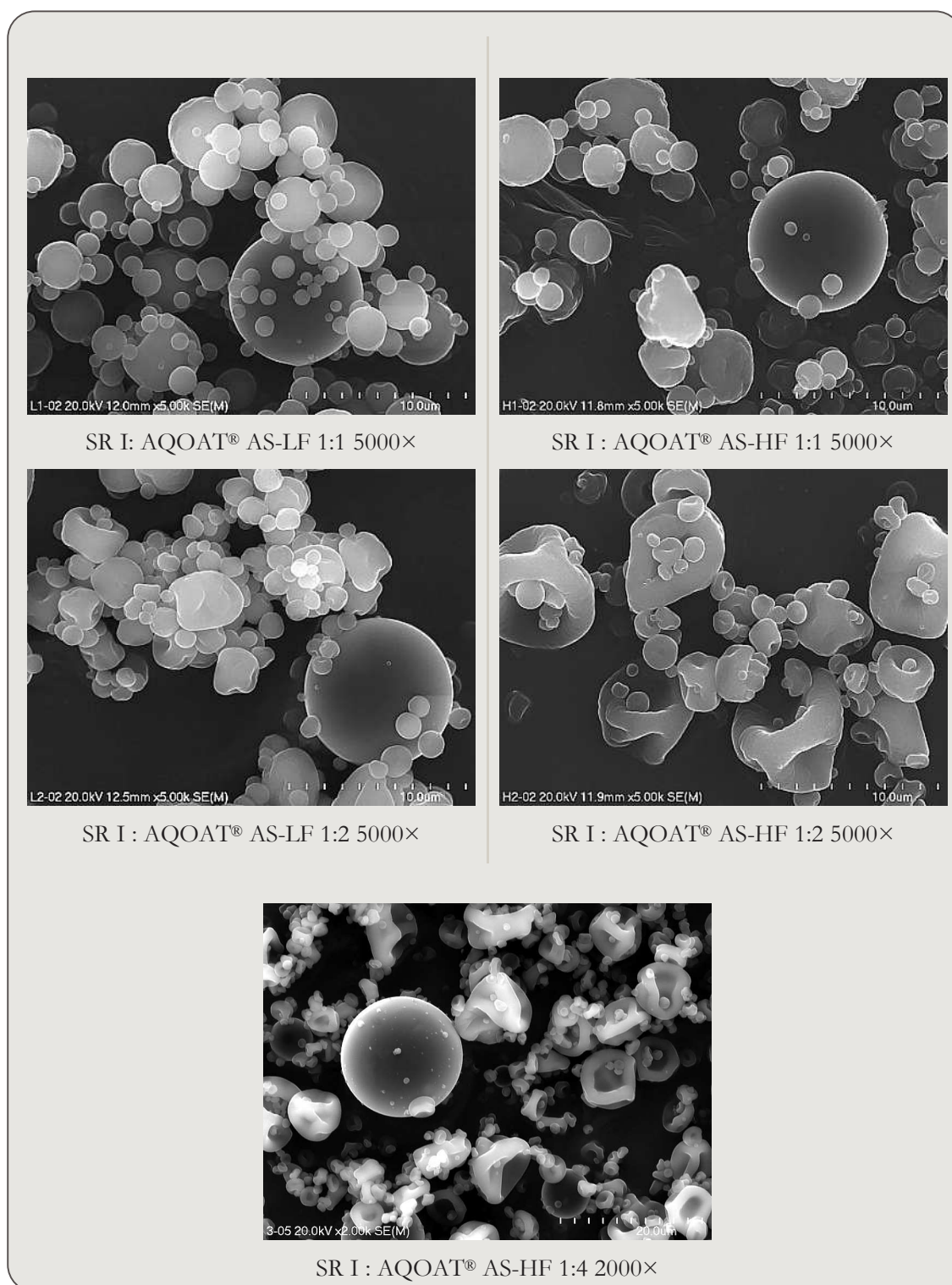
Ocenę właściwości fizycznych układów proszkowych z itrakonazolem przeprowadzono w oparciu o wyniki analizy mikroskopowej.

Wyniki badań w mikroskopie skaningowym wykazały zmiany w kształcie i wielkości w zależności od składu. Itrakonazol jest substancją krystaliczną o wielkości kryształów w granicach od 5 do 60 μm . Częstki AQOAT[®] mają kształt zaokrąglony przy czym AQOAT[®] AS-HF ma drobniejsze cząstki niż AS-LF. Wielkość cząstek mieści się w przedziale od 5 do 10 μm . W mieszaninach fizycznych widoczne są kryształy substancji leczniczej oraz cząstki AQOAT[®] (ryc. 8). Dwuskładnikowe stałe rozproszenia (1:1) charakteryzowały się kulistym kształtem cząstek wielkości od 1 do 7 μm . Użycie większej ilości AQOAT[®] AS-LF (1:2) wpływało na zmianę ich struktury. Pojawiały się cząstki z wgłębionym środkiem. Zastosowanie większej ilości AQOAT[®] AS-HF (układy 1:2 i 1:4) zmieniało kształt cząstek na nieregularny i pomarszczony, nie zmieniła się wielkość cząstek (ryc. 9). W przypadku

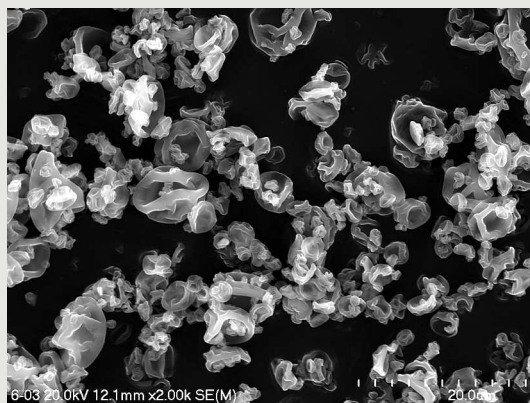
układów trójskładnikowych wszystkie cząstki miały wgłębienia w powierzchni. Dochodziło także do agregacji cząstek. Wielkość cząstek mieściła się w przedziale od 1 do 20 μm (ryc. 10).



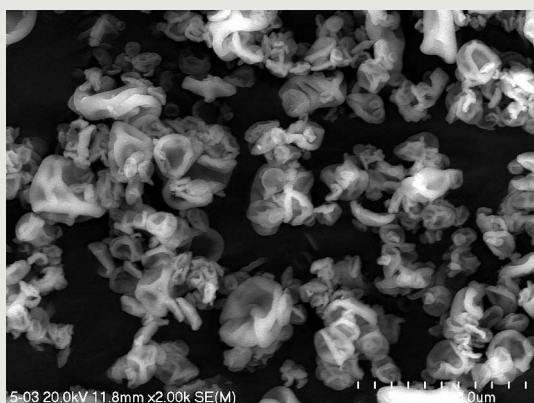
Rycina 8. Substancja lecznicza, nośniki oraz mieszanina fizyczna (MF). Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 1000 i 5000 $\times$.



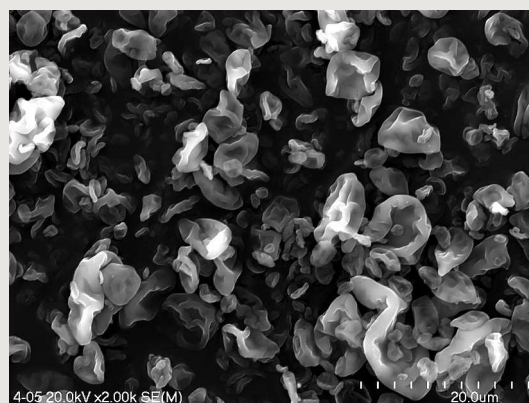
Rycina 9. Dwuskładnikowe stałe rozproszenia (SR) itrakonazolu (I), układy 1:1, 1:2 i 1:4. Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 2000 i 5000×



SR I : Aqoat® AS-HF : PVP 1:4:0,5



SR I : Aqoat® AS-HF : Gelucire® 44/14
1:4:0,5



SR I : Aqoat® AS-HF : Gelucire® 50/13
1:4:0,5

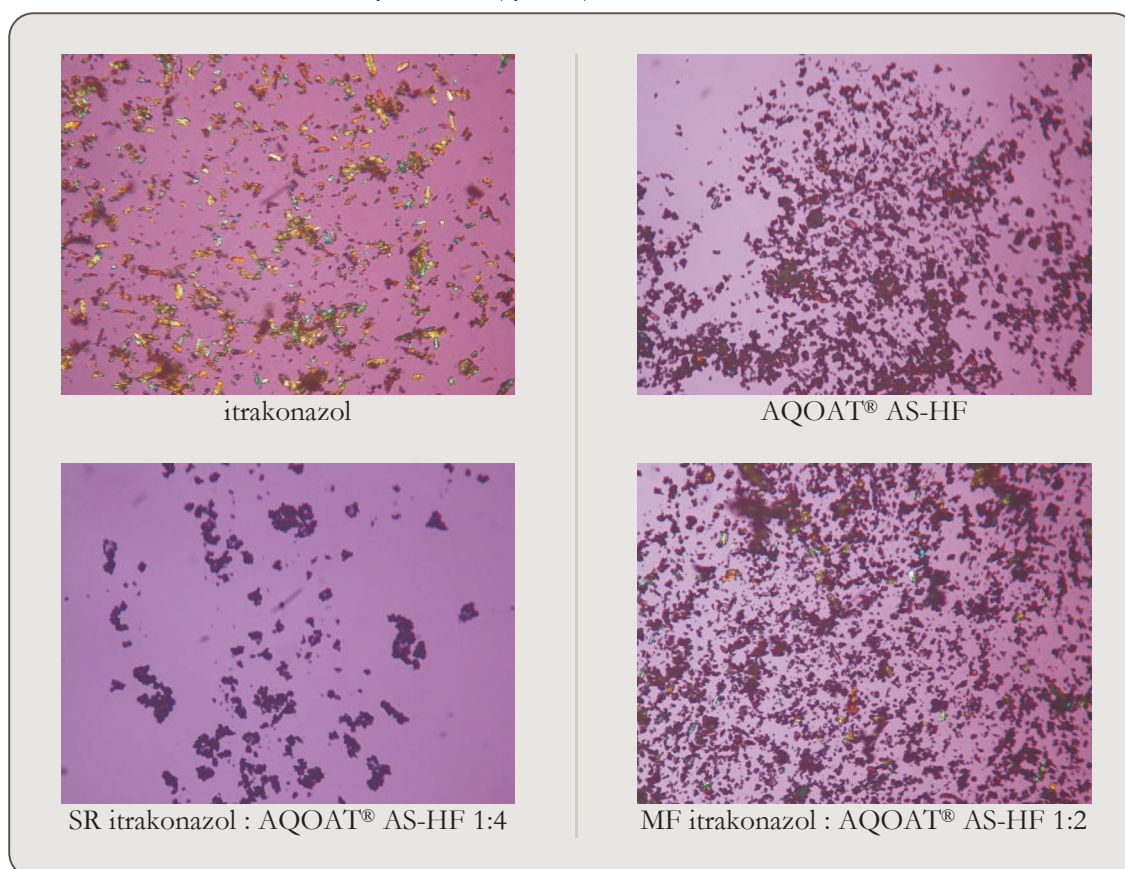
Rycina 10. Trójskładnikowe stałe rozproszenia (SR) itrakonazolu (I). Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 2000×.

1.2. Wpływ wytwarzania stałego rozproszenia na właściwości substancji leczniczej

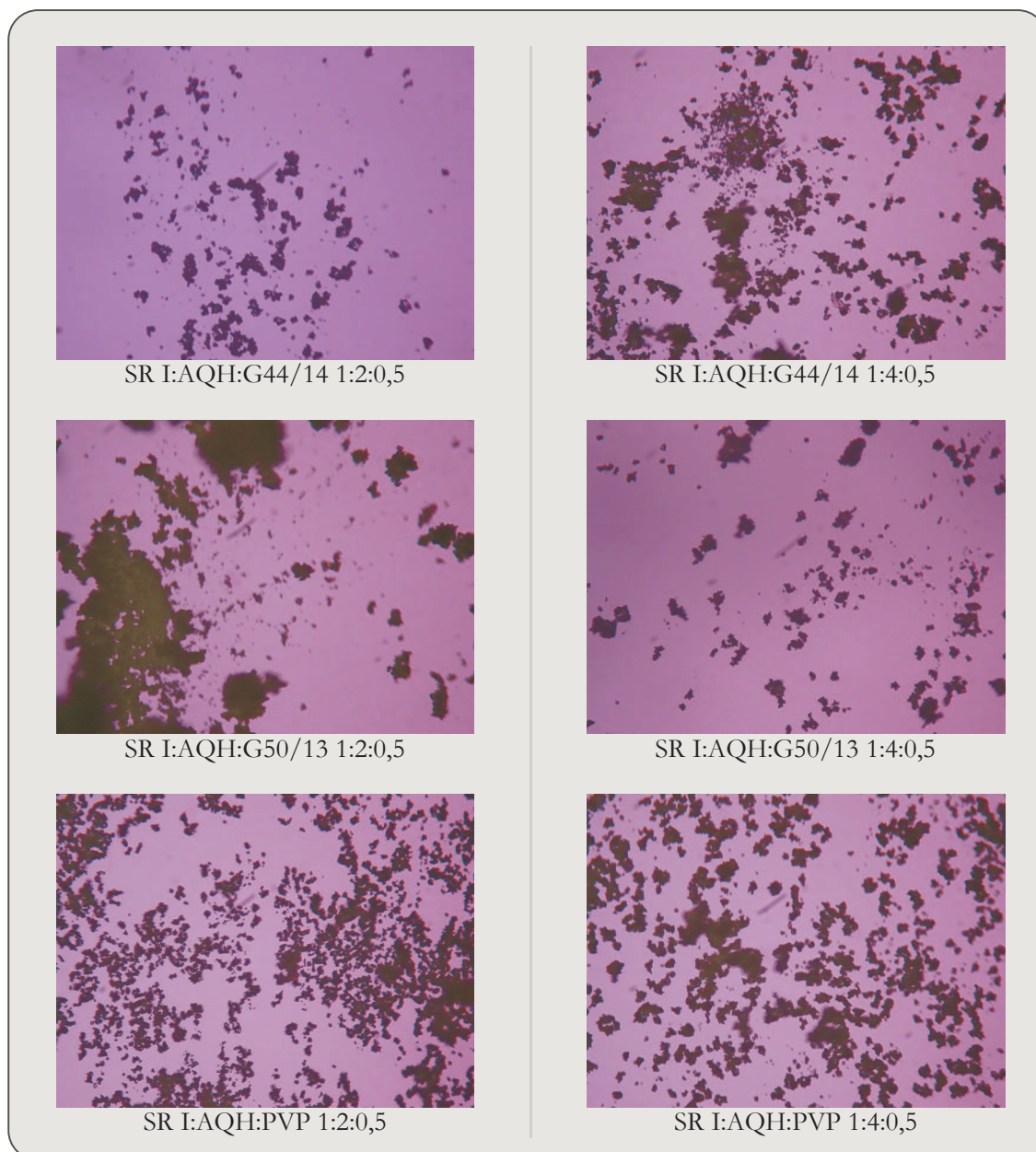
Wyniki badań mikroskopowych i rentgenograficznych posłużyły do oceny sporządzonych układów proszkowych, a także substancji leczniczej i nośnika.

1.2.1. Wyniki badań mikroskopowych

Na podstawie wyników analizy mikroskopowej w świetle spolaryzowanym stwierdzono obecność kryształów itrakonazolu tylko w przypadku mieszanin fizycznych. Identyfikowano dwójłomność kryształów w wyniku podwójnego załamania światła oraz pleochroizm o czym świadczy wielobarwność kryształów (ryc. 11). Natomiast we wszystkich próbkach stałych rozproszonych sporządzonych z różnymi związkami polimerowymi jako nośnikami w formie zarówno układów dwu- jak i trójskładnikowych nie stwierdzono obecności kryształów (ryc. 12).



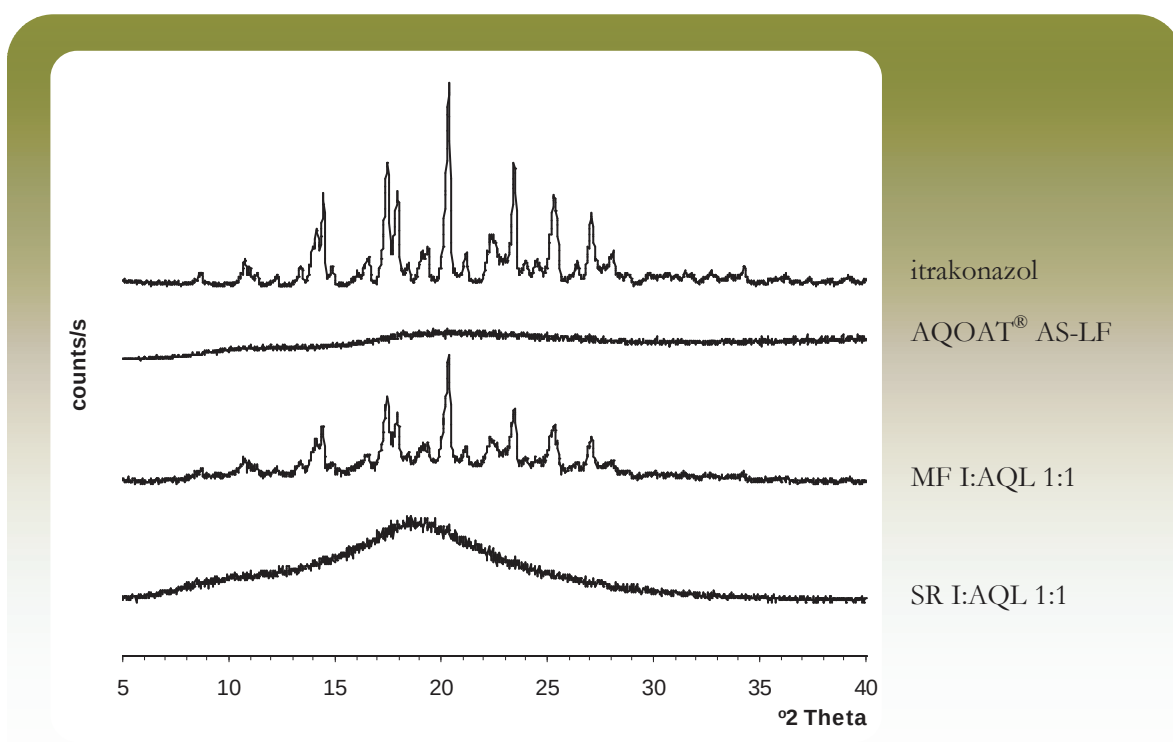
Rycina 11. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). I – itrakonazol, SR – stałe rozproszenie, MF – mieszanina fizyczna.



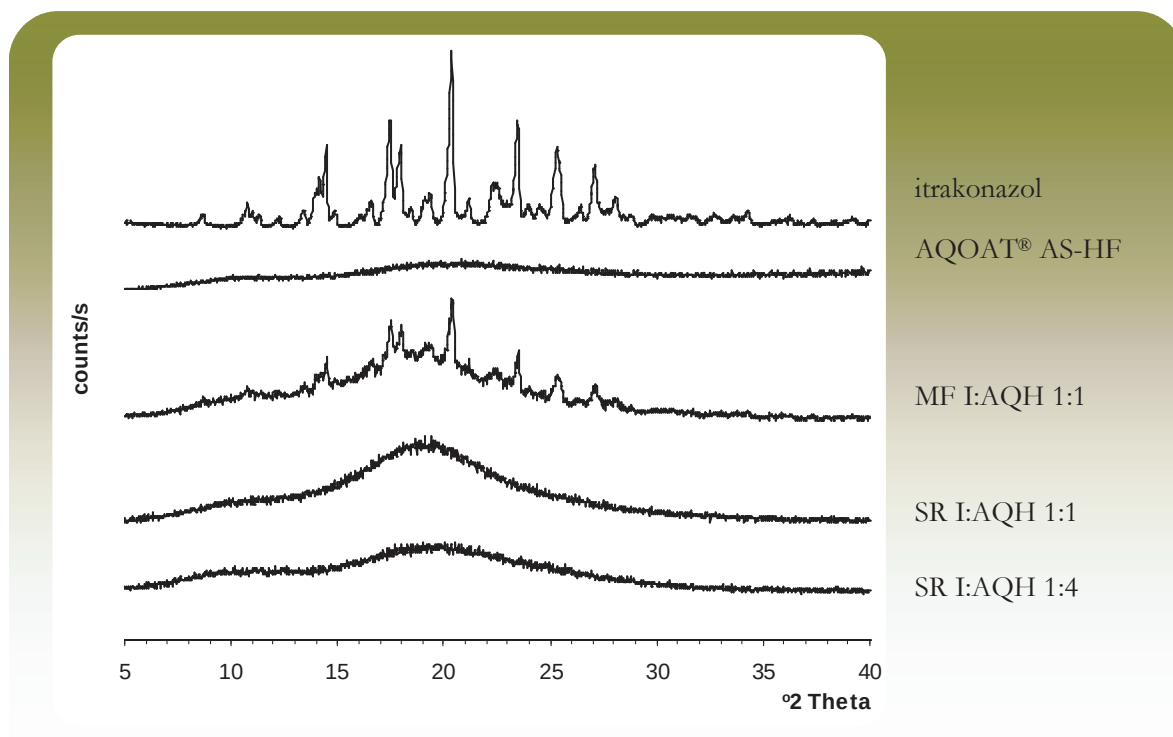
Rycina 12. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). I – itrakonazol, AQ – AQOAT®, G – Gelucire®, PVP - poliwinylpirolidon, SR – stale rozproszenie.

1.2.2. Wyniki badań rentgenograficznych

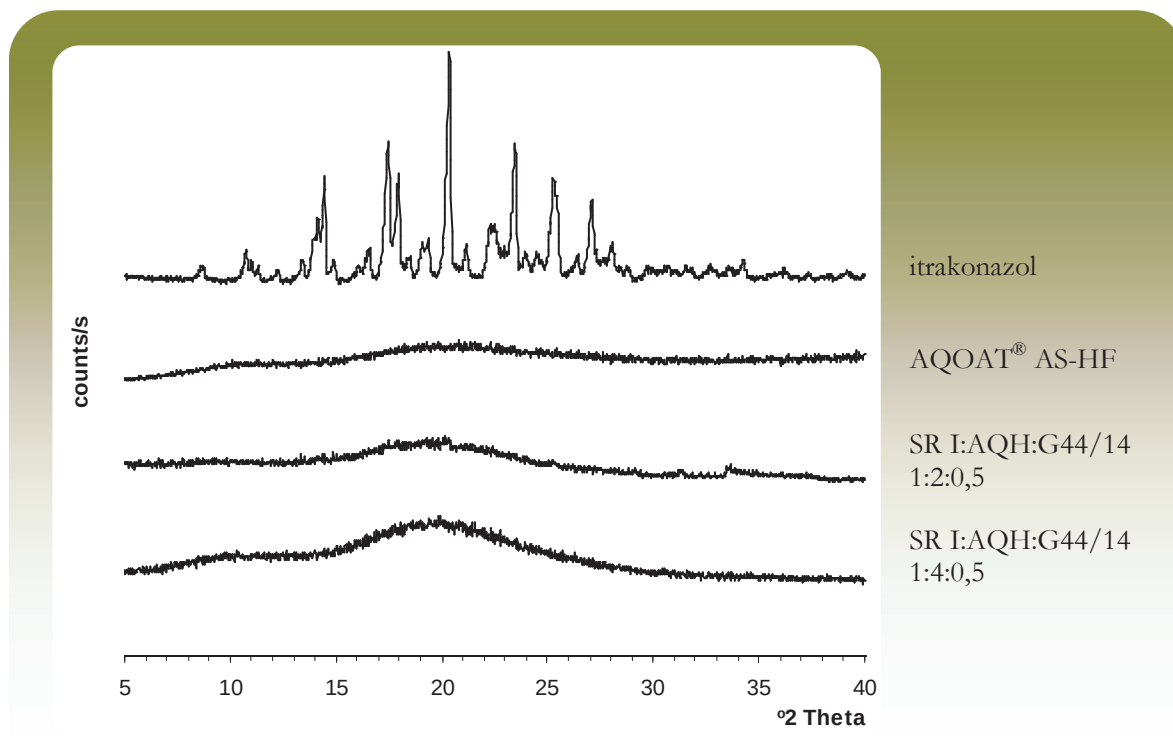
W badaniach rentgenograficznych itrakonazolu wykazano obecność pików charakterystycznych przy kącie 2Θ 14°, 17°, 18°, 20°, 23°, 25°, 27°. Rentgenogramy nośników charakteryzowało *halo* w zakresie kątów 2Θ od 5 do 40°. Analiza mieszanin fizycznych wykazała obecność pików charakterystycznych dla substancji leczniczej o mniejszej intensywności, co wynika z mniejszej ich ilości w próbkach, z uwagi na obecność nośnika. Natomiast w przypadku dwu- i trójskładnikowych stałych rozproszeń nie stwierdzono pików charakterystycznych dla substancji leczniczej. Na wszystkich rentgenogramach obserwowano *halo* w zakresie kątów 2Θ od 5 do 40° (ryc. 13 - 17).



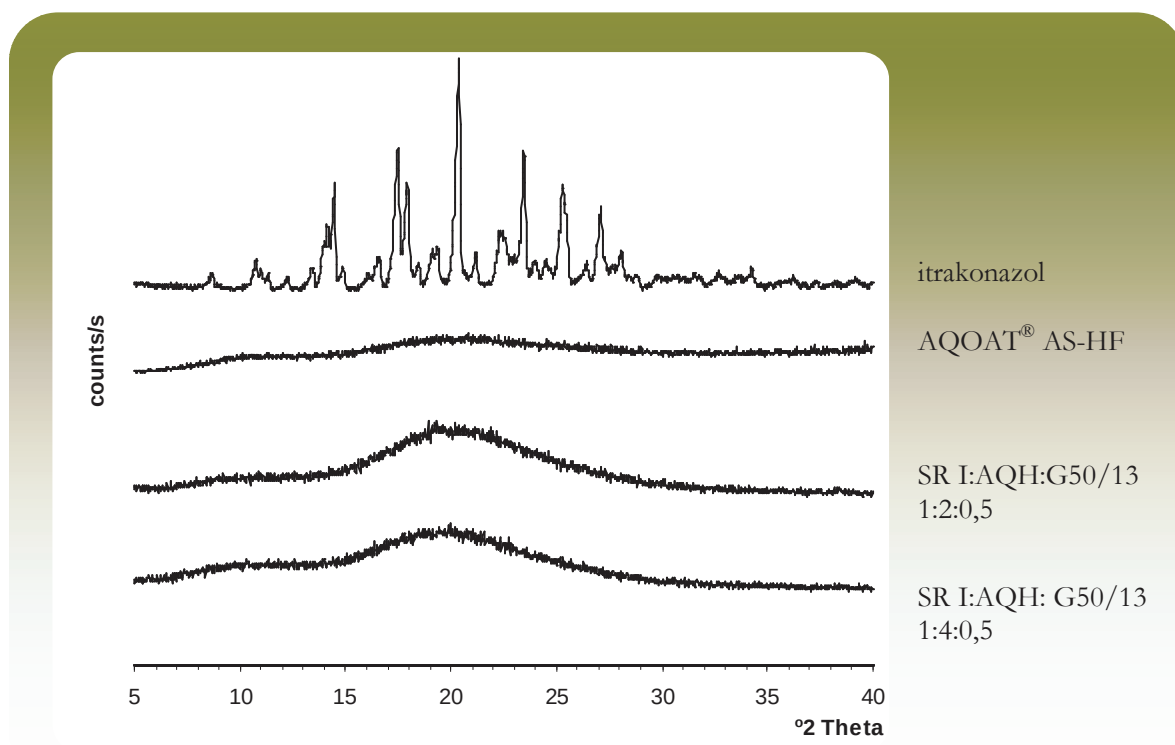
Rycina 13. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-LF (AQL), mieszaniny fizycznej (MF) i stałego rozproszenia (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-LF.



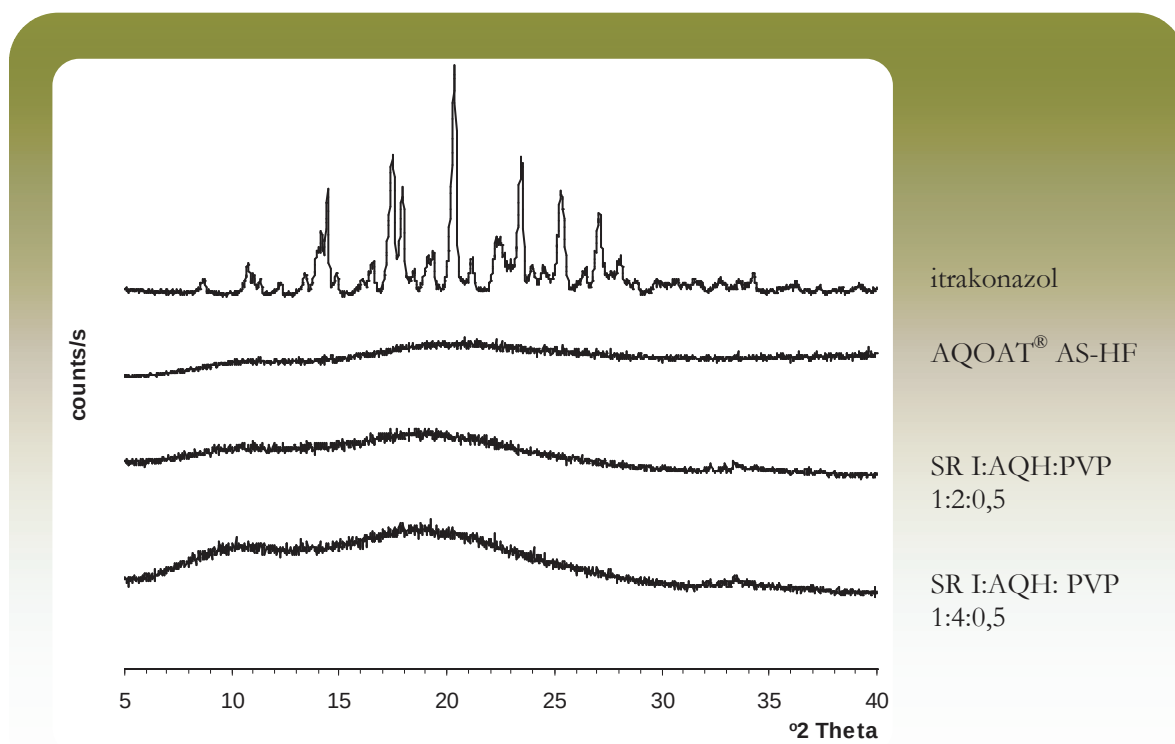
Rycina 14. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH), mieszaniny fizycznej (MF) i stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF.



Rycina 15. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH) i stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14.



Rycina 16. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH), stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13.



Rycina 17. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH), stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i PVP.

1.3. Wpływ ilości i rodzaju nośnika w układzie na rozpuszczalność i profil rozpuszczania itrakonazolu

1.3.1. Wyniki badań rozpuszczalności

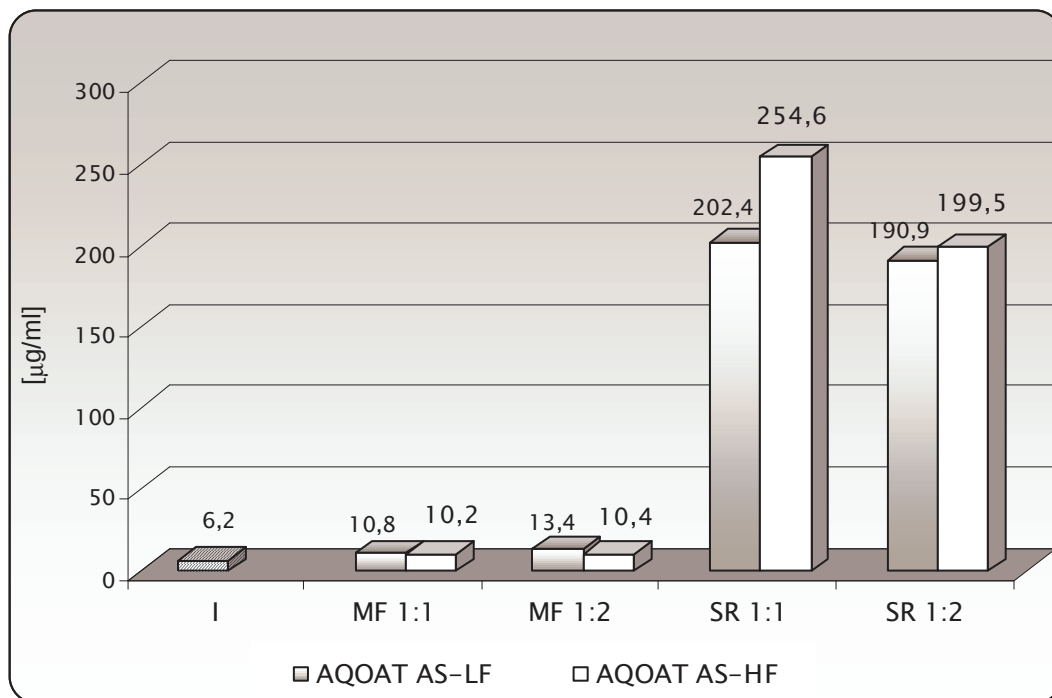
Ocenie poddano dwu- i trójskładnikowe stałe rozproszenia, w porównaniu z mieszaninami fizycznymi i samą substancją leczniczą.

Wykazano znaczną poprawę rozpuszczalności itrakonazolu z dwuskładnikowych stałych rozproszeń zawierających AQOAT[®]. W przypadku układów 1:1 ze stałego rozproszenia z AQOAT[®] AS-HF lub LF w porównaniu z samą substancją leczniczą uzyskano odpowiednio 41-krotny i 32-krotny wzrost rozpuszczalności. Również w porównaniu z mieszaninami fizycznymi uzyskano poprawę rozpuszczalności (ryc. 18). W przypadku stałych rozproszeń 1:2 w zależności od rodzaju AQOAT[®] uzyskano ok. 14 - 19-krotne zwiększenie rozpuszczalności w porównaniu z mieszaniną fizyczną i około 30 - 32-krotne zwiększenie rozpuszczalności w porównaniu z itrakonazolem. Wyniki tych badań wskazują na większe oddziaływanie AQOAT[®] AS-HF. Z tego względu dokonano oceny wpływu ilości AQOAT[®] AS-HF w stałych rozproszeniach na rozpuszczalność itrakonazolu. Najwięcej itrakonazolu rozpuściło się ze stałych rozproszeń 1:4 – 277,04 µg/ml tj. 44,6-krotnie więcej niż w przypadku samej substancji leczniczej (6,21 µg/ml) (ryc. 19).

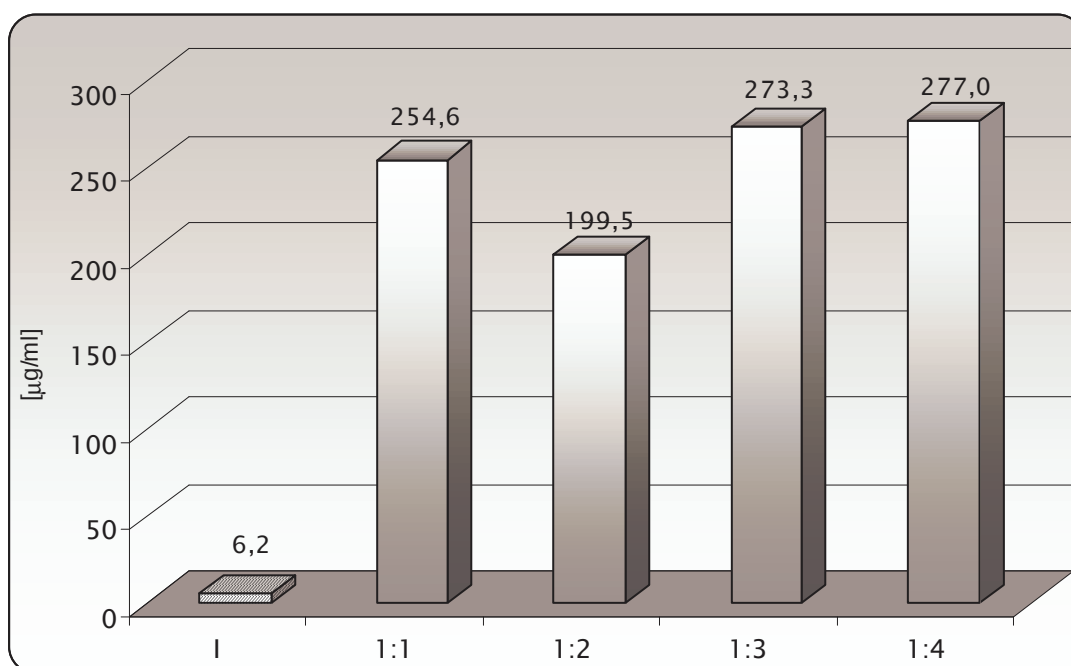
Wprowadzenie do układu trzeciego składnika poprawiającego zwilżalność - PVP spowodowało dalsze zwiększenie rozpuszczalności itrakonazolu. Z najlepszego układu trójskładnikowego itrakonazol : AQOAT[®] AS-HF : PVP 1:2:1 po 24 godz. rozpuściło się ponad 53-krotnie więcej itrakonazolu (331,44 µg/ml) w porównaniu z samą substancją leczniczą (ryc. 20).

Spośród układów trójskładnikowych najmniejszy wpływ nośników stwierdzono w przypadku użycia Gelucire[®] jako drugiego nośnika. W obecności Gelucire[®] 44/14 w zależności od jego ilości w układzie rozpuszczalność wynosiła od 30,13 µg/ml do 42,97 µg/ml (ryc. 21). Wyższe wartości uzyskano stosując Gelucire[®] 50/13 gdyż rozpuszczalność wynosiła od 51,28 µg/ml do 99,48 µg/ml to oznacza 8- i 16-krotny wzrost (ryc. 24). Z układów 1:2:0,5 i 1:4:0,5 dokonano kontroli ilości rozpuszczonej substancji dodatkowo po 2, 6 i 10 godz. Wraz z upływem czasu następowało zmniejszenie

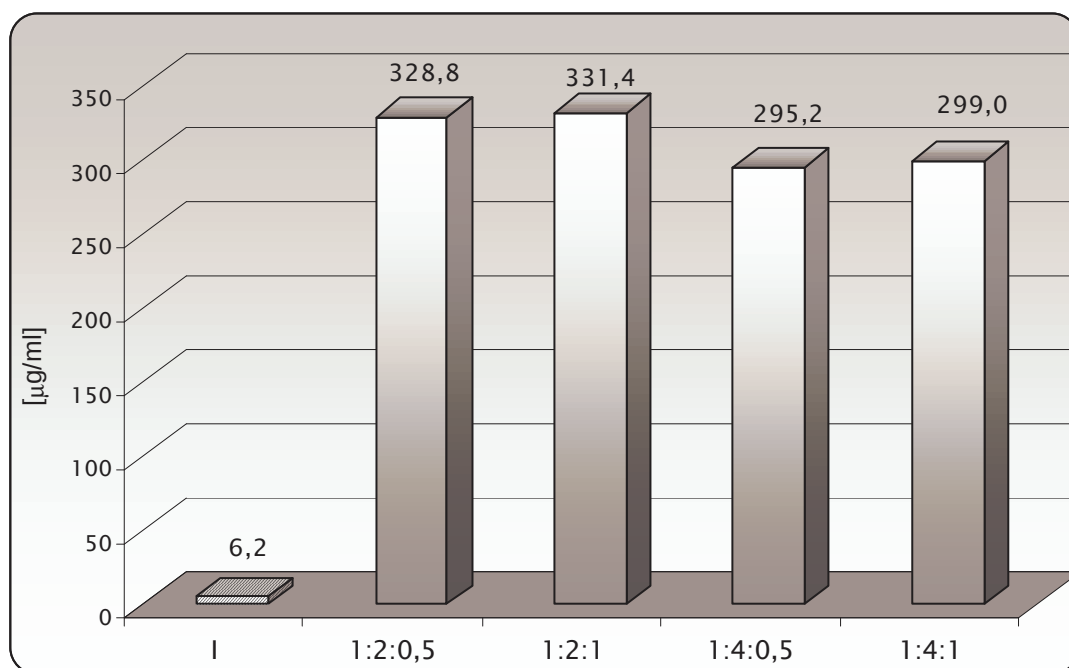
rozpuszczalności itrakonazolu (I) (ryc. 22, 25). Poddano analizie osad po badaniu rozpuszczalności. Na podstawie obrazów z mikroskopu polaryzacyjnego stwierdzono obecność drobno krystalicznego itrakonazolu w badanych układach (ryc. 23, 26).



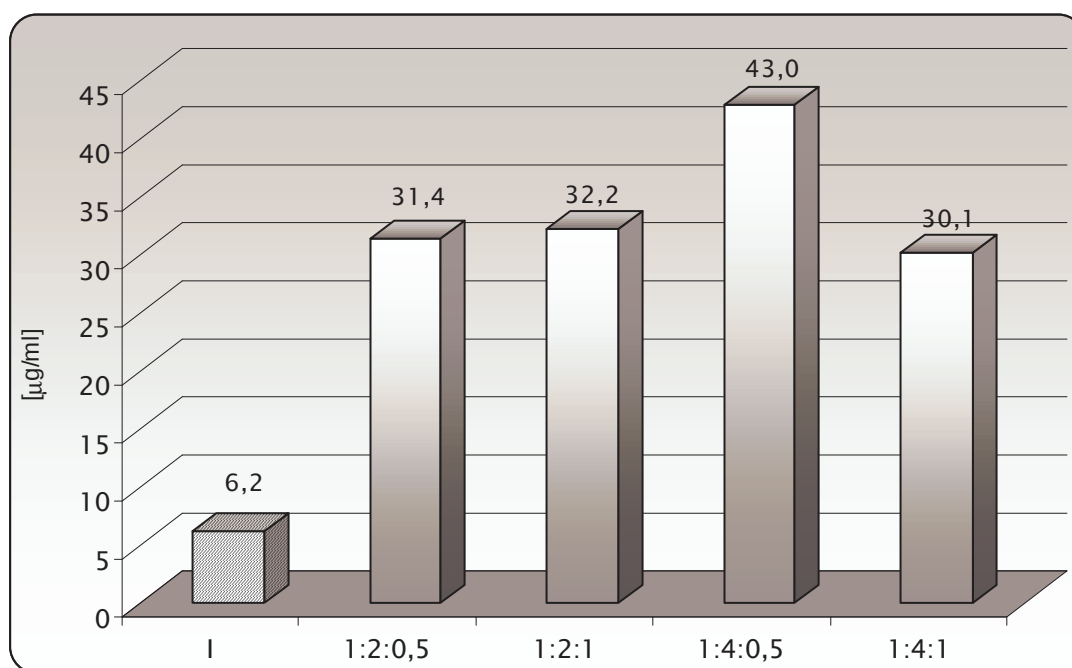
Rycina 18. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z mieszanin fizycznych (MF) i stałych rozproszeń (SR).



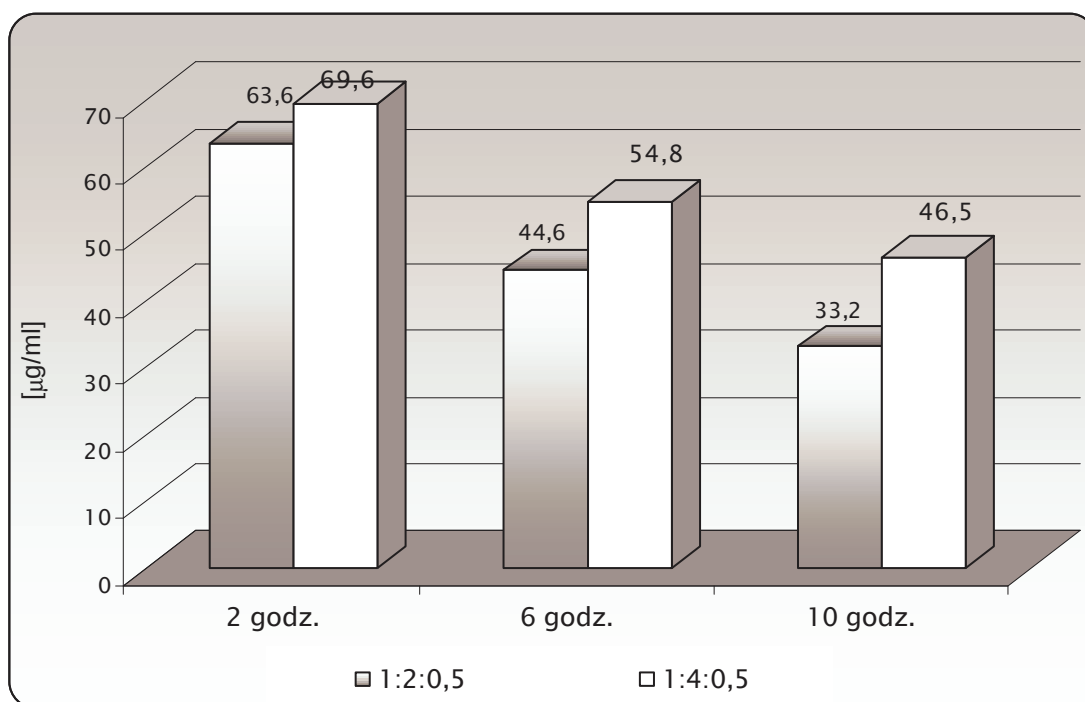
Rycina 19. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń (SR) z AQOAT® AS-HF.



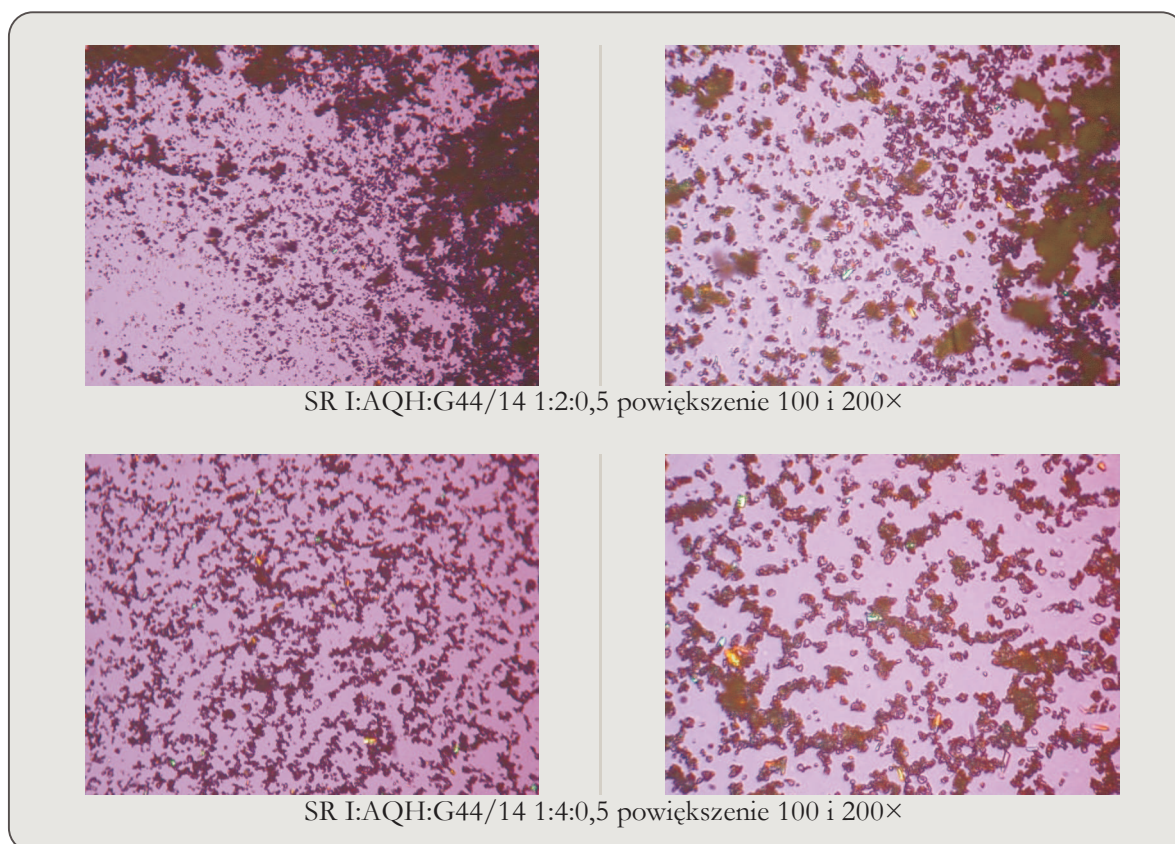
Rycina 20. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) z ATOAT® AS-HF i PVP.



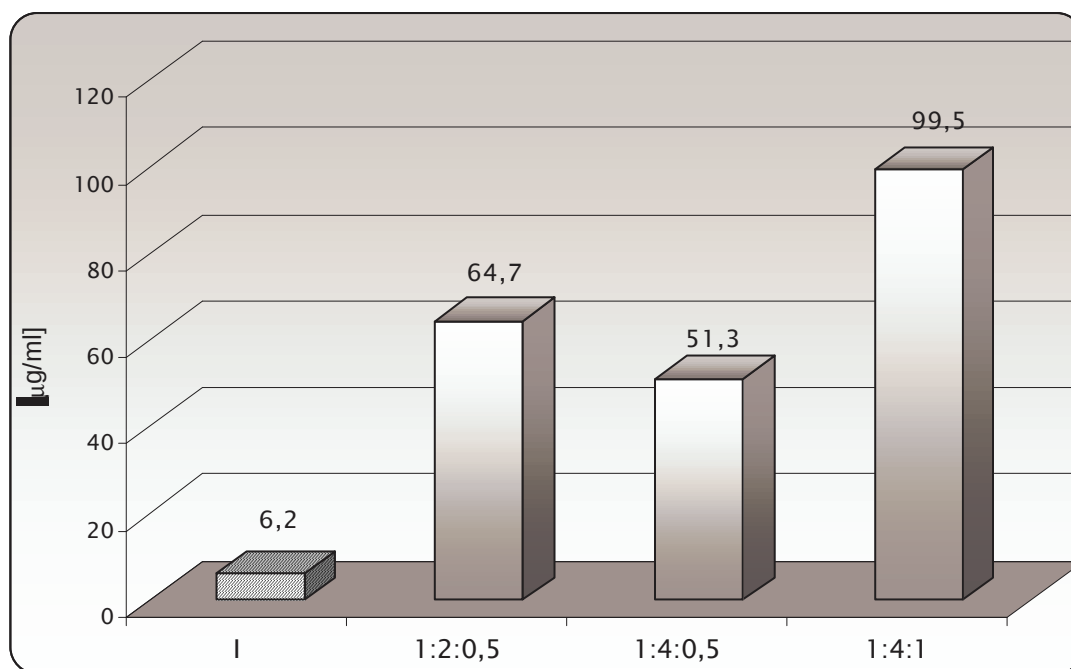
Rycina 21. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) z ATOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14.



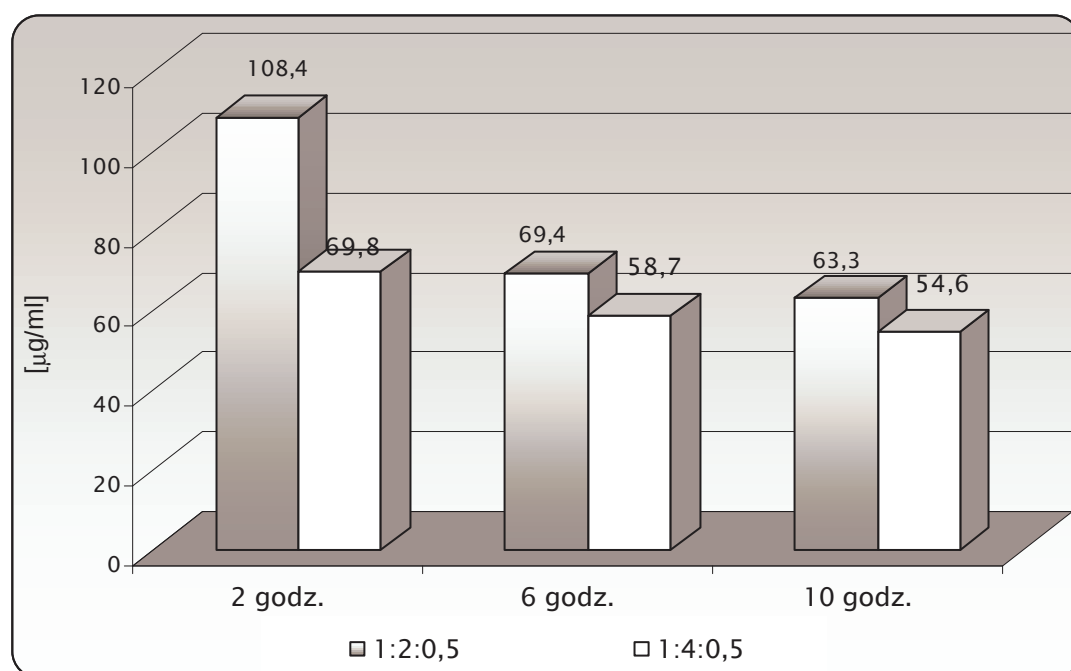
Rycina 22. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14 w trakcie 10 godz. badania.



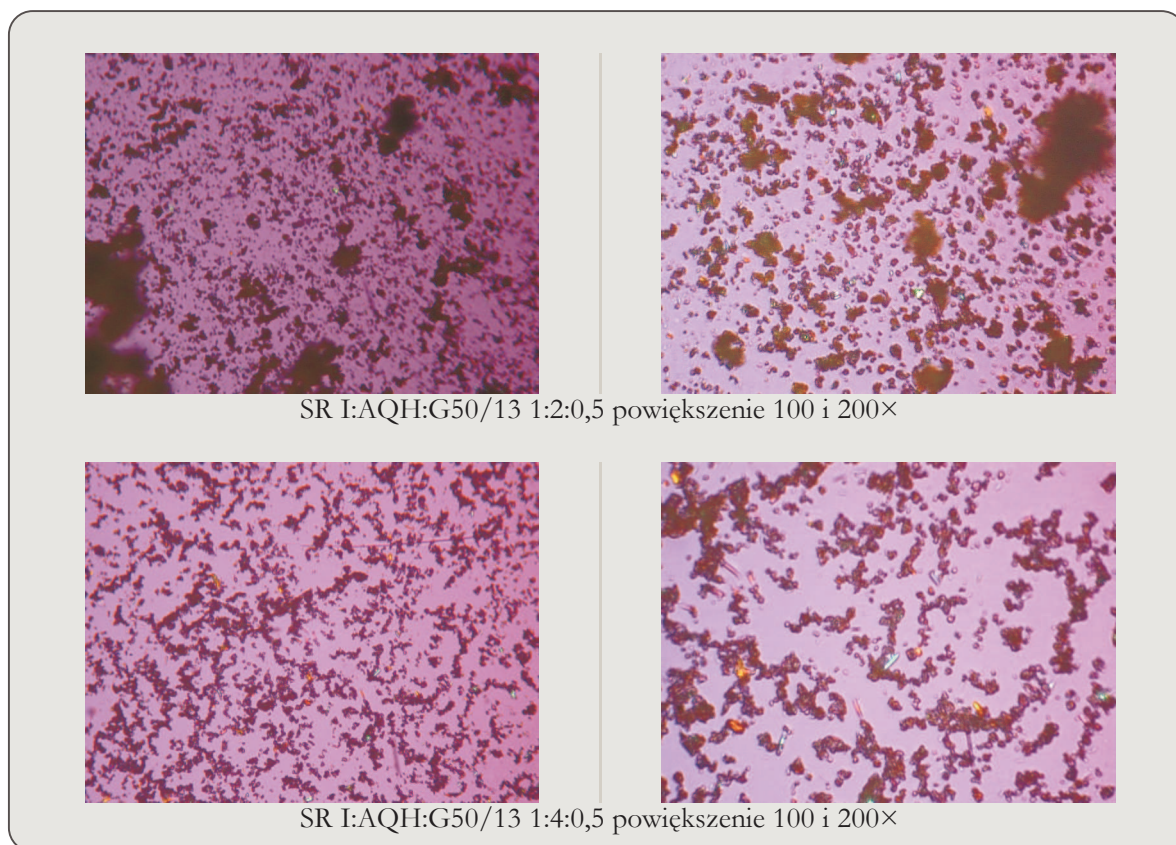
Rycina 23. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego układów z Gelucire® 44/14 po 10 godz. badania rozpuszczalności. I – itrakonazol, AQ – AQOAT®, G – Gelucire®, SR – stałe rozproszenie.



Rycina 24. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13.



Rycina 25. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13 w trakcie 10 godz. badania.



Rycina 26. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego układów z Gelucire® 50/13 po 10 godz. badania rozpuszczalności. I – itrakonazol, AQ – Aqoat®, G – Gelucire®, SR – stałe rozproszenie.

1.3.2. Wyniki badań szybkości rozpuszczania

W celu określenia wpływu rodzaju i ilości nośnika dokonano oceny stałych rozprożeń w formie układów dwuskładnikowych z Aqoat® oraz trójskładnikowych z Gelucire® 44/14, 50/13, PVP i PEG 6000 jako trzecim nośnikiem w porównaniu z samą substancją leczniczą. Niezależnie od rodzaju użytego nośnika uzyskano w przypadku wszystkich analizowanych stałych rozprożeń zwiększenie ilości rozpuszczonej substancji leczniczej. Analiza wyników badań przedstawiona na rycinach 27 i 28 wykazała zwiększenie ilości rozpuszczonego itrakonazolu w przypadku użycia Aqoat® AS-HF. Ze stałych rozprożeń z Aqoat® AS-HF 1:1 po 2 godz. rozpuściło się 24,13 % substancji leczniczej zaś z układów AS-LF 20,44 %, co stanowi odpowiednio ok. 6,5-krotne i 5,5-krotne zwiększenie ilości rozpuszczonego itrakonazolu w porównaniu z samą substancją leczniczą (ryc. 27). Nie stwierdzono oddziaływania nośnika w przypadku mieszanin fizycznych.

Podobne zależności stwierdzono w przypadku układów 1:2. Ze stałego rozproszenia z AQOAT[®] AS-HF 1:2 po 2 godz. rozpuściło się 32,41 % itrakonazolu, a z układu AQOAT[®] AS-LF 25,18 % (ryc. 28).

Na przykładzie 5 układów stałych rozproszeń tj. 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:10 stwierdzono przyspieszenie procesu rozpuszczania wraz ze wzrostem ilości AQOAT[®]. Po dwóch godzinach z układu 1:1 rozpuściło się 24,13 % itrakonazolu podczas gdy ze stałych rozproszeń 1:10 ponad dwukrotnie większa ilość tj. 54,12 % (ryc. 29).

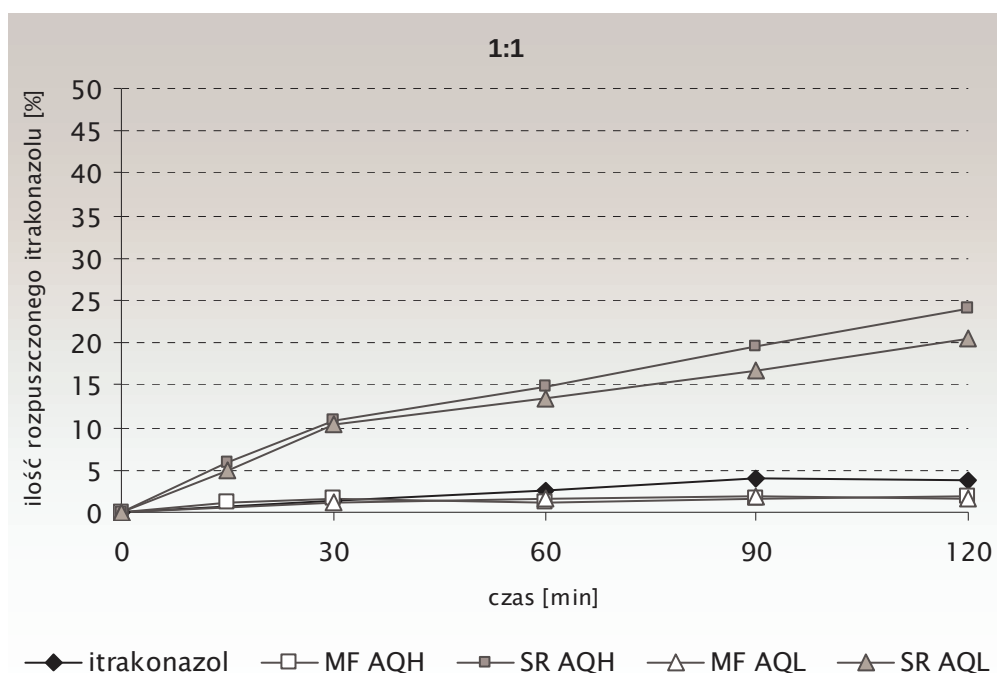
Wprowadzenie Gelucire[®] 44/14 jako drugiego nośnika stałych rozproszeń z AQOAT[®] AS-HF spotęgowało to działanie w przypadku układów 1:4. Najlepsze wyniki uzyskano dla układu (1:4:0,5). Po dwóch godzinach rozpuściło się 60,51 % tj. o 10 % więcej substancji leczniczej niż z analogicznego układu dwuskładnikowego (50,37 %) (tab. 14, ryc. 30). W przypadku układów zawierających dwukrotnie mniejszą ilość nośnika tj. 1:2:0,5; 1:2:1, 1:2:2 stwierdzono znaczną poprawę szybkości rozpuszczania tylko w przypadku najmniejszej ilości Gelucire[®] (1:2:0,5). Po dwóch godzinach rozpuściło się 53,10 % (ryc. 31). Zwiększenie ilości Gelucire[®] powodowało spowolnienie procesu. Po tym samym czasie z układów 1:2:1 rozpuściło się 13,16 % natomiast ze stałych rozproszeń 1:2:2 7,13 % (tab. 14, ryc. 31).

W celu określenia wpływu Gelucire[®] na szybkość rozpuszczania itrakonazolu ocenie poddano układy dwuskładnikowe 1:0,1; 1:0,5, z których rozpuściło się po 2 godz. ok. 15 % substancji leczniczej (tab. 14, ryc. 31).

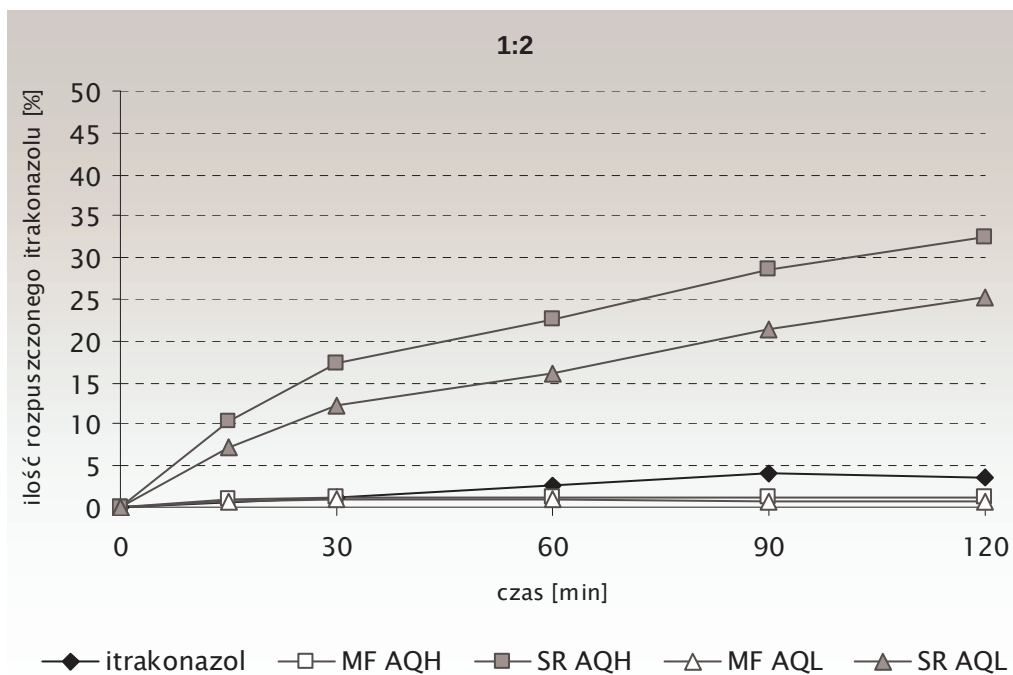
Także w przypadku trójskładnikowych stałych rozproszeń z PVP najlepszym układem okazało się stałe rozproszenie 1:4:0,5. Po 2 godz. rozpuściło się podobnie jak w przypadku układu z Gelucire[®] 44/14 ok. 57 % substancji czynnej tj. 15-krotnie większa ilość itrakonazolu w porównaniu z samą substancją leczniczą. Dwukrotne zmniejszenie ilości AQOAT[®] w układzie spowodowało po tym samym czasie obniżenie ilości rozpuszczonej substancji leczniczej o ok. 13,5 %, gdyż po 2 godz. z układu 1:2:0,5 rozpuściło się 43,57 % (tab. 16, ryc. 33).

Analiza podobnych pod względem ilościowym trójskładnikowych układów stałych rozproszeń lecz zawierających Gelucire[®] 50/13 wykazała zwiększenie szybkości rozpuszczania itrakonazolu. Spośród badanych trzech układów najlepsze wyniki uzyskano w przypadku stałych rozproszeń 1:2:0,5 gdyż po 2 godz. rozpuściło się 82,30 % itrakonazolu, z pozostałych 1:4:0,5 i 1:4:1 odpowiednio 67,20 % i 71,07 % (tab. 15, ryc. 32).

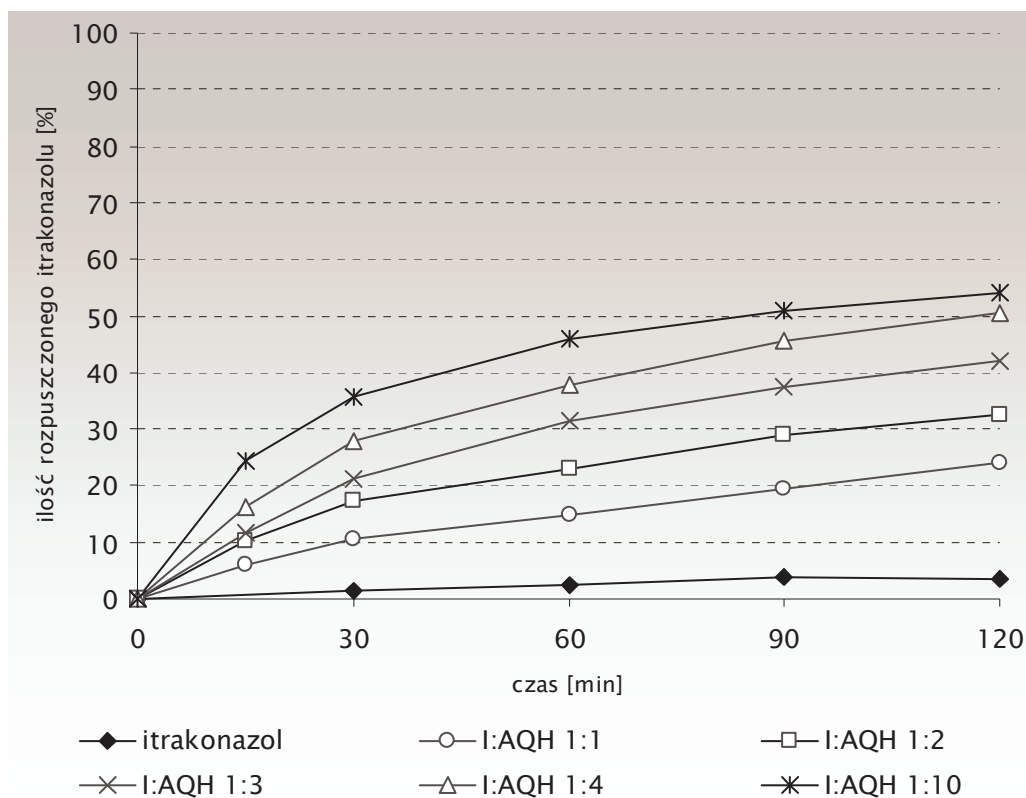
Zastosowanie PEG jako trzeciego składnika w stałych rozproszeniach nie spowodowało poprawy szybkości rozpuszczania. Po 2 godzinach rozpuściło się ok. 20 % itrakonazolu (tab. 17, ryc. 34).



Rycina 27. Profil rozpuszczania itrakonazolu z dwuskładnikowych układów proszkowych: mieszaniny fizyczne (MF), stałe rozproszenia (SR).



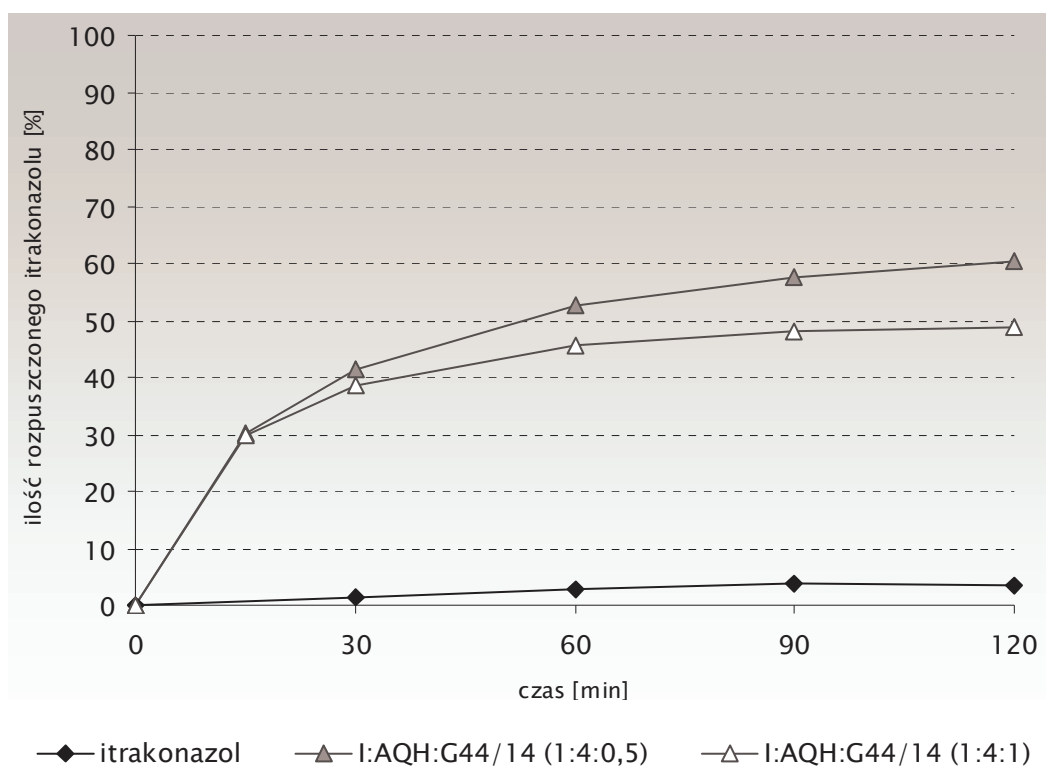
Rycina 28. Profil rozpuszczania itrakonazolu z dwuskładnikowych układów proszkowych: mieszaniny fizyczne (MF), stałe rozproszenia (SR).



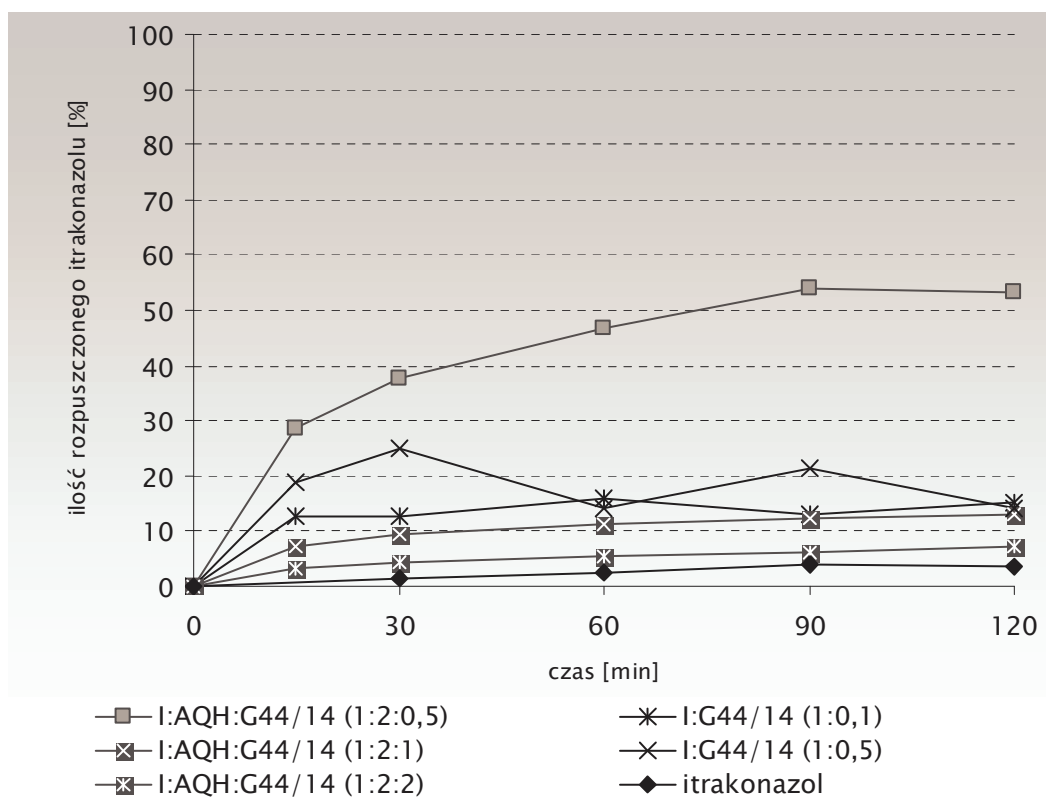
Rycina 29. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) z dwuskładnikowych stałych rozprożeń z AQOAT® AS-HF (AQH).

Tabela 14. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozprożeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 44/14.

czas [min]	itraconazol		SR I:AQH:Gelucire® 44/14										SR I:Gelucire® 44/14			
			1:2:0,5		1:2:1		1:2:2		1:4:0,5		1:4:1		1:0,1		1:0,5	
	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}
15	-	9,6	28,76	5,6	7,31	3,2	3,25	11,7	30,32	1,8	29,88	4,3	12,72	13,2	18,80	9,0
30	1,31	8,8	37,75	4,9	9,43	5,1	4,31	1,6	41,41	3,4	38,50	3,5	12,74	6,0	24,87	12,1
60	2,65	8,9	46,65	4,5	11,24	6,2	5,34	0,7	52,48	3,0	45,67	2,4	15,85	9,8	14,30	15,7
90	3,98	4,4	53,93	1,2	12,41	7,4	6,32	6,4	57,67	2,5	48,08	2,2	13,08	14,3	21,41	16,3
120	3,69	9,6	53,10	3,4	13,16	7,0	7,13	5,2	60,51	2,8	48,66	1,9	15,30	11,1	14,29	18,3



Rycina 30. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 44/14 (G).



Rycina 31. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 44/14 (G).

Tabela 15. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 50/13.

czas [min]	itrakonazol		SR I:AQH:Gelucire® 50/13					
			1:2:0,5		1:4:0,5		1:4:1	
	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}
15	-	-	49,34	4,9	35,20	4,3	41,63	1,2
30	1,31	9,6	62,84	4,4	47,00	5,0	52,47	3,3
60	2,65	8,8	74,35	3,6	58,06	4,9	62,64	4,1
90	3,98	8,9	79,63	2,9	63,34	4,4	68,18	3,5
120	3,69	4,4	82,30	2,4	67,20	4,7	71,07	4,0

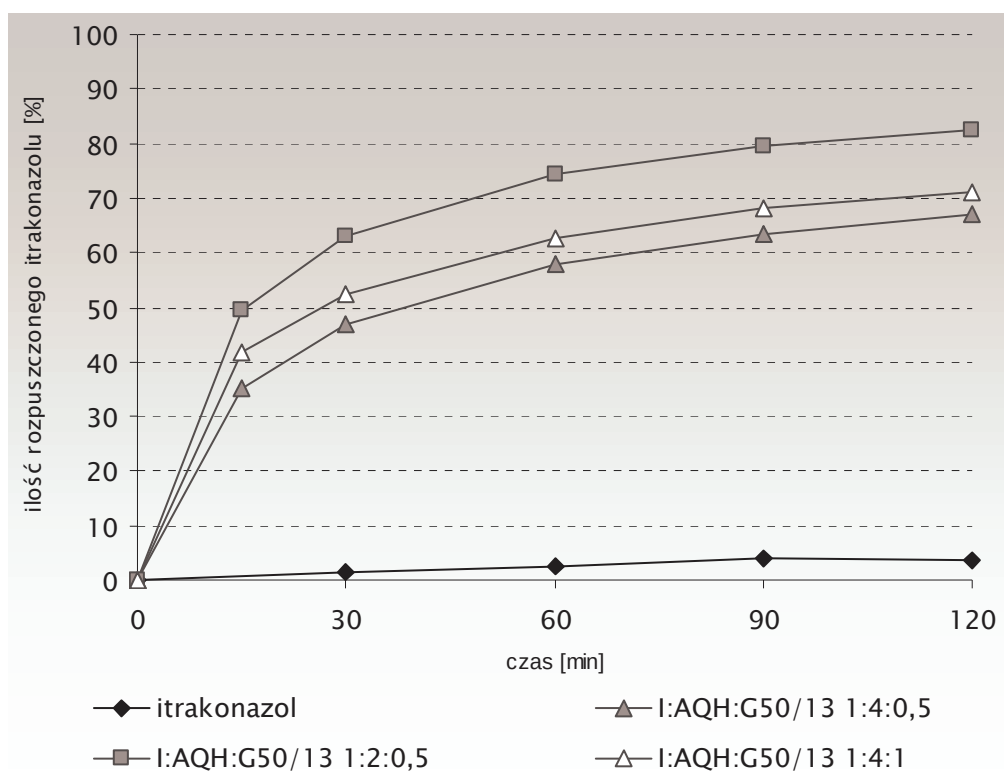
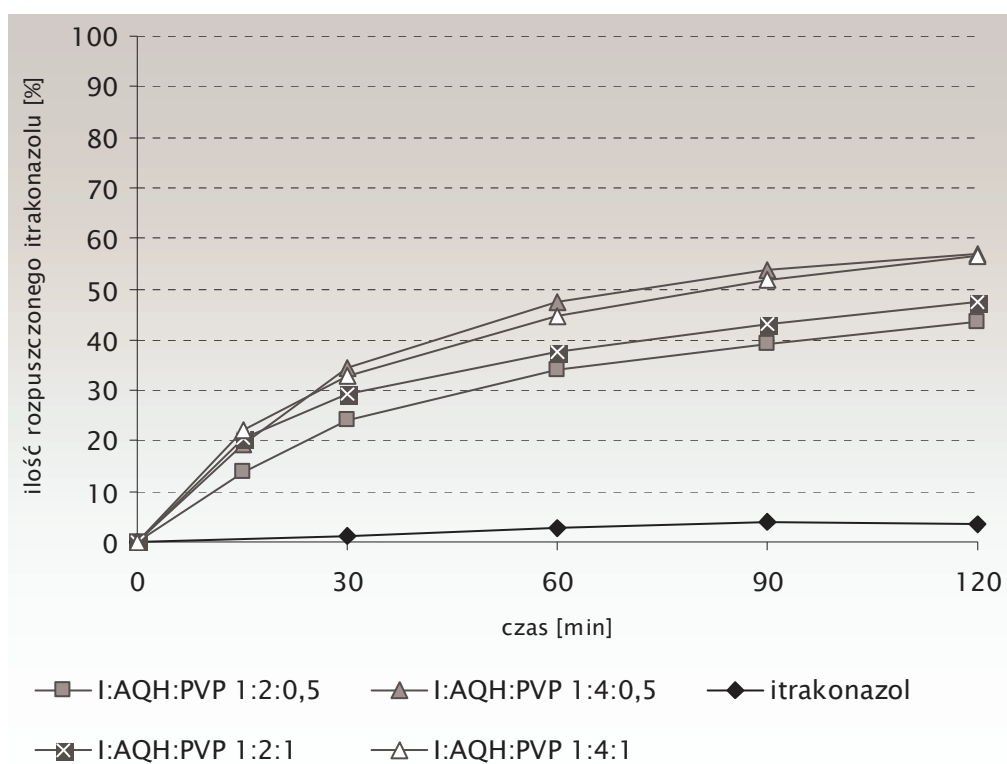
**Rycina 32.** Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 50/13 (G).

Tabela 16. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i PVP.

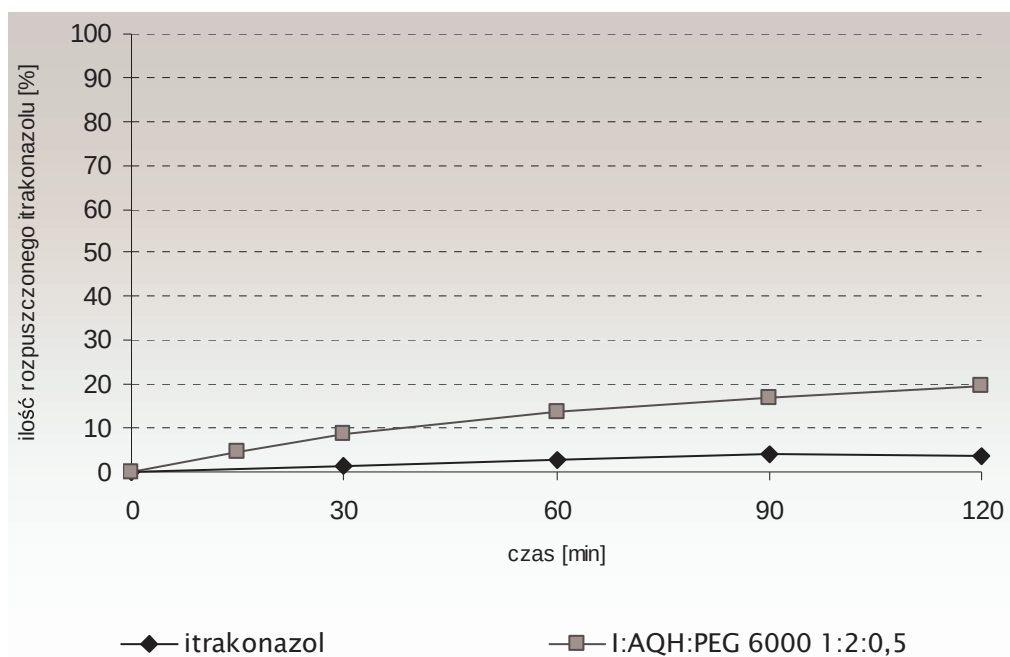
czas [min]	Itrakonazol		I:AQH:PVP							
			1:2:0,5		1:2:1		1:4:0,5		1:4:1	
	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}
15	-		13,83	4,0	20,42	10,9	19,30	8,9	21,97	11,9
30	1,31	9,6	24,10	7,2	29,10	11,0	34,21	15,9	32,80	7,6
60	2,65	8,8	33,97	3,7	37,68	9,2	47,27	14,5	44,72	7,1
90	3,98	8,9	39,12	4,3	43,17	7,7	53,67	10,1	51,70	5,5
120	3,68	4,4	43,57	5,7	47,29	6,7	57,03	9,0	56,62	5,0



Rycina 33. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i PVP.

Tabela 17. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i PEG 6000.

czas [min]	Itrakonazol		I:AQH:PEG 6000 1:2:0,5	
	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}
15	-	-	4,71	5,1
30	1,31	9,6	8,73	6,2
60	2,65	8,8	13,50	5,6
90	3,98	8,9	17,04	1,9
120	3,68	4,4	19,85	2,7



Rycina 34. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i PEG 6000.

Charakterystyka procesu rozpuszczania itrakonazolu przy użyciu modeli matematycznych

W analizie kinetycznej przebiegu rozpuszczania itrakonazolu z wybranych układów proszkowych wykazano zgodność procesu rozpuszczania z modelem Korsmeyer-Peppas, o czym świadczą wartości współczynników korelacji (tab. 18). Wykazano różnice w wartościach stałej K w zależności od formulacji co wskazuje na korzystny wpływ trzeciego składnika w stałych rozproszeniach na szybkość rozpuszczania itrakonazolu.

Tabela 18. Charakterystyka procesu rozpuszczania itrakonazolu (I) z układów proszkowych przy użyciu modelu matematycznego.

Stale rozproszenia	Model matematyczny		
	równanie Korsmeyer-Peppas		
	K [min ^{-N}]	N	R ²
I:AQOAT® AS-HF			
1:4	4,05	0,54	0,978
I:AQOAT® AS-HF:Gelucire®44/14			
1:4:0,5	12,78	0,33	0,978
I:AQOAT® AS-HF:Gelucire®50/13			
1:2:0,5	26,23	0,25	0,972
1:4:0,5	15,80	0,31	0,982
I:AQOAT® AS-HF:PVP			
1:4:0,5	5,30	0,51	0,953

1.3.3. Ocena trwałości stałych rozprożeń z itrakonazolem w badaniach długoterminowych

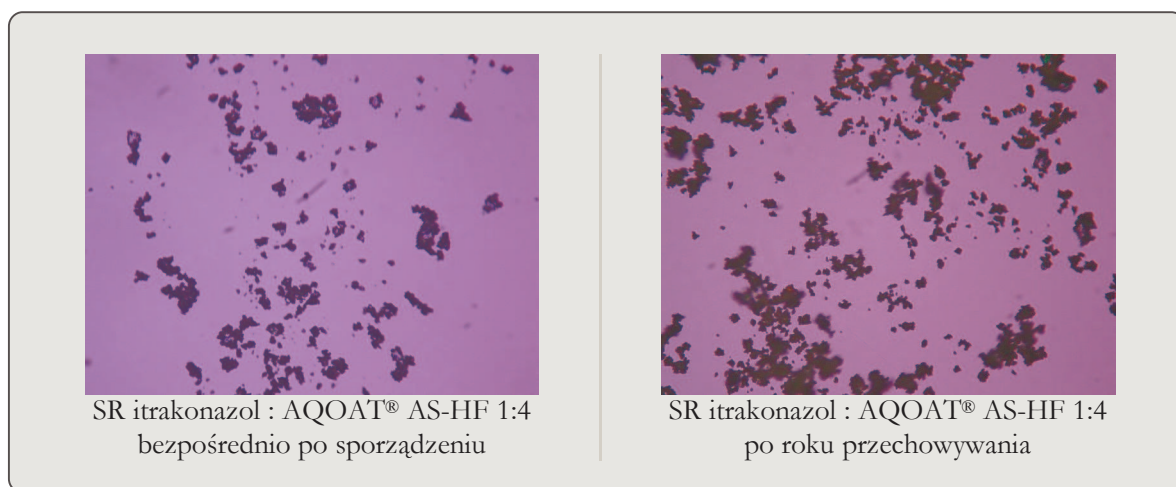
W oparciu o analizę mikroskopową, wyniki badań rentgenograficznych i szybkości rozpuszczania dokonano oceny wybranych układów stałych rozprożeń dwuskładnikowych z AQOAT® AS-HF (1:4) i trójskładnikowych zawierających dodatkowo Gelucire® 44/14, 50/13, PVP (1:2:0,5; 1:4:0,5) po okresie jednego roku przechowywania w temperaturze pokojowej.

Analiza obrazów z mikroskopu polaryzacyjnego nie wykazała zmian w badanych układach (ryc. 35, 38, 41, 44).

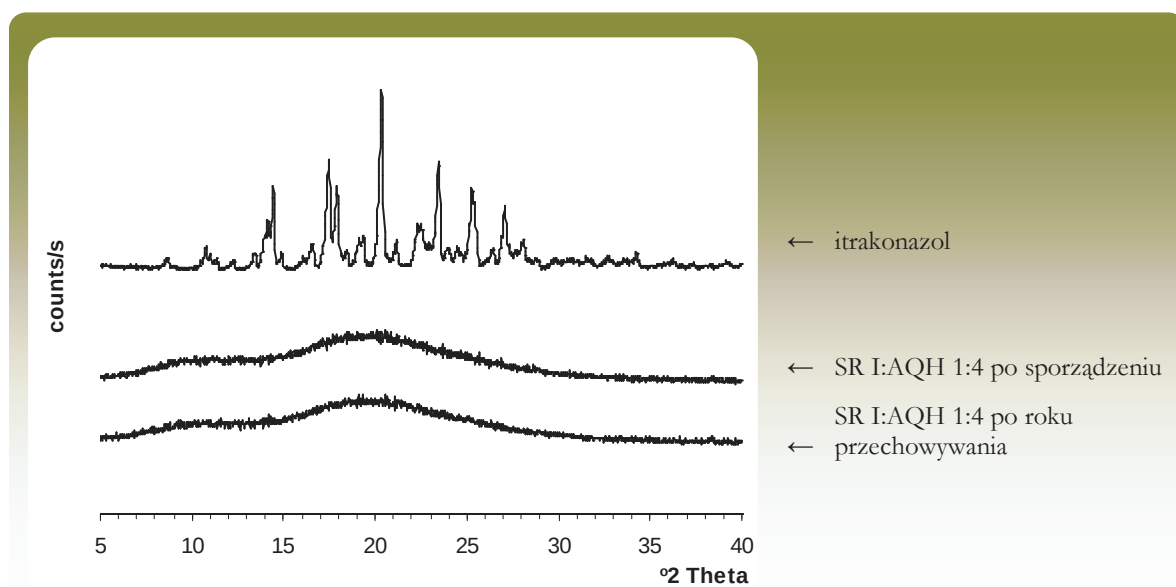
Potwierdzeniem były wyniki badań rentgenograficznych. Na rentgenogramach układu dwuskładnikowego (1:4), a także w przypadku układów trójskładnikowych o takiej samej zawartości AQOAT® nie stwierdzono pików charakterystycznych dla itrakonazolu (ryc. 36, 39, 42, 45). Również w przypadku układów trójskładnikowych (1:2:0,5) z PVP na rentgenogramach występowało charakterystyczne *halo* (ryc. 45). Jedynie na rentgenogramach trójskładnikowych stałych rozprożeń z Gelucire® (1:2:0,5) występowały niewielkie piki przy kącie 2Θ 17°, 18°, 20°, 23°, 25°, 27° (ryc. 39, ryc. 42).

Analiza porównawcza profili rozpuszczania itrakonazolu z dwuskładnikowych stałych rozprożeń (1:4) i trójskładnikowych (1:4:0,5) po jednym roku przechowywania wykazała różnice nie przekraczające 13 % ilości rozpuszczonej substancji po 2 godz. badania. W przypadku układów dwuskładnikowych różnica w ilości rozpuszczonej substancji leczniczej po 2 godz. wynosiła 6,29 %, z 50,37 % itrakonazolu rozpuszczonego ze stałych rozprożeń bezpośrednio po przyrządzeniu (ryc. 37). Również w przypadku układów trójskładnikowych z PVP (1:4:0,5) różnica w ilości rozpuszczonej substancji leczniczej wynosiła 7,15%. Po 2 godz. rozpuściło się 49,88 % w porównaniu z 57,03 % (ryc. 46). Natomiast największą różnicę stwierdzono dla układów stałych rozprożeń z Gelucire® 44/14 (1:4:0,5) po 2 godz. rozpuściło się 47,77 % co w porównaniu z układami przed badaniem stabilności (60,51 %) jest ilością o 12,73 % mniejszą (ryc. 40). Najlepszym okazał się układ z Gelucire® 50/13. Po 2 godz. z układu stałych rozprożeń bezpośrednio po sporządzeniu rozpuściło się 67,20 % itrakonazolu, a po roku przechowywania 66,77 % (ryc. 43).

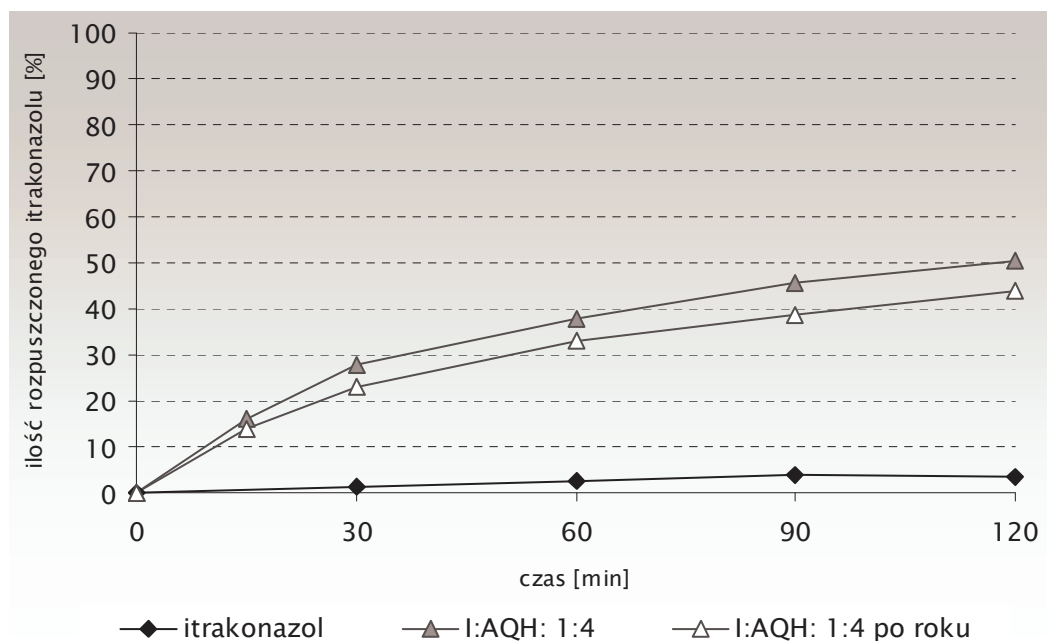
W przypadku trójskładnikowych stałych rozproszeń (1:2:0,5) niewielkie różnice w ilości rozpuszczonej substancji leczniczej stwierdzono tylko dla układów z PVP. Po tym samym czasie ilość rozpuszczonego itrakonazolu ze stałych rozproszeń po przechowywaniu zmieniła się w granicach od 41,99 % do 43,57 % (ryc. 46). Natomiast w przypadku stałych rozproszeń z dwoma rodzajami Gelucire® różnice w ilości rozpuszczonej substancji leczniczej wynosiły ok. 42 %. Po 12 miesiącach przechowywania ze stałych rozproszeń z Gelucire® 44/14 rozpuściło się tylko 11,10 %, a z układu z Gelucire® 50/13 41,04 % itrakonazolu (ryc. 40, 43).



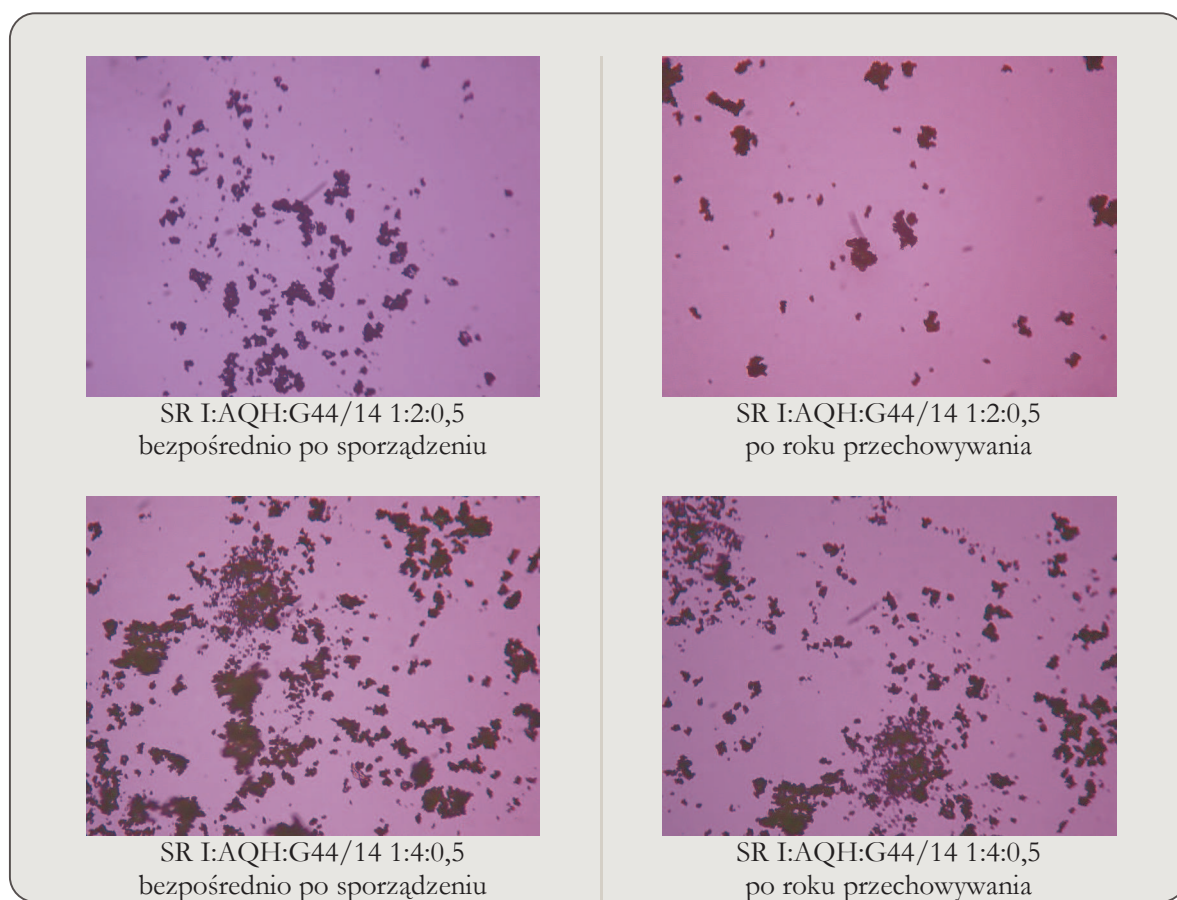
Rycina 35. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) dwuskładnikowych stałych rozproszeń (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



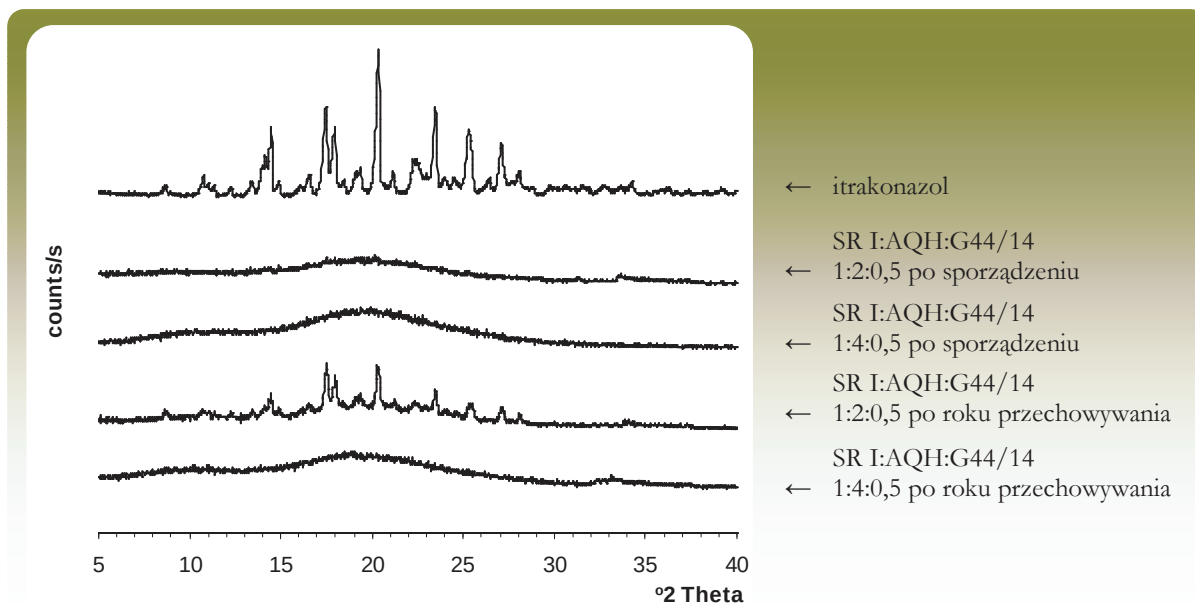
Rycina 36. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu oraz stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



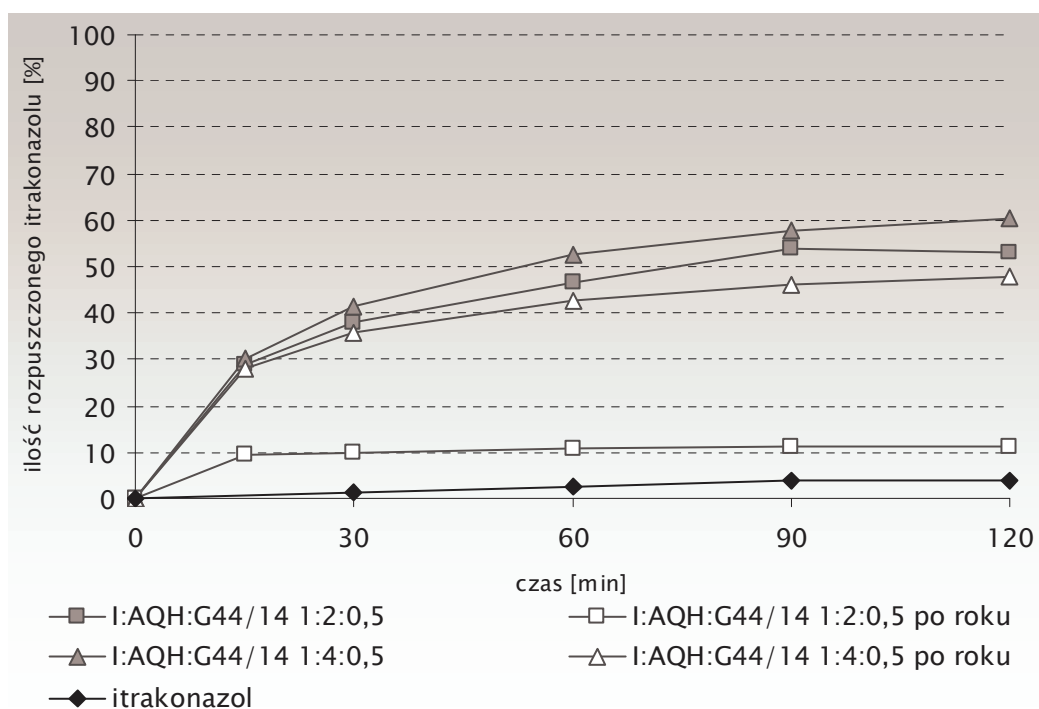
Rycina 37. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT[®] AS-HF bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, $f_2 = 63,62$.



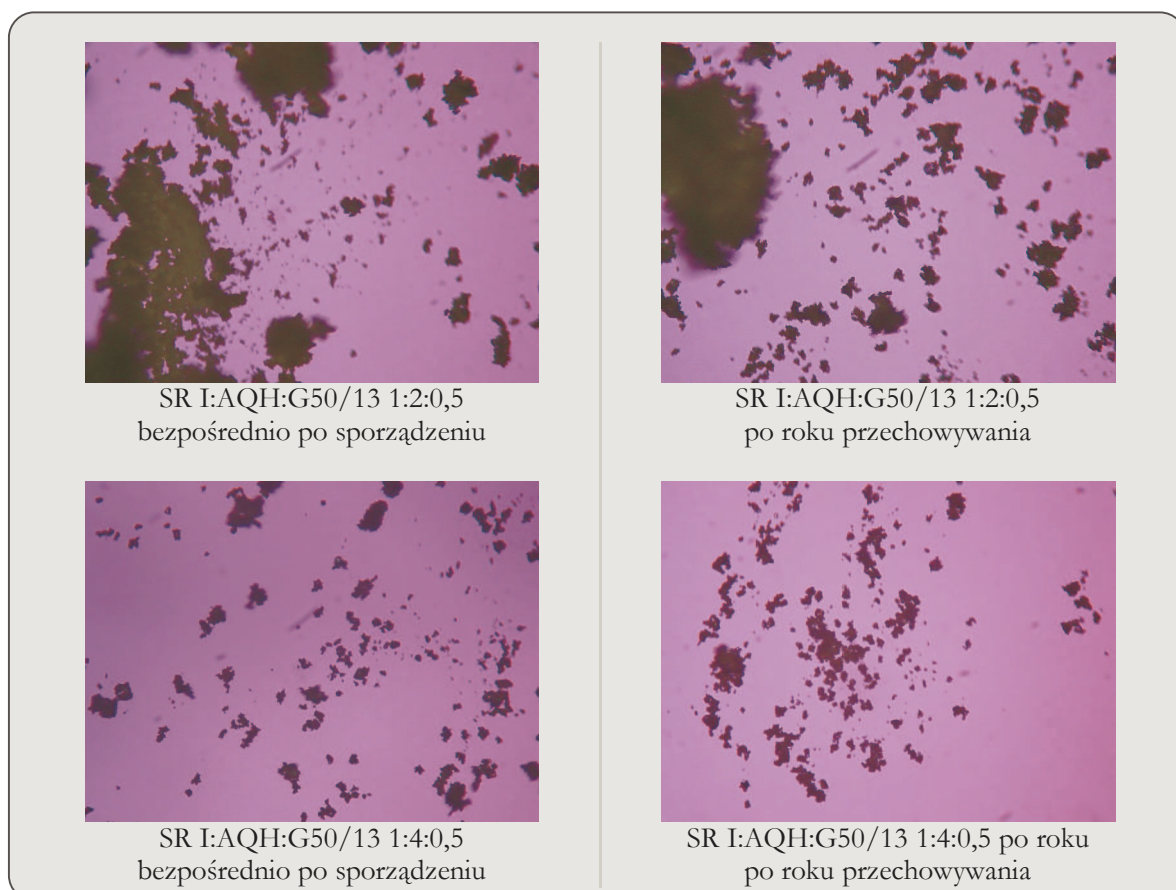
Rycina 38. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100 $\times$) trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



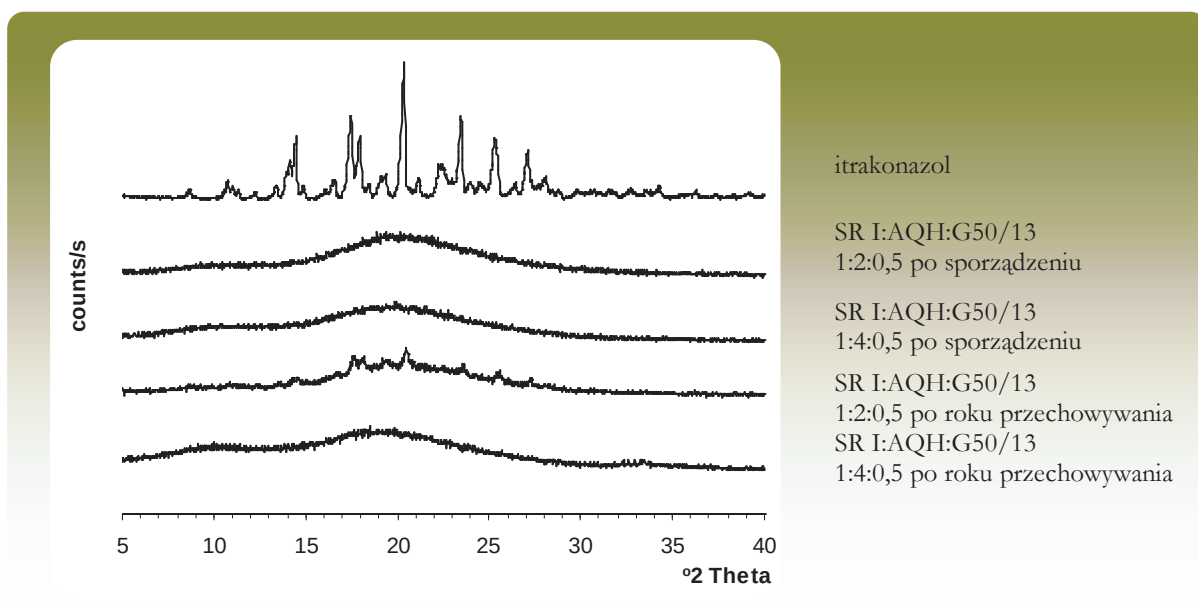
Rycina 39. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu i stałych rozprożeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



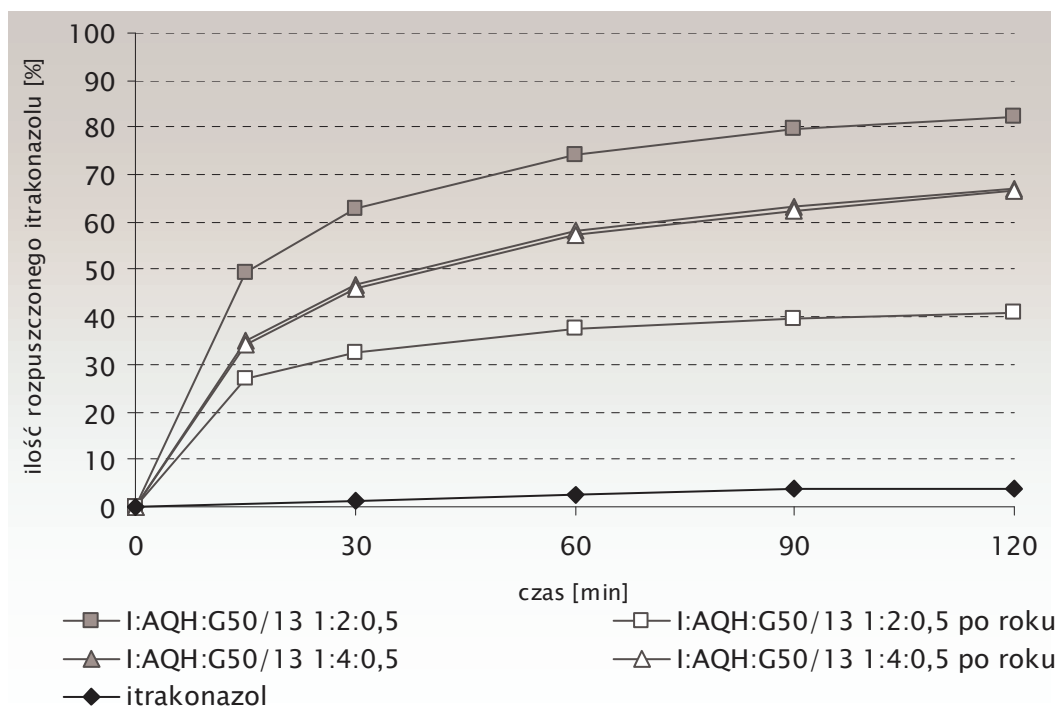
Rycina 40. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozprożeń zawierających AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, f_2 dla 1:4:0,5 = 51,62 dla 1:2:0,5 = 30,68.



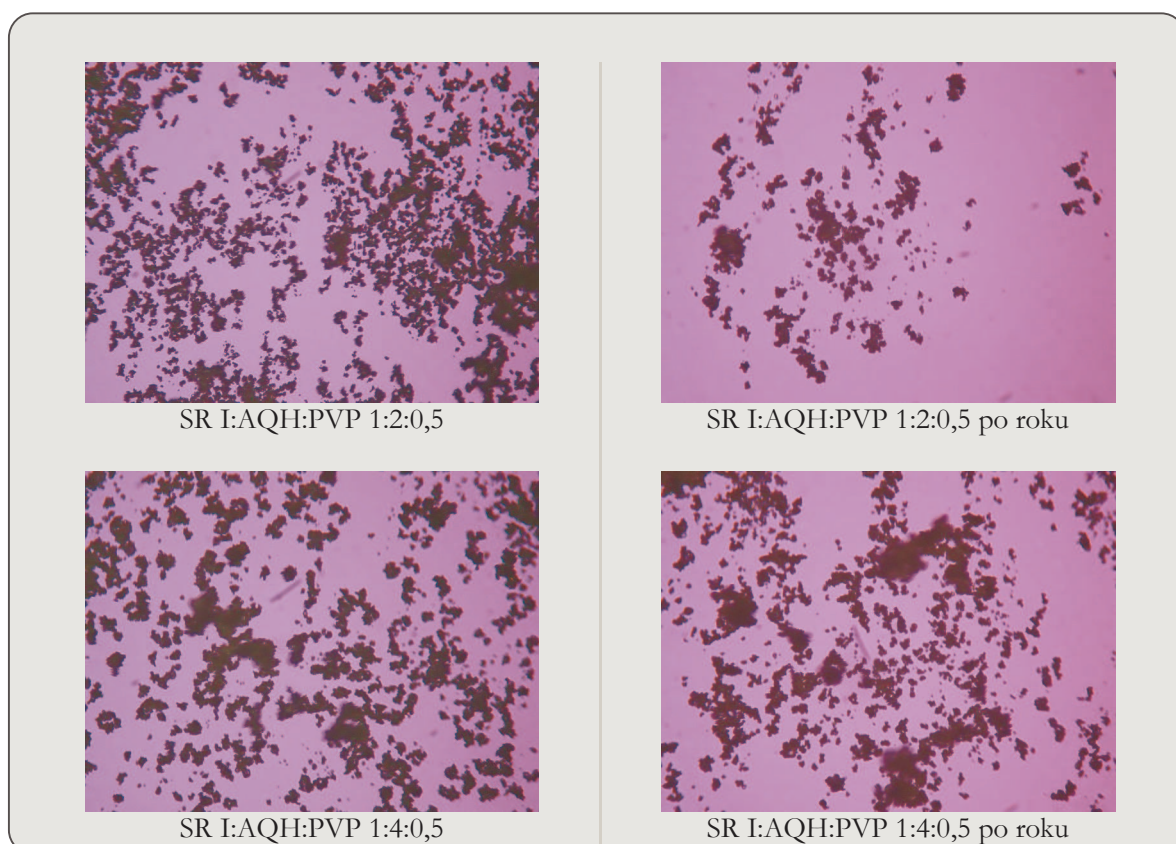
Rycina 41. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



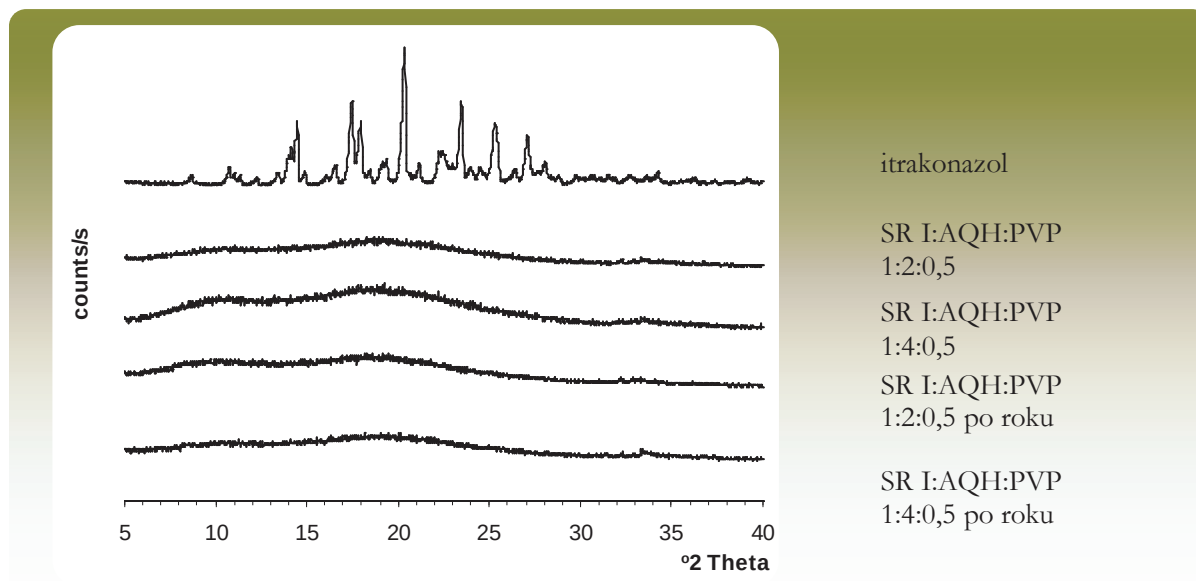
Rycina 42. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu i stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



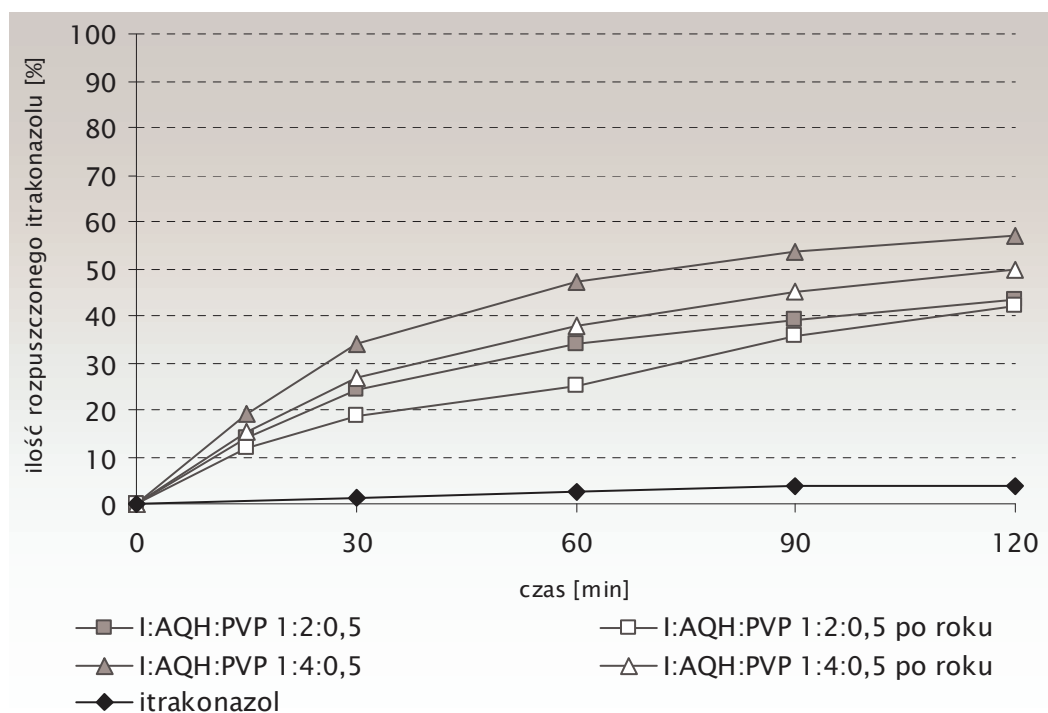
Rycina 43. Profil rozpuszczania itraconazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT[®] AS-HF i Gelucire[®] 50/13 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, f_2 dla 1:4:0,5 = 93,82 dla 1:2:0,5 = 31,25.



Rycina 44. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



Rycina 45. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu i stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i PVP bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.



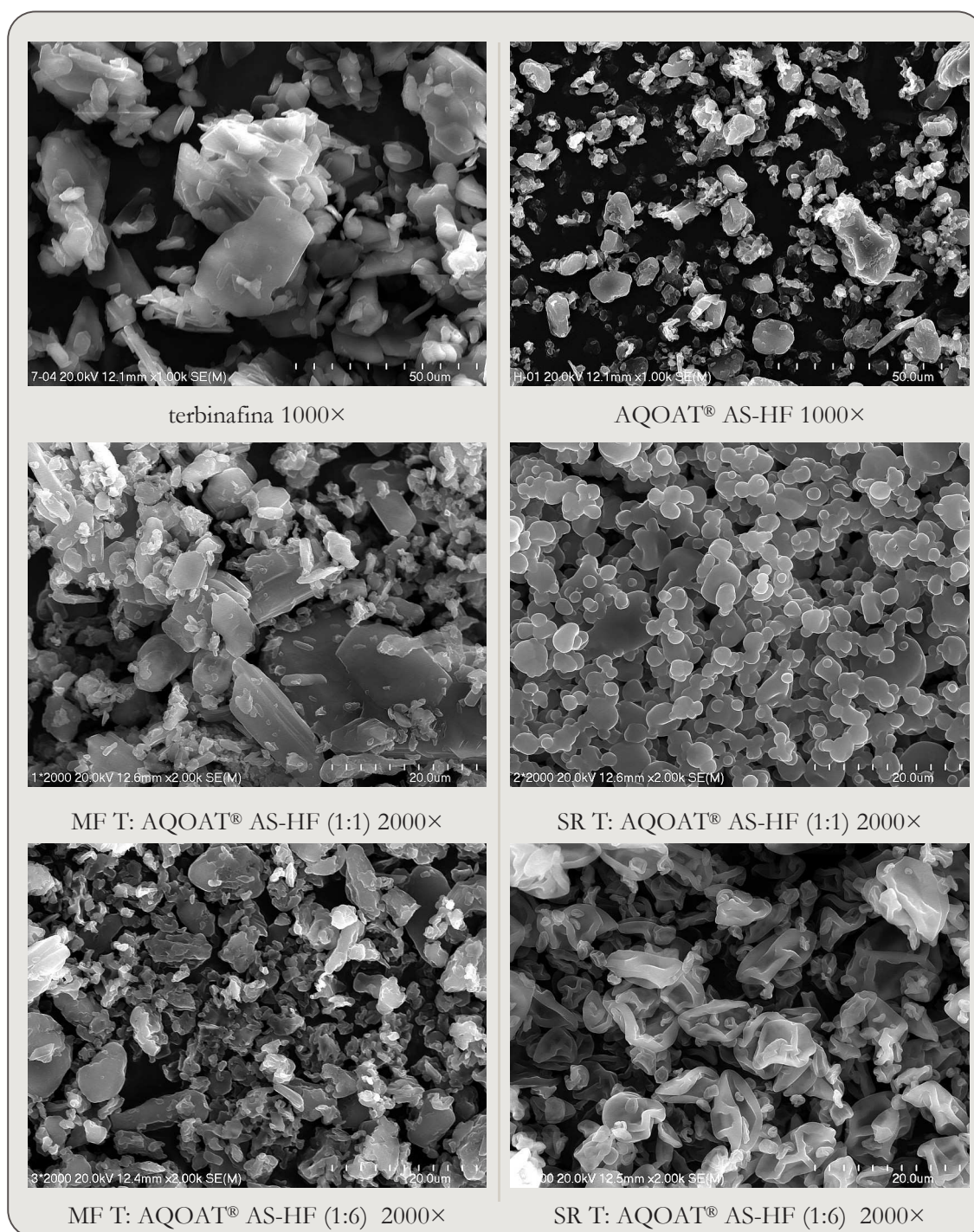
Rycina 46. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF i PVP bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, f_2 dla 1:4:0,5 = 56,00 dla 1:2:0,5 = 59,02.

2. Układy proszkowe z chlorowodorkiem terbinafiny

2.1. Charakterystyka układów

Właściwości układów proszkowych z terbinafiną oceniono w oparciu o wyniki badań mikroskopowych, rentgenograficznych i kalorymetrycznych. W wyniku zastosowanych procesów technologicznych uzyskano stałe rozproszenia w formie białego sypkiego proszku, który w trakcie przechowywania wykazywał tendencję do tworzenia aglomeratów. Po zakończeniu procesu suszenia rozpyłowego występowały trudności z całkowitym opróżnieniem odbieralnika z uwagi na elektryzowanie produktu. Efekt ten nasilał się w przypadku zwiększenia ilości nośnika w stałym rozproszeniu.

Wyniki badań w mikroskopie skaningowym wykazały zmiany w kształcie i wielkości cząstek w zależności od składu. Chlorowodorek terbinafiny jest substancją krystaliczną o wielkości kryształów w granicach od 5 do 80 μm . Cząstki AQOAT[®] mają kształt zaokrąglony. Wielkość cząstek AQOAT[®] AS-HF mieści się w przedziale od 5 do 10 μm . W mieszaninach fizycznych widoczne są kryształy substancji leczniczej oraz cząstki AQOAT[®] (ryc. 47). Stałe rozproszenia (1:1) charakteryzowały się kulistym kształtem cząstek, które tworzyły połączone struktury o wielkości od 2 do 10 μm . Użycie większej ilości AQOAT[®] AS-HF (1:6) zmieniało kształt cząstek na nieregularny i pomarszczony. Zmieniła się także wielkość cząstek, która mieściła się w przedziale od 1 do 20 μm (ryc. 47).



Rycina 47. Substancja lecznicza, nośniki oraz mieszaniny fizyczne (MF) i stałe rozproszenia (SR) terbinafiny (I). Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 1000 i 2000×

2.2. Wpływ wytwarzania stałego rozproszenia na właściwości substancji leczniczej

Dokonano oceny wpływu metody wytwarzania stałych rozproszeń tj. suszenia rozpyłowego oraz użytego nośnika na właściwości terbinafiny. W celach porównawczych badaniom poddano także mieszaniny fizyczne.

2.2.1. Wyniki badań mikroskopowych

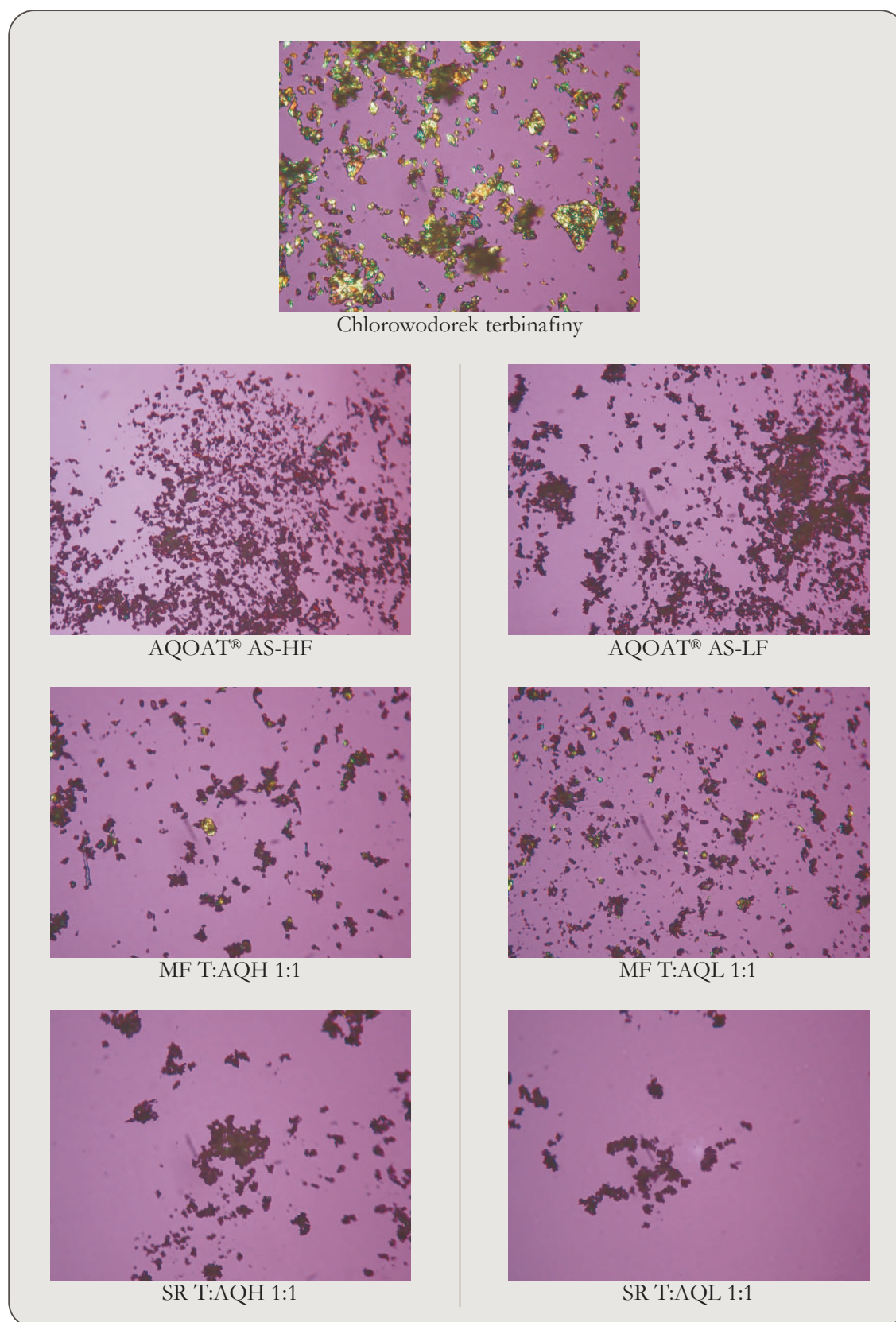
Analiza obrazów mikroskopowych wykazała brak obecności kryształów w stałych rozproszeniach. W świetle spolaryzowanym obserwowano tylko nieregularne skupiska stałych rozproszeń bez efektów załamania promieniowania charakterystycznego dla substancji krystalicznych. Natomiast w mieszaninach fizycznych widoczne były kryształy terbinafiny pomiędzy cząstkami polimerowymi AQOAT[®] (ryc. 48, 49).

2.2.2. Wyniki badań rentgenograficznych

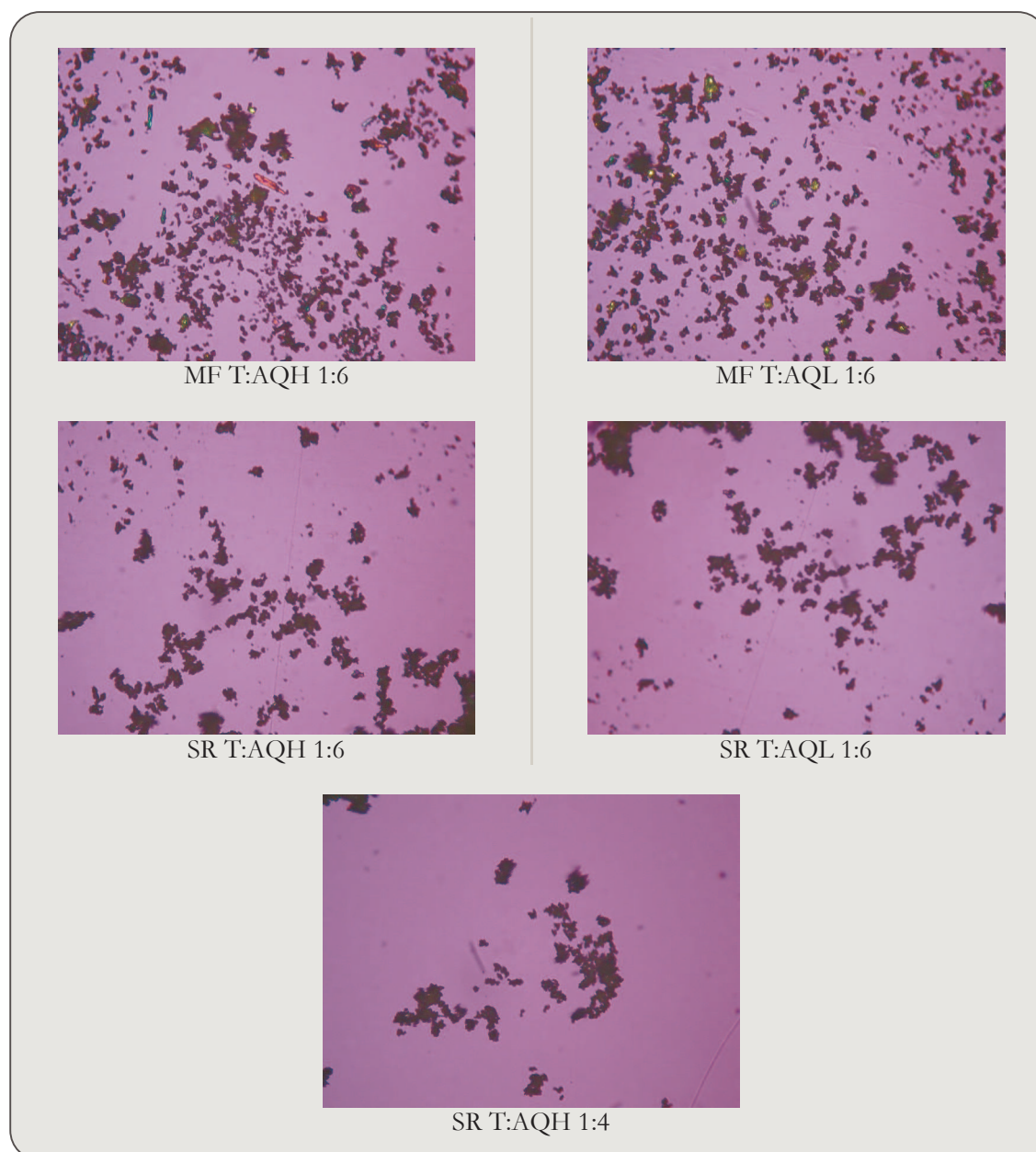
W badaniach rentgenograficznych substancji leczniczej zidentyfikowano piki charakterystyczne dla terbinafiny przy kącie 2Θ 6°, 19°, 20°, 21°, 22°, 24°, 25°, 26°. Analiza rentgenogramów stałych rozproszeń wykazała brak obecności pików typowych dla substancji leczniczej. Charakterystyczne *halo* obserwowano w przypadku układów z AQOAT[®] AS-HF jak i LF. Natomiast na rentgenogramach mieszanin fizycznych widoczne były piki charakteryzujące terbinafinę (ryc. 50, 52).

2.2.3. Wyniki badań różnicowej kalorymetrii skaningowej

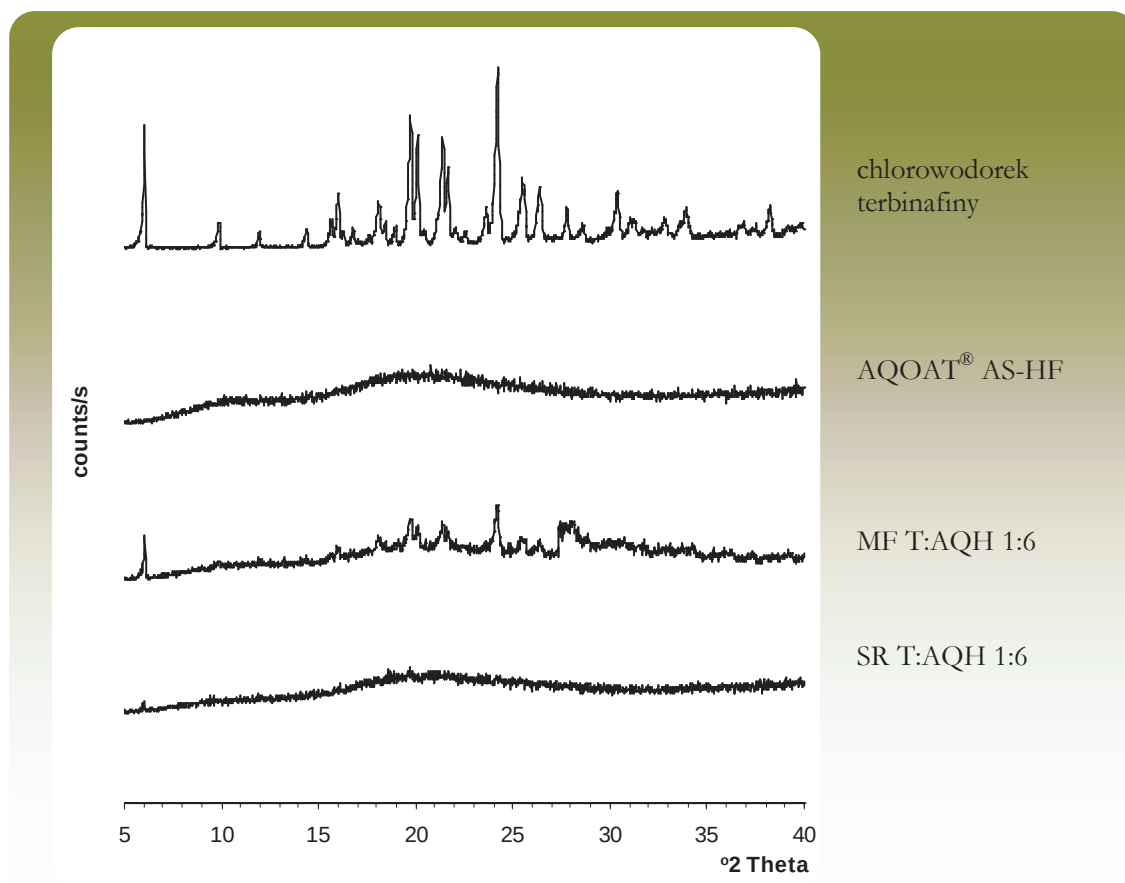
Analiza substancji leczniczej metodą różnicowej kalorymetrii skaningowej wykazała obecność pików endotermicznych w temperaturze 211 °C. Nie stwierdzono natomiast obecności pików przy tej temperaturze w przypadku nośników i sporządzonych układów (ryc. 51, 53).



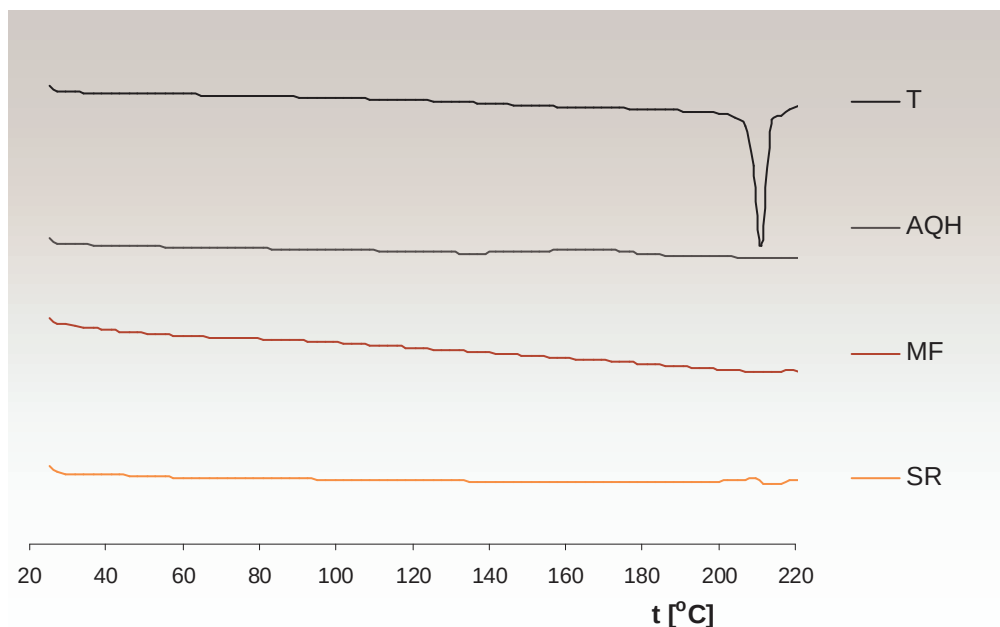
Rycina 48. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). T – chlorowodorek terbinafiny, AQ – AQOAT®, MF – mieszanina fizyczna, SR – stałe rozproszenie.



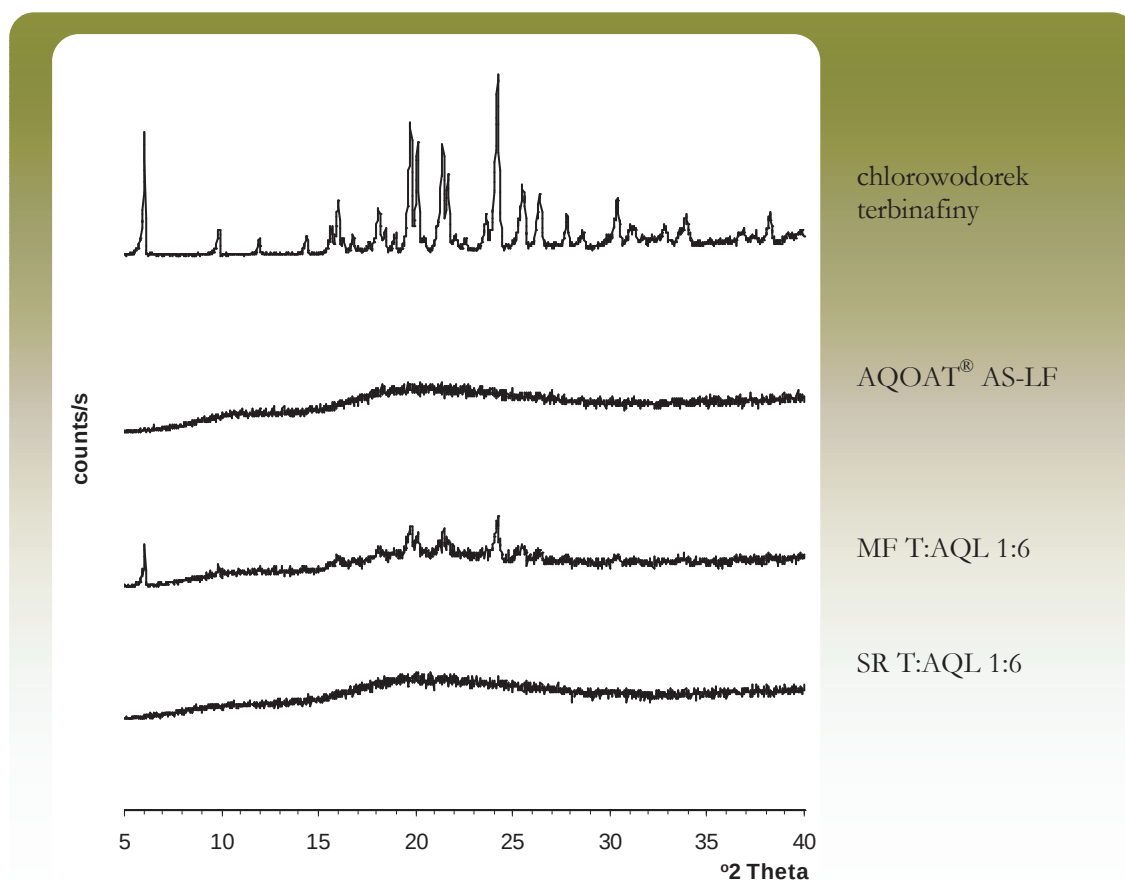
Rycina 49. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). T – chlorowoderek terbinafiny, AQ – AQOAT®, MF – mieszanina fizyczna, SR – stale rozproszenie.



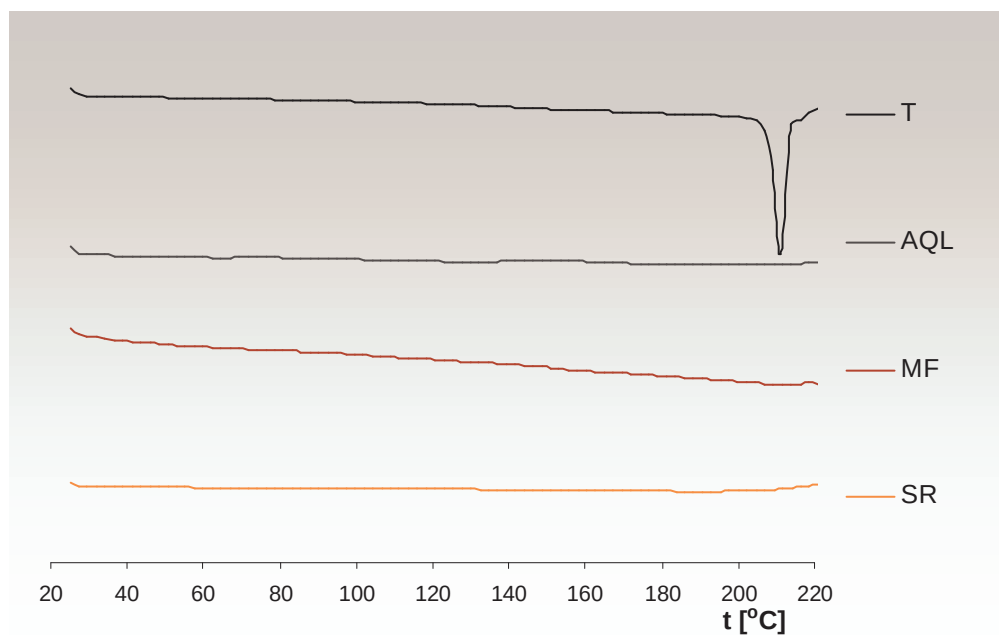
Rycina 50. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny chlorowodoru terbinafiny (T), AQOAT[®] AS-HF, (AQH) mieszaniny fizycznej (MF) i stałego rozproszenia (SR) terbinafiny z AQOAT[®] AS-HF.



Rycina 51. Termogramy DSC terbinafiny (T), AQOAT[®] AS-HF (AQH), stałego rozproszenia (SR), mieszaniny fizycznej (MF) o składzie: T:AQH 1:6.



Rycina 52. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny chlorowodoru terbinafiny (T), AQOAT® AS-LF, (AQL) mieszaniny fizycznej (MF) i stałego rozproszenia (SR) terbinafiny z AQOAT® AS-LF.



Rycina 53. Termogramy DSC terbinafiny (T), AQOAT® AS-LF (AQL), stałego rozproszenia (SR), mieszaniny fizycznej (MF) o składzie: T:AQL 1:6.

2.3. Wpływ składu stałych rozproszeń na profil rozpuszczania terbinafiny

Analiza wyników badań dla stałych rozproszeń wykazała spowolnienie szybkości rozpuszczania chlorowodorku terbinafiny niezależnie od rodzaju AQOAT[®] jak i środowiska uwalniania. W wodzie profil uwalniania przebiegał szybciej. Po 2 godz. z układów (1:1) zawierających zarówno AQOAT[®] AS-HF jak i AS-LF rozpuściło się ok. 60 % substancji leczniczej (tab. 19, ryc. 54), natomiast w środowisku 0,1 mol/l HCl po tym samym czasie rozpuściło się ok. 45 % terbinafiny (ryc. 56). W wyniku zwiększenia ilości nośnika (stałe rozproszenia 1:6) uzyskano również zbliżone wartości ilości rozpuszczonej substancji leczniczej w 0,1 mol/l HCl, jakkolwiek profil rozpuszczania przebiegał wolniej. Po 2 godz. uzyskano mniejszą wartość rozpuszczonej terbinafiny odpowiednio ok. 35 % w porównaniu z samą substancją leczniczą (ryc. 57). Analiza w wodzie wykazała zróżnicowanie w zależności od rodzaju użytego polimeru gdyż z układów zawierających AQOAT[®] AS-HF po 2 godz. rozpuściło się ok. 55,61 %, a z układów z AQOAT[®] AS-LF zaledwie 41,01 % (tab. 20, ryc. 55).

24 godzinna analiza stałego rozproszenia (1:4) wykazała, że po tym czasie rozpuściła się największa ilość substancji leczniczej tj. 67,25 % (ryc. 58).

Analiza mieszanin fizycznych wykazała, że w przypadku AQOAT[®] AS-LF uzyskano zawsze niższe wartości niż w przypadku AQOAT[®] AS-HF. W wodzie po 2 godz. z mieszanin fizycznych z AQOAT[®] AS-HF (1:1) rozpuściło się 68,21 % substancji leczniczej podczas gdy z układu z AQOAT[®] AS-LF 48,64% (tab. 19, ryc. 54). W wyniku zastosowania większej ilości polimeru (1:6) doszło do zmniejszenia różnicy do 10 %. Z mieszanin fizycznych rozpuściło się odpowiednio 44,01 % i 34,45 % (tab. 20, ryc. 55). Zwiększenie różnic pomiędzy układami obserwowano po zmianie środowiska uwalniania. Po 2 godz. rozpuściło się z układu z AQOAT[®] AS-HF 78,57 % tj. ok. 35 % więcej niż z mieszaniny fizycznej z AQOAT[®] AS-LF z taką samą ilością nośnika (43,95 %) (ryc. 56). W przypadku układów (1:6) wartości wynosiły odpowiednio 38,01 % i 21,26 % (ryc. 57).

Tabela 19. Ilość rozpuszczonego w wodzie chlorowodoru terbinafiny (T) ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).

czas [min]	terbinafina [%]		T:AQL 1:1				T:AQH 1:1			
			MF		SR		MF		SR	
		S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}
5	15,85	0,42	6,30	0,03	13,63	0,10	13,37	0,07	12,09	0,19
10	30,15	0,97	11,31	0,09	21,16	0,50	23,26	0,33	18,89	0,55
15	41,12	1,57	15,39	0,15	26,08	0,49	29,57	0,32	24,20	0,67
20	48,80	2,87	18,87	0,20	29,25	0,62	34,43	0,89	28,39	0,87
30	57,83	2,40	24,34	0,33	35,95	0,83	41,33	1,23	34,72	1,06
60	71,65	4,48	35,07	0,63	46,36	1,15	49,98	2,15	46,63	1,50
90	78,76	1,99	43,05	0,91	53,03	1,26	62,75	2,59	54,44	1,30
120	81,62	7,71	48,64	1,15	57,78	1,23	68,21	3,40	60,13	1,65

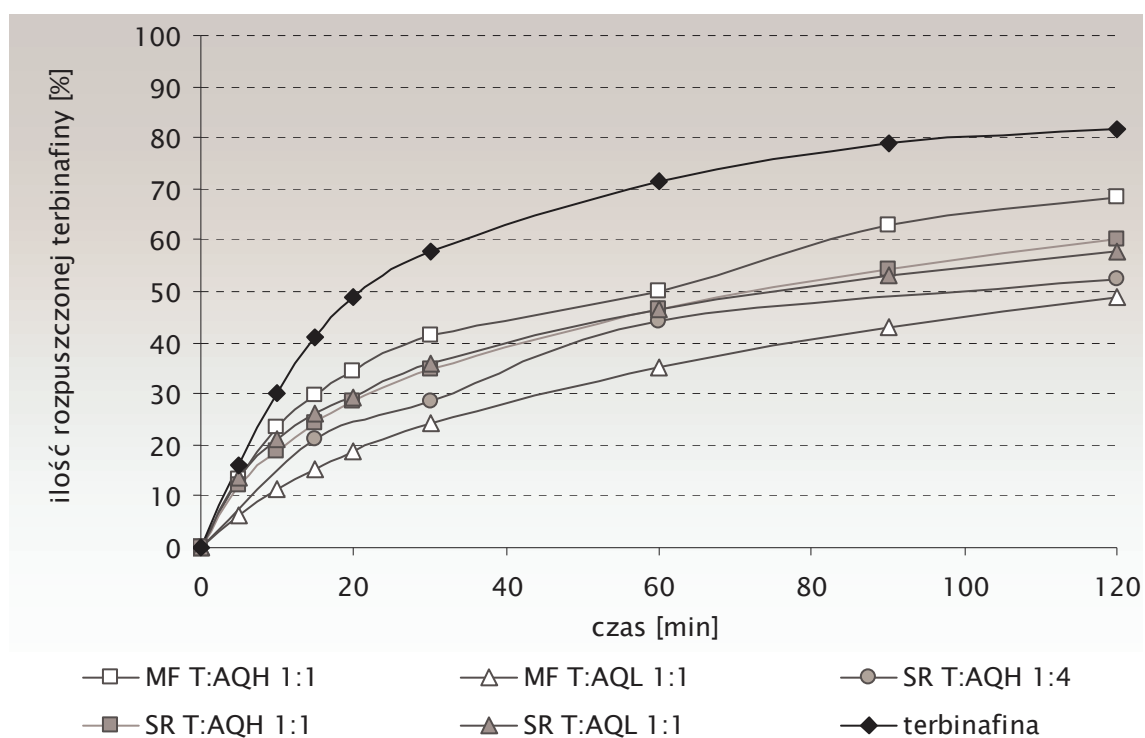
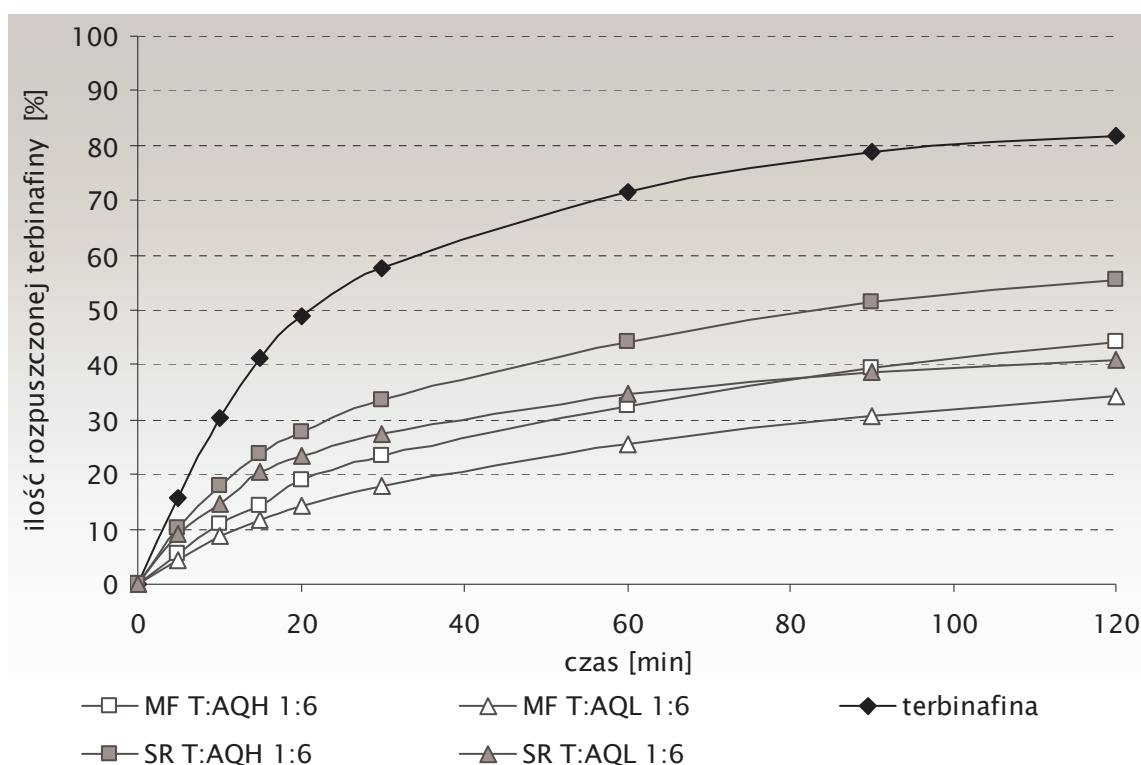
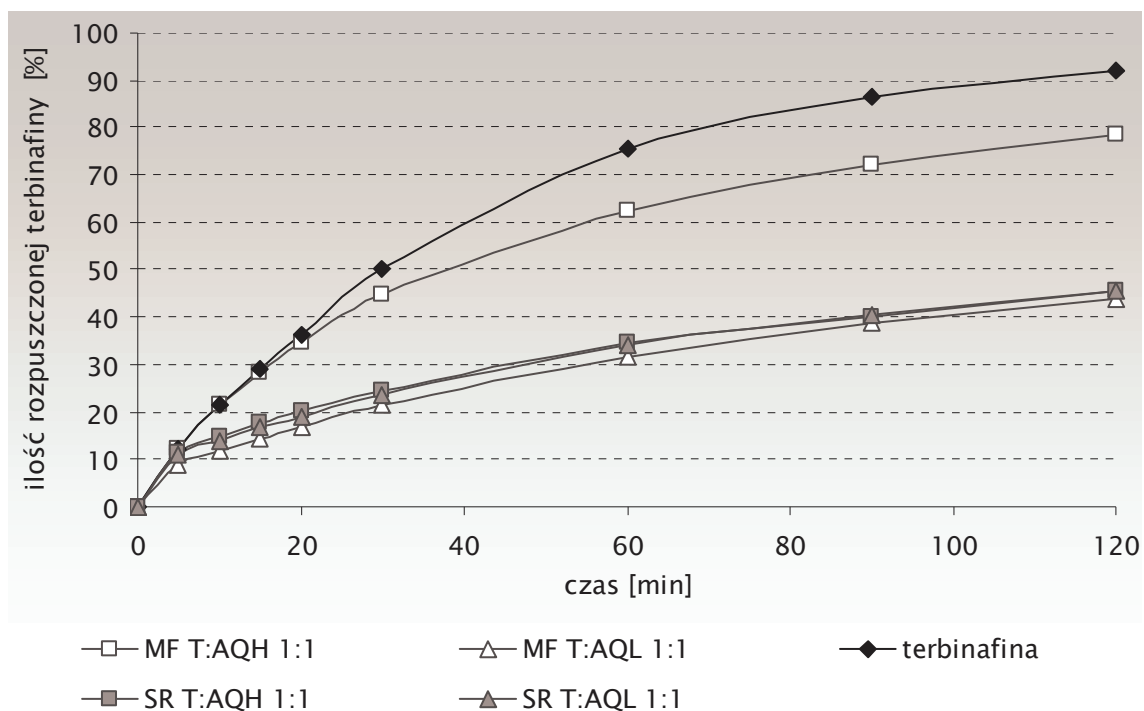
**Rycina 54.** Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w wodzie ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).

Tabela 20. Ilość rozpuszczonego w wodzie chlorowodorku terbinafiny (T) ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).

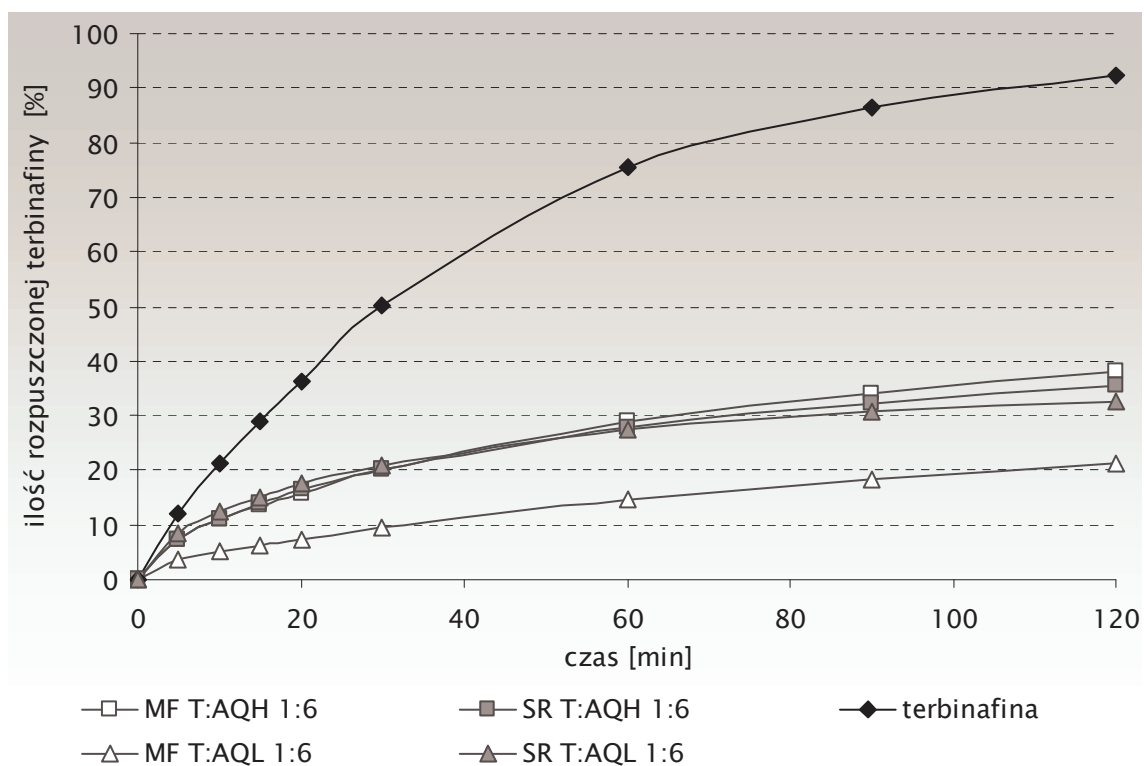
czas [min]	terbinafina [%]	S_{rel}	T :AQL 1:6				T:AQH 1:6			
			MF		SR		MF		SR	
			[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}	[%]	S_{rel}
5	15,85	37,08	4,44	11,20	9,08	5,73	5,30	9,50	10,30	6,44
10	30,15	34,00	8,58	8,77	14,67	5,95	11,12	25,85	17,86	6,99
15	41,12	28,50	11,66	9,00	20,27	6,34	14,31	26,41	23,62	7,88
20	48,80	18,38	14,12	12,18	23,20	6,38	18,83	25,52	27,70	8,81
30	57,83	4,29	17,91	7,98	27,52	6,65	23,38	26,44	33,54	9,11
60	71,65	3,06	25,54	4,64	34,57	7,50	32,58	21,08	44,00	9,61
90	78,76	3,96	30,73	4,67	38,64	7,06	39,33	17,85	51,28	11,34
120	81,62	4,39	34,45	7,00	41,04	6,64	44,01	15,35	55,61	12,22



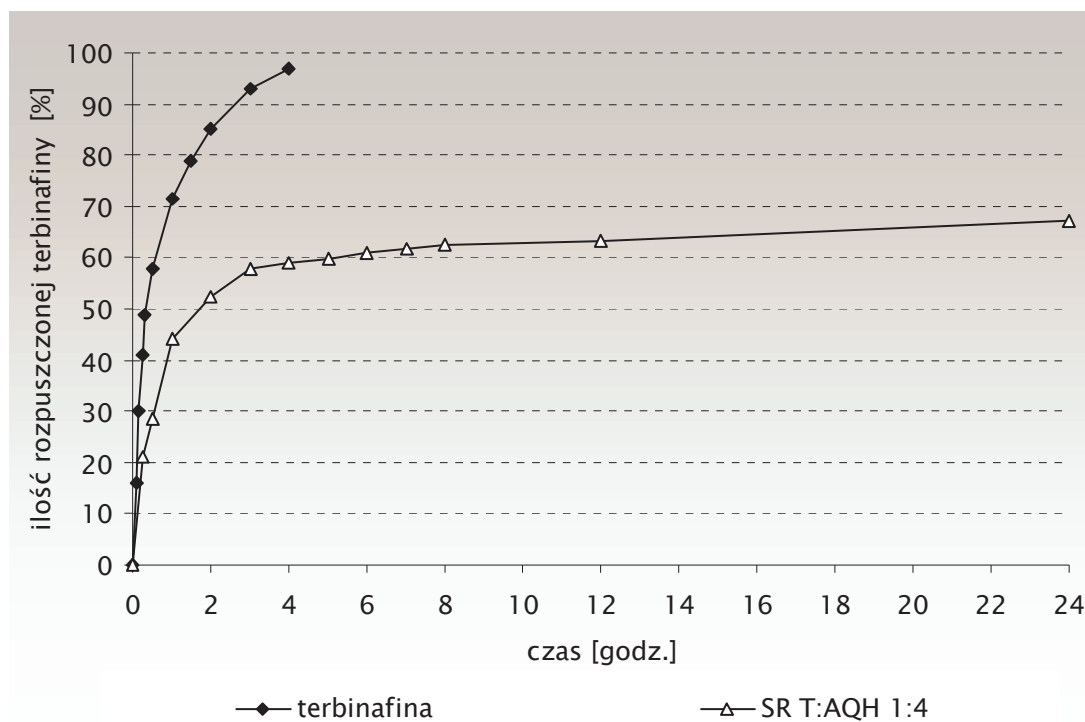
Rycina 55. Profil rozpuszczania chlorowodorku terbinafiny w wodzie ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).



Rycina 56. Profil rozpuszczania chlorowodorku terbinafiny w 0,1 mol/l HCl ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).



Rycina 57. Profil rozpuszczania chlorowodorku terbinafiny w 0,1 mol/l HCl ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).



Rycina 58. Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w wodzie ze stałych rozproszeń (SR).

Charakterystyka procesu rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny przy użyciu modeli matematycznych

W przypadku stałego rozproszenia chlorowodoru terbinafiny (1:4) dopasowanie profilu 24 godzinowego badania szybkości rozpuszczania do pojedynczego modelu kinetycznego było utrudnione. Najlepsze wyniki uzyskano przy zastosowaniu modelu Korsmeyer-Peppas ($R^2 = 0,853$) i modelu empirycznego Weibulla ($R^2 = 0,886$). Ze względu na stosunkowo niskie wartości R^2 zastosowano metodę regresji przedziałowej. Analizowano kinetykę procesu rozpuszczania w przedziałach 0-3 godz. i 3-12 godz. uzyskując w obu przedziałach najlepsze dopasowanie do modelu Korsmeyer-Peppas (tab. 21).

Tabela 21. Charakterystyka procesu rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny (THCl) z układów proszkowych 1:4 przy użyciu modelu matematycznego.

Stale rozproszenie THCl:AQOAT® AS-HF 1:4	Model matematyczny		
	równanie Korsmeyer-Peppas		
	K [godz ^{-N}]	N	R ²
0 – 3 godz.	39,07	0,419	0,972
3 – 12 godz.	53,78	0,070	0,999

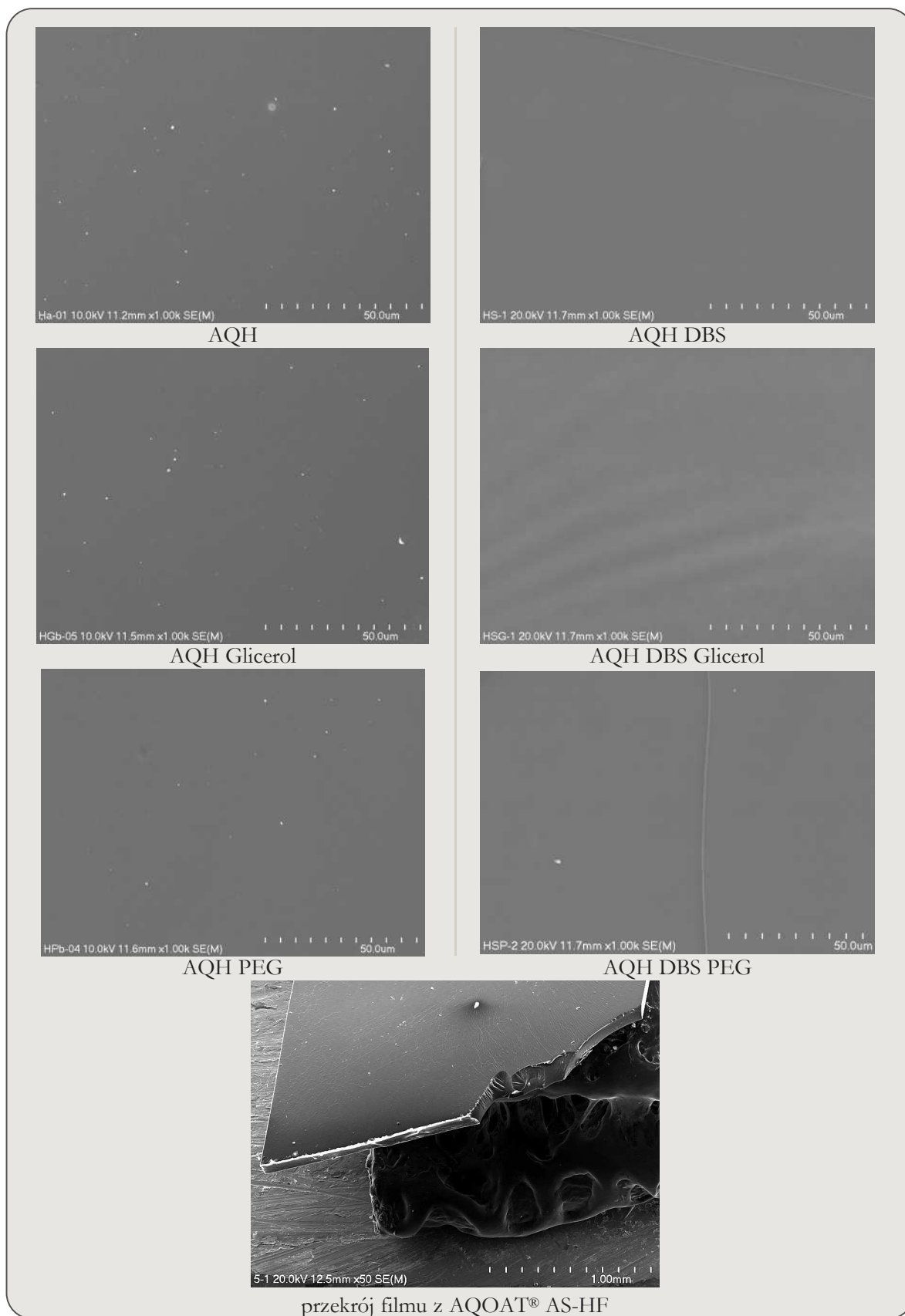
3. Lakiery do paznokci z terbinafiną

Sporządzono 26 lakierów zawierających układ terbinafina : AQOAT® (1:4) o różnej zawartości plastifikatorów (tab. 11 - 13). Wszystkie formułacje były lepкими, opalizującymi cieczami, które po rozprowadzeniu na gładkiej powierzchni tworzyły po odparowaniu rozpuszczalnika jednorodny film.

3.1. Charakterystyka filmów otrzymanych z lakierów do paznokci

Lakiery rozprowadzone na powierzchni szklanej płytki Petriego tworzyły po odparowaniu rozpuszczalnika przeźroczyste jednorodne filmy o lekko żółtawym zabarwieniu. Grubość filmów wynosiła od 0,1 do 0,2 mm. Filmy sporządzone z lakierów bez plastifikatora w trakcie przechowywania stawały się kruche. Poprawę ich jakości uzyskano po wprowadzeniu do formułacji cytrynianu trietylu, PEG-u lub glicerolu. Natomiast dodatek sebacynianu dibutyłu tylko w niewielkim stopniu wpłynął na poprawę elastyczności filmów. Stwierdzono także większą zawartość wilgoci w filmach zawierających glicerol lub PEG (od 3,5 do 6,5 %) niż miało to miejsce w przypadku filmów z DBS (1-2 %).

Powierzchnię filmów analizowano w mikroskopie elektronowym. Filmy charakteryzują się gładką powierzchnią i zwartą, jednolitą strukturą. Nie obserwowano różnic w wyglądzie powierzchni w zależności od użytego plastifikatora (ryc. 59).



Rycina 59. Obrazy mikroskopowe powierzchni (powiększenie 1000 ×) i przekroju (powiększenie 50 ×) filmów z AQOAT® AS-HF (AQH) i plastyfikatorami sporządzone przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.

3.2. Wpływ składu lakierów na szybkość uwalniania terbinafiny z filmów

3.2.1. Rozpuszczalnik aceton/woda

W oparciu o wyniki badań szybkości uwalniania terbinafiny z filmów stwierdzono różnice w ilości uwolnionej substancji leczniczej w zależności od rodzaju AQOAT®. Po 24 godz. z filmu z AQOAT® AS-HF uwolniło się 38,4 %, a w przypadku filmu z AQOAT® AS-LF – 25,69 % substancji leczniczej (tab. 22, 23, ryc. 60). Zastosowanie plastyfikatorów: glicerolu, PEG-u, TEC wpłynęło na zwiększenie szybkości uwalniania terbinafiny.

Wprowadzenie PEG-u lub glicerolu w ilości 10 % spowodowało całkowite uwolnienie terbinafiny z filmów z AQOAT® AS-HF po 24 godz. Natomiast w przypadku zastosowania TEC jako plastyfikatora po tym samym czasie uwolniło się 61,51 % substancji czynnej w porównaniu z wyżej opisanymi filmami (tab. 22, ryc. 60).

Z wszystkich rodzajów filmów zawierających stałe rozproszenie z AQOAT® AS-LF oraz plastyfikator uzyskano mniejsze ilości uwolnionej substancji leczniczej. Najlepsze wyniki uzyskano dla układów zawierających PEG, gdyż po 24 godz. uwolniło się 59,70 %. Z filmów zawierających TEC lub glicerol po tym samym czasie uwolniło się odpowiednio 47,04 % i 43,64 %. (tab. 23, ryc. 60).

Wprowadzenie DBS do składu filmów wpłynęło na uwalnianie. Ilość uwolnionej substancji leczniczej po 24 godz. była mniejsza w porównaniu z wynikami uzyskanymi w przypadku filmów zawierających tylko polimerowy nośnik. Po 24 godz. uwolniło się tylko 20,78 % terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF i 10,82 % substancji leczniczej z formułacji zawierającej AQOAT® AS-LF.

Dodatek PEG lub glicerolu podobnie jak w przypadku filmów bez DBS zwiększył ilość uwolnionej substancji czynnej. Po 24 godz. uwolniło się odpowiednio 78,51 % lub 62,96 % terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF, natomiast z formułacji z AQOAT® AS-LF uwolniło się odpowiednio 42,88 % i 39,93 % (tab. 24, 25, ryc. 61).

Stwierdzono również zmiany w wyglądzie filmów utrzymywanych przez 24 godz. w środowisku uwalniania. Filmy bez plastyfikatorów lub zawierające w swoim składzie DBS lub TEC nie traciły elastyczności. Filmy z dodatkiem PEG-u lub glicerolu pęczniały,

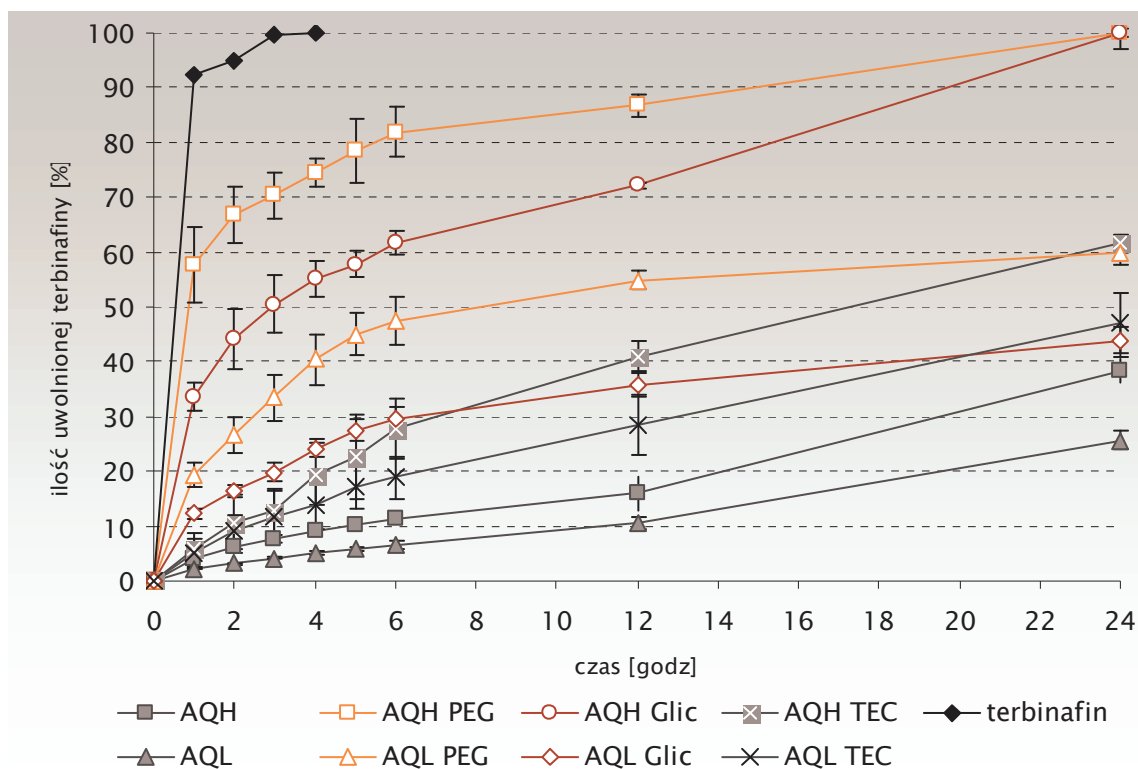
były kruche i mało elastyczne. Wszystkie filmy po 24 godz. były nieprzeźroczyste i białe (ryc. 62).

Tabela 22. Ilość uwolnionego chlorowodoru terbinafiny z filmów z AQOAT® AS-HF z dodatkiem plastyfikatorów.

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-HF			
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]	TEC [%]
1	92,38	4,01	33,58	57,70	5,72
2	92,83	6,09	44,16	66,85	10,43
3	99,70	7,78	50,51	70,34	12,73
4	100,00	9,18	54,94	74,50	19,51
5		10,24	57,84	78,34	22,64
6		11,26	61,70	81,89	27,75
12		15,93	72,25	86,74	40,98
24		38,40	100,00	100,00	61,51

Tabela 23. Ilość uwolnionego chlorowodoru terbinafiny z filmów z AQOAT® AS-LF z dodatkiem plastyfikatorów

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-LF			
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]	TEC [%]
1	92,38	2,18	12,30	19,26	5,21
2	92,83	3,20	16,54	26,67	9,04
3	99,70	4,17	19,89	33,42	11,74
4	100,00	5,02	24,22	40,41	13,96
5		5,87	27,49	45,06	17,34
6		6,61	29,55	47,58	18,84
12		10,51	35,82	54,92	28,44
24		25,69	43,64	59,70	47,04



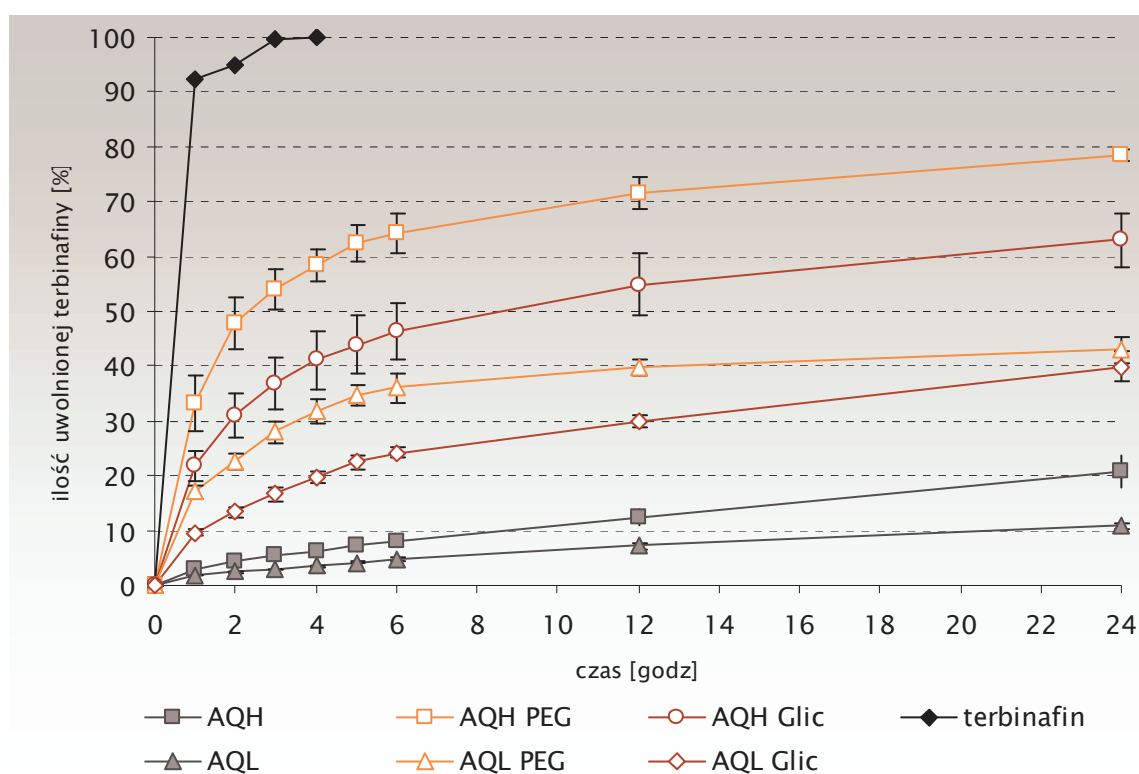
Rycina 60. Szybkość uwalniania chlorowodoru terbinafiny z filmów z AQOAT® oraz z dodatkiem plastyfikatorów. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.

Tabela 24. Ilość uwolnionego chlorowodoru terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF, DBS oraz PEG i glicerol.

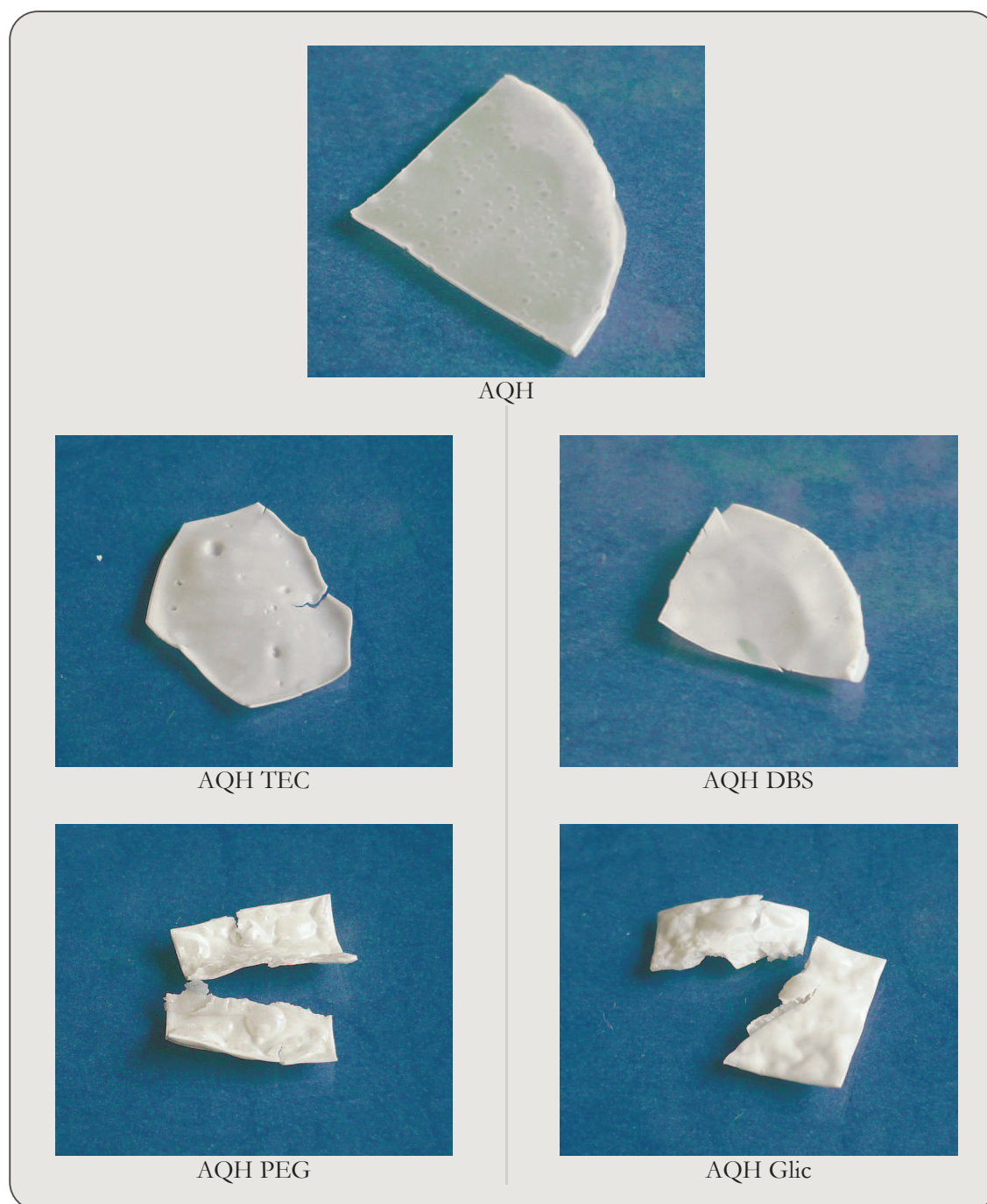
czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-HF, DBS		
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]
1	92,38	3,06	21,74	33,35
2	92,83	4,36	30,98	47,82
3	99,70	5,42	36,84	53,91
4	100,00	6,38	41,22	58,45
5		7,17	43,84	62,38
6		8,06	46,25	64,15
12		12,42	54,87	71,41
24		20,78	62,96	78,51

Tabela 25. Ilość uwolnionego chlorowodoru terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-LF, DBS oraz PEG i glicerol.

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-LF, DBS		
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]
1	92,38	1,68	9,63	17,09
2	92,83	2,38	13,43	22,79
3	99,70	3,01	16,69	27,92
4	100,00	3,55	19,65	31,67
5		4,15	22,45	34,57
6		4,74	24,25	36,01
12		7,16	29,86	39,71
24		10,82	39,93	42,88



Rycina 61. Szybkość uwalniania chlorowodoru terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-LF, DBS oraz PEG lub glicerol. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.



Rycina 62. Zdjęcia filmów z AQOAT® AS-HF (AQH) i plastyfikatorami po badaniu szybkości uwalniania.

3.2.2. Rozpuszczalnik etanol/aceton/woda

W oparciu o wyniki badań szybkości uwalniania terbinafiny z filmów stwierdzono różnice w ilości uwolnionej substancji leczniczej w zależności od rodzaju użytego AQOAT®. Po 24 godz. z filmu z AQOAT® AS-HF lub AQOAT® AS-LF uwolniło się odpowiednio 41,70 % i 20,07 % substancji leczniczej (tab. 26, 27, ryc. 63). Dodatek plastyfikatorów PEG lub glicerolu powodował zwiększenie ilości uwolnionej substancji czynnej. Po 24 godzinach z układów tych przeszło do roztworu 89,38 % i 71,89 % terbinafiny, natomiast z filmów z AQOAT® AS-LF odpowiednio 66,35 % i 61,29 % (tab. 26, 27, ryc. 63).

W porównaniu z wynikami uzyskanymi w badaniu filmów bez plastyfikatorów użycie DBS wpłynęło na zmniejszenie ilości uwolnionej substancji leczniczej. W przypadku AQOAT® AS-HF o 23 %, dla AQOAT® AS-LF o 8 %. Wprowadzenie kolejnych plastyfikatorów: PEG i glicerol zwiększyło ilość uwolnionej substancji. Zastosowanie podwójnego układu plastyfikatorów z PEG lub glicerolem do filmu z AQOAT® AS-HF skutkowało zwiększeniem ilości rozpuszczonej substancji leczniczej do wartości odpowiednio 80,78 % i 69,96 % (tab. 28, ryc. 64) w przypadku AQOAT® AS-LF 62,02 % i 59,88 % (tab. 29, ryc. 64).

Tabela 26. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF oraz PEG i glicerol.

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-HF		
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]
1	92,38	4,05	25,42	57,15
2	92,83	5,92	36,84	69,94
3	99,70	7,39	40,45	75,95
4	100,00	8,94	46,14	76,84
5		10,32	48,26	78,92
6		11,58	50,33	80,33
12		17,35	60,13	85,60
24		41,70	71,89	89,38

Tabela 27. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-LF oraz PEG i glicerol.

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-LF		
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]
1	92,38	1,67	14,56	11,10
2	92,83	2,50	20,60	17,87
3	99,70	3,19	22,78	22,88
4	100,00	3,70	26,89	26,77
5		4,52	28,73	29,47
6		4,57	30,22	31,65
12		7,99	34,08	36,11
24		20,07	61,29	66,35

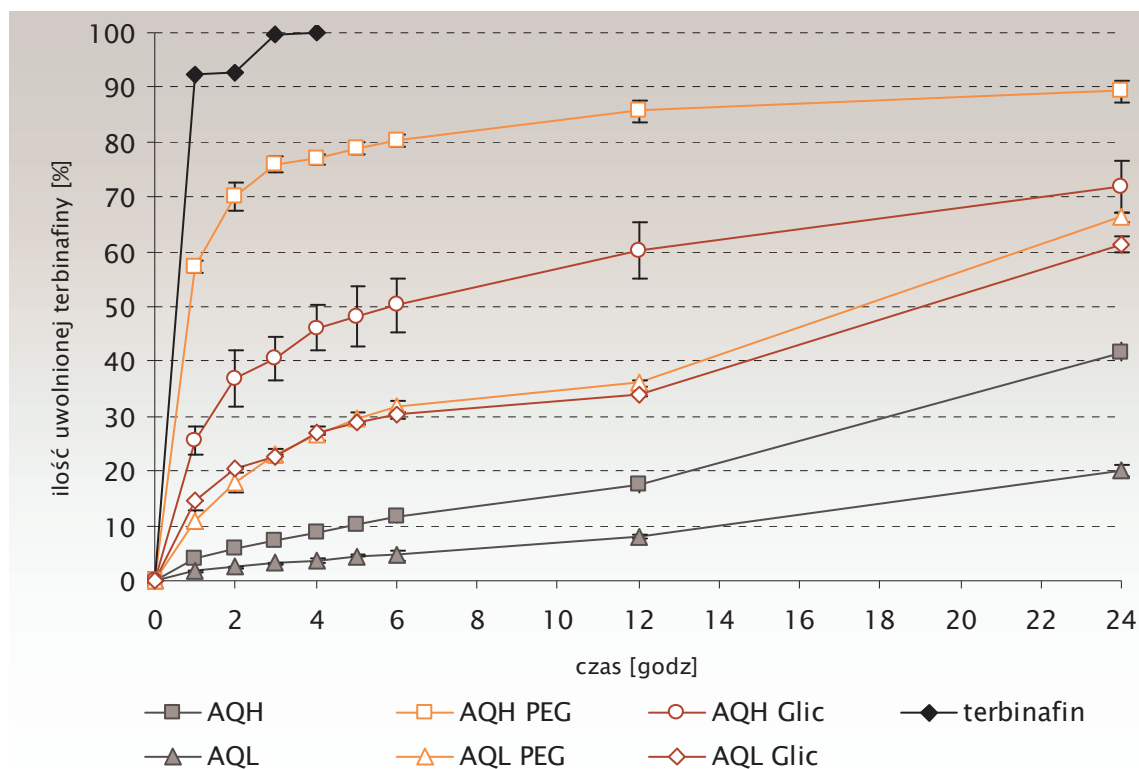
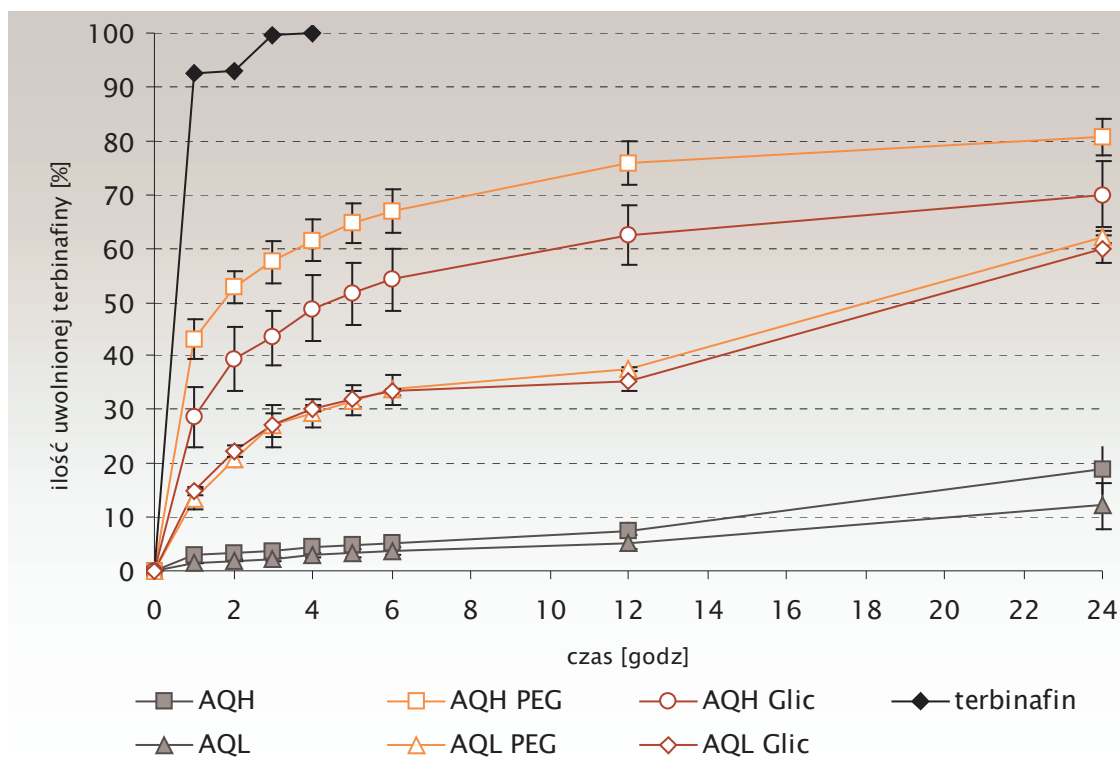
**Rycina 63.** Szybkość uwalniania chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® oraz plastyfikatory. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.

Tabela 28. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF, DBS oraz PEG i glicerol.

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-HF, DBS		
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]
1	92,38	2,91	28,53	43,02
2	92,83	3,31	39,36	52,70
3	99,70	3,80	43,42	57,56
4	100,00	4,42	48,87	61,44
5		4,85	51,49	64,68
6		5,38	54,14	66,90
12		7,26	62,58	75,89
24		18,81	69,96	80,78

Tabela 29. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających DBS, AQOAT® AS-LF oraz PEG i glicerol.

czas [godz]	terbinafina [%]	AQOAT® AS-LF, DBS		
		- [%]	Glicerol [%]	PEG [%]
1	92,38	1,57	14,91	13,21
2	92,83	1,92	22,30	20,78
3	99,70	2,22	27,06	27,04
4	100,00	2,99	30,24	29,36
5		3,35	31,99	31,73
6		3,75	33,44	33,73
12		5,36	35,33	37,51
24		12,14	59,88	62,02

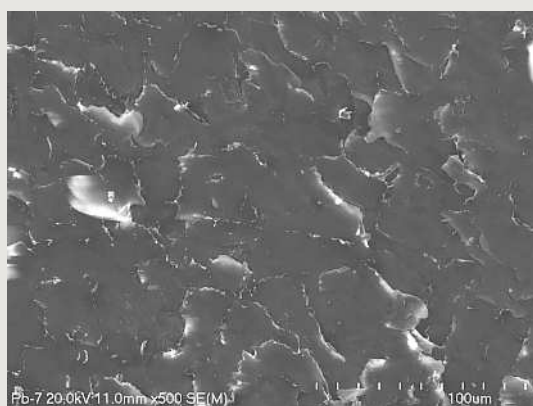


Rycina 64. Szybkość uwalniania chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® DBS oraz PEG lub glicerol. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.

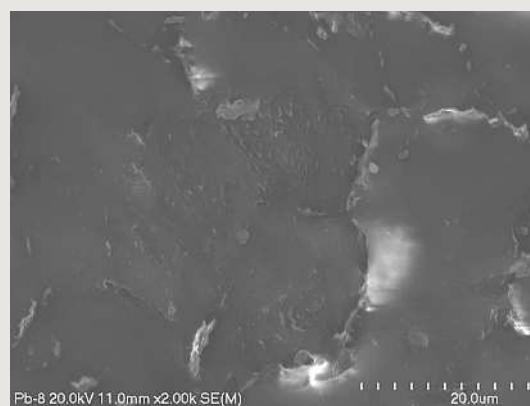
3.3. Wpływ nośnika i plastyfikatorów na przenikanie terbinafiny przez membrany

3.3.1. Charakterystyka membran otrzymanych z kopyt wołowych

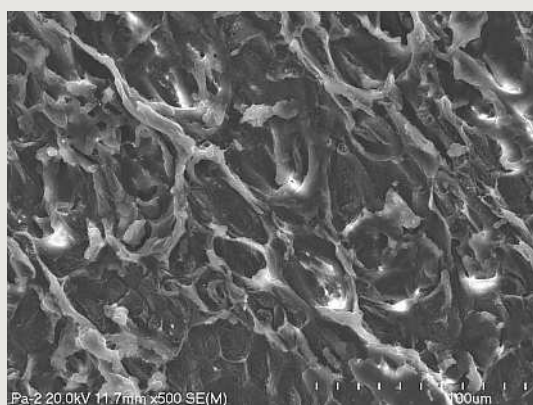
W badaniach użyto jako modelową barierę dyfuzyjną, membranę pozyskaną z kopyt wołowych. Z tego względu dokonano mikroskopowej analizy porównawczej, przy użyciu mikroskopu elektronowego zewnętrznej i wewnętrznej powierzchni płytki paznokciowej oraz powierzchni membrany otrzymanej z kopyt wołowych. Jak widać na rycinie 65, zewnętrzna powierzchnia płytki paznokciowej jest zwarta, w przeciwieństwie do warstwy wewnętrznej która jest mocno pofałdowana. Na powierzchni membran z kopyt wołowych widoczne są wgłębienia, natomiast membrana tworzy jednolitą strukturę (ryc. 65).



plytka paznokciowa strona zewnętrzna 500×



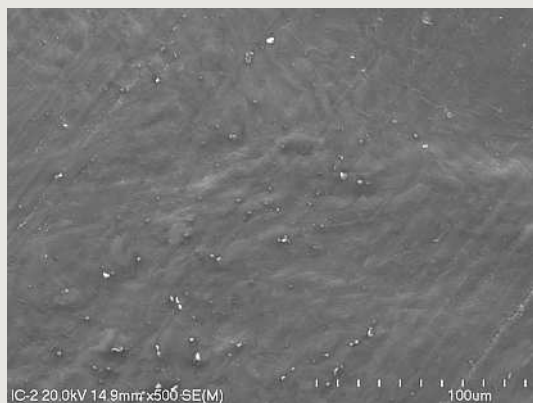
plytka paznokciowa strona zewnętrzna 2000×



plytka paznokciowa strona wewnętrzna 500×



plytka paznokciowa strona wewnętrzna 2000×



membrana otrzymana z kopyt wołowych
500×



membrana otrzymana z kopyt wołowych 2000×

Rycina 65. Obrazy mikroskopowe powierzchni płytki paznokciowej i membrany otrzymanej z kopyt wołowych sporządzone przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.

3.3.2. Wyniki badań przenikania

Dokonano oceny lakierów zawierających oba rodzaje AQOAT[®] i plastyfikatory w oparciu o wyniki badań szybkości przenikania chlorowodorku terbinafiny przez membrany pozyskane z kopyt wołowych. Wykazano zróżnicowanie wyników badań zależne od grubości membrany i rodzaju użytego nośnika.

W przypadku zastosowania membran o grubości ok. 150 μm i powierzchni 1 cm^2 do roztworu akceptorowego przeszło po 5 dniach od 1,63 mg do 2,2 mg chlorowodorku terbinafiny w zależności od składu formułacji. Nie obserwowano znacznego wpływu formułacji na przenikanie substancji czynnej (ryc. 66).

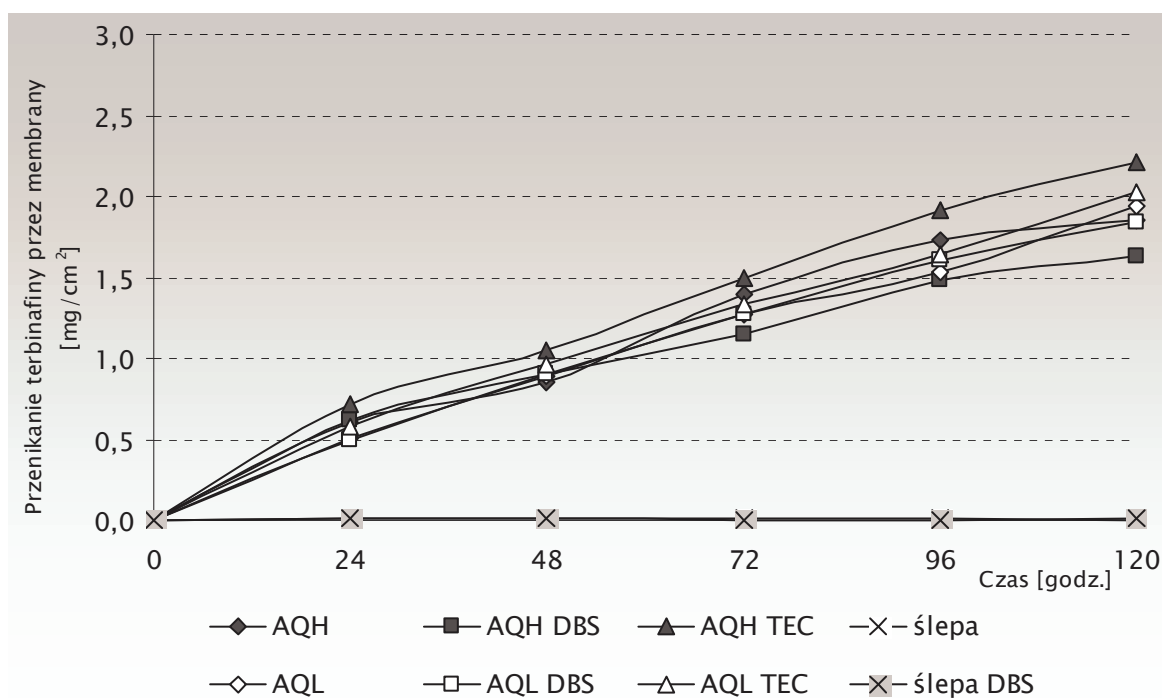
Zwiększenie grubości membrany wpłynęło na spowolnienie szybkości przenikania. Po tym samym czasie uzyskano wyniki w granicach od 0,49 mg/cm^2 do 1,07 mg/cm^2 . Ponadto stwierdzono również zmniejszenie szybkości przenikania terbinafiny ze wszystkich formułacji zawierających AQOAT[®] AS-LF w porównaniu z formułacjami zawierającymi AQOAT[®] AS-HF (ryc. 67). W przypadku układów z AQOAT[®] AS-LF nie zawierających plastifikatora, po 5 dniach do płynu akceptorowego przeniknęło 0,84 mg/cm^2 substancji leczniczej, a z układów z AQOAT[®] AS-HF 1,07 mg/cm^2 substancji leczniczej. Podobne zależności stwierdzono w przypadku formułacji z plastifikatorami (ryc. 67).

Charakterystyka procesu przenikania chlorowodorku terbinafiny przy użyciu modeli matematycznych

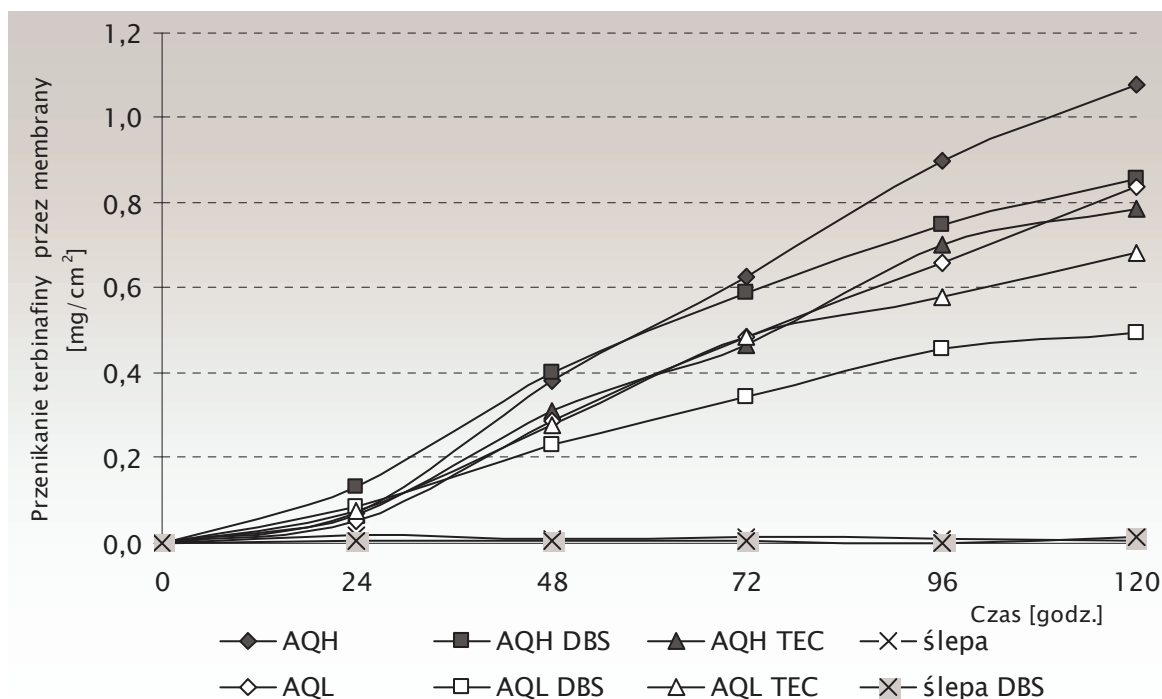
W przypadku badań przenikania chlorowodorku terbinafiny z lakierów z AQOAT[®] AS-HF przez modelowe membrany z kopyt wołowych uzyskano zgodność procesu z kinetyką zerowego rzędu. Współczynniki korelacji świadczą o dobrej zgodności kinetyki przenikania także z modelem Korsmeyer-Peppas (tab. 30).

Tabela 30. Charakterystyka procesu przenikania chlorowodorku terbinafiny (THCl) z lakierów z AQOAT[®] AS-HF (AQ) przez modelowe membrany przy użyciu modelu matematycznego.

Lakier do paznokci	Model matematyczny				
	równanie zgodne z kinetyką zerowego rzędu		równanie Korsmeyer-Peppas		
	K [$\text{mg}/\text{cm}^2 \cdot \text{godz}^{-1}$]	R ²	K [godz^{-N}]	N	R ²
THCl : AQ	0,0140	0,962	0,055	0,7408	0,971
THCl : AQ : DBS	0,0109	0,990	0,082	0,6236	0,994
THCl : AQ : TEC	0,0162	0,995	0,068	0,7252	0,989



Rycina 66. Profil przenikania substancji leczniczej z lakierów do paznokci przez membrany o grubości ok. 150 µm.



Rycina 67. Profil przenikania substancji leczniczej z lakierów do paznokci przez membrany o grubości ok. 250 µm.

3.4. Ocena skuteczności działania lakierów w oparciu o badania mikrobiologiczne

Dokonano oceny skuteczności hamowania wzrostu *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) po nałożeniu lakierów na membrany z kopyt wołowych lub płytkę paznokciową.

Membrany z kopyt wołowych

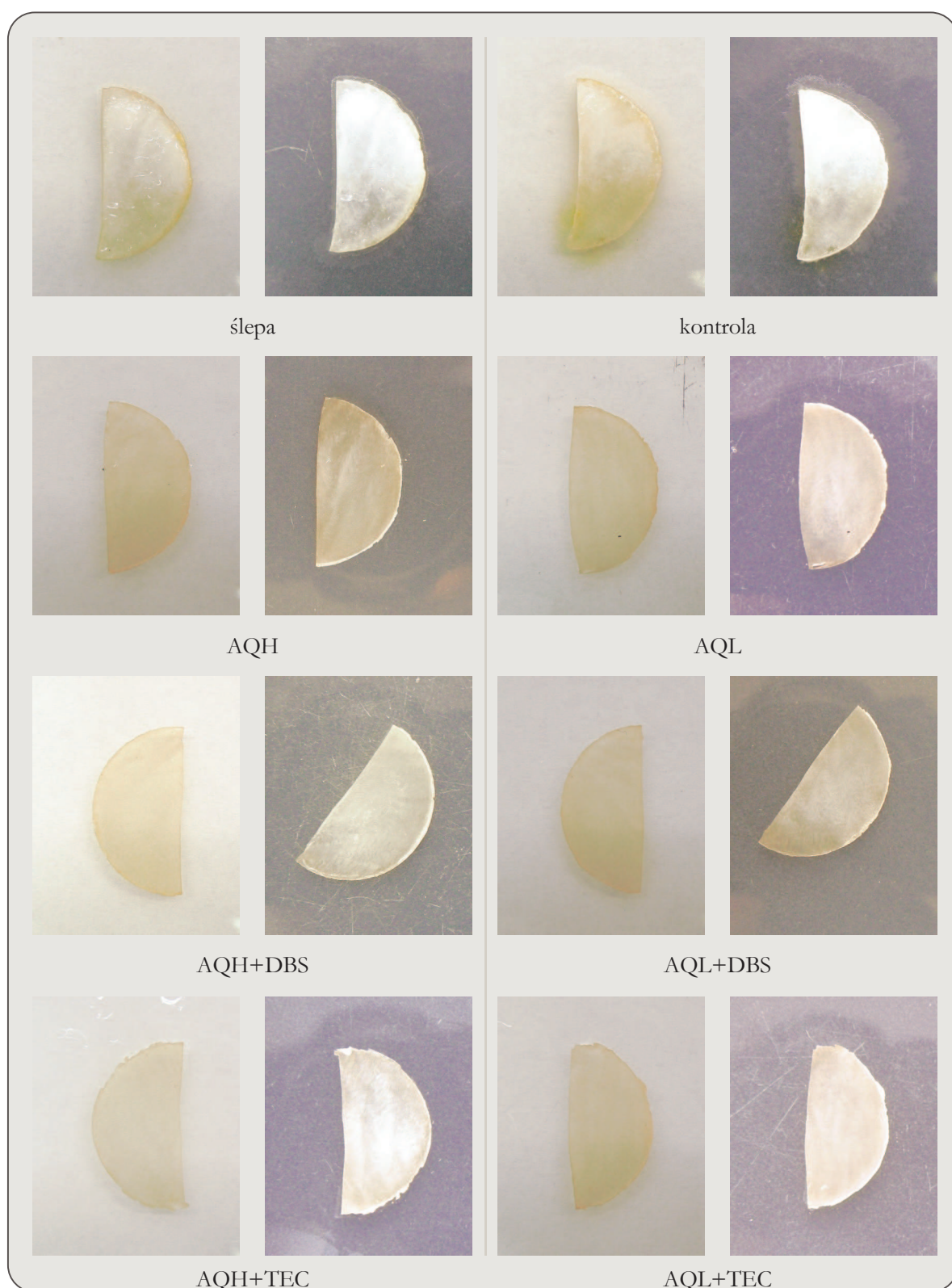
Po 7 dniowej oraz 14 dniowej inkubacji membran z kopyt wołowych pokrytych lakierami dokonano analizy zmian na podłożu w porównaniu z próbą kontrolną i próbą ślepą. Po upływie 7 dni stwierdzono wzrost strzępek grzybni tylko w próbie ślepej i kontrolnej, pozostałe próbki były bez zmian (ryc. 68). Po okresie 14 dni również następował wzrost strzępek grzybni w próbie ślepej i kontrolnej (ryc. 69).

Ocena wzrostu kolonii

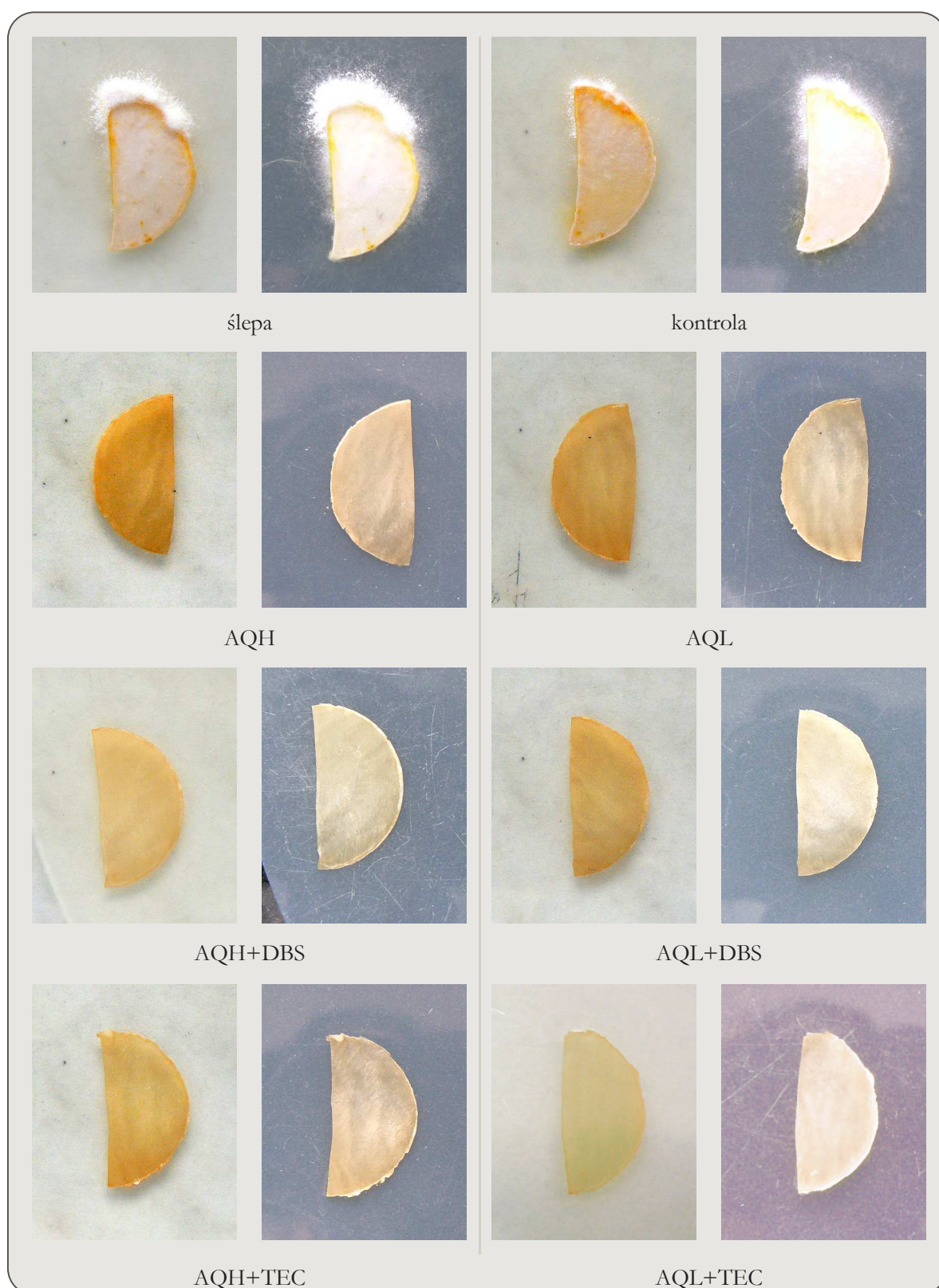
Do oceny obszaru wzrostu kolonii posłużono się metodą komputerowej analizy obrazu. Dzięki zastosowaniu kontrastowych rodzajów tła, otrzymano obrazy, które po nałożeniu na siebie z wykorzystaniem metody obliczeń na kanałach szarości pozwoliły na dokładne określenie stref wzrostu dermatofitu.

Segmentacja obrazu oraz sporządzenie dwuwymiarowego profilu intensywności obszaru w skali szarości pozwoliło na dokładniejszą identyfikację strzępków grzybni w zakresie od 190 do 256 jednostek umownych w 256 stopniowej skali szarości, co uwidoczniono na zamieszczonych na rycinie 70 i 71 wykresach w kolumnie C.

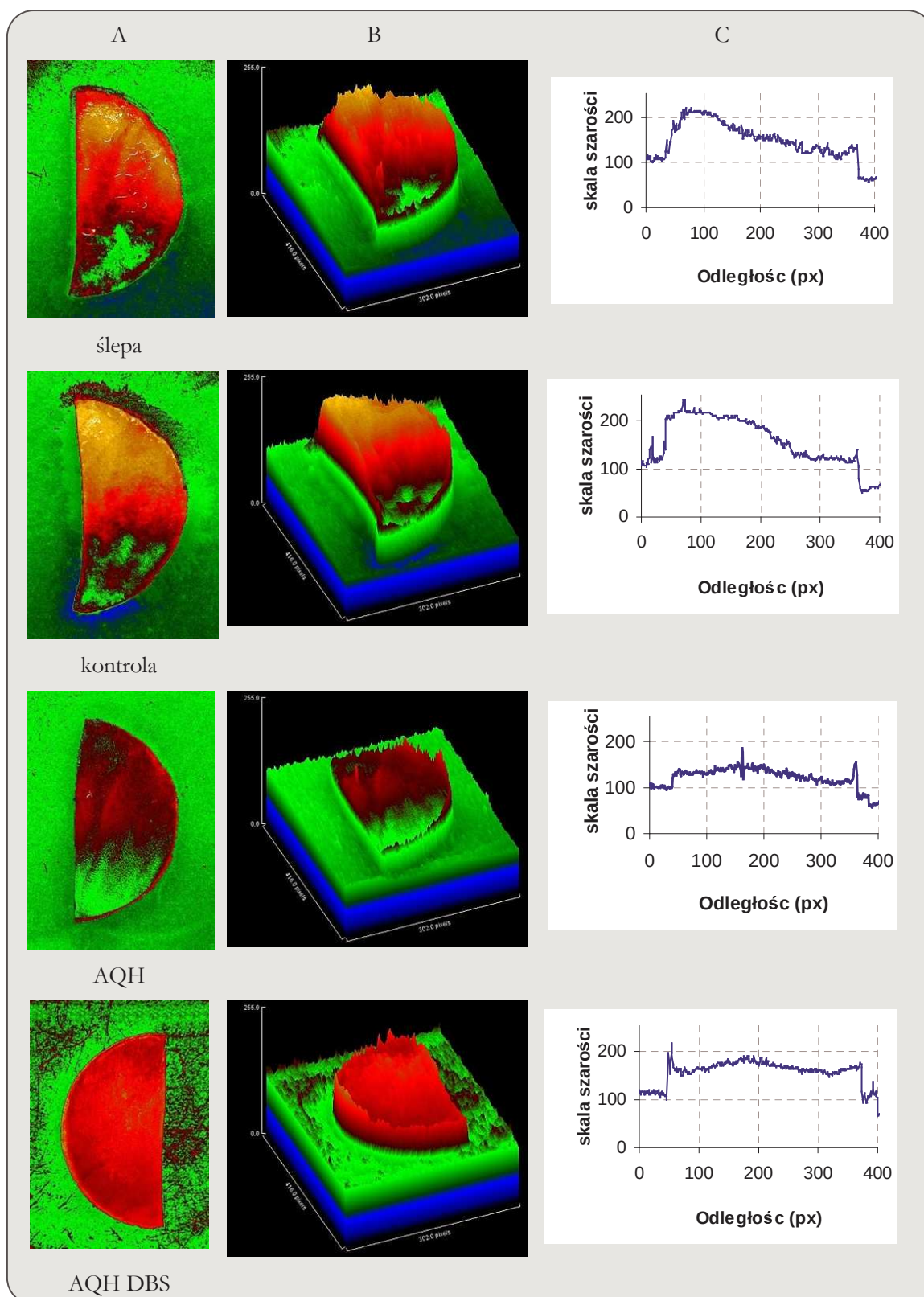
Przekształcenie w tryb RGB i sporządzenie trójwymiarowego profilu intensywności obszaru umożliwiło lepszą wizualizację i separację odcieni oraz wyznaczenie granicy obszaru wzrostu dermatofitów na całej powierzchni membrany, co w przypadku nie przetworzonych obrazów było utrudnione. Obszary o barwie od białej do bardzo jasno czerwonej wskazują na obecność strzępków grzybni na membranach i w bezpośrednim ich sąsiedztwie (kolumna A i B ryc. 70 i ryc. 71).



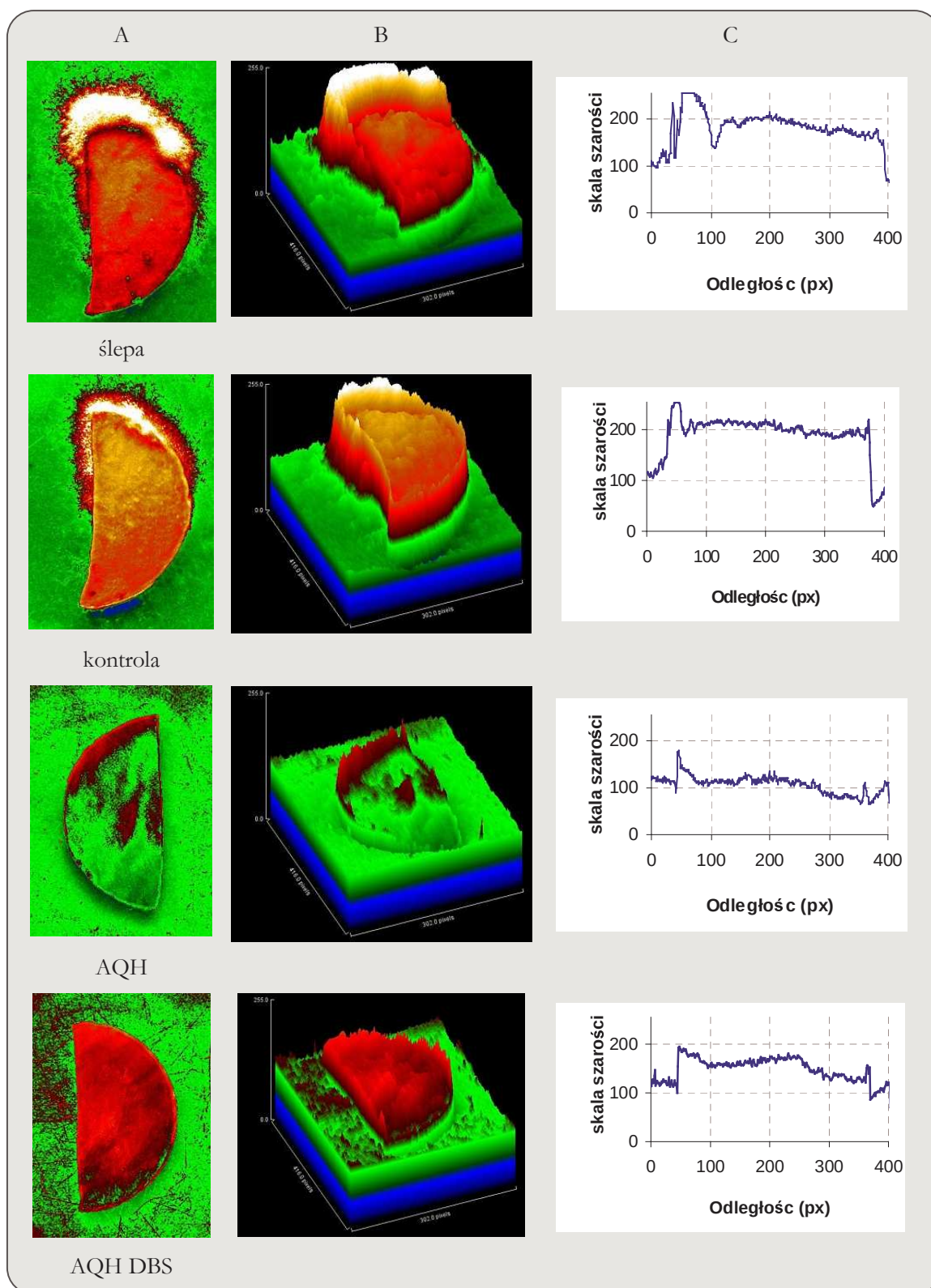
Rycina 68. Zdjęcia membran po 7 dniach.



Rycina 69. Zdjęcia membran po 14 dniach.



Rycina 70. Analiza obrazu hodowli po 7 dniach.

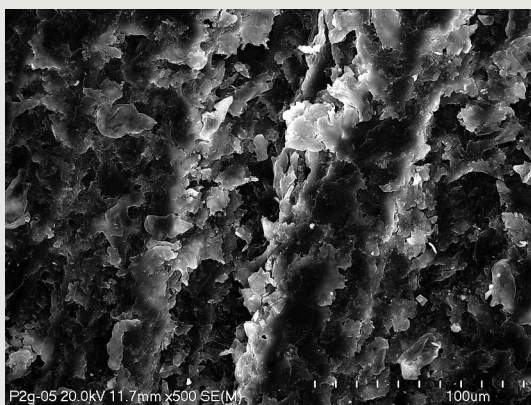


Rycina 71. Analiza obrazu hodowli po 14 dniach.

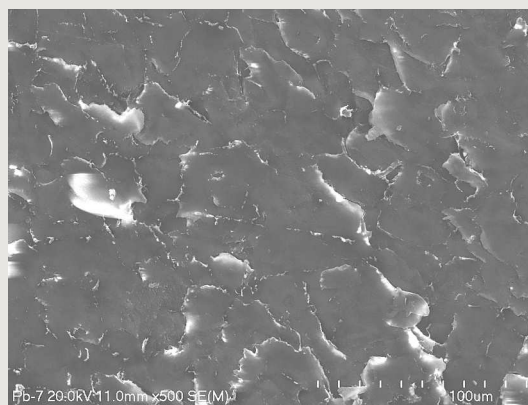
Badania z użyciem płytek paznokciowych

Powierzchnia płytek paznokciowych była zmatowiona przed nałożeniem lakieru pilnikiem do paznokci co spowodowało naruszenie zwartej struktury zewnętrznej powierzchni paznokcia (ryc. 72).

Po 7 dniowej oraz 14 dniowej inkubacji izolowanych płytek paznokciowych dokonano analizy zmian na podłożu w porównaniu z próbą kontrolną i próbą ślepą. Po upływie 7 dni stwierdzono wzrost strzępek grzybni tylko w próbie ślepej i kontrolnej. Pozostałe próbki były bez zmian (ryc. 73). Nie obserwowano także wzrostu kolonii w przeciągu 14 dni inkubacji (ryc. 74). Badanie, w trakcie którego lakier aplikowano 14 dni zakończyło się podobnym wynikiem (ryc. 75, 76).

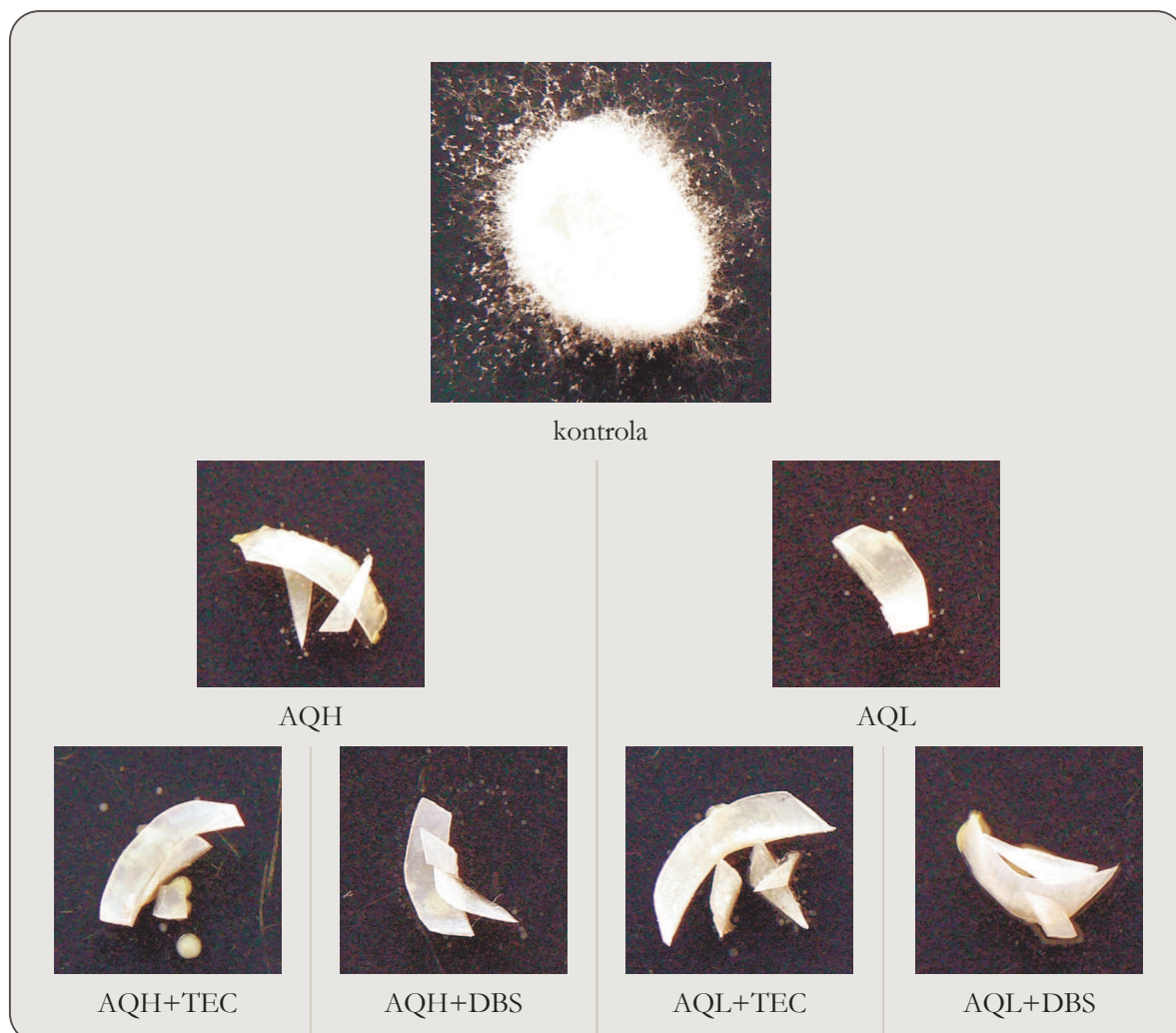


plytka paznokciowa zmatowiona pilnikiem
500x

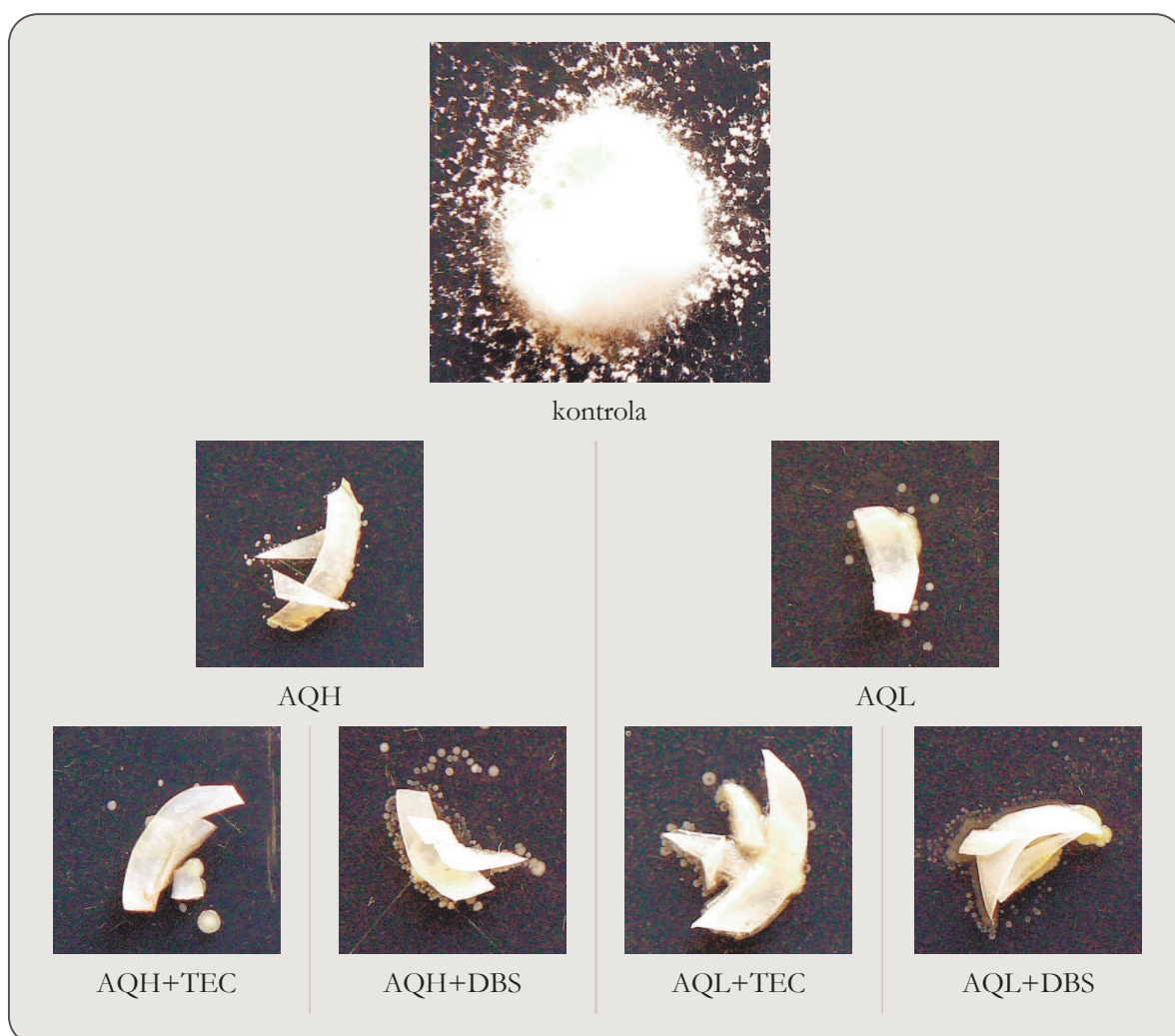


plytka paznokciowa przed zmatowaniem
500x

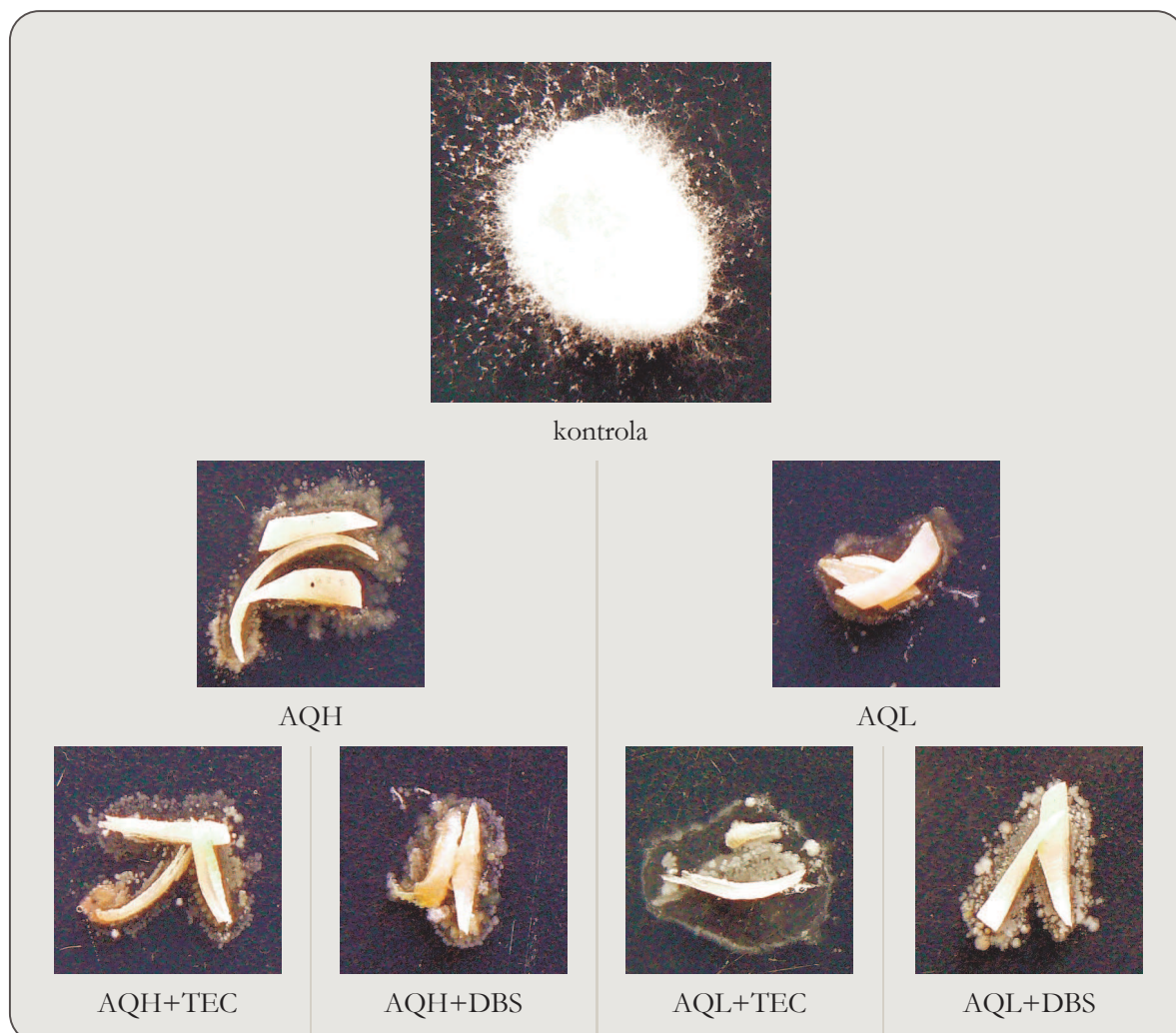
Rycina 72. Obrazy mikroskopowe powierzchni płytki paznokciowej.



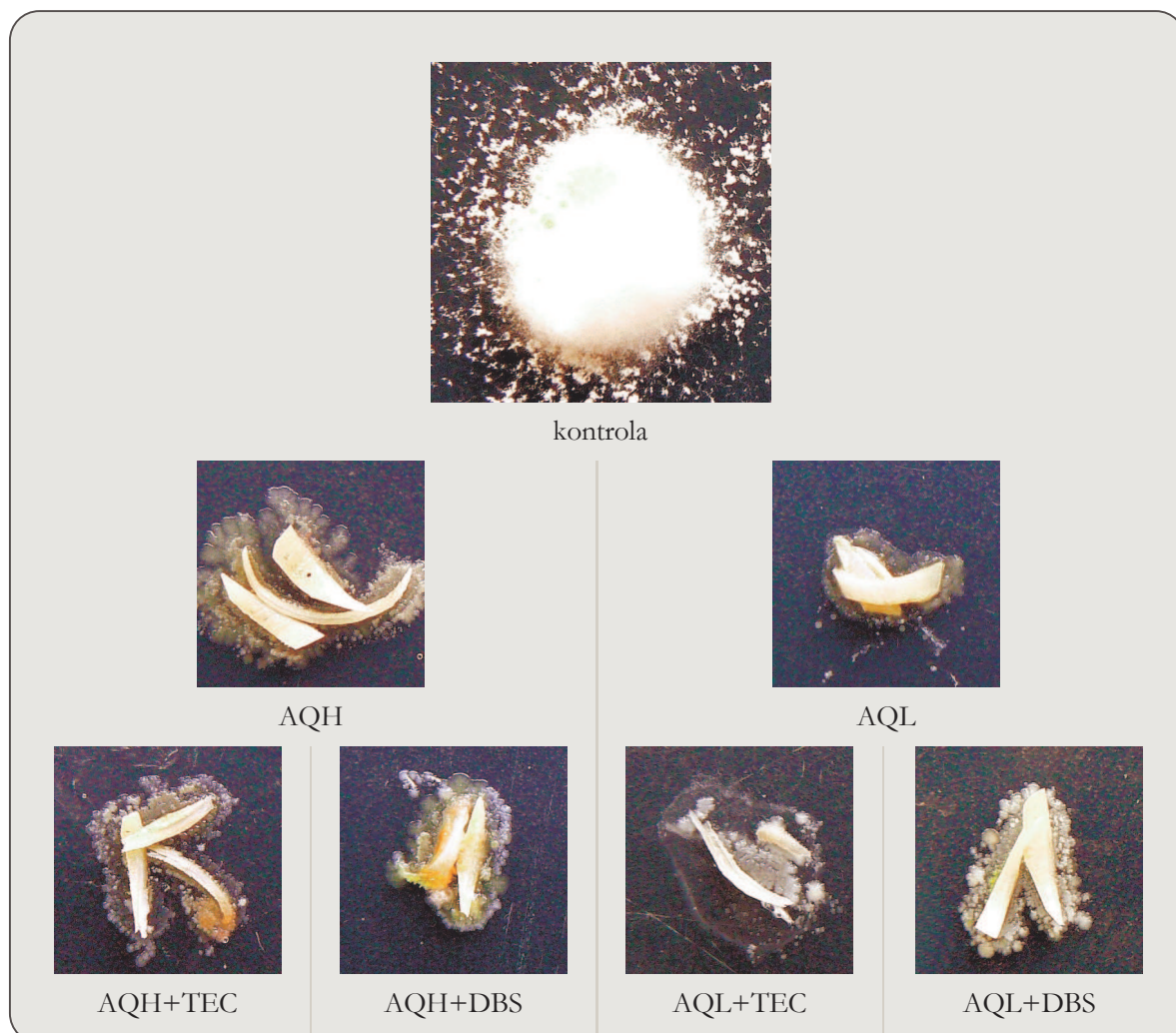
Rycina 73. Zdjęcia płytek paznokciowych (7 dni aplikacji 7 dni inkubacji).



Rycina 74. Zdjęcia płytek paznokciowych (7 dni aplikacji 14 dni inkubacji).



Rycina 75. Zdjęcia płytek paznokciowych (14 dni aplikacji 7 dni inkubacji).



Rycina 76. Zdjęcia płytek paznokciowych (14 dni aplikacji 14 dni inkubacji).

V. Omówienie i dyskusja wyników badań

Poszukiwania nowych rozwiązań technologicznych mających na celu optymalizację terapii grzybicy paznokci skupiają się z jednej strony na poprawie rozpuszczalności doustnych substancji trudno lub praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie, z drugiej strony na udoskonalaniu opracowanych, miejscowo działających matrycowych systemów, długotrwale uwalniających substancję leczniczą w miejscu aplikacji. Wychodząc naprzeciw tym założeniom prowadzono badania nad poprawą rozpuszczalności itrakonazolu, praktycznie nierozpuszczalnej w wodzie substancji leczniczej o działaniu przeciwgrzybiczym oraz opracowaniem jako formułacji technologicznej lakieru do paznokci z chlorowodorkiem terbinafiny.

Jako nośnik wybrano pochodną celulozy - octanobursztynian hydroksypropylometylocelulozy (HPMCAS, AQOAT®), która stosowana jest przede wszystkim jako polimer błonotwórczy do powlekania tabletek. Zastosowano ją po raz pierwszy jako nośnik stałych rozprożeń z itrakonazolem. W piśmiennictwie opisane są przykłady zastosowania HPMCAS jako nośnika w przypadku nifedypiny [85, 113], felodypiny [62, 63], piroksikamu [44].

Właściwości błonotwórcze AQOAT® uzasadniały podjęcie badań w kierunku wykorzystania go jako nośnika w lakierach z terbinafiną. Obecnie nie ma postaci leku w formie lakieru z chlorowodorkiem terbinafiny, prowadzone są jednak badania nad możliwością zastosowania tej substancji leczniczej w terapii miejscowej grzybicy paznokci [29, 82, 84, 101].

Ocenie poddano właściwości sporządzonych układów proszkowych z itrakonazolem i chlorowodorkiem terbinafiny oraz lakierów do paznokci z terbinafiną. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań stwierdzono zasadność stosowania octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy jako substancji pomocniczej do sporządzania ww. formułacji technologicznych.

Układy proszkowe z itrakonazolem

Itrakonazol jest substancją praktycznie nierozpuszczalną w wodzie ($< 1 \mu\text{g/ml}$) należąca do II grupy BCS [14, 21, 108, 130].

Z tego względu prowadzone są różnokierunkowe badania zmierzające do poprawy jej dostępności farmaceutycznej [15, 45, 47, 53, 57, 107, 119, 125, 128].

Biorąc pod uwagę właściwości substancji leczniczej oraz octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy sporządzono 20 formułacji dwu- i trójskładnikowych stałych rozproszeń itrakonazolu. Do wytwarzania wszystkich rodzajów stałych rozproszeń użyto mieszaninę rozpuszczalników chlorek metylenu : etanol (1:1) jako optymalną ze względów technologicznych, a także jakości sporządzonego produktu. Ten rodzaj rozpuszczalników stosował m. in. Janssens [45, 46, 47, 49] oraz Weuts [121] do wytwarzania stałych rozproszeń loperamidu w PEG 6000.

Jakość sporządzonych stałych rozproszeń zależała także od doboru parametrów technologicznych. Zastosowano jednakowy przepływ powietrza (700 l/min) i wydajność aspiratora (100 %). Natomiast dla poszczególnych układów konieczne było ustalenie odpowiedniej temperatury wlotu powietrza, a także wydajności pompy perystaltycznej i ciśnienia z kompresora (tab. 7, 8).

W przypadku stałych rozproszeń z Gelucire® konieczność obniżenia temperatury wlotu powietrza wynikała ze stosunkowo niskiej temperatury topnienia nośnika, która w zależności od rodzaju polimeru wynosi od 45°C do 50°C. Wraz ze zmniejszeniem temperatury wlotu następowało zmniejszenie szybkości odparowania rozpuszczalnika. Powodowało to blokowanie dyszy atomizera i odkładania się produktu w szklanej komorze. W związku z tym niekorzystnym zjawiskiem, pozostałe parametry wymagały korekty w celu uzyskania produktu o odpowiedniej jakości. Zmniejszono wydajność pompy perystaltycznej o ok. 50 % tj. do wartości 16 %, natomiast zwiększono ciśnienie kompresora o 1 MPa (tab. 8). Stosując ww. parametry w procesie suszenia rozpyłowego uzyskano w odbieralniku produkt z dobrą wydajnością tj. powyżej 50 %. Podobne parametry zastosowano do sporządzania układów trójskładnikowych z PVP.

W wyniku suszenia rozpyłowego prowadzonego wg ustalonych parametrów operacyjnych uzyskano dwuskładnikowe stałe rozproszenia z AQOAT® oraz trójskładnikowe z AQOAT® i PEG lub PVP w formie białego proszku. Tylko w przypadku układów dwuskładnikowych z Gelucire® oraz trójskładnikowych o większej zawartości Gelucire® 44/14 (1:2:1 i 1:2:2) stałe rozproszenia miały zabarwienie kremowe

i wraz ze zwiększeniem ilości Gelucire® w układzie wykazywały tendencję do tworzenia większych aglomeratów.

Analiza morfologiczna sporządzonych układów przy użyciu mikroskopu skaningowego wykazała, że kształt cząstek zależał od składu stałych rozproszeń. Kuliste cząstki obserwowano tylko w przypadku dwuskładnikowych układów z AQOAT® AS-LF (1:1) (ryc. 9). Zmiana rodzaju i ilości AQOAT® powodowała zmiany ich kształtu na nieregularny. Podobny efekt obserwowano w układach trójskładnikowych. We wszystkich przypadkach struktura cząstek była jednolita. Natomiast w mieszaninach fizycznych identyfikowano kryształy substancji leczniczej (ryc. 8). Również analiza próbek w świetle spolaryzowanym wykazała obecność kryształów itrakonazolu tylko w mieszaninie fizycznej. Obserwowano wówczas efekty barwne charakterystyczne dla kryształów dwójłomnych (ryc. 11).

Potwierdzenie tych badań stanowiły wyniki analizy rentgenograficznej. Na dyfraktogramach próbek stałych rozproszeń obserwowano *halo* charakterystyczne dla formy amorficznej w zakresie kątów 2Θ od 5 do 40° (ryc. 13 - 17). Piki charakterystyczne dla itrakonazolu przy kącie 2Θ 14° , 17° , 18° , 20° , 23° , 25° , 27° występowały jedynie w przypadku mieszanin fizycznych (ryc. 13, 14).

Obecność formy amorficznej itrakonazolu w stałych rozproszeniach tłumaczy poprawę jego rozpuszczalności i szybkości rozpuszczania. Spośród dwuskładnikowych stałych rozproszeń większe ilości rozpuszczonego itrakonazolu uzyskano z układów AQOAT® AS-HF niż AS-LF. W przypadku układów (1:1) stwierdzono odpowiednio 41-krotny i 32-krotny wzrost rozpuszczalności w porównaniu z samą substancją leczniczą oraz 25- i 19-krotny w porównaniu z mieszaninami fizycznymi (ryc. 18). Najlepsze wyniki uzyskano w przypadku dwuskładnikowych stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (1:4), gdyż z układów tych rozpuściła się ponad 44-krotnie większa ilość itrakonazolu ($277\text{ }\mu\text{g/ml}$) w porównaniu z samą substancją leczniczą (ryc. 19). Wynik ten jest lepszy niż uzyskany przez Junga w badaniach stałych rozproszeń itrakonazolu z AEA®, Eudragitem® E100, PEG 20000, HPMC, PVP [53]. Rozpuszczalność itrakonazolu wynosiła odpowiednio 264, 254, 166, 163, $75\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Biorąc po uwagę powyższe wyniki, trójskładnikowe stałe rozproszenia sporządzono z jednym rodzajem tj. AQOAT® AS-HF. Wybór trzeciego składnika dokonany został w oparciu o wyniki wcześniejszych prac doświadczalnych realizowanych w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJ CM oraz w oparciu o dane z piśmiennictwa [45, 53, 85]. Spośród trzech stosowanych nośników: PVP, PEG 6000, Gelucire®, największy

wpływ na poprawę rozpuszczalności wykazał PVP, gdyż z układów 1:2:1 uzyskano 53-krotny wzrost rozpuszczalności względem samej substancji leczniczej oraz 1,66-krotny względem układów dwuskładnikowych (ryc. 20). W przypadku Gelucire® uzyskano wprawdzie w porównaniu z samą substancją leczniczą w zależności od ilości nośnika 5 - 16-krotne zwiększenie rozpuszczalności, to jednak w porównaniu z dwuskładnikowymi stałymi rozproszczeniami wartości te były 6 - 9-krotnie mniejsze w przypadku Gelucire® 44/14 (ryc. 21) oraz 3 - 5-krotnie mniejsze w przypadku Gelucire® 50/13 (ryc. 24). To zmniejszenie ilości rozpuszczonej substancji leczniczej wiąże się z krystalizacją itrakonazolu w środowisku badania rozpuszczalności po upływie 2 godzin (ryc. 22, 23, 25, 26). Podobnie zjawisko obserwował Janssens [50] w badaniach trójskładnikowych stałych rozproszeń itrakonazolu z bursztynianem polietylenoglikolu 1000 z witaminą E (TPGS 1000) i PVPVA 64 oraz Six [107] w badaniach dwuskładnikowych stałych rozproszeń itrakonazolu z Eudragit® E100.

Wyniki badań rozpuszczalności itrakonazolu z układów dwuskładnikowych znalazły odzwierciedlenie w badaniach szybkości rozpuszczania. Ze wszystkich układów dwuskładnikowych z AQOAT®, niezależnie od wzajemnej proporcji substancji leczniczej i nośnika ilość rozpuszczonej po 2 godz. substancji leczniczej była większa ze stałych rozproszeń AQOAT® AS-HF niż AQOAT® AS-LF, jakkolwiek różnice te były niewielkie tj. 3,70 % i 7,23 % odpowiednio dla stałych rozproszeń 1:1 i 1:2 (ryc. 27, 28).

Stwierdzono także korzystny wpływ AQOAT® na szybkość rozpuszczania itrakonazolu z układów dwuskładnikowych. Analiza wyników badań wykazała zwiększenie ilości rozpuszczonego itrakonazolu ze wszystkich badanych rodzajów stałych rozproszeń. Wartości te po 2 godz. były 6,5-krotnie większe dla układów (1:1) i 14,7-krotne w przypadku 1:10 (ryc. 29). Z danych przedstawionych na rycinie 29 wynika, że wraz ze zwiększeniem ilości nośnika zwiększała się ilość rozpuszczonego itrakonazolu, co wyraźnie zaznaczyło się przy porównaniu stałych rozproszeń 1:1, 1:2, 1:3, 1:4. Zwiększenie ilości AQOAT® do 90 % (1:10) skutkowało niewielkim wzrostem ilości rozpuszczonego itrakonazolu tj. o 3,75 %. Z wszystkich rodzajów dwuskładnikowych stałych rozproszeń ilość rozpuszczonego itrakonazolu po 2 godz. była większa w porównaniu z samą substancją leczniczą.

Również w swoich badaniach Yang [132] wykazał korzystny wpływ ilości AQOAT® na szybkość rozpuszczania nitrendypiny z mikrosfer z AQOAT® AS-HF. Ilość uwolnionej substancji leczniczej zwiększała się wraz ze wzrostem ilości nośnika.

Poprzez sporządzenie trójskładnikowych układów uzyskano zwiększenie tego efektu. W wyniku wprowadzenia do układu 1:2 trzeciego składnika w ilości 25 % w stosunku do nośnika (1:2:0,5), ilość rozpuszczonego itrakonazolu po 2 godz. zwiększyła się o 11,16 % w przypadku PVP (ryc. 33), o 20,69 % w przypadku Gelucire® 44/14 (ryc. 31) i o 49,89 % w przypadku Gelucire® 50/13 (ryc. 32) w porównaniu z analogicznymi układami dwuskładnikowymi. W porównaniu z samą substancją leczniczą wartości te były odpowiednio 11,8-, 14,4- i 22,3-krotnie większe.

Tak więc w wyniku sporządzenia trójskładnikowych stałych rozproszeń z Gelucire® 50/13 (1:2:0,5) po 2 godz. rozpuściło się ponad 80 % substancji leczniczej. Stanowiło to lepszy efekt niż uzyskany przez Janssensa w badaniach formulacji stałych rozproszeń o zawartości 40 % itrakonazolu w PVPVA 64/PEG 6000 oraz PVPVA 64/HPMC. Niezależnie od proporcji nośnika ilość rozpuszczonej substancji leczniczej po 2 godz. nie przekroczyła 70 % [45, 46, 48].

Zwiększenie ilości trzeciego składnika w układzie, niezależnie od jego rodzaju nie powodowało dalszej poprawy szybkości rozpuszczania itrakonazolu. W przypadku Gelucire® 44/14 stwierdzono ponadto zmianę właściwości fizycznych stałych rozproszeń, gdyż w wyniku procesu technologicznego układy (1:2:1) i (1:2:2) charakteryzowały się konsystencją zbliżoną do wosku i twardniejącą po kilku dniach przechowywania. Układy te charakteryzowały się też mniejszą zwilżalnością. Tego rodzaju zmianom należy przypisać ok. 4 - 7,4-krotne zmniejszenie ilości rozpuszczonego po 2 godz. itrakonazolu w porównaniu z omawianymi wcześniej stałymi rozproszeniami 1:2:0,5 (ryc. 31).

Analiza wyników badań układów dwuskładnikowych 1:4 i trójskładnikowych 1:4:0,5 i 1:4:1 wykazała mniejsze różnice w ilości rozpuszczonej substancji po 2 godz. niż miało to miejsce dla układów 1:2. W przypadku użycia PVP jako trzeciego składnika (układy 1:4:0,5), ilość rozpuszczonego itrakonazolu po 2 godz. zwiększyła się o 6,66 % (ryc. 33), w przypadku Gelucire® 44/14 o 10,14 % lub o 16,86 % w przypadku Gelucire® 50/13 w porównaniu z układami dwuskładnikowymi (ryc. 31, 32). Wartości te były odpowiednio 15,5-, 16,4- i 18,2-krotnie większe w porównaniu z samą substancją leczniczą.

Dwukrotne zwiększenie Gelucire® 50/13 jako trzeciego składnika w układach 1:4:1 wzmocniło nieznacznie ten efekt, gdyż ilość rozpuszczona po dwóch godzinach była o 3,87 % większa w porównaniu z układami 1:4:0,5 (ryc. 32). Natomiast takiego efektu nie stwierdzono stosując PVP i Gelucire® 44/14, gdyż ilość rozpuszczonej substancji leczniczej była odpowiednio o 0,41 % lub o 11,81 % mniejsza w porównaniu z układami 1:4:0,5 (ryc. 31, 33).

Na podstawie ww. wyników do badań stabilności wybrano układ dwuskładnikowy 1:4 oraz układy trójskładnikowe 1:2:0,5 i 1:4:0,5 z Gelucire® 44/14, Gelucire® 50/13 i PVP.

Wszystkie badane próbki dwu- i trójskładnikowych stałych rozproszeń po 12 miesięcznym okresie przechowywania w temperaturze pokojowej nie zmieniły właściwości fizycznych. Nie stwierdzono zmian zabarwienia, sypkości a także wyglądu cząstek w oparciu o analizę mikroskopową.

Stwierdzono jednak zróżnicowanie w profilach rozpuszczania. W związku z tym wyliczono wartości współczynników podobieństwa krzywych f_2 badanych układów stałych rozproszeń bezpośrednio po sporządzeniu jak i po okresie przechowywania. Najmniejsze różnice w ilości rozpuszczonej substancji leczniczej -0,44 % stwierdzono w przypadku trójskładnikowych stałych rozproszeń z Gelucire® 50/13 (1:4:0,5). Współczynnik podobieństwa krzywych f_2 wynosił 93,82 (ryc. 43). W wyniku użycia Gelucire® 44/14 lub PVP różnice te były większe i wynosiły odpowiednio 12,73 % i 7,15 % (ryc. 40, 46). Natomiast w przypadku układów stałych rozproszeń 1:2:0,5 współczynnik podobieństwa krzywych f_2 powyżej wartości 50 tj. 59,02 uzyskano tylko w przypadku układu zawierającego PVP (ryc. 46). Stwierdzono znaczne różnice, wynoszące ponad 40 % w ilości rozpuszczonego itrakonazolu ze stałych rozproszeń stosując Gelucire® jako trzeci składnik. Współczynniki podobieństwa krzywych f_2 wynosiły ok. 31 (ryc. 40, 43). W przypadku dwuskładnikowych stałych rozproszeń 1:4, różnica w ilości rozpuszczonej substancji leczniczej po 12-miesięcznym okresie przechowywania wynosiła 6,29 %, współczynnik podobieństwa krzywych f_2 wynosił 63,62 (ryc. 37). Powyższa analiza wykazała, że bardziej stabilne okazały się układy dwu- i trójskładnikowe 1:4 i 1:4:0,5.

Przyczyną zmian ilości rozpuszczonego itrakonazolu z układów po 12-miesięcznym okresie przechowywania jest tworzenie się formy krystalicznej itrakonazolu w trakcie przechowywania. Na rentgenogramach stałych rozproszeń z Gelucire® (1:2:0,5) po roku przechowywania widoczne są piki charakterystyczne dla itrakonazolu, których nie obserwowano w przypadku pozostałych układów poddanych badaniu stabilności (ryc. 36, 39, 42, 45). Mniejsza ich intensywność w porównaniu z samą substancją leczniczą wynika z mniejszej jej zawartości w próbce stałego rozproszenia. Zmiany są na tyle małe, że nie stwierdzono efektów optycznych na obrazach z mikroskopu polaryzacyjnego przy powiększeniu $100\times$ (ryc. 38, 41). Stwierdzenie obecności itrakonazolu w formie krystalicznej w stałym rozproszeniu stanowi wyjaśnienie zmniejszenia szybkości rozpuszczania z tych układów.

Janssens w badaniach stałych rozproszeń zwrócił uwagę na tworzenie się również formy krystalicznej itrakonazolu po 6 miesięcznym przechowywaniu badanych próbek w temp. 25°C i wilgotności wynoszącej 52 %. Skutkowało to także zmniejszeniem szybkości rozpuszczania substancji leczniczej w porównaniu z układami badanymi bezpośrednio po sporządzeniu [48].

Układy z terbinafiną

Sporządzono 9 formułacji stałych rozproszeń i mieszanin fizycznych w celu określenia wpływu AQOAT® na właściwości chlorowodoru terbinafiny i możliwości spowolnienia jej rozpuszczania w celu wydłużenia działania po miejscowej aplikacji preparatu w formie lakieru. Dokonano oceny obu rodzajów AQOAT® AS-HF i LF.

Podobnie jak w przypadku układów z itrakonazolem stwierdzono wpływ składu stałych rozproszeń na kształt cząstek. Kuliste cząstki obserwowano w przypadku układów 1:1. Zwiększenie ilości AQOAT® powodowało zmianę kształtu na nieregularny. W mieszaninach fizycznych identyfikowano kryształy substancji leczniczej (ryc. 47), które także były widoczne w świetle spolaryzowanym (ryc. 48, 49).

W wyniku zastosowanej metody suszenia rozpyłowego uzyskano układy, w których substancja lecznicza występuje w formie amorficznej. Świadczą o tym wyniki badań rentgenograficznych (ryc. 50, 52). Na rentgenogramach stałych rozproszeń nie występowały piki charakterystyczne dla terbinafiny w zakresie kątów 2Θ od 5 do 40°. Także nie stwierdzono efektów optycznych właściwych dla substancji krystalicznych w badaniach przy użyciu mikroskopu polaryzacyjnego (ryc. 48, 49). Również analiza różnicowej kalorymetrii skaningowej nie wykazała na termogramach stałych rozproszeń piku charakterystycznego dla terbinafiny w temp. 211 °C (ryc. 51, 53). Pomimo zidentyfikowania formy amorficznej terbinafiny w stałych rozproszeniach stwierdzono spowolnienie jej szybkości rozpuszczania w porównaniu z samą substancją leczniczą w zależności od rodzaju użytego AQOAT® od 1,36- do 1,41-krotne ze stałych rozproszeń 1:1, 1,55-krotne ze stałych rozproszeń 1:4 oraz od 1,47- do 1,99-krotne z układów 1:6 (ryc. 54, 55). Efekt ten należy przypisać oddziaływaniu wody jako rozpuszczalnika na badane formułacje. Podczas prowadzenia badań szybkości rozpuszczania obserwowano tendencję do powstawania większych agregatów, które tworzyły zbite skupiska, jeżeli zwiększał się udział AQOAT® w stałym rozproszeniu. Penetracja wody do głębszych warstw próbki była utrudniona. Zmiana medium na 0,1 mol/l HCl potęgowała jeszcze to

zjawisko. Ilość rozpuszczonej substancji leczniczej ze stałych rozproszeń 1:1 była o ok. 47 % mniejsza w środowisku kwaśnym niż w wodzie (ryc. 56). Różnica ta w przypadku układów 1:6 wynosiła ok. 60 % (ryc. 57). Podobne zależności stwierdzono dla stałych rozproszeń z AQOAT® AS-LF (ryc. 56, 57).

Wyniki powyższych badań wskazują, że oba rodzaje AQOAT® oddziałują spowalniająco na szybkość rozpuszczania terbinafiny.

W oparciu o analizę profili rozpuszczania do 24 godzinnego badania szybkości rozpuszczania wybrano stałe rozproszenia 1:4. Jak widać na rycinie 58 proces ten przebiegał dwuetapowo. W przedziale czasowym do 4 godz. uwolniło się 58,99 % substancji leczniczej. Po tym czasie uwalnianie substancji następowało stopniowo, do wartości 67,25 % po 24 godzinach.

Z tego względu do dalszych badań tj. sporządzenia lakierów wybrano układ 1:4. Wykonano 26 formułacji, do których użyto dwa rodzaje rozpuszczalników aceton/woda, aceton/etanol/woda oraz 4 rodzaje plastyfikatorów (tab. 11 - 13). Wybór substancji pomocniczych do sporządzenia lakierów podyktowany był wymaganiami jakie powinna spełnić ta postać leku. Należało przygotować formułacje w formie roztworów o odpowiedniej lepkości, które po rozprowadzeniu na gładkiej powierzchni tworzyły jednorodny, elastyczny film o właściwościach adhezyjnych. Wstępne badania związane z doбором rozpuszczalników wskazały na konieczność użycia acetonu jako jednego z współrozpuszczalników. Uzyskanie roztworu składników, który po odparowaniu rozpuszczalnika tworzyłby odpowiedni film nie powiodło się w przypadku innych kombinacji rozpuszczalników.

Wprowadzenie wody do mieszaniny rozpuszczalników miało na celu zapobieganie nadmiernej dehydratacji płytki paznokciowej, co może utrudnić penetrację substancji leczniczej [79]. Zastosowane mieszaniny rozpuszczalników charakteryzowały się odpowiednią lotnością. Lepkość roztworu umożliwiała równomierne rozprowadzenie porcji lakieru na powierzchni płytki Petriego lub paznokcia. Stężenie substancji leczniczej w lakierze wynosiło 4 %, natomiast po rozprowadzeniu lakieru i odparowaniu rozpuszczalnika 20 %. Stężenie to było optymalne, gdyż po odparowaniu rozpuszczalnika z lakieru w powstającym filmie nie dochodziło do precypitacji substancji leczniczej, którą obserwowano w przypadku filmów o zawartości substancji leczniczej powyżej 25 %.

Filmy zawierające tylko AQOAT® po tygodniowym przechowywaniu pękały i stawały się kruche. Wprowadzenie plastyfikatorów do składu lakierów poprawiło parametry mechaniczne filmów uzyskiwanych po odparowaniu rozpuszczalnika. Filmy były

bardziej elastyczne co było spowodowane m. in. większą w nich zawartością wilgoci tj. od 3,5 do 6,5 %. W filmach zawierających tylko AQOAT® lub AQOAT® i DBS zawartość wilgoci była mniejsza od 1 % do 2 %.

Niezależnie od zastosowanej mieszaniny rozpuszczalników i rodzaju AQOAT® plastyfikatory hydrofilowe: PEG, glicerol lub TEC powodowały zwiększenie szybkości uwalniania terbinafiny z ww. filmów w porównaniu z formulacjami nie zawierającymi plastyfikatorów. W przypadku użycia jako plastyfikatorów PEG lub glicerolu, z filmów z AQOAT® AS-HF po 24 godzinach nastąpiło całkowite uwolnienie substancji leczniczej, natomiast w obecności TEC uwolniło się tylko ok. 60 % terbinafiny (ryc. 60). Z filmów nie zawierających plastyfikatorów po tym samym czasie uwolniło się ok. 40 % substancji leczniczej, co wskazuje na zwiększenie 1,6 - 2,6-krotne ilości uwolnionej terbinafiny po zastosowaniu plastyfikatorów. W przypadku formulacji z AQOAT® AS-LF wystąpił podobny efekt tj. 1,2 - 2,3-krotne zwiększenie ilość uwolnionej terbinafiny z filmów w zależności od rodzaju plastyfikatora (ryc. 60). W przypadku użycia DBS stwierdzono zmniejszenie szybkości uwalniania z wszystkich badanych układów. Po 24 godz. stwierdzono zmniejszenie ilości rozpuszczonej terbinafiny w granicach od 3,72 % do 37,04 % w zależności od rodzaju formulacji (ryc. 61).

Dokonano także oceny właściwości filmów po 24 godzinnym badaniu uwalniania. Niezależnie od zastosowanego rozpuszczalnika, filmy zawierające jako plastyfikatory glicerol lub PEG miały mleczną barwę, stały się kruche, łamliwe i pofałdowane. Filmy bez plastyfikatorów lub zawierające w swoim składzie DBS lub TEC nie traciły elastyczności (ryc. 62). Z tego względu do dalszych badań wybrano formulacje dwuskładnikowe z obydwoma rodzajami AQOAT® oraz trójskładnikowe z dodatkiem TEC lub DBS.

Z uwagi na to, że nie stwierdzono wpływu rodzaju rozpuszczalnika użytego do sporządzania lakieru na właściwości filmów i szybkość uwalniania z nich terbinafiny, do dalszych prac doświadczalnych stosowano lakiery na bazie dwuskładnikowej mieszaniny rozpuszczalników: aceton/woda.

W badaniach przenikania substancji leczniczej *in vitro* użyto jako modelową membranę keratynową z kopyt wołowych. Membrany charakteryzowały się jednolitą strukturą. Drobne wgłębienia na ich powierzchni widoczne na obrazach z mikroskopu elektronowego nie miały wpływu na jakość membran. Mertin [72, 73] badając szybkość przenikania chloramfenikolu z lakieru do paznokci przez membrany z kopyt wołowych poczynił podobne obserwacje. Ten rodzaj membran stosował także Mohorčič w badaniach

dotyczących przenikania modelowego leku – metforminy [77]. W obu eksperymentach stosowano do tego celu komory dyfuzyjne wg Franz’a.

Do oceny przenikania terbinafiny użyto również komory Franz’a stosując membrany o dwóch grubościach tj. 150 μm i 250 μm . Po 5 dniach badania przez membranę o grubości 150 μm i powierzchni 1 cm^2 przeniknęło do środowiska akceptora od 1,63 mg do 2,21 mg terbinafiny w zależności od rodzaju formulacji (ryc. 66). Wyniki powyższych badań wskazują na przebieg profilu przenikania zgodnie z kinetyką zerowego rzędu.

Zwiększenie grubości membrany do wartości ok. 250 μm spowodowało spowolnienie procesu przenikania. Po tym samym czasie w płynie akceptorowym uzyskano maksymalną wartość 1,07 mg/cm^2 dla układu dwuskładnikowego z AQOAT[®] AS-HF. Najwolniej proces ten przebiegał w przypadku układu trójskładnikowego z AQOAT[®] AS-LF i DBS, gdyż po pięciu dniach przeniknęła ok. 2-krotnie mniejsza ilość chlorowodoru terbinafiny (0,49 mg/cm^2) (ryc. 67).

W badaniach mikrobiologicznych oceniano skuteczność hamowania wzrostu kolonii *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) w wyniku stosowania lakieru z terbinafiną na membrany z kopyt wołowych i fragmenty płytek paznokciowych, poddanych wcześniej działaniu opracowanych lakierów. Podobną metodykę użyto w badaniach oceny skuteczności działania terbinafiny, amorolfiny, bifonazolu i pirytonianu sodu stosowanych w leczeniu grzybicy paznokci [84], a także monitorowania terbinafiny *ex vivo* w płytkach paznokciowych, u pacjentów stosujących preparaty doustne [92].

Ocenie poddano formulacje dwuskładnikowe z obydwoma rodzajami AQOAT[®] oraz trójskładnikowe z AQOAT[®] i TEC lub DBS.

W oparciu o komputerową analizę obrazów membran z kopyt wołowych wyznaczono obszar kolonii dermatofitów. Zdjęcia wykonane na jasnym i ciemnym tle, różniły się między sobą zakresem wzrostu dermatofitów. Na zdjęciach posiadających jasne tło lepiej widoczny był wzrost dermatofitów na powierzchni membrany, podczas gdy na zdjęciach o ciemnym tle widoczne były strzępki grzybni wokół membrany. W celu uzyskania jednego obrazu przekształcono kolorowe zdjęcia w obrazy o 8 bitowej skali szarości. Nałożono obydwa obrazy na siebie poprzez mnożenie kanałów szarości. Dzięki wykorzystaniu algorytmów zaimplementowanych w programie do obróbki grafiki rastrowej ImageJ uzyskano kolorowy obraz na którym kolonia dermatofitów była lepiej widoczna niż miało to miejsce w przypadku nie przetworzonych zdjęć (ryc. 70, 71).

Wyniki badań wykazały, że trzydniowa aplikacja lakieru zawierającego 2,4 mg substancji czynnej na zwilżoną membranę z kopyt wołowych wystarczyła do zahamowania wzrostu kolonii wzorcowego szczepu *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) w okresie 7-dniowej inkubacji. Wzrost białej grzybni obserwowano jedynie w przypadku próby ślepej i kontrolnej (ryc. 68). Zastosowanie takiej ilości lakieru okazało się także wystarczające do zahamowania wzrostu grzybni przez okres 14 dni inkubacji (ryc. 69).

Przeprowadzono także badania z użyciem płytek paznokciowych. Płytkę paznokciową zmatowiono pilnikiem w celu zwiększenia przylegania lakieru do powierzchni, a także naruszenia zwartej struktury zewnętrznej warstwy płytki paznokciowej co ułatwia przenikanie terbinafiny. Obrazy przedstawiające powierzchnię płytki przed i po zmatowaniu przedstawiono na rycinie 72. Niezależnie od zastosowanej formulacji, 7-dniowa aplikacja lakieru wystarczyła do zahamowania wzrostu kolonii podczas 14-dniowej inkubacji (ryc. 73, 74). Analogiczne wyniki uzyskano dla płytek paznokciowych poddawanych działaniu lakieru przez okres 14 dni (ryc. 75, 76).

Wyniki powyższych badań wskazują na przydatność octanobursztynianu hydroksypropylometylcelulozy jako nośnika mającego wpływ na poprawę dostępności farmaceutycznej itraconazolu ze stałych rozproszeń. Ze względu na właściwości błonotwórcze okazał się on także odpowiedni jako składnik lakierów do paznokci z chlorowodorkiem terbinafiny. Po odparowaniu rozpuszczalnika AQOAT[®] tworzył filmy przylegające do płytki paznokciowej, z których substancja lecznicza uwalniała się w sposób długotrwały zapewniając skutecznie hamowanie wzrostu wzorcowego szczepu dermatofitów w badaniach mikrobiologicznych.

VI. Wnioski

1. Zastosowanie octanobursztynianu hydroksypropylometylocelulozy (AQOAT[®]) jako nośnika stałych rozproczeń substancji leczniczych trudno lub praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie jest uzasadnione.
2. W wyniku zastosowanej metody suszenia rozpyłowego obie badane substancje lecznicze występują w stałych rozproszeniach w formie amorficznej.
3. Poprawa dostępności farmaceutycznej itrakonazolu zależy od rodzaju nośnika i jego ilości w układzie. Lepsze parametry uzyskano w przypadku zastosowania AQOAT[®] AS-HF. Spośród sporządzonych formułacji najlepsze wyniki uzyskano dla układów trójskładnikowych z Gelucire[®] 50/13 (1:2:0,5).
4. Dzięki właściwościom, AQOAT[®] może być stosowany jako nośnik w lakierach do paznokci z terbinafiną. Lakier po nałożeniu na płytkę paznokciową charakteryzuje się dobrą przyczepnością, gładką powierzchnią, a uwalnianie substancji leczniczej następuje w sposób spowolniony.
5. O skuteczności oddziaływania terbinafiny nałożonej w formie lakierów na membranę z kopyt wołowych lub płytkę paznokciową świadczy zahamowanie wzrostu wzorcowego szczepu *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) w badaniach mikrobiologicznych.

VII. Piśmiennictwo

1. Adamski Z., Deja M.: *Nowości i przyszłość w terapii przeciugrzybiczej*, Mikol. Lek. 12 (2) (2005) 115-121
2. Akkar A., Müller R. H.: *Intravenous itraconazole emulsions produced by SolEmuls technology*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 56 (2003) 29-36
3. Al-Marzouqi A.H. i wsp.: *Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques*, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 227-233
4. Al-Marzouqi A. H. i wsp.: *Phase Solubility and Inclusion Complex of Itraconazole with β -Cyclodextrin using Supercritical Carbon Dioxide*, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 292-304
5. Baran E.: *Interakcje leków przeciugrzybiczych stosowanych ogólnie z innymi grupami leków*, Mikol. Lek. 8 (3-4) (2001) 171-174
6. Baran E., Adamski Z., Maleszka R.: *Terapia skojarzona – zalecane leczenie ciężkich postaci grzybicy paznokci*, Mikol. Lek. 10(2) (2003) 75-78.
7. Bohn M., Kraemer K. Th.: *Dermatopharmacology of ciclopirox nail lacquer topical solution 8% in the treatment of onychomycosis*, J. Am. Acad. Dermatol. 43 (2000) 57-69
8. Baran R.: *A randomized trial of amorolfine 5% solution nail lacquer combined with oral terbinafine compared with terbinafine alone in the treatment of dermatophytic toenail onychomycoses affecting the matrix region*, Br. J. Dermatol. 142 (2000) 1177 – 2000
9. Baran R., Hay R. J., Tosti A., Hanek E.: *A new classification of onychomycosis*, Br. J. Dermatol. 139 (1998) 567-571
10. Barret A. M. i wsp.: *Increasing the Dissolution Rate of Itraconazole Processed by Gas Antisolvent Techniques using Polyethylene Glycol as a Carrier*, Pharm. Res. 25 (2008) 1274-1289
11. Buchanan C. M. i wsp.: *Pharmacokinetics of Itraconazole After Intravenous and Oral Dosing of Itraconazole-Cyclodextrin Formulations*, J. Pharm. Sci. 96 (2007) 3100-3116
12. Budak A.: *Farmakoterapia grzybicy powierzchniowych i narządowych*, Farmacja Polska 63 (7) (2007) 304-312
13. Burzykowski T. i wsp.: *High prevalence of foot disease in Europe: results of the Achilles Project*, Mycoses 46 (2003) 496-505
14. Chen W. i wsp.: *Development and evaluation of novel itraconazole-loaded intravenous nanoparticles* Int. J. Pharm. 362 (2008) 133-140
15. Chowdary K. P. R.: *Investigation of dissolution enhancement of itraconazole by solid dispersion in superdisintegrants*, Drug. Dev. Ind. Pharm. 26 (11) (2000) 1207-1211.
16. Cisło M.: *Cyklopiroks- właściwości farmakologiczne i zastosowanie kliniczne*, Mikol. Lek. 7 (3) (2000) 165-169

17. Czech A., Pieszczyk B., Jachowicz R.: *Preparation and characterization of piroxicam-hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate microspheres*, Eur. J. Pharm. Sci. 34 (2008) 34-39
18. Donnelly R. F.: *Bioadhesive patch-based delivery of 5-aminolevulinic acid to the nail for photodynamic therapy of onychomycosis*, J. Control. Release 103 (2005) 381-392
19. *Drug Information for the Health Care Professional USP DI 2000 20th Edition* Micromedex.
20. Elewski B.: *Grzybicze zakażenia skóry*, α-medica press 2000 r.
21. Farmakopea Polska VIII
22. Foster K. W. i wsp.: *Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002*, J. Am. Acad. Dermatol. 50 (2004) 748-52
23. Freichel O.L., Lippold B.C.: *An easy producible new oral hydrocolloid drug delivery system with a late burst in the release profile*, Int. J. Pharm. 216 (2001) 165-169
24. Fukui E., Miyamura N., Kobayashi M.: *An In vivo investigation of the suitability of press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) and hydrophobic additives in the outer shell for colon targeting*, J. Control. Release 70 (2001) 97-107
25. Fukui E., Miyamura N., Kobayashi M.: *Effect of magnesium stearate or calcium stearate as additives on dissolution profiles of diltiazem hydrochloride from press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate in the outer shell*, International Journal of Pharmaceutics, 216 (2001) 137-146
26. Fukui E., Miyamura N., Yoneyama T.: *Drug release from and mechanical properties of press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate and plasticizers in the outer shell*, Int. J. Pharm. 21 (2001) 33-43
27. Ghannoum M. A. i wsp.: *A large-scale North American study of fungal isolates from nails: The frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns*, J. Am. Acad. Dermatol. 43 (2000) 641-8
28. Gliński W., Baran E.: *Konsensus dotyczący leczenia powierzchownych zakażeń grzybiczych* Przegląd Dermatologiczny, 2 (89) (2002) 85-92
29. Goodfield & Evans: *Treatment of superficial white onychomycosis with topical terbinafine cream* Br. J. Dermatol. 141 (3) (1999) 604 – 605
30. *Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*, U.S. Department of Health and Human Services, FDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER) August 1997
31. Gupta A. K.: *Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV – positive individuals*, Int. J. Dermatol 39 (10) (2000) 746-9
32. Gupta A. K.: *Fungal infections in immunocompromised patients*, J. Eur. Acad. Dermatol. 17 (2003) 1-2
33. Gupta A. K. i wsp.: *Prevalence and epidemiology of onychomycosis in patients visiting physicians' offices: A multicenter Canadian survey of 15,000 patients*, J. Am. Acad. Dermatol. 43 (2000) 244-8
34. Gupta A. K. i wsp.: *Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey*, Br. J. Dermatol. Volume 139 (4) (1998) 665 -9

35. Gupta A. K., Shear N. H.: *The new oral antifungal agents for onychomycosis of the toenails*, J. Eur. Acad. Dermatol. 13 (1999) 1-13
36. Gupta A. K. i wsp.: *Treatment of Onychomycosis: Pros and Cons of Antifungal Agents*, J. Cutan. Med. Surg. 2004 25–30
37. Hao J., Smith A., Li K.: *Iontophoretically Enhanced Ciclopirox Delivery into and Across Human Nail Plate*, DOI 10.1002/jps.21664
38. Hassan H. A. i wsp.: *Enhancement of dissolution amount and in vivo bioavailability of itraconazole by complexation with β -cyclodextrin using supercritical carbon dioxide*, J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 243–250
39. Hryncewicz-Gwózdź A., Plomer-Niezgoda E., Maj J.: *Grzybica stóp, rąk i paznokci – epidemiologia, objawy, leczenie*, Mikol. Lek. 12 (1) (2005) 57-62
40. Hui X., Chan T.: *Enhanced Econazole Penetration into Human Nail by 2-n-Nonyl-1,3-dioxolane*, J Pharm Sci 92 (2003) 142–148
41. Huyghebaert N. i wsp.: *In vitro evaluation of coating polymers for enteric coating and human ileal targeting*, Int. J. Pharm. 298 (2005) 26–37
42. Jachowicz R.: *Stałe rozproszenia jako układy o kontrolowanym uwalnianiu substancji leczniczej*, Farm. Pol. 55 (3) (1999) 155-160
43. Jachowicz R.: *Zwiększenie rozpuszczalności substancji leczniczych poprzez wytwarzanie stałych rozprożeń*, Farm. Pol. 41 (10) 1985 577-580
44. Jachowicz R., Czech A.: *Preparation and evaluation of piroxicam-HPMCAS solid dispersions for ocular use*, Pharm. Dev. Techn. 13 (2008) 495-504
45. Janssens S. i wsp.: *Characterization of ternary solid dispersions of Itraconazole in polyethylene glycol 6000/polyvidone-vinylacetate 64 blends*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 69 (2008) 1114–1120
46. Janssens S. i wsp.: *Characterization of Ternary Solid Dispersions of Itraconazole, PEG 6000, and HPMC 2910 E5*, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 2110–2120
47. Janssens S. i wsp.: *Evaluation of the formulation of solid dispersions by co-spray drying itraconazole with Inutec SP1, a polymeric surfactant, in combination with PVPVA 64*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 70 (2008) 500–505
48. Janssens S., Roberts C.: *Physical stability of ternary solid dispersions of itraconazole in polyethyleneglycol 6000/hydroxypropylmethylcellulose 2910 E5 blends*, Int. J. Pharm. 355 (2008) 100–107
49. Janssens S. i wsp.: *The use of a new hydrophilic polymer, Kollicoat IR, in the formulation of solid dispersions of Itraconazole*, Eur. J. Pharm. Sci. 30 (2007) 288–294
50. Janssens S. i wsp.: *Formulation and characterization of ternary solid dispersions made up of Itraconazole and two excipients, TPGS 1000 and PVPVA 64, that were selected based on a supersaturation screening study*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 69 (2008) 158–166
51. Ji-Yeon H. i wsp.: *A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption*, J. Control. Release 110 (2006) 332 – 338
52. Jung H. i wsp.: *Laponite-based nanohybrid for enhanced solubility and controlled release of itraconazole*, Int. J. Pharm. 349 (2008) 283–290
53. Jung Y.J., Yoo S.D., Lee S.H.: *Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by solid dispersion technique*, Int. J. Pharm. 187 (1999) 209- 218

54. Kablitz C.D., Harder K., Urbanetz N.A.: *Dry coating in a rotary fluid bed*, Eur. J. Pharm. Sci. 27(2-3) (2006) 212-9
55. Kablitz C.D. i wsp.: *Characterization of the film formation of the dry coating process*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 67 (2007) 449–457
56. Kablitz C.D. i wsp.: *Parameters influencing polymer particle layering of the dry coating process*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 69 (2008) 760–768
57. Kapsi S. G. i wsp.: *Processing factors in development of solid solution formulation of itraconazole for enhancement of drug dissolution and bioavailability*, Int. J. Pharm. 229 (2001) 193–203
58. Kim C. J.: *Controlled-release from triple-layer, donut-shaped tablets with enteric polymers*, Phar. Sci. Tech 06(03) (2005) 439-436
59. Kipp J. E.: *The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs*, Int. J. Pharm. 284 (2004) 109–122
60. Kobayashi Y.: *In vitro permeation of several drugs through the human nail plate: relationship between physicochemical properties and nail permeability of drugs*, Eur. J. Pharm. Sci. 21 (2004) 471–477
61. Kojima M., Nakagami H.: *Development of controlled release matrix pellets by annealing with micronized water-insoluble or enteric polymers*, J. Control. Release 82 (2-3) (2002) 335-43
62. Konno H i wsp.: *Effect of polymer type on the dissolution profile of amorphous solid dispersions containing felodipine*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 70 (2008) 493–499.
63. Konno H i wsp.: *Influence of Different Polymers on the Crystallization Tendency of Molecularly Dispersed Amorphous Felodipine*, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 2692–2705
64. Kostowski W.: *Farmakologia, Podstawy farmakoterapii 2005*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 2005
65. Lecha M.: *An Open – Label, Multicenter Study of the Combination of Amorolfine Nail Lacquer and Itraconazole Compared with Oral Itraconazole Alone in the Treatment of Severe Toenail Onychomycosis*, Curr. Thera. Res. 63 (6) (2002) 366-379
66. Lecha M.: *Amorolfine and itraconazole combination for severe toenail onychomycosis; results of an open randomized trial in Spain*, Br. J. Dermatol. 145 (2001) 21-26
67. Leuner C., Dressman J.: *Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 50 (2000) 47- 60
68. Maleszka R.: *Monoterapia itrakonazolem i leczenie skojarzone dermatofitowej grzybicy paznokci na tle patomechanizmu szerzenia się zakażenia grzybiczego w narzędzie paznokciowym*, Mikol. Lek. 12 (1) (2005) 15-19
69. Maleszka R, Baran E.: *Lecznictwo mikologiczne w końcu dwudziestego wieku*, Mikol. Lek. 7 (1) (2000) 47-55
70. Maleszka R, Ratajczak-Stefańska V.: *Zastosowanie postępowania operacyjnego we współczesnym leczeniu grzybicy paznokci*, Mikol. Lek. 10 (3) (2003) 173-177
71. Mellaerts R. i wsp.: *Increasing the oral bioavailability of the poorly water soluble drug itraconazole with ordered mesoporous silica*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 69 (2008) 223–230

72. Mertin D., Lippold B.C.: *In vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves : Influence of the Partition Coefficient Octanol/ water and the water solubility of drugs on their permability and maximum flux*, J. Pharm. Pharmacol. 49 (1997) 30-34
73. Mertin D., Lippold B.C.: *In vitro permeability of the human nail and of a keratin membrane from bovine hooves : penetration of chloramphenicol from lipophilic vehicles and nail lacquer*, J. Pharm. Pharmacol. 49 (1997) 241-245
74. Mididoddi P. K., Repka M. A.: *Characterization of hot-melt extruded drug delivery systems for onychomycosis*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 66 (2007) 95-105
75. Miller D. A. i wsp.: *Targeted Intestinal Delivery of Supersaturated Itraconazole for Improved Oral Absorption*, Pharm. Res. 25 (6) (2008) 1450-1459
76. Miyake K. i wsp.: *Characterization of itraconazole:2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution*, Int. J. Pharm. 179 (1999) 237-245
77. Mohorčič M., i wsp.: *An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery*, Int. J. Pharm. 332 (2007) 196-201
78. Moore J. W., Flanner H. H.: *Mathematical Comparison of Dissolution Profiles Pharmaceutical Technology*, 20 (6) (1996) 64-74.
79. Murdan S.: *Drug delivery to the nail following topical application*. Int. J. Pharm. 236 (2002) 1-26
80. Müller R.H., Hildebrand G.E.: *Technologia nowoczesnych postaci leku*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1998
81. Myoung Y., Choi H-K.: *Permeation of ciclopirox across porcine hoof membrane: effect of pressure sensitive adhesives and vehicles*, Eur. J. Pharm. Sci. 20 (2003) 319-325
82. Nair A. B., i wsp.: *Trans-Ungual Iontophoretic Delivery of Terbinafine*, J. Pharm. Sci. 99 (2008) 1-9
83. Nakamichi K., Yasuura H., Fukui H.: *Evaluation of a floating dosage form of nifedipine hydrochloride and HPMCAS prepaed using a twin- screw extruder*, Int. J. Pharm. 218 (2001) 103 -112
84. Nakashima T., Nozawa A., Ito T.: *Experimental tinea unguium model to assess topical antifungal agents using the infected human nail dermatophyte in vitro*, J. Infect. Chemother. 8(4) (2002) 331-5
85. Niwiński K., Jachowicz R., Cedro A.: *The infuence of different carriers on dissolution rate of nifedipine from solid dispersions*, Proc. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 2004, Nuremberg 15-18 March (2004) 527-528
86. Nowicki R.: *Współczesne metody leczenia grzybic powierzchniowych – Biblioteka lekarza praktyka*, pod red A. Langer – „Współczesne leczenie wybranych chorób skóry” - Ośrodek Informacji Naukowej „Polfa” Wa-wa 2002
87. Obadiah J., Scher R.: *Nail Disorders: Unapproved Treatments*, Clin. Dermatol. 20 (2002) 643-648
88. Obara S., Maruyama N., Nishiyama Y.: *Dry coating: an innovative enteric coating method using a cellulose derivative*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 47 (1999) 51-59
89. Odom R. B.: *New therapies for onychomycosis*, J. Am. Acad. Dermatol. 35 (1996) 26-30

90. Olafsson J.H., Sigurgeirsson B., Baran R.: *Combination therapy for onychomycosis*, Br. J. Dermatol. 149 (Suppl. 65) (2003) 15–18
91. Oshima T. i wsp.: *Preparation of Rapidly Disintegrating Tablets Containing Itraconazole Solid Dispersions*, Chem. Pharm. Bull. 55 (11) (2007) 1557–1562
92. Pawlik B., *Próba Monitorowania ex vivo terbinafiny w płytkach paznokciowych*, Mikol. Lek. 10 (4) (2003) 255–259
93. Peeters J. i wsp.: *Characterization of the Interaction of 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin With Itraconazole at pH 2, 4, and 7*, J. Pharm. Sci. 91 (2002) 1414–1422
94. PHARMINDEX Kompendium Leków 2009
95. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlowska A. *Leki Współczesnej Terapii 2002*. Split Trading. Wyd. Fundacji Büchnera wydanie XIV 2002 rok
96. Rafati H. i wsp.: *A New Solution for a Chronic Problem; Aqueous Enteric Coating*, J. Pharm. Sci. 95 (2006) 2432–2437
97. Ratajczak-Stefańska V, Maleszka R.: *Kliniczne i mikologiczne aspekty nawrotowej grzybicy paznokci*, Mikol. Lek. 10 (2) (2003) 85–91
98. Reich A., Szpiewowski J., Baran E.: *Terbinafina w leczeniu niedermatofitowych i mieszanych zakażeń grzybiczych paznokci*, Mikol. Lek. 10 (2) (2003) 145–148
99. Repka M. A., i wsp.: *Influence of human nail etching for the assessment of topical onychomycosis therapies*, Int. J. Pharm. 282 (2004) 95–106
100. Repka M. A., i wsp.: *Nail morphology studies as assessments for onychomycosis treatment modalities*, Int. J. Pharm. 245 (2002) 25–36
101. Ricketti J.C.: *Terbinafine/miconazole nitrate 2% tincture compound for the treatment of onychomycosis*, The Foot 11 (2001) 21–23
102. Robbins J. R.: *Treatment of onychomycosis in the diabetic patient population* J. Diabetes Complicat. 17 (2003) 98–104
103. Roberts D.T., Taylor W. D.: *Guidelines for treatment of onychomycosis*, Br. J. Dermatol. 148 (2003) 402–410
104. Sawicki W.: *Histologia* PZWL Warszawa 2003
105. Shin-Etsu – materiały firmowe
106. Sinswat P. i wsp.: *Stabilizer choice for rapid dissolving high potency itraconazole particles formed by evaporative precipitation into aqueous solution*, Int. J. Pharm. 302 (2005) 113–124
107. Six K., Verreck G., Peters J.: *Increased physical stability and improved dissolution properties of itraconazole, a class II drug, by solid dispersion that combine fast- and slow- dissolving polymers*, J. Pharm. Sci. 93 (2004) 124–131
108. Six K., Daems T., Hoon J., Van Hecken A.: *Clinical study of solid dispersions of itraconazole prepared by hot-stage extrusion*, Eur. J. Pharm. Sci. 24 (2005) 179–186
109. Six K. i wsp.: *Identification of Phase Separation in Solid Dispersions of Itraconazole and Eudragit E100 Using Microthermal Analysis*, Pharm. Res. 20 (1) (2003) 135–138
110. Six K. i wsp.: *Characterization of Solid Dispersions of Itraconazole and Hydroxypropylmethylcellulose Prepared by Melt Extrusion, Part II*, Pharm. Res. 20 (7) (2003) 1047–1054

-
111. Streubel A., Siepmann J., Peppas N.A.: *Bimodal drug release achieved with multi-layer matrix tablets: transport mechanism and device design*, J. Control. Release 69 (2000) 455-468
 112. Szepietowski J.: *Grzybica paznokci* Nowa Medycyna – zeszyt 109 (1) (2001)
 113. Tanno F., Nishiyama Y., Kokubo H.: *Evaluation of hypromellose acetate succinate (HPMCAS) as a carrier in solid dispersions*, Drug. Dev. Ind. Pharm. 30 (1) (2004) 9-17
 114. Tanno F. K., i wsp.: *Site-Specific Drug Delivery to the Middle Region of the Small Intestine by Application of Enteric Coating with Hypromellose Acetate Succinate (HPMCAS)*, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 2665–2679
 115. Tanno F. K., i wsp.: *Site-Specific Drug Delivery to the Middle-to-Lower Region of the Small Intestine Reduces Food–Drug Interactions that Are Responsible for Low Drug Absorption in the Fed State*, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 5341–5353
 116. Tao T. i wsp.: *Preparation and evaluation of itraconazole dihydrochloride for the solubility and dissolution rate enhancement*, Int. J. Pharm. 367 (2009) 109–114
 117. Thoma K., Bechtold K.: *Influence of aqueous coatings on the stability of enteric coated pellets and tablets*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 47 (1999) 39-50
 118. *Urzędowy Wykaz Produktów Leczniczych dopuszczonych do obrotu na Terytorium Rzeczypospolitej Polskiej według stanu na 31 stycznia 2008 r. uzupełniony o Suplement wg stanu na 31 lipca 2008 r.*
 119. Wang X.: *Solid state characteristics of ternary solid dispersions composed of PVP VA64, Myrj 52 and itraconazole*, Int. J. Pharm. 303 (2005) 54–61.
 120. Wang X. i wsp.: *Study of the phase behavior of polyethylene glycol 6000–itraconazole solid dispersions using DSC*, Int. J. Pharm. 272 (2004) 181–187
 121. Weuts I. i wsp.: *Study of the physicochemical properties and stability of solid dispersions of loperamide and PEG6000 prepared by spray drying*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 59 (2005) 119–126
 122. *WHO Model List of Essential Medicines 15th list, March 2007*
<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/index.html>
 123. Woo J. S. i wsp.: *Reduced food-effect and enhanced bioavailability of a self-microemulsifying formulation of itraconazole in healthy volunteers*, Eur. J. Pharm. Sci. 33 (2008) 159–165
 124. Van Eerdenbrugh B. i wsp.: *Microcrystalline cellulose, a useful alternative for sucrose as a matrix former during freeze-drying of drug nanosuspensions – A case study with itraconazole*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 70 (2008) 590–596
 125. Van den Mooter G. i wsp.: *Evaluation of Inutec SP1 as a new carrier in the formulation of solid dispersions for poorly soluble drugs*, Int. J. Pharm. 316 (2006) 1-6
 126. Vasconcelos T., Sarmiento B., Costa P.: *Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs*, Drug Discov. Today 12 (2007) 1068-1075
 127. Vaughn J. M. i wsp.: *Single dose and multiple dose studies of itraconazole nanoparticles*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 63 (2006) 95–102
 128. Verreck G. i wsp.: *Characterization of solid dispersions of itraconazole and hydroxypropylmethylcellulose prepared by melt extrusion/part I*, Int. J. Pharm. 251 (2003) 165-17

129. Verreck G. i wsp.: *The effect of pressurized carbon dioxide as a temporary plasticizer and foaming agent on the hot stage extrusion process and extrudate properties of solid dispersions of itraconazole with PVP-VA 64*, Eur. J. Pharm. Sci. 26 (2005) 349–358
130. Verreck G. i wsp.: *Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer*, J. Control. Release 92 (2003) 349–360
131. Yang M. i wsp.: *A novel pH-dependent gradient-release delivery system for nitrendipine. I. Manufacturing, evaluation in vitro and bioavailability in healthy dogs*, J. Control. Release 98. (2004) 219-229
132. Yang M., i wsp.: *A novel pH-dependent gradient-release delivery system for nitrendipine. II. Investigation of the factors affecting the release behaviors of the system*, Int. J. Pharm. 286 (2004) 99-109
133. Ye G. i wsp.: *Development and optimization of solid dispersion containing pellets of itraconazole prepared by high shear pelletization*, Int. J. Pharm. 337 (2007) 80–87

VIII. Streszczenie

Założenia badawcze pracy dotyczyły oceny możliwości zastosowania octanobrsztynianu hydroksypropylometylocelulozy (AQOAT[®]) jako nośnika substancji o działaniu przeciwgrzybiczym. Do badań użyto chlorowoderek terbinafiny i itrakonazol jako modelowe substancje trudno lub praktycznie nierozpuszczalne w wodzie.

Sporządzono 22 formułacje dwu- i trójskładnikowych stałych rozproszeń itrakonazolu metodą suszenia rozpyłowego stosując AQOAT[®] AS-LF lub AS-HF jako nośniki oraz dodatek Gelucire[®] 44/14 lub Gelucire[®] 50/13 lub PVP lub PEG 6000. W przypadku terbinafiny opracowano 5 formułacji dwuskładnikowych stałych rozproszeń z AQOAT[®] AS-LF lub AS-HF, a także 26 formułacji lakierów do paznokci zawierających AQOAT[®] AS-LF lub AS-HF oraz jako plastyfikatory: PEG 400, glicerol, cytrynian trietylu, sebacynian dibutyli.

W oparciu o wyniki badań rentgenograficznych, mikroskopowych i różnicowej kalorymetrii skaningowej stwierdzono wpływ AQOAT[®], parametrów technologicznych i metody sporządzania na właściwości substancji leczniczych w stałych rozproszeniach. We wszystkich badanych układach zawierających AQOAT[®] substancje lecznicze były w formie amorficznej.

Spośród dwuskładnikowych układów stałych rozproszeń itrakonazolu najlepszym okazał się układ zawierający AQOAT[®] AS-HF (1:4). Stwierdzono ponad 44-krotną poprawę rozpuszczalności, a w badaniach szybkości rozpuszczania uzyskano po 2 godz. 14-krotne zwiększenie ilości rozpuszczonego itrakonazolu w porównaniu z samą substancją leczniczą. Efekt ten został spotęgowany poprzez wytworzenie układów trójskładnikowych, w przypadku układów z Gelucire[®] i PVP. Po okresie 1 roku przechowywania w temperaturze pokojowej najlepszą stabilnością charakteryzowały się dwuskładnikowe rozproszenia itrakonazolu z AQOAT[®] AS-HF (1:4) i trójskładnikowe (1:4:0,5).

Wyniki badań stałych rozproszeń z terbinafiną wykazały spowolnienie szybkości rozpuszczania. W oparciu o ocenę ich właściwości do sporządzania lakierów wybrano układ terbinafina : AQOAT[®] (1:4), stosując jako rozpuszczalniki mieszaninę: aceton/woda lub aceton/etanol/woda. Badania szybkości uwalniania chlorowodoru terbinafiny prowadzono z filmów uzyskanych po odparowaniu rozpuszczalnika z lakieru.

Szybkość przenikania chlorowodorku terbinafiny przez membrany zależała od ich grubości. W wyniku zastosowania membran o grubości ok. 150 μm lub ok. 250 μm z powierzchni 1 cm^2 po 5 dniach ilość substancji leczniczej, która znajdowała się w płynie akceptorowym wynosiła odpowiednio 1,85 mg i 1,07 mg (formulacja z AQOAT[®] AS-HF).

Na podstawie wyników badań mikrobiologicznych stwierdzono skuteczność oddziaływania terbinafiny nałożonej w postaci lakieru na membrany keratynowe oraz płytki paznokciowe poprzez zahamowanie wzrostu wzorcowego szczepu *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) przez okres 14 dni inkubacji.

IX. Summary

The aim of the study was to assess the possibility of using hydroxypropylomethylcellulose acetate succinate (AQOAT[®]) as carrier of antifungal drugs, hardly or practically insoluble in the water. Itraconazole and terbinafine hydrochloride were used in the study as model drugs.

In the studies the properties of 22 binary and ternary solid dispersions with itraconazole, 5 binary solid dispersions with terbinafine hydrochloride and 26 nail varnishes, were assessed. The solid dispersions were prepared by the spray drying of itraconazole with AQOAT[®] AS-LF, AS-HF as a carrier and with addition of Gelucire[®] 44/14, Gelucire[®] 50/13, PVP or PEG 6000. For preparation of binary solid dispersions with terbinafine hydrochloride, AQOAT[®] AS-LF and AS-HF were used as excipients. In formulations of nail varnishes additional PEG 400, glycerol, triethyl citrate and dibutyl sebacate as a plasticizers were added.

The influence of the quantity of the carrier, technological parameters and method of solid dispersions preparation on the drugs properties was revealed by scanning and polarizing microscope analyses, X-ray diffractions and differential scanning calorimetry. All solid dispersions with AQOAT[®] contained drugs in the amorphous state.

In case of binary solid dispersions the best results were obtained for formulation with AQOAT[®] AS-HF (1:4). The solubility of itraconazole from this formulation was 44-fold greater than the solubility of drug alone. During dissolution studies the quantity of the drug dissolved after 2 hr was 14-fold larger than amount of pure drug. The further improvement of the itraconazole dissolution was achieved by preparation of ternary solid dispersions with Gelucire[®] or PVP. The most stable formulations, in the shelf test during 1 year of storage, were binary solid dispersions with AQOAT[®] AS-HF (1:4) and ternary (1:4:0,5).

The amounts of dissolved terbinafine from binary solid dispersions with AQOAT[®] were decreased. After assessment of the properties of solid dispersions, formulation 1:4 was chosen as an appropriate for preparation of nail lacquers. Mixtures of acetone/water and acetone/ethanol/water were used to dissolving drug, carrier and plasticizers. The film,

formed after evaporation of the solvent from varnishes was examined in dissolution studies.

The drug permeation studies were carried out in Franz cells with natural membranes prepared from bovine hooves. The amount of terbinafine permeated through membrane depends on the thickness of the membrane. After 5 days the cumulative amount of terbinafine permeated through membrane 150 μm or 250 μm thick and with the surface equal 1 cm^2 was as follows 1,85 mg and 1,07 mg (formulation with AQOAT[®] AS-HF).

Application of terbinafine hydrochloride in form of the nail polish to membrane or nail plate is effective and inhibit the growth of *Trichophyton mentagrophytes* (ATTC 18784) colony during 14 days of incubation.

X. Spis tabel

Tabela 1. Przykłady preparatów zarejestrowanych w Polsce stosowanych doustnie w leczeniu grzybic paznokci.....	12
Tabela 2. Preparaty zarejestrowane w Polsce stosowane w leczeniu miejscowym grzybic paznokci.....	13
Tabela 3. Przykłady dwuskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.....	20
Tabela 4. Przykłady trójskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.....	21
Tabela 5. Skład dwuskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.....	38
Tabela 6. Skład trójskładnikowych stałych rozproszeń z itrakonazolem.....	38
Tabela 7. Parametry suszenia rozpyłowego układów dwuskładnikowych z itrakonazolem.....	40
Tabela 8. Parametry suszenia rozpyłowego układów dwuskładnikowych z Gelucire® i trójskładnikowych.....	40
Tabela 9. Skład stałych rozproszeń z chlorowodorkiem terbinafiny.....	42
Tabela 10. Parametry suszenia rozpyłowego układów z chlorowodorkiem terbinafiny.....	43
Tabela 11. Skład lakierów bez plastyfikatorów.....	50
Tabela 12. Skład lakierów z jednym plastyfikatorem.....	50
Tabela 13. Skład lakierów z dwoma plastyfikatorami.....	50
Tabela 14. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 44/14.....	73
Tabela 15. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 50/13.....	75
Tabela 16. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i PVP.....	76
Tabela 17. Ilość rozpuszczonego itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń z AQOAT® AS-HF (AQH) i PEG 6000.....	77
Tabela 18. Charakterystyka procesu rozpuszczania itrakonazolu (I) z układów proszkowych przy użyciu modelu matematycznego.....	78
Tabela 19. Ilość rozpuszczonego w wodzie chlorowodoru terbinafiny (T) ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).....	94
Tabela 20. Ilość rozpuszczonego w wodzie chlorowodoru terbinafiny (T) ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).....	95
Tabela 21. Charakterystyka procesu rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny (THCl) z układów proszkowych 1:4 przy użyciu modelu matematycznego.....	97
Tabela 22. Ilość uwolnionego chlorowodoru terbinafiny z filmów z AQOAT® AS-HF z dodatkiem plastyfikatorów.....	101
Tabela 23. Ilość uwolnionego chlorowodoru terbinafiny z filmów z AQOAT® AS-LF z dodatkiem plastyfikatorów.....	101

Tabela 24. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF, DBS oraz PEG i glicerol.....	102
Tabela 25. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-LF, DBS oraz PEG i glicerol.....	103
Tabela 26. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF oraz PEG i glicerol.....	105
Tabela 27. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-LF oraz PEG i glicerol.....	106
Tabela 28. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® AS-HF, DBS oraz PEG i glicerol.....	107
Tabela 29. Ilość uwolnionego chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających DBS, AQOAT® AS-LF oraz PEG i glicerol.....	107
Tabela 30. Charakterystyka procesu przenikania chlorowodorku terbinafiny (THCl) z lakierów z AQOAT® AS-HF (AQ) przez modelowe membrany przy użyciu modelu matematycznego.....	111

XI. Spis rycin

Rycina 1. Budowa paznokcia.....	8
Rycina 2. Typy grzybicy paznokci [9].....	10
Rycina 3. Mechanizm działania substancji przeciwgrzybiczych.....	14
Rycina 4. Suszarka rozpyłowa Büchi Mini Spray Dryer B 191.....	41
Rycina 5. Proces suszenia rozpyłowego.	41
Rycina 6. Membrany z kopyt wołowych. A – wycięty fragment kopyta, B – membrana sucha, C – membrana nawilżona.....	51
Rycina 7. Komora dyfuzyjna wg Franz’a.....	53
Rycina 8. Substancja lecznicza, nośniki oraz mieszanina fizyczna (MF). Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 1000 i 5000×.....	57
Rycina 9. Dwuskładnikowe stałe rozproszenia (SR) itrakonazolu (I), układy 1:1, 1:2 i 1:4. Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 2000 i 5000×.....	58
Rycina 10. Trójskładnikowe stałe rozproszenia (SR) itrakonazolu (I). Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 2000×.....	59
Rycina 11. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). I – itrakonazol, SR – stałe rozproszenie, MF – mieszanina fizyczna.....	60
Rycina 12. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). I – itrakonazol, AQ – AQOAT®, G – Gelucire®, PVP - poliwinylpirolidon, SR – stałe rozproszenie.....	61
Rycina 13. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-LF (AQL), mieszaniny fizycznej (MF) i stałego rozproszenia (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-LF.....	62
Rycina 14. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH), mieszaniny fizycznej (MF) i stałych rozprośnień (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF.....	63
Rycina 15. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH) i stałych rozprośnień (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14.....	63
Rycina 16. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH), stałych rozprośnień (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13.....	64
Rycina 17. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu (I), AQOAT® AS-HF (AQH), stałych rozprośnień (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i PVP.....	64
Rycina 18. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z mieszanin fizycznych (MF) i stałych rozprośnień (SR).....	66
Rycina 19. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) ze stałych rozprośnień (SR) z AQOAT® AS-HF.....	66
Rycina 20. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) z AQOAT® AS-HF i PVP.....	67
Rycina 21. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14.....	67
Rycina 22. Rozpuszczalność itrakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14 w trakcie 10 godz. badania.....	68

Rycina 23. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego układów z Gelucire® 44/14 po 10 godz. badania rozpuszczalności. I – itakonazol, AQ – AQOAT®, G – Gelucire®, SR – stałe rozproszenie.	68
Rycina 24. Rozpuszczalność itakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13.	69
Rycina 25. Rozpuszczalność itakonazolu (I) z trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13 w trakcie 10 godz. badania.	69
Rycina 26. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego układów z Gelucire® 50/13 po 10 godz. badania rozpuszczalności. I – itakonazol, AQ – AQOAT®, G – Gelucire®, SR – stałe rozproszenie.	70
Rycina 27. Profil rozpuszczania itakonazolu z dwuskładnikowych układów proszkowych: mieszaniny fizyczne (MF), stałe rozproszenia (SR).	72
Rycina 28. Profil rozpuszczania itakonazolu z dwuskładnikowych układów proszkowych: mieszaniny fizyczne (MF), stałe rozproszenia (SR).	72
Rycina 29. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) z dwuskładnikowych stałych rozprośnień z AQOAT® AS-HF (AQH).	73
Rycina 30. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 44/14 (G).	74
Rycina 31. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 44/14 (G).	74
Rycina 32. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i Gelucire® 50/13 (G).	75
Rycina 33. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i PVP.	76
Rycina 34. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF (AQH) i PEG 6000.	77
Rycina 35. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) dwuskładnikowych stałych rozprośnień (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	80
Rycina 36. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itakonazolu oraz stałych rozprośnień (SR) itakonazolu z AQOAT® AS-HF bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	80
Rycina 37. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, $f_2 = 63,62$.	81
Rycina 38. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	81
Rycina 39. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itakonazolu i stałych rozprośnień (SR) itakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	82
Rycina 40. Profil rozpuszczania itakonazolu (I) ze stałych rozprośnień zawierających AQOAT® AS-HF i Gelucire® 44/14 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, f_2 dla 1:4:0,5 = 51,62 dla 1:2:0,5 = 30,68.	82
Rycina 41. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) trójskładnikowych stałych rozprośnień (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	83
Rycina 42. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itakonazolu i stałych rozprośnień (SR) itakonazolu z AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	83

Rycina 43. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF i Gelucire® 50/13 bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, f_2 dla 1:4:0,5 = 93,82 dla 1:2:0,5 = 31,25.....	84
Rycina 44. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×) trójskładnikowych stałych rozproszeń (SR) bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.....	84
Rycina 45. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny itrakonazolu i stałych rozproszeń (SR) itrakonazolu z AQOAT® AS-HF i PVP bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania.	85
Rycina 46. Profil rozpuszczania itrakonazolu (I) ze stałych rozproszeń zawierających AQOAT® AS-HF i PVP bezpośrednio po sporządzeniu i po roku przechowywania, f_2 dla 1:4:0,5 = 56,00 dla 1:2:0,5 = 59,02.	85
Rycina 47. Substancja lecznicza, nośniki oraz mieszaniny fizyczne (MF) i stałe rozproszenia (SR) terbinafiny (T). Obraz z elektronowego mikroskopu skaningowego – powiększenie 1000 i 2000×.	87
Rycina 48. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). T – chlorowoderek terbinafiny, AQ – AQOAT®, MF – mieszanina fizyczna, SR – stałe rozproszenie.....	89
Rycina 49. Obrazy z mikroskopu polaryzacyjnego (powiększenie 100×). T – chlorowoderek terbinafiny, AQ – AQOAT®, MF – mieszanina fizyczna, SR – stałe rozproszenie.....	90
Rycina 50. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny chlorowodoru terbinafiny (T), AQOAT® AS-HF, (AQH) mieszaniny fizycznej (MF) i stałego rozproszenia (SR) terbinafiny z AQOAT® AS-HF.....	91
Rycina 51. Termogramy DSC terbinafiny (T), AQOAT® AS-HF (AQH), stałego rozproszenia (SR), mieszaniny fizycznej (MF) o składzie: T:AQH 1:6.....	91
Rycina 52. Rentgenowski obraz dyfrakcyjny chlorowodoru terbinafiny (T), AQOAT® AS-LF, (AQL) mieszaniny fizycznej (MF) i stałego rozproszenia (SR) terbinafiny z AQOAT® AS-LF.	92
Rycina 53. Termogramy DSC terbinafiny (T), AQOAT® AS-LF (AQL), stałego rozproszenia (SR), mieszaniny fizycznej (MF) o składzie: T:AQL 1:6.....	92
Rycina 54. Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w wodzie ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).	94
Rycina 55. Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w wodzie ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).	95
Rycina 56. Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w 0,1 mol/l HCl ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).	96
Rycina 57. Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w 0,1 mol/l HCl ze stałych rozproszeń (SR) i mieszanin fizycznych (MF).	96
Rycina 58. Profil rozpuszczania chlorowodoru terbinafiny w wodzie ze stałych rozproszeń (SR).	97
Rycina 59. Obrazy mikroskopowe powierzchni (powiększenie 1000 ×) i przekroju (powiększenie 50 ×) filmów z AQOAT® AS-HF (AQH) i plastifikatorami sporządzone przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.....	99
Rycina 60. Szybkość uwalniania chlorowodoru terbinafiny z filmów z AQOAT® oraz z dodatkiem plastifikatorów. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.....	102
Rycina 61. Szybkość uwalniania chlorowodoru terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® DBS oraz PEG lub glicerol. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.	103
Rycina 62. Zdjęcia filmów z AQOAT® AS-HF (AQH) i plastifikatorami po badaniu szybkości uwalniania.	104

Rycina 63. Szybkość uwalniania chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® oraz plastyfikatory. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.....	106
Rycina 64. Szybkość uwalniania chlorowodorku terbinafiny z filmów zawierających AQOAT® DBS oraz PEG lub glicerol. Słupki błędów oznaczają $\pm$ SD.....	108
Rycina 65. Obrazy mikroskopowe powierzchni płytki paznokciowej i membrany otrzymanej z kopyt wołowych sporządzone przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego.....	110
Rycina 66. Profil przenikania substancji leczniczej z lakierów do paznokci przez membrany o grubości ok. 150 μ m.....	112
Rycina 67. Profil przenikania substancji leczniczej z lakierów do paznokci przez membrany o grubości ok. 250 μ m.....	112
Rycina 68. Zdjęcia membran po 7 dniach.....	114
Rycina 69. Zdjęcia membran po 14 dniach.....	115
Rycina 70. Analiza obrazu hodowli po 7 dniach.....	116
Rycina 71. Analiza obrazu hodowli po 14 dniach.....	117
Rycina 72. Obrazy mikroskopowe powierzchni płytki paznokciowej.....	118
Rycina 73. Zdjęcia płytek paznokciowych (7 dni aplikacji 7 dni inkubacji).....	119
Rycina 74. Zdjęcia płytek paznokciowych (7 dni aplikacji 14 dni inkubacji).....	120
Rycina 75. Zdjęcia płytek paznokciowych (14 dni aplikacji 7 dni inkubacji).....	121
Rycina 76. Zdjęcia płytek paznokciowych (14 dni aplikacji 14 dni inkubacji).....	122